UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vliv vybraných UVA a UVB protektivních látek na stárnutí kůže

Vypracovala:	Bc. Anna Mouková
Studijní obor:	Biofyzika
Vedoucí diplomové práce:	Prof. RNDr. Hana Kolářová, CSc.

Olomouc 2021

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Bc. Anna Mouková
Název práce:	Vliv vybraných UVA a UVB protektivních látek na stárnutí kůže
Typ práce:	Diplomová práce
Pracoviště:	Katedra biofyziky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Vedoucí práce:	Prof. RNDr. Hana Kolářová, CSc., Ústav lékařské biofyziky, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Rok obhajoby práce:	2021

Abstrakt: Ultrafialové (UV) záření dopadající na lidskou kůži má řadu nežádoucích účinků. Akumulace těchto jevů vede k předčasnému stárnutí kůže (fotostárnutí). Soubor mechanismů, které poškození kůže UV zářením a fotostárnutí zabraňují, označujeme jako fotoprotekci. V této diplomové práci byl studován účinek UVA a UVB záření na lidské keratinocyty a změny účinku UVA a UVB záření na lidské keratinocyty po ošetření fotoprotektivními látkami. Zkoumané fotoprotektivní látky byly astragalin, 2,4-dihydroxybenzofenon, 2-hydroxy-4-methoxybenzofenon, β-karoten, hyperosid, 3-(4-methylbenzyliden)kafr, pachypodol, nanočástice TiO_2 a trans-urokanová kyselina. Byla hodnocena životaschopnost buněk, produkce ROS v buňkách, změny mitochondriálního membránového potenciálu, poškození lyzosomální integrity a poškození DNA. UVA a UVB záření snižují životaschopnost buněk. Již při nízkých dávkách významně zvyšují produkci ROS v buňkách.

Naopak při větších dávkách poškozují membránovou integritu lyzosomů a vyvolávají depolarizační změny mitochondriálního membránového potenciálu. Tyto změny jsou ve všech zmíněných případech rozsáhlejší pro ozáření UVB ve srovnání s ozářením UVA. UV protektivní účinek byl zjištěn u 3-(4-methylbenzyliden)kafru, trans-urokanové kyseliny a hyperosidu, přičemž nejlepší UVA i UVB protektivní účinek ze všech studovaných látek vykazuje hyperosid. Hyperosid vede v případě expozice UVA i UVB ke snížení produkce ROS, snižuje fragmentaci DNA a především zvyšuje životaschopnost buněk vystavených UV záření. Hyperosid nevede pouze k ochraně buněk před UV zářením, ale v kombinaci s UV zářením také stimuluje buněčnou proliferaci. Inkubace buněk s hyperosidem vede k významné depolarizaci mitochondriálního membránového potenciálu, aniž by vedla k významnému snížení buněčného růstu a dělení. Usuzujeme, že právě tato depolarizace je příčinou UV protektivních vlastností hyperosidu. Další slibnou UV protektivní látkou se ukázala být transurokanová kyselina, která v souladu se svým absorpčním spektrem poskytuje buňkám ochranu před UVB zářením.

Klíčová slova: UV záření, keratinocyty, fotostárnutí, fotoprotekce

Počet stran: 94

Počet příloh: 0

Jazyk: čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Bc. Anna Mouková
Title of thesis:	Effect of selected UVA and UVB protective compounds on photoaging
Type of thesis:	Master thesis
Department:	Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Supervisor:	Prof. RNDr. Hana Kolářová, CSc., Department of Medical Biophysics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc
The year of defence:	2021
Abstract:	Exposure of skin to ultraviolet (UV) radiation cause different undesirable effects. Acumulation of these effects leads to premature skin aging (photoaging). The set of mechanisms that defend the skin from UV damage and photoaging is called photoprotection. In this tesis the effect of UVA and UVB radiation on human keratinocytes and changes of UVA and UVB effect on human keratinocytes cured with photoprotective compounds were studied. The photoprotective compounds astragalin, 2,4-dihydroxybenzophenon, 2-hydroxy-4-methoxybenzophenon, β-caroten, hyperoside, 3-(4-methylbenzylidene)camphor, pachypodol, TiO_2 nanoparticles and transurocanic acid were analyzed. Evaluated aspects were the cell viability, endogenous ROS production, changes of mitochondrial membrane potential, lysosomal integrity distortion and DNA damage. UVA and UVB radiation decrease the cell viability. Already low doses

significantly increase the endogenous ROS production. Higher doses distort lysosomal integrity and cause depolarization of mitochondrial membrane potential. These changes are in all the cases mentioned greater for the UVB exposure compared with UVA exposure. UV protective effect was found in 3-(4-methylbenzylidene)camphor, trans-urocanic acid and hyperoside whereas the best both UVA and UVB protective effect above all studied compounds is exhibited by hyperoside. Hyperoside causes in case of UVA or UVB exposure to ROS production decrease, decreases the DNA fragmentation and in particular increases the cell viability of UV exposed cells. Hyperoside not only causes the UV protection but in combination with UV radiation also stimulates the cell proliferation. Cell incubation with hyperoside leads to significant depolarization of mitochondrial membrane potential without causing any significant decrease in cell growth or division. We conclude that this depolarization is the cause of hyperoside's UV protective effect. Another promising UV protective compound is trans-urocanic acid that in accordance with its absorption spectrum provides to cell the protection against UVB radiation.

Key words: UV radiation, keratinocytes, photoaging, photoprotection

Number of pages: 94

Number of attachements: 0

Language: czech

Poděkování

Děkuji vedoucí své diplomové práce Prof. RNDr. Haně Kolářové, CSc. za pomoc při volbě mého směřování v oblasti biofyziky a vedení diplomové práce. Také děkuji MUDr. Mgr. Robertu Bajgarovi, Ph.D. za užitečné rady a konzultace při experimentálním měření i při sepisování práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Prof. RNDr. Hany Kolářové, CSc. a použila jsem pouze literaturu uvedenou v přiloženém seznamu.

V Olomouci dne 28. dubna 2021

.....

Bc. Anna Mouková

Obsah

1 Úvod **1**

2 Přehled problematiky **3**

2.1 Kůže . . . 3

2.1.1 Fyziologie kůže . . . 3

2.1.2 Anatomie kůže . . . 4

2.1.2.1 Pokožka . . . 4

2.1.2.2 Škára . . . 5

2.2 Ultrafialové (UV) záření . . . 6

2.2.1 Elektromagnetické záření . . . 6

2.2.2 Účinky UV záření na lidský organismus . . . 7

2.2.2.1 Akutní změny kůže . . . 8

2.2.2.2 Chronické změny kůže . . . 10

2.2.2.3 Terapeutické a diagnostické účinky UV záření . . . 10

2.2.3 Molekulární mechanismus působení UV záření . . . 11

2.2.3.1 Mechanismy působení UV fotonů . . . 11

2.2.3.2 UVA senzitizéry a UVB chromofory . . . 13

2.2.3.3 Biologické poškození molekul . . . 14

2.2.3.4 Poškození mitochondrií . . . 18

2.2.3.5 Antioxidační a reparační mechanismy . . . 19

2.3 Stárnutí kůže . . . 20

2.3.1 Chronologické stárnutí kůže . . . 20

2.3.2 Fotostárnutí kůže . . . 21

2.3.2.1 Klinické a histologické změny . . . 22

2.3.2.2 Molekulární mechanismus . . . 23

2.3.3 Fotoprotektivní látky 24
2.3.3.1 Primární fotoprotekce 25
2.3.3.2 Sekundární fotoprotekce 28

3 Cíl práce **31**

4 Materiál a metody **32**
4.1 Biologický materiál 32
4.2 Zdroje UV záření 32
4.3 Kultivace a pasážování buněk 32
4.4 Měření absorpčních spekter 33
4.5 Inkubace UV protektivních látek 33
4.6 Stanovení životaschopnosti buněk 34
4.7 Stanovení produkce ROS 34
4.8 Stanovení poškození mitochondrií 35
4.9 Stanovení poškození lyzosomů 36
4.9.1 Značka Akridinová oranž 36
4.9.2 Značka LysoTracker Blue 36
4.10 Stanovení poškození DNA 37
4.11 Statistické zpracování dat 38

5 Výsledky **40**
5.1 Charakteristiky zdrojů UV záření 40
5.1.1 Spektrum zdrojů 40
5.1.2 Homogenita vyzařování zdrojů 41
5.2 Studium poškození buněk UV zářením 43
5.2.1 Stanovení životaschopnosti buněk 43
5.2.2 Stanovení produkce ROS 45
5.2.3 Stanovení poškození mitochondrií 47
5.2.4 Stanovení poškození lyzosomů 48
5.3 Studium účinku UV protektivních látek 49
5.3.1 Absorpční spektra studovaných látek 49
5.3.2 Stanovení životaschopnosti buněk 51
5.3.2.1 Stanovení životaschopnosti po expozici UVA záření . 51

5.3.2.2 Stanovení životaschopnosti po expozici UVB záření . 54
5.3.3 Stanovení produkce ROS 54
5.3.3.1 Stanovení produkce ROS po expozici UVA záření . . 54
5.3.3.2 Stanovení produkce ROS po expozici UVB záření . . 56
5.3.4 Toxicita UV protektivních látek 58
5.3.5 Stanovení životaschopnosti buněk 60
5.3.5.1 Stanovení životaschopnosti po expozici UVA záření . 60
5.3.5.2 Stanovení životaschopnosti po expozici UVB záření . 60
5.3.6 Stanovení produkce ROS 63
5.3.6.1 Stanovení produkce ROS po expozici UVA záření . . 63
5.3.6.2 Stanovení produkce ROS po expozici UVB záření . . 65
5.3.7 Stanovení poškození mitochondrií 67
5.3.7.1 Stanovení vlivu zkoumaných látek na poškození mitochondrií 67
5.3.7.2 Stanovení poškození mitochondrií po expozici UVA záření 67
5.3.7.3 Stanovení poškození mitochondrií po expozici UVB záření 70
5.3.8 Stanovení poškození lyzosomů 72
5.3.8.1 Stanovení vlivu zkoumaných látek na poškození lyzosomů 72
5.3.8.2 Stanovení poškození lyzosomů po expozici UVA záření 72
5.3.8.3 Vybělení značky LysoTracker Blue po expozici UVA záření 72
5.3.8.4 Stanovení poškození lyzosomů po expozici UVB záření 75
5.3.9 Stanovení poškození DNA 77

6 Diskuze **80**

7 Závěr **88**

Seznam zkratek

6-4 PP	6-4 fotoprodukty
8oG	8-oxo-guanin
AP-1	protein aktivátor 1
CM-H_2DCFDA	chlormetylový derivát 2′, 7′-dichlorodihydrofluorescein diacetátu
CO_2	oxid uhličitý
CPD	cyklobutan pyrimidinové dimery
Cys	cystein
DCF	2′, 7′-dichlorofluorescein
DMEM	Dulbecco′s Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
FBS	fetální hovězí sérum (fetal bovine serum)
H_2DCF	2′, 7′-dichlorodihydrofluorescein
H_2O_2	peroxid vodíku
HaCaT buňky	buněčná linie lidských keratinocytů
His	histidin
IL	interleukin(y)
IPD	okamžitá pigmentace (immediate pigment darkening)
JC-1	5,5′,6,6′-tetrachloro-1,1′,3,3′-tetraethyl-benzimidazolylcarbocyanin iodid
KCl	chlorid draselný
KH_2PO_4	dihydrogenfosforečnan draselný
MED	minimální erytemální dávka
Met	methionin
MMP	matrixová metaloproteináza
mtDNA	mitochondriální DNA

MTT	(3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid)
Na_2HPO_4	hydrogenfosforečnan disodný
$NaCHO_3$	hydrogenuhličitan sodný
NAD(P)H	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid(fosfát)
NaOH	hydroxid sodný
NER	nukleotidová excisní oprava
NFκB	jaderný faktor κB
OGG1	oxoguanin glykosyláza 1
PABA	kyselina 4-aminobenzoová
PBS	fostátový pufr
PPD	trvalá pigmentace (persistent pigment darkening)
RNA	ribonukleotidová kyselina
RNS	reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
SPF	sun protective factor
T4E5	T4 endonukleáza V
TGF-β	transkripční růstový faktor β
TiO_2	oxid titaničitý
TNF-α	tumor-nekrotizující faktor α
Trp	tryptofan
Tyr	tyrozin
UCA	urokanová kyselina
UV	ultrafialové
VIS	viditelné záření (visible light)
ZnO	oxid zinečnatý

1 Úvod

UV záření je složka elektromagnetického spektra v oblasti vlnových délek 100–400 nm a je tvořeno 3 podložkami UVA, UVB a UVC. UV záření je součástí slunečního záření a skrze atmosféru na Zem dopadají jako součást terestriálního záření UVA a UVB záření. Tyto složky záření mají žádoucí i nežádoucí účinky na lidský organismus, zejména pak ovlivňují kůži, která tvoří fyzickou bariéru mezi lidským tělem a vnějším prostředím. Mezi žádoucí účinky UV záření dopadajícího na lidskou kůži patří podpora syntézy vitaminu D či jeho využití při léčbě některých onemocnění. Nežádoucích účinků UV záření pak dělíme na akutní a chronické. Významným chronickým účinkem UV záření je proces označovaný jako fotostárnutí – ten představuje předčasné stárnutí lidské kůže v důsledku akumulace poškození kůže. K poškození dochází dvěma mechanismy – přímým mechanismem absorpce, kdy jsou fotony UV záření absorbovány molekulou, v důsledku čehož dochází ke změně její struktury; a nepřímým mechanismem, kdy absorpce fotonu UV vede k produkci ROS. Následně dochází k poškození biologických molekul jako jsou DNA, proteiny a lipidy, tj. i k poškození organel, zejména pak mitochondrií.

Lidský organismus si vyvinul řadu obranných mechanismů, pomocí nichž se těmto nežádoucím jevům brání. Velký význam mají melanin, který zabraňuje průchodu UV fotonů hlouběji do kůže, a antioxidační mechanismy a mechanismy opravy DNA, které jsou schopny vznikající poškození včak zvrátit. Tyto přirozené mechanismy však nejsou schopny zcela potlačit negativní dopady UV na kůži, a tak byla historicky identifikována řada fotoprotektivních látek, které jsou orálně či povrchově aplikovány ve snaze zvýšit přirozený ochranný účinek.

Tato práce se v první části soustředí na podrobnější popis molekulárních mechanismů působení UV záření na lidskou kůži, pojem fotostárnutí a možnosti fotoprotekce. V experimentální části pak jsou ověřeny některé účinky UVA a UVB záření

na lidské keratinocyty v závislosti na dávce ozáření. V následující části je sledován vliv aplikace vybraných fotoprotektivních látek na účinky UVA a UVB záření na lidské keratinocyty.

2 Přehled problematiky

2.1 Kůže

Kůže, latinsky *cutis*, řecky *derma*, je plošný orgán, který pokrývá celý povrch lidského těla a tvoří fyzickou bariéru mezi lidským tělem a vnějším prostředím (Čihák 2016). Jde tedy o místo primární interakce organismu s vnějším prostředím. Kůže je se svou plochou 1,2–2,2 m^2 a hmotností odpovídající průměrně 7 % hmotnosti lidského těla největším a zároveň nejhmotnějším orgánem lidského těla (Marieb a Hoehn 2016).

2.1.1 Fyziologie kůže

Kůže na povrchu lidského těla má řadu různých funkcí. V první řadě slouží jako fyzická bariéra. Tato bariéra ochraňuje organismus před vlivy vnějšího prostředí, a to fyzikálními, chemickými i biologickými – omezuje pronikání UV záření, mikroorganismů či toxinů hlouběji do organismu (Čihák 2016; Marieb a Hoehn 2016; Montagna 1974). Zároveň však zprostředkovává látkovou výměnu s okolím(Čihák 2016).

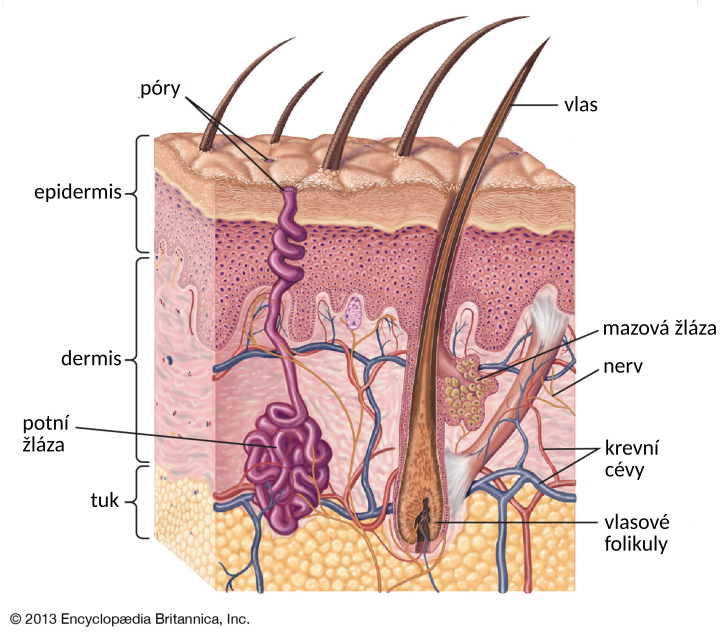
Další funkcí kůže je udržení homeostázy. Kůže je zodpovědná za udržení teploty tělesného jádra a regulaci tělesné teploty, kdy předává teplo generované procesy uvnitř organismu chladnějšímu okolnímu prostředí na základě principu tepelné výměny (Marieb a Hoehn 2016). Součástí tohoto termoregulačního systému jsou i potní žlázy a tok krve kůží (Čihák 2016). Potní žlázy jsou zodpovědné za bilanci vody v organismu, kdy sekrecí teplé vody ven z organismu zabraňují přehřátí organismu. Tento druhý mechanismus je organismem přirozeně využíván bez ohledu na vnější teplotu, nicméně s rostoucí teplotou okolí jeho význam roste (Marieb a Hoehn 2016). Cévy přítomné v kůži jsou schopny se sevřít a dočasně zabránit toku krve do této

oblasti. Tím umožní pokles teploty kůže a snížení tepelných ztrát způsobených tepelnou výměnou s okolím (Marieb a Hoehn 2016).

Kůže má též metabolickou funkci. Dochází zde k syntéze látek jako jsou vitamin D či melanin z prekurzorů a skladují se zde látky rozpustné v tucích, například vitaminy A, D, E a K (Čihák 2016; Marieb a Hoehn 2016). Kůže také obsahuje velké množství receptorů sloužících pro přenos smyslové informace z vnějšího prostředí a je podstatnou součástí imunitního systému (Čihák 2016).

2.1.2 Anatomie kůže

Anatomie kůže je názorně vyobrazena na Obr. 2.1. Z hlediska stavby má kůže 2 hlavní vrstvy, a to pokožku (*epidermis*) a škáru (*dermis*) (Čihák 2016; Marieb a Hoehn 2016). Pod těmito dvěma vrstvami se nachází podkožní vazivo (*hypodermis*), které již není součástí kůže a slouží k uskladnění tuku a uchycení kůže na vnitřní struktury těla (Marieb a Hoehn 2016).



Obr. 2.1: Struktura kůže. Převzato z (Ebling a Montagna 2021), přeloženo.

2.1.2.1 Pokožka

Vnější vrstvou kůže je pokožka (Čihák 2016), která funguje jako štít těla (Marieb a Hoehn 2016). Pokožka je hladká tkáň, která je narušena pouze vlasovými folikuly a póry potních žláz (Jablonski 2004). Pokožka je tenčí než škára (Jablonski 2004) a na

rozdíl od škáry neobsahuje žádné krevní cévy (Čihák 2016; Marieb a Hoehn 2016). Dodávání živin je zajištěno difúzí z dermis (Čihák 2016; Marieb a Hoehn 2016).

Pokožka je tvořena 4 různými typy buněk – keratinocyty, melanocyty, Langerhansovými buňkami a Merkelovými buňkami (Marieb a Hoehn 2016; McGrath a Uitto 2016).

Keratinocyty představují většinu buněk epidermis (Čihák 2016; Marieb a Hoehn 2016). Keratinocyty se v pokožce téměř neustále množí a umožňují tak obměnu pokožky každých 25–45 dní (Marieb a Hoehn 2016). Jejich funkční význam spočívá zejména v tvorbě prekurzorů pro tvorbu vláknitého proteinu keratinu (Čihák 2016). Keratinizovaná vrstva pokožky je zodpovědná za její elasticitu a odolnost vůči fyzikálním a chemickým faktorům (Marieb a Hoehn 2016; Jablonski 2004).

Melanocyty se vyskytují v nejhlubších vrstvách pokožky a jejich funkcí je syntéza pigmentu melaninu, který kumulují v granulích označovaných jako melanozomy (Marieb a Hoehn 2016). Melanozomy jsou obsaženy ve výběžcích melanocytů (dendritech) a akumulací v nich se melanin dostává do okolí keratinocytů (Jablonski 2004), kde zapříčiňují zbarvení kůže (McGrath a Uitto 2016). Melanozomy se následně akumulují kolem keratinocytů na té straně, která je vystavena slunečnímu záření a působí jako štít, který brání jádro keratinocytů před vlivem UV záření (Marieb a Hoehn 2016).

Langerhansovy buňky jsou specializované buňky imunitního systému, které hrají klíčovou roli v imunitní odpovědi kůže (McGrath a Uitto 2016; Jablonski 2004).

Merkelovy buňky fungují jako hmatové senzory (McGrath a Uitto 2016).

2.1.2.2 Škára

Škára je silná, flexibilní spojovací tkáň (Jablonski 2004). Tvoří ji převážně fibroblasty, makrofágy a v menším množství i žírné buňky a bílé krvinky (Marieb a Hoehn 2016). Škára je bohatá na nervová vlákna, krevní cévy a lymfatické cévy (Marieb a Hoehn 2016) a obsahuje též potní žlázy zodpovědné za termoregulaci (Jablonski 2004).

Škáru tvoří podpůrná polotekutá matrix, v níž jsou polysacharidy a proteiny zapleteny do sítě, která poskytuje kůži pružnost a má kapacitu pro zadržení vody (McGrath a Uitto 2016). Voda tak představuje asi 60 % škáry. Proteinovou složku

škáry tvoří kolagen a elastická tkáň, přičemž kolagen představuje 80–85 procent suché hmoty proteinové matrix a zajišťuje pružnost kůže a její pevnost v tahu (McGrath a Uitto 2016).

2.2 Ultrafialové (UV) záření

2.2.1 Elektromagnetické záření

Elektromagnetické pole je jedním ze základních fyzikálních projevů hmoty. Elektromagnetické pole má vlastnost přenášet vlny, které označujeme jako elektromagnetické vlny, a které charakterizuje jejich vlnová délka λ, resp. energie E či frekvence f. Tyto veličiny jsou spolu vzájemně propojeny vztahy

$$\lambda = \frac{v}{f}, \quad E = h \cdot f, \tag{2.1}$$

kde v je rychlost šíření elektromagnetické vlny a $h = 6,626 \cdot 10^{-34}$ J $\cdot$ s je Planckova konstanta.

Na základě rozsahu vlnových délek dělíme elektromagnetické vlny zpravidla do 7 oblastí elektromagnetického záření. Nejkratší vlny, jejichž vlnová délka odpovídá řádově 10–100 pm, jsou vlny gama záření. Se zvyšující se vlnovou délkou pak rozlišujeme rentgenové záření, ultrafialové záření, viditelné záření, infračervené záření, mikrovlnné záření a radiové záření s vlnovou délkou až několik kilometrů.

Sluneční záření je elektromagnetické záření emitované z povrchu Slunce a je jednou z nezbytných podmínek pro existenci života na Zemi. Spektrum tohoto elektromagnetické záření zahrnuje vlnové délky od infračervené oblasti až po gama záření (Rajnochová Svobodová 2012). Spektrální charakteristiky a intenzita složek terestriálního záření, tj. slunečního záření dopadajícího na zemský povrch, se mění v průběhu dne, roku, či se zeměpisnou polohou (Hart a kol. 2018). Přibližně je terestriální záření tvořeno z 50 % infračerveným zářením (760–1000 nm), z 40 % viditelným zářením (390–760 nm) a z 10 % UV zářením (295–400 nm) (Rajnochová Svobodová 2012). Ostatní složky slunečního záření (tj. ty s kratší vlnovou délkou) jsou absorbovány ozónovou vrstvou zemské atmosféry (Beneš a kol. 2015; Ettler a Ettler 2016).

Ultrafialové (UV) záření je formálně definováno jako elektromagnetické záření v oblasti vlnových délek 100–400 nm, přičemž je dále děleno na 3 podoblasti – UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) a UVC (100–280 nm) (*Ultraviolet radiation* 2021). UVA také bývá označováno jako blízké pásmo, UVB jako střední pásmo a UVC jako germicidní pásmo UV záření (Beneš a kol. 2015). UVA záření je dále děleno na UVA1 (315–340 nm) a UVA2 (340–400 nm) (Moyal a Fourtanier 2004). Na zemský povrch však jako součást terestriálního záření dopadá UV záření pouze v oblasti vlnových délek 295–400 nm. Zbylá část UV záření o vlnových délkách 100–295 nm (tj. veškeré UVC a významná část UVB záření) je absorbována zemskou atmosférou. V UV záření dopadající na zemský povrch tak je zastoupeno přibližně 95 % UVA a 5 % UVB složky (Beneš a kol. 2015; Rajnochová Svobodová 2012; Ettler a Ettler 2016).

Pro elektromagnetické vlny obecně platí, že hloubka pronikání roste s rostoucí vlnovou délkou, a tedy delší vlny pronikají hlouběji (Beneš a kol. 2015). To plyne ze vztahu pro hloubku pronikání elektromagnetického záření δ_p

$$\frac{1}{\delta_p} = \frac{4\pi}{\lambda}\mathrm{Im}\left(\tilde{n}\left(\omega\right)\right), \tag{2.2}$$

kde $\tilde{n}$ je komplexní index lomu a ω úhlová frekvence záření. Z toho plyne, že zatímco UVB záření je ze 70 % absorbováno na povrchu kůže, přibližně 20 % proniká do pokožky a pouhých 10 % dosáhne svrchní části škáry, UVA je z části absorbováno ve škáře a 20 – 30 % záření proniká do hluboké škáry (Moyal a Fourtanier 2004).

Zejména v souvislosti s biologickým působením UV záření je třeba definovat veličinu, která kvantitativně popíše množství absorbovaného záření. Dávka záření D je dána vztahem

$$D\left[\mathrm{J}\cdot\mathrm{cm}^{-2}\right] = E\left[\mathrm{W}\cdot\mathrm{cm}^{-2}\right]\cdot t_e\left[\mathrm{s}\right], \tag{2.3}$$

kde E je ozáření, které je definováno jako výkon záření dopadajícího na jednotku plochy, a t_e doba expozice (Grimes 2015).

2.2.2 Účinky UV záření na lidský organismus

Jednorázové i opakované vystavení lidského organismu slunečnímu záření vyvolává krátkodobé i dlouhodobé účinky na kůži (Moyal a Fourtanier 2004). Za většinu kožních změn, ke kterým dochází v důsledku expozice slunečního záření, je zodpo-

vědné právě UV záření (Moyal a Fourtanier 2004). Vysoké dávky UV záření dopadajícího na kůži mohou vyvolat akutní degenerativní změny na kůži jako je opálení či spálení kůže, v extrémním případě vedou až k chronickým změnám jako je předčasné stárnutí kůže či vznik (zhoubných) nádorů kůže (Beneš a kol. 2015; Moyal a Fourtanier 2004).

2.2.2.1 Akutní změny kůže

Mezi akutní změny kůže řadíme erytém a pigmentaci kůže a imunologické změny neboli fotosenzitivitu (Taylor a Sober 1996).

Spálení kůže je stav, kdy dochází k poškození epidermis i dermis. Je zpravidla reprezentován vznikem erytému a edému spolu se zvýšenou citlivostí pokožky. Krom těchto dochází i k méně zjevným změnám jako je narušení termoregulace či molekulární změny (například poškození biomembrán či chyby v syntéze DNA, RNA a proteinů). Je-li spálená většina povrchu těla, dochází k systémovým reakcím jako je horečka, nachlazení, nevolnost či vyčerpání. (Taylor a Sober 1996)

Intenzita i doba nástupu erytému závisí na vlnové délce záření. Intenzita vzniklého erytému roste se zkracující se vlnovou délkou a rostoucí dávkou. Vznik erytému se liší podle typu UV záření dobou nástupu i molekulárním mechanismem. Erytém v důsledku ozáření UVB vzniká zpravidla se zpožděním a svého vrcholu dosahuje zpravidla po 6–24 hodinách po ozáření, konkrétní doba závisí na dávce a při silném ozáření může erytém vznikat okamžitě (Ettler a Ettler 2016). UVA erytém představuje asi 15 % erytému vzniklého v důsledku slunečního záření a nastupuje okamžitě po skončení ozařování. UVA erytém je závislý na přítomnosti kyslíku, UVB erytém je na kyslíku nezávislý, tj. mechanismy jejich vzniku jsou odlišné (podrobněji v sekci 2.2.3). (Moyal a Fourtanier 2004)

UV záření stimuluje pigmentaci kůže (Ettler a Ettler 2016). Pigmentace kůže následující po vystavení slunečnímu záření je okamžitou reakcí se zpožděnou formací nového melaninu. K přímé pigmentaci dochází pouze po expozici UVA záření a závisí na jeho dávce – při dávce menší než 6 $\mathrm{J \cdot cm^{-2}}$ dochází k okamžité pigmentaci (IPD, immediate pigment darkening), při dávce přesahující 10 $\mathrm{J \cdot cm^{-2}}$ dochází k trvalé pigmentaci (PPD, persistent pigment darkening), kterou je možné pozorovat po odeznění IPD a trvá několik hodin až dní, a při dávce přesahující 15 $\mathrm{J \cdot cm^{-2}}$ pro

světlé kožní typy a 60 $J \cdot cm^{-2}$ pro tmavé kožní typy dochází k tvorbě erytému. Oproti tomu v důsledku expozice UVB nedochází k pigmentaci, jedinou barevnou reakcí na expozici UVB je erytém. Obě složky jsou však zodpovědné za opožděné opálení, kdy po ozáření dochází k excitaci melanocytů a k tvorbě melaninu, jehož nárůst můžeme pozorovat 72 hodin po ozáření. Melanizace v důsledku kumulativní expozice UVA trvá déle než ta dosažená expozicí UVB, což zřejmě souvisí s bazální lokalizací pigmentu aktivovaného UVA, kdežto melanizace v důsledku UVB zmizí během měsíce v důsledku obnovy epidermis. (Moyal a Fourtanier 2004)

Expozice UV může způsobit lokální i systémové potlačení imunity, tento jev bývá označován jako imunosuprese (Moyal a Fourtanier 2004). V důsledku působení UV záření dochází k poklesu počtu Langerhansových buněk a růstu počtu T-supresorových lymfocytů. UV záření navíc přímo ovlivňuje lymfocyty – dochází k funkčním změnám a změnám v jejich distribuci. Ozáření UV kůže může modifikovat proteiny v buněčném jádře či membránách. Tyto modifikované proteiny (fotoantigeny) jsou pak vnímány jako cizorodé proteiny, a tak vyvolávají obrannou reakci imunitního systému. UV expozice keratinocytů a dalších kožních buněk způsobuje sekreci interleukinů, které jsou schopny lokálně i systémově ovlivnit imunitní systém. Tento jev hraje důležitou roli v rozvoji rakoviny kůže, zvyšuje výskyt a závažnost infekcí a virových onemocnění a snižuje účinnost vakcín (Moyal a Fourtanier 2004). (Taylor a Sober 1996)

Zvýšená citlivost kůže na světlo (fotosenzitivita) je abnormální reakcí kůže na vystavení UV záření. Fotosenzitivita může být metabolická, léky indukovaná, idiopatická či vyvolána fotodrážděním. Fotosenzitivita indukovaná léky či jinými chemikáliemi je způsobena absorpcí konkrétních vlnových délek UV záření danou látkou. Příkladem metabolické reakce jsou porfyrie, které jsou způsobeny endogenní fotosenzitizací jednou nebo více porfyrinových složek v kůži. Hypersenzitivita vůči slunečním paprskům se též často vyskytuje u pacientů s vzácným onemocněním *Xeroderma pigmentosum*, kteří mají porušenou schopnost opravy DNA. (Taylor a Sober 1996):

V důsledku UV expozice dochází také ke ztluštění epidermis, což vede k vyšší odolnosti vůči dalšímu ozáření (Ettler a Ettler 2016). To je výsledkem zvýšené mitotické aktivity keratinocytů (Ettler a Ettler 2016).

2.2.2.2 Chronické změny kůže

Mezi chronické změny kůže vzniklé v důsledku expozice UV záření patří fotodermatózy, stárnutí kůže a fotokancerogeneze.

Fotodermatózy jsou skupina kožních chorob, na jejichž vzniku se podílí UV či viditelné světlo (Záruba a kol. 1994). Fotodermatózy pak můžeme rozdělit na fototoxické, kdy se citlivost na UV záření mění kvantitativně s množstvím dopadajícího záření, a fotoalergické, kdy ke změnám dochází kvalitativně v důsledku změny imunitních procesů (Buček 2003).

Stárnutí je přirozený proces, který však může být ovlivněn vnějšími faktory. Předčasné stárnutí kůže v důsledku opakovaného působení UV záření, fotostárnutí, narozdíl od běžného stárnutí nezávisí pouze na toku času, nýbrž zejména na míře vystavení UV záření v kombinaci s kožním typem jedince (Chung a kol. 2004). Fotostárnutí se od přirozeného stárnutí neliší pouze původem vzniku, odlišné jsou i projevy. Fotostárnutí se projevuje tvorbou vrásek, vznikem nadměrně či málo pigmentovaných oblastí kůže, změnami v pružnosti kůže či hypertrofií pokožky, která je reprezentována ztluštěním pokožky (Moyal a Fourtanier 2004).

V extrémním případě vede nadměrná expozice UV až ke vzniku nádorů. K indukci zhoubných nádorů dochází skrze poškození DNA, nonmelanomové kožní nádory vznikají v důsledku chronické expozice UV, maligní melanomy v důsledku opakovaného akutního aktinického poškození kůže (spálení se) (Ettler a Ettler 2016).

2.2.2.3 Terapeutické a diagnostické účinky UV záření

Dopadající UV záření v odpovídající míře je nezbytné pro správnou funkci lidského organismu, jeho nedostatek se projevuje formou onemocnění. Například UV záření o vlnové délce kratší než 300 nm je nezbytné pro tvorbu vitaminu D z prekurzorů v kůži. Dostatečné množství vitaminu D v těle je nezbytné pro správné fungování lidského organismu a jeho nedostatek vede k onemocnění známé pod názvem křivice (*rachitis*). (Beneš a kol. 2015)

UV záření se uplatňuje i při fyzikální léčbě některých kožních chorob (tzv. fototerapie). Přístroj označovaný jako Finsenova lampa využívá UV záření k léčbě kožní tuberkulózy (*lupus vulgaris*) a chronické formy lupénky (*psoriázy*) se léčí působením UV záření v rozsahu vlnových délek 315–400 nm. Terapeutická metoda PUVA

je chemoterapeutická metoda, která spočívá v kombinaci působení UVA záření a léků (především psoralenů) zvyšujících citlivost na světlo (Záruba a kol. 1994). Tyto terapeutické metody jsou založeny na dějích fotoimunomodulace a fotoimunosuprese (Ettler a Ettler 2016).

Součástí diagnostiky kůže jsou laboratorní vyšetření, přičemž některá z nich využívají UV záření. Při mykologických vyšetřeních kůže je využívána Woodova lampa, která emituje UVA. Na toto UVA pak některé částice či látky reagují fluorescencí. Podle vlnové délky, na které k fluorescenci dochází, je možné stanovit konkrétní dermatomykózy. Dalším možným využití UV záření v diagnostice je stanovení citlivosti kůže vůči UV paprskům, které se provádí při vyšetření fotodermatóz. (Záruba a kol. 1994)

2.2.3 Molekulární mechanismus působení UV záření

2.2.3.1 Mechanismy působení UV fotonů

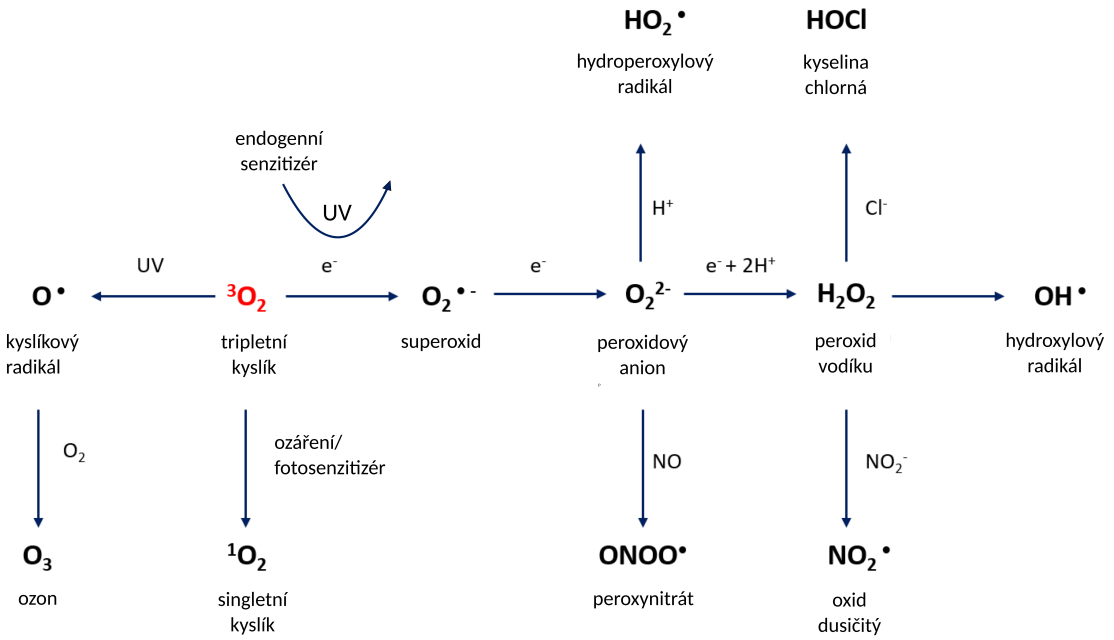
UV foton dopadající na povrch kůže může být absorbován, odražen či rozptýlen. Absorpce je fotochemická reakce, při které dochází k absorpci jednoho fotonu molekulou a následné produkci excitovaného stavu, ve kterém je elektron absorbující molekuly vybuzen na vyšší energetickou hladinu. Tento přenos může být efektivní, pokud energie fotonu záření odpovídá energetickému rozdílu energetických hladin počátečního a koncového stavu. Fotony UV záření mají však dostatek energie na to, aby jejich absorpce vedla nejen k excitaci elektronů, ale i k ionizaci či rozbití molekulárních vazeb. Odraz nastává na povrchu kůže i v jejím vnitřním prostředí. Rozptyl nastává v důsledku rozdílných strukturních prvků jako jsou vlasové folikuly či mazové žlázy či buněčných komponent jako jsou mitochondrie či ribozomy. (Poljsak 2012)

K biologickému poškození UV fotony dochází dvěma různými mechanismy. Přímý mechanismus poškození spočívá v absorpci UV záření buněčným materiálem (DNA, proteiny), která vede ke změně jejich struktury a následné modulaci imunitních a biochemických drah (Hart a kol. 2018). Molekuly v kůži nebo jejich části, které jsou schopny absorbovat UV-VIS záření označujeme jako chromofory (Moyal a Fourtanier 2004). Nepřímý mechanismus poškození se odehrává za pomoci fotosenzitizač-

ního procesu. Senzitizér přítomný v kůži absorbuje dopadající UV foton, čímž dojde k jeho vybuzení do vyššího excitovaného stavu. Senzitizér tak přechází ze základního stavu do singletního excitovaného stavu, který má krátkou dobu života, a z něj zpravidla přechází do tripletového stavu s delší dobou života. K přechodu z excitovaného stavu zpět do základního stavu pak může dojít neškodně vnitřní konverzí, nebo může dojít k poškození okolního buněčného materiálu. Mezi UVB chromofory patří DNA, trans-urokanová kyselina, membránové fosfolipidy či tryptofan (Hart a kol. 2018). Kožní buňky obsahují fotosenzitivní molekuly jako jsou báze nukleových kyselin, NAD(P)H, hem, chinony, flaviny, porfyriny, karotenoidy, 7-dehydrocholesterol a UVA chromofory jako eumelanin či urokanová kyselina (Rajnochová Svobodová 2012). (Pattison a Davies 2006)

Nepřímé poškození se může odehrávat dvěma různými cestami, hovoříme o fotopoškození typu I a fotopoškození typu II. Fotopoškození typu I zahrnuje přímou reakci excitovaného senzitizéru, kdy je přenesen excitovaný elektron na cílovou molekulu, v důsledku čehož dochází k tvorbě radikálu. Tyto radikály následně mohou interagovat s kyslíkem za vzniku oxidovaných produktů. Fotopoškození typu II spočívá v přímém přenosu energie z tripletu na molekulární kyslík za vzniku singletního kyslíku. Obě tato poškození probíhají v buňce zároveň a jejich poměr je dán typem senzitizéru, koncentrací cílové molekuly a kyslíku. (Pattison a Davies 2006; Rajnochová Svobodová 2012)

UVA záření zpravidla nemá dostatečnou energii pro vyvolání přímého poškození molekul, a tak jeho působení spočívá v iniciaci masivní produkce reaktivních kyslíkových a dusíkových sloučenin (ROS, RNS) v důsledku interakce UVA fotonů s endogenními senzitizéry jako jsou riboflavin, koenzymy nikotinamidu a vzácné báze DNA (Rajnochová Svobodová 2012; Poljsak 2012). Přenosem elektronu na molekulu kyslíku vznikají reaktivní formy molekul kyslíku a dusíku (Obr. 2.2), jež jsou následně schopny poškodit molekuly DNA, proteiny a lipidy (Hart a kol. 2018). Jelikož jsou fotony UVA méně energetické v porovnání s fotony UVB, je pro vyvolání poškození třeba vyšší množství těchto fotonů. To však neznamená, že by poškození indukovaná UVA zářením měla býti méně častá, neboť procentuální zastoupení UVA oproti UVB v terestriálním záření je značně vyšší a zároveň jsou UVA fotony schopny pronikat hlouběji do kůže (Poljsak 2012). Minoritně mohou UVA fotony generovat



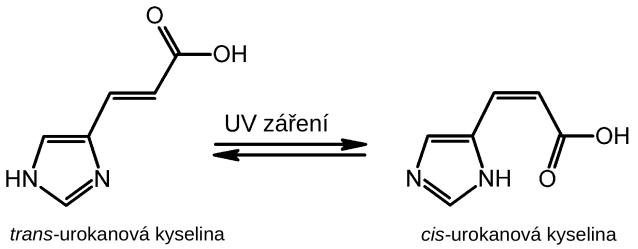
Obr. 2.2: Schéma znázorňující mechanismy produkce ROS a RNS v důsledku působení UV záření. Převzato z (Mitra a kol. 2019), upraveno.

poškození skrze přímou absorbci DNA či proteiny (Pattison a Davies 2006).

UVB oproti tomu vyvolává přímé poškození molekul, zpravidla pak aromatických heterocyklických bazí nukleových kyselin a aromatických aminokyselin s absorpčním maximem 260-280 nm (Rajnochová Svobodová 2012). Zároveň však, podobně jako UVA, vyvolává i nepřímé poškození v důsledku produkce reaktivních forem molekul (Poljsak 2012).

2.2.3.2 UVA senzitizéry a UVB chromofory

Urokanová kyselina (UCA) je UV chromofor běžně se vyskytující v lidské kůži. UCA se vyskytuje ve dvou izomerních formách jako *trans*- nebo *cis*-izomer, přičemž v kůži, která nebyla vystavena působení UV záření se vyskytuje *trans*-UVA. Oba izomery vykazují podobná absorpční spektra v UV oblasti s absorpčním maximem okolo 268 nm (Young 1997). Expozice UVB vede k fotoizomeraci *trans* → *cis* (Obr. 2.3), čímž přispívá k fotoprotekci (Wondrak a kol. 2006). Zároveň však vzniklá *cis*-UCA funguje jako mediátor fotoimunosuprese, která může vést až k fotokancerogenezi (Tulah a Birch-Machin 2013). *Trans*-UCA navíc podléhá fotosenzitizačním reakcím, což vede k přeměně na její *cis* formu a následně k produkci $^1O_2$, čímž přispívá k fotostárnutí (Wondrak a kol. 2006).



Obr. 2.3: Izomerace urokanové kyseliny. Převzato z (Wezynfeld a kol. 2014), přeloženo.

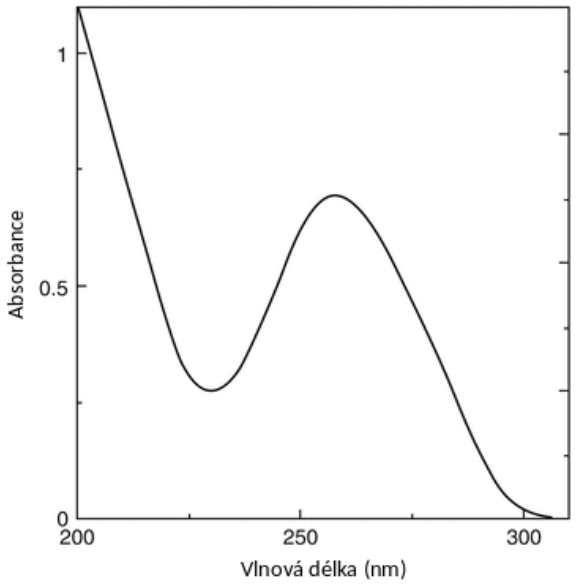
Řada porfyrinů jako například uroporfyriny, koproporfyriny či protoporfyrin IX jsou potenciálními UVA senzitizéry (Wondrak a kol. 2006). Zejména endogenní Protoporfyrin IX, prekurzor hemu, se významně podílí na produkci $^1O_2$ v důsledku UVA ozáření (Bäumler a kol. 2012).

Flaviny jsou též významnými UVA senzitizéry. Excitace riboflavinu, flavin mononukleotidu a flavin adenin dinukleotidu zářením v oblasti UVA vede k silné produkci $^1O_2$ (Baier a kol. 2006). Riboflavin však po absorpci UVA podléhá fotosenzitizačním reakcím typu I i II, a tak dochází k produkci nejen $^1O_2$ ale i superoxidu či H_2O_2. Vzniklý tripletní stav riboflavinu řídí fotodegradaci volných či na protein navázaných aminokyselin jako je tryptofan či tyrozin a zahajuje fotoinaktivaci některých buněčných enzymů (Wondrak a kol. 2006).

2.2.3.3 Biologické poškození molekul

Biologické molekuly jako DNA, lipidy a proteiny jsou konstantně vystaveny škodlivým vlivům z okolí. Takovými přírodními vlivy jsou působení UV záření, radiace či vliv chemikálií přítomných v jídle, ovzduší i vodním prostředí (Poljsak 2012). Tyto molekuly mohou být poškozeny přímým či nepřímým mechanismem. V případě nepřímého poškození ROS a RNS vzniklé v důsledku absorpce UV záření atakují tyto molekuly a způsobují oxidační poškození. V důsledku toho vznikají lipidové hydroperoxidy, karbonylované proteiny, jednoduché zlomy i modifikované báze DNA (Rajnochová Svobodová 2012).

Absorpční spektrum DNA (Obr. 2.4) obsahuje absorpční pás v intervalu vlnových délek 230–300 nm s maximem odpovídajícím hodnotě 260 nm, za které jsou zodpovědné purinové a pyrimidinové báze (Pattison a Davies 2006). Přímé poškození DNA tak může způsobit pouze UVB záření.



Obr. 2.4: Absorpční spektrum molekuly DNA v oblasti UV záření. Převzato z (Rodger 2013).

DNA je sice schopna převést většinu příchozích fotonů na neškodnou tepelnou energii, nicméně malé procento UVB fotonů je zcela absorbováno (Grimes 2015). Tato absorpce způsobuje vznik lézí na pyrimidinových bázích, které se spolu kovalentně párují a způsobují distorzi dvoušroubovice DNA (Moyal a Fourtanier 2004). Těmito lézemi jsou cyklobutan pyrimidinové dimery (CPD), 6-4 fotoprodukty (6-4 PP) a Dewarovy izomery (Moyal a Fourtanier 2004). Nejčastější a nejvíce cytotoxické jsou CPD, které vznikají v důsledku adice druhé pyrimidinové báze na dvojnou vazbu tripletového excitovaného stavu pyrimidinové báze a svou přítomností ve struktuře DNA blokují transkripci a replikaci (Moyal a Fourtanier 2004; Pattison a Davies 2006). Zatímco CPD jsou nejčastější a nejvíce cytotoxické, 6-4 PP vedou k závažnějším, mutagenním efektům (Sinha a Häder 2002). Dewarovy izomery jsou tvořeny izomerací 6-4 PP zářením o vlnové délce větší než 290 nm (Sinha a Häder 2002). Schopnost UV záření poškodit DNA souvisí s flexibilitou molekuly DNA – CPD se častěji tvoří na jednovláknových molekulách DNA a na flexibilních koncích molekul (Sinha a Häder 2002; Pattison a Davies 2006).

Vznik pyrimidinových dimerů není jediné možné poškození pyrimidinových bazí. Expozice monomerního cytosinu UV záření vede ke vzniku nestabilního hydratovaného produktu, který se následnou deaminací přeměňuje na analog uracilu (Pattison a Davies 2006).

Přímá absorpce UVB však může poškodit i purinové báze – vlivem UVC záření

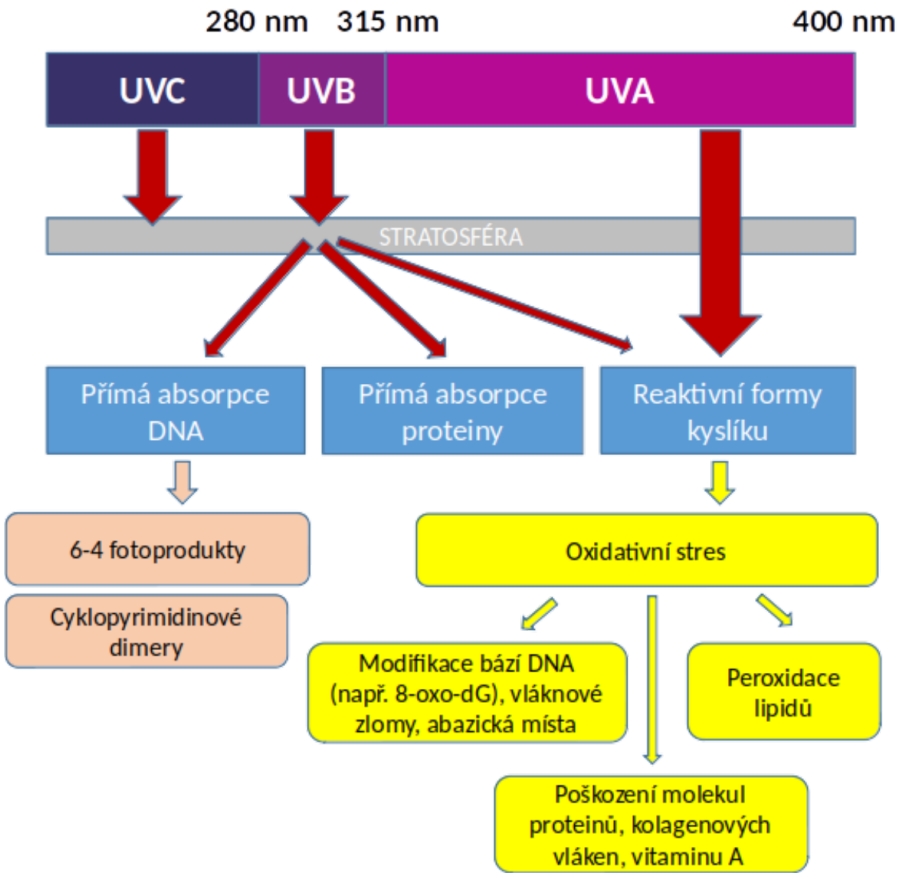
mohou vznikat dimery adeninových reziduí a vlivem UVB záření dimery adeninu a thyminu. Četnost těchto změn je však velmi nízká v porovnání s množstvím pyrimidinových dimerů (Pattison a Davies 2006) .

Poškození vzniklá v důsledku působení UVA jsou způsobena nepřímým mechanismem a negativní vliv UVA záření na DNA je v porovnání s UVB nižší (Moyal a Fourtanier 2004). Nepřímé poškození DNA nastává při kontaktu UV fotonu s chromoforem, který není schopný rychle snížit excitovanou molekulu na neškodné teplo, a tak má dlouhou dobu života, během které může reagovat s okolními molekulami (Grimes 2015). Produkce volných radikálů a ROS vede k tvorbě lézí v důsledku oxidace DNA (Pattison a Davies 2006). Oba typy nepřímého poškození DNA poškozují bazické skupiny DNA, přičemž nejnáchylnější je guanin, jehož ionizační potenciál je nejnižší, druhou nejcitlivější bází je adenin a reakce pro thymin a cytosin jsou přibližně stejně časté (Pattison a Davies 2006). Jedním z nejčastějších poškození DNA v důsledku působení UV záření (a obecně i ROS) tak je tvorba 8-oxo-guaninu (8oG) (Yarosh a Smiles 2009).

Pokud tato poškození nejsou opravena, dochází k mutacím, jež vedou k chybnému čtení genetického kódu a způsobují buněčnou smrt (Moyal a Fourtanier 2004; Grimes 2015).

Díky své četnosti, přítomnosti endogenních chromoforů v rámci své struktury, schopnosti vázat exogenní chromoforní látky a rychlým reakcím s ostatními excitovanými molekulami jsou proteiny hlavním cílem fotooxidací v buňce. Fotooxidace aminokyselin, peptidů a proteinů nastává přímým i oběma nepřímými mechanismy. Přímá oxidace UV zářením je významná, pouze pokud je záření absorbováno proteinem. To pro proteiny bez navázaných kofaktorů nastává pouze pro záření s vlnovými délkami kratšími než 320 nm. K fotooxidaci proteinů dochází v důsledku přímé absorpce UV záření postranními řetězci nebo navázanými senzitizéry. (Pattison a Davies 2006; Davies a Truscott 2001)

Hlavní chromoforní aminokyseliny přítomné ve struktuře proteinů jsou tryptofan, tyrozin, fenylalanin, histidin, cystein a cystin, ostatní aminokyseliny při vlnových délkách nad 230 nm nijak výrazně neabsorbují. Nejsilnějším chromoforem mezi aminokyselinami je tryptofan, nicméně pro jeho nízké zastoupení v lidských proteinech není významnějším cílem UV poškození než ostatní aminokyseliny. Přímá absorpce



Obr. 2.5: Schematické znázornění molekulárních mechanismů, skrze které UV záření poškozuje biologické molekuly. Převzato z (Nguyen 2014), upraveno.

UV záření kostrou proteinu je zanedbatelná, pouze peptidové vazby disponují slabým absorpčním pásem v oblasti 210-220 nm, a tak jsou za přímou absorpci UV záření v proteinech zodpovědné právě postranní aminokyselinové řetězce. (Pattison a Davies 2006; Davies a Truscott 2001)

K poškození proteinů dochází i nepřímým mechanismem. Produkované ROS vytvářejí kovalentní vazby mezi proteiny, například oxidací sulfhydrylových skupin vznikají disulfidové vazby, jež vedou k inaktivaci enzymů, funkčnímu poškození buněk a následnému uvolnění proteáz, kolagenáz a elastáz (Poljsak 2012). Většina poškození proteinů v důsledku působení UV je způsobena reakcemi se singletním kyslíkem reagujícím přednostně s postranními řetězci obsahujícími Trp, His, Tyr, Met a Cys, které vedou k chemické změně struktury molekuly proteinu (Pattison a Davies 2006; Poljsak 2012).

Poškození UV zářením se týká také lipidů. Nenasycené lipidy reagují s ROS a tvoří lipidové peroxylové a alkoxylové radikály, které mají tendenci zahajovat řetě-

zové autokatalytické reakce. (Poljsak 2012)

Všechny popsané molekulární mechanismy působení UV záření vedoucí k poškození biologických molekul jsou schematicky znázorněny na Obr. 2.5.

2.2.3.4 Poškození mitochondrií

Kůže vystavená působení UV záření může být poškozena na úrovni DNA, a to jak jaderné tak mitochondriální (mtDNA) (Poljsak 2012; Tulah a Birch-Machin 2013). Na rozdíl od jaderné DNA však mtDNA nemá obranné histony, nemá introny a disponuje menším množstvím opravných mechanismů (Brand a kol. 2018; Birch-Machin a Swalwell 2010). Tyto rozdíly vedou k tomu, že u mtDNA vzniká asi 10–17× více mutací v důsledku působení ROS než u jaderné DNA (Birch-Machin a Swalwell 2010).

Mitochondrie jsou zvláště citlivé na produkci ROS nadměrným ozářením UV, jelikož jsou hlavním zdrojem buněčných oxidantů (Brand a kol. 2018). Přibližně 90 % kyslíku je v eukaryotní buňce spotřebováváno v rámci mitochondriálního dýchacího řetězce (Birch-Machin a Swalwell 2010). Nedochází-li zde ke kompletní redukci kyslíku, elektrony uvolněné z dýchacího řetězce reagují s kyslíkem za vzniku superoxidového radikálu a dochází k produkci ROS (Birch-Machin a Swalwell 2010). MtDNA, která je lokalizována v matrix v blízkosti vnitřní mitochondriální membrány, je pravděpodobně nejkritičtějším cílem této endogenní produkce ROS (Brand a kol. 2018; Poljsak 2012).

Popsaná skutečnost vede k tzv. začarovanému kruhu. Vnitrobuněčné ROS jsou primárně generovány mitochondriálním dýchacím řetězcem, a tak jsou právě mitochondrie primárním cílem pro oxidativní poškození buňky. Akumulované poškození buněčných signálních drah generuje chronicky se zvyšující hladinu mitochondriálních ROS, která převyšuje množství, které může být běžně zvládnuto vnitrobuněčnými antioxidanty, a dochází ke zrychlení mitochondriálního poškození (Brand a kol. 2018). Oxidativní poškození a zvýšený počet mutací mtDNA, která je esenciální pro funkci mitochondrií, vede ke stárnutí buněk a buněčné smrti. Nefunkční mitochondrie pak produkují více ROS, a tak oxidativní poškození v důsledku produkce ROS vede k produkci dalších ROS. (Birch-Machin a Swalwell 2010)

2.2.3.5 Antioxidační a reparační mechanismy

Produkce ROS v kůži je přirozený proces (Tyrrell 2012). Kůže disponuje obranným antioxidačním systémem, jehož smyslem je vypořádat se s oxidativním stresem a imunotoxicitou (Poljsak 2012). Tento systém sestává z neenzymatických (glutathion, kyselina askorbová) i enzymatických (superoxid dismutáza, kataláza, glutathion peroxidáza, glutathion reduktáza, thioredoxin reduktáza) antioxidantů, které se koordinovaným způsobem podílí na udržení redoxní rovnováhy (Tyrrell 2012).

Expozice UVA a UVB však zvyšuje produkci ROS, čímž dochází k přetížení endogenní antioxidační kapacity kůže a vzniku oxidativního stresu. To dále vede k oxidativnímu poškození, imunotoxicitě, imunosupresi, poškození DNA a aktivaci signálních drah, které ovlivňují transkripci genů, buněčný cyklus, proliferaci a apoptózu. Všechny tyto změny vedou k předčasnému stárnutí kůže a podporují kancerogenezi. (Dunaway a kol. 2018; Poljsak 2012).

Jelikož antioxidantů v kůži zpravidla není dostatek, dochází k poškození okolních molekul včetně molekul DNA (Poljsak 2012). Jelikož molekuly DNA není možné (na rozdíl například od proteinů) v buňce nahradit a poškození DNA by pro buňku mělo dalekosáhlé důsledky, vyvinuly si organismy řadu mechanismů opravy DNA (Sinha a Häder 2002).

Pravděpodobně nejjednodušší a nejstarší mechanismus opravy poškození v důsledku působení UV záření je fotoreaktivace. Během fotoreaktivace dochází k navázání fotolyázy na CPD (CPD fotolyáza) či 6-4PP (6-4 fotolyáza) a za využití světelné energie dochází k rozštěpení vzniklé vazby a zpětné transformaci na původní molekulu. Komplexnější mechanismy excisní opravy neprovádí změnu molekuly, ale nahrazují poškozené úseky DNA novými, nepoškozenými. V případech, kdy DNA nemůže být opravena, dochází k tolerantním opravám. Tyto opravy upevňují léze v DNA a jsou pravděpodobně zdrojem mutagenezí v důsledku působení UV záření. (Sinha a Häder 2002)

Nukleotidová excisní oprava (NER) je evolučně zakonzervovaný opravný mechanismus, která opravuje léze DNA s různým stupněm distorze DNA šroubovice či s vlivem na zastavení replikace a transkripce. NER má dva podmechanismy – NER celého genomu a transkripční párová oprava. NER celého genomu je schopna opravovat fotodimery v různě kondenzovaném chromatinu i v různých fázích buněčného

cyklu. Transkripční párová oprava umožňuje rychlou obnovu transkripce zastavené v důsledku působení UV, a to efektivní opravou fotodimerů, které zabraňují prodloužování RNA polymerázou II. Defekty NER vedou k toxicitě kůže, vývojovým a neurologickým abnormalitám, předčasnému stárnutí a extrémní náchylnosti k rakovinám. (Mullenders 2018)

2.3 Stárnutí kůže

2.3.1 Chronologické stárnutí kůže

„Stárnutí je pokles maximální funkce a rezervní kapacity všech tělních orgánů, který vede k nárůstu pravděpodobnosti vzniku onemocnění a smrti“ (Chung a kol. 2004). Podobně jako všechny tkáně i kůže podléhá stárnutí.

Chronologické stárnutí kůže zahrnuje změny v kůži, které nastávají pouze v důsledku toku času (Yaar 2006). S věkem se mění biochemické složení tkání, fyziologická kapacita se postupně snižuje, schopnost přizpůsobení se vnějším podmínkám je zmenšena a náchylnost k onemocněním roste (Chung a kol. 2004). Proces stárnutí je komplexní, může vycházet z řady různých mechanismů a je způsoben paletou různých faktorů. Existuje proto řada teorií, které stárnutí vysvětlují každá ze svého úhlu pohledu. Tyto teorie obecně dělíme na teorie náhodného a teorie programovaného stárnutí. Teorie náhodného stárnutí vychází z předpokladu, že stárnutí představuje přehlcení systému v důsledku dlouhodobé akumulace poškození a chyb, zatímco teorie programovaného stárnutí zastávají existenci vnitřních hodin, které řídí nejen vývoj ale i sebedestrukci jedince (Poljsak 2012).

Hlavní roli mezi faktory vedoucími k chronologickému stárnutí hraje endogenní produkce a kumulace ROS během buněčného oxidativního metabolismu (Helfrich a kol. 2012; Yaar 2006). ROS jsou sice za běžných podmínek zhášeny antioxidačním systémem, nicméně jeho aktivita se s rostoucím věkem snižuje, a tak dochází k nárůstu hladiny ROS v buňkách (Chung a kol. 2004). ROS přítomné v buňce poškozují buněčné komponenty jako jsou membrány, enzymy a DNA (Yaar 2006). V souladu s touto teorií je i pozorování, že staří savci ve svých buňkách mají velké množství oxidovaných lipidů a proteinů a poškozené či zmutované DNA, zejména mtDNA (Poljsak 2012).

Na stárnutí má vliv i genetika – starší lidé mají telomerické sekvence chromozomů kratší než mladší (Chung a kol. 2004). Bylo experimentálně ukázáno, že s každým buněčným dělením se délka lidských telomer zkracuje (Poljsak 2012). Zkracování telomer je schopen zabránit enzym telomeráza, ten je však aktivní zejména během vývoje a od jistého stádia vývoje je (mimo permanentně či periodicky se obnovující tkáně) jeho exprese inhibována (Chung a kol. 2004). To aktivuje mechanismus, který zabraňuje dalšímu buněčnému dělení, neboť kriticky krátké telomery vysílají buněčnému cyklu signál k zastavení či apoptóze (Yaar 2006). Normální diploidní buňky tak asi po 50 děleních ztrácí schopnost se dále dělit (Poljsak 2012).

K chronologickému stárnutí přispívá i modifikace růstových faktorů a hormonů – dochází k poklesu hladiny pohlavních steroidů (estrogen, testosteron), úbytku melatoninu, kortisolu, thyroxinu, růstového hormonu či insulinu. Zároveň s rostoucím věkem klesají indukované hladiny signálních molekul (cytokiny, chemokiny), což vede ke snížení některých kožních funkcí, a klesá i hladina příslušných receptorů. (Yaar 2006)

Chronologické stárnutí kůže je charakterizováno spíše funkčními než morfologickými změnami kůže (Chung a kol. 2004). Zestárlá kůže je suchá, bledá, laxní a s jemnými vráskami, mohou na ní vznikat benigní útvary (Helfrich a kol. 2012). Dochází k zploštění epidermálních výběžků na dermo-epidermálních spojích, což vede k redukci povrchového kontaktu mezi epidermis a dermis, a tak i ke snížení výměny živin a metabolitů mezi nimi (Yaar 2006). Snižuje se hustota melanocytů a Langerhansových buněk a naopak roste počet fibroblastů (Chung a kol. 2004; Helfrich a kol. 2012). V zestárlé kůži dochází k úbytku extracelulární matrix a nárůstu hladiny kolagen-degradujících matrixových metaloproteináz (MMP) (Chung a kol. 2004). To v kombinaci s poklesem syntézy prokolagenu vede k poklesu hladiny kolagenu v dermis (Helfrich a kol. 2012).

2.3.2 Fotostárnutí kůže

Stárnutí kůže je komplexní proces, na němž se podílí genetický program i kumulativní vliv vnějších a vnitřních faktorů (Yaar 2006; Yin a kol. 2015). Chronologické stárnutí, které je dáno pouze tokem času, je tak dále ovlivňováno dalšími faktory (Chung a kol. 2004). Nejvýznamnějším vnějším faktorem, který má vliv na předčasné

stárnutí kůže, je UV záření (Krutmann a Gilchrest 2006). Roku 1986 byl poprvé použit pojem fotostárnutí (photoaging), který byl definován jako vliv chronické expozice UV záření na kůži (Kligman a Kligman 1986). Procesy chronologického stárnutí a fotostárnutí se od sebe sice liší, nicméně jejich projevy se zpravidla vyskytují současně (Huang a Chien 2020).

2.3.2.1 Klinické a histologické změny

Zatímco chronologické stárnutí vede primárně k funkčním změnám a projevuje se jako fyziologické změny v průběhu času (Yin a kol. 2015), fotostárnutí vede ke změnám vzhledu kůže (Garmyn a Van den Oord 2004). Fotozestárlá kůže má drsný vzhled a hluboké vrásky, ztrácí odolnost a elasticitu, zvyšuje se její křehkost a snižuje se schopnost hojení (Garmyn a Van den Oord 2004; Glogau 2004). Klinické projevy fotostárnutí na kůži se navíc liší podle kožního typu jedince – zatímco u kožních typů III a IV se projevuje drsnou, tlustou kůží s hrubými vráskami, kožní typy I a II mají méně vrásek a hladší kůži s premalignantními lézemi jako jsou například aktinické keratózy (Yaar 2006). Jedním z nejobecnějších projevů fotostárnutí je kožní elastóza, což je útvar složený z velkých, spletitých mas degradované elastické tkáně (Yaar 2006).

Jelikož je UVB záření většinově absorbováno v epidermis, ovlivňuje zejména epidermální buňky, tj. keratinocyty. Oproti tomu UVA záření prochází až do dermis, a tak ovlivňuje jak keratinocyty tak dermální fibroblasty (Berneburg a kol. 2000). Fotostárnutí tak ovlivňuje epidermis i dermis na morfologické úrovni. Epidermis vykazuje různou tloušťku, atypické keratinocyty a melanocyty a úbytek Langerhansových buněk. Tyto změny se následně projevují jako viditelné změny pigmentu, benigní hyperproliferující kožní léze, premaligní léze a maligní kožní nádory. Dermis ztrácí kolagen, objevují se zde dermální elastózy a dochází k redukci mikrofibril bohatých na fibrilin, což vede k poklesu elasticity a odolnosti kůže a nárůstu počtu vrásek (Garmyn a Van den Oord 2004).

Zatímco u chronologického stárnutí dochází obecně k poklesu počtu buněk, fotozestárlá kůže je charakterizována vyšším počtem dermálních fibroblastů ale i žírných buněk, histiocytů a monojaderných buněk, jejichž přítomnost poukazuje na možnost vzniku zánětlivých procesů. Dochází také k nárůstu počtu $CD4^+$ T-buněk, zatímco

počet Langerhansových buněk klesá. (Krutmann a Gilchrest 2006)

2.3.2.2 Molekulární mechanismus

Vzhled zestárlé a fotozestárlé kůže je ovlivněn komplikovanou sítí vlivů, která zahrnuje několik zánětlivých buněčných signálních drah, interakce mnoha cytokinů a sebe-opravné reakce poškozených buněk či tkání (Yin a kol. 2015). UV záření generuje ROS, indukuje mutace mtDNA, mění transkripci jaderných genů a také spouští důležité zánětlivé a strukturu degradující dráhy (Huang a Chien 2020).

Jelikož UV záření dopadající na kůži zvyšuje produkci ROS, je proces fotostárnutí doprovázen oxidativním poškozením, jemuž jsou vystaveny všechny buněčné komponenty (Krutmann a Gilchrest 2006). Vzniklé ROS odstraňují fosfátové skupiny z receptorů tyrozinfosfatáz, což vede k aktivaci buněčných povrchových receptorů a následnému šíření intracelulární signalizace a související syntéze transkripčních faktorů (Glogau 2004). ROS přímo aktivují buněčné povrchové receptory pro zánětlivé cytokiny na keratinocytech a fibroblastech jako jsou interleukiny (IL), epidermální růstový faktor (EGF) či tumor-nekrotizující faktor α (TNF-α) (Huang a Chien 2020; Glogau 2004). K aktivaci receptorů dochází během minuty po expozici UV zářením (Chung a kol. 2004). Aktivované receptory stimulují transkripci faktorů jako jaderný faktor κ B (NFκB) či protein aktivátor 1 (AP-1) (Chung a kol. 2004).

Cytokiny TNF-α a IL hrají hlavní roli v imunosupresi v důsledku působení UVB záření (Yaar 2006). Transkripční faktor NFκB navíc stimuluje transkripci genů dalších prozánětlivých cytokinů (IL-1β, TNF-α, IL-6 a IL-8), čímž dochází k tvorbě pozitivní zpětnovazebné smyčky (Huang a Chien 2020; Chung a kol. 2004).

Indukce AP-1 a NFκB vede k indukci matrixových metaloproteináz (MMP), které degradují proteiny v extracelulární matrix (Berneburg a kol. 2000). Extracelulární matrix v dermis je tvořena zejména kolagenem I a III, elastinem, proteoglykanem a fibrokonektinem, přičemž kolagenová vlákna jsou důležitá pro pružnost a odolnost kůže a změna jejich počtu či struktury vede k formaci vrásek (Krutmann a Gilchrest 2006). MMP degradují kolagen I a III a elastin, čímž snižují jejich množství v dermis (Huang a Chien 2020; Yin a kol. 2015). Za běžných podmínek je sice činnost MMP inhibována svými endogenními inhibitory TIMP, nicméně UV záření indukuje MMP bez vlivu na expresi či aktivitu TIMP (Krutmann a Gilchrest 2006).

AP-1 navíc inhibuje signalizaci receptoru transkripčního růstového faktoru β (TGF-β), čímž blokuje syntézu prokolagenu I a III ve fibroblastech (Huang a Chien 2020; Helfrich a kol. 2012). V důsledku toho dochází ke snížení hladiny prekurzorů kolagenu a zvýšení hladiny elastinu (Yin a kol. 2015). Ve fotozestárlé kůži se proto akumulují degradovaná, dezorganizovaná kolagenová vlákna a abnormální materiál obsahující elastin (Krutmann a Gilchrest 2006; Glogau 2004). Tyto akumulované, poškozené proteiny tvoří charakteristické zesílení horní dermis, které rozeznáváme jako solární elastózu a vrásky (Glogau 2004).

Produkce ROS v buňkách vede také k poškození DNA (Yin a kol. 2015). Fotoprodukty vzniklé v důsledku působení UV mohou vést k mutacím kožních buněk a jejich stárnutí (Yin a kol. 2015). Kombinace mutací, poklesu reparační kapacity, změny exprese genů zodpovědných za diferenciaci a růstové regulátory a mutace protoonkogenů a tumor-supresorových genů v důsledku působení UV záření může vést ke vzniku fotokancerogeneze (Garmyn a Van den Oord 2004).

Častým projevem fotozestárlé kůže je vznik aktinických keratóz. Aktinické keratózy jsou epidermální útvary, které vykazují proliferaci cytologicky abnormálních keratinocytů. Tyto keratinocyty jsou výsledkem UV mutace tumor-supresorového genu p53, která umožňuje buňkám proliferaci i přes trvalé poškození DNA. (Yaar 2006)

Kumulace mutací mtDNA hraje významnou roli v procesu chronologického stárnutí, ve fotozestárlé kůži navíc dochází k nárůstu počtu těchto mutací (Krutmann a Gilchrest 2006). Kůže chronicky vystavená slunečnímu záření má vyšší četnost mutací mtDNA než chráněná kůže, zejména se zde projevují rozsáhlé delece (Chung a kol. 2004). Například k tzv. běžné deleci, tj. deleci 4977-bp mtDNA, dochází ve fotozestárlé kůži až 10× častěji než v před UV ochráněné kůži téhož jedince (Krutmann a Gilchrest 2006).

2.3.3 Fotoprotektivní látky

Fotoprotekce představuje soubor mechanismů, které slouží k ochraně kůže před poškozením UV zářením (Yin a kol. 2015). Konzistentní využívání těchto mechanismů je důležitým prvkem prevence akutních i chronických jevů v důsledku působení UV záření, fotostárnutí a fotokancerogeneze (Friedman a kol. 2016). Ochrana

před těmito vlivy zahrnuje endogenní faktory, vyhýbání se přímému slunečnímu záření, nošení vhodného oblečení včetně slunečních brýlí a povrchově či orálně podané fotoprotektivní látky (Yin a kol. 2015; Friedman a kol. 2016).

Fotoprotektivní látky dělíme na primární a sekundární. Primární fotoprotekci zastávají hlavně UV filtry, které se dnes vyskytují nejen v opalovacích krémech ale jsou i součástí kosmetických produktů pro každodenní použití (Rai a kol. 2012; Krutmann a Yarosh 2006). Moderní opalovací krémy kombinují UV filtry se sekundárními fotoprotektivy. Sekundární fotoprotektiva jsou biologicky aktivní molekuly (aktiva), jejichž molekulární mechanismus spočívá ve snaze předcházet biochemickým a molekulárním důsledkům, které nastávají v kůži po absorpci UV záření (Krutmann a Yarosh 2006).

Pro stanovení účinnosti opalovacích krémů byl na konci 70. let 20. století zaveden sun protective factor (SPF) (Lim a kol. 2004). SPF stanovuje míru absorpce UV záření, a to jako poměr minimální erytemální dávky (MED) UV záření v případě kůže chráněné aplikací 2 mg/cm^2 zkoumané látky ku MED pro nechráněnou kůži (Wilson a kol. 2012). Vzhledem k rozdílnému mechanismu působení UVA a UVB fotonů však tento faktor reprezentuje spíše schopnost efektivně chránit před účinky dopadajícího UVB záření. Z pohledu UVA záření SPF neposkytuje informaci o tom, jak daný přípravek chrání před fotoimunosupresí či fotostárnutím (Halliday a Hönigsmann 2009). Ačkoliv pro měření míry protekce vůči UVA záření byla navržena řada metod, neexistuje dosud žádný konsenzus (Wilson a kol. 2012).

2.3.3.1 Primární fotoprotekce

Kůže má vlastní mechanismy, jak se bránit poškození UV zářením. Podle míry adaptace na sluneční záření rozlišujeme ve světové populaci 6 fototypů (Ettler a Ettler 2016). Obecně můžeme říci, že u tmavších kožních typů dochází k pozdějším klinickým projevům fotostárnutí ve srovnání se světlejšími kožními typy (Friedman a kol. 2016). To souvisí s tvorbou melaninu, endogenního pigmentu, který rozptyluje a absorbuje UV záření (Sies a Stahl 2004). UV záření dopadající na kůži stimuluje syntézu melaninu v epidermálních melanocytech, což vede k pigmentaci kůže (Sies a Stahl 2004). Nárůst melaninu v reakci na ozáření UV je jedním z přirozených obranných mechanismů proti fotokancerogenezi a fotostárnutí (Friedman a kol. 2016). Na

primární fotoprotekci se však podílí také dermální proteiny kolagen a elastin (Ettler a Ettler 2016).

Umělou primární ochranu před nežádoucími účinky UV záření kůži poskytuje aplikace opalovacích krémů (Sies a Stahl 2004). První komerčně dostupný opalovací krém se na trhu objevil roku 1928 a obsahoval účinné látky benzyl salicylát a benzyl cinamát. Významným milníkem v historii opalovacích krémů byl patent kyseliny 4-aminobenzoové (PABA) roku 1943. Pro četnost způsobených alergických reakcí však byla roku 1970 stažena ze složení opalovacích krémů a nahrazena svými deriváty. První opalovací krémy chránily pouze před UVB zářením, první filtr UVA se objevil teprve roku 1962. V letech 1989 a 1992 se začaly do opalovacích krémů přidávat i mikronizované anorganické filtry, nejprve oxid titaničitý (TiO_2) a pak oxid zinečnatý (ZnO). Od 90. let se na trhu běžně vyskytují opalovací krémy poskytující ochranu před UVA i UVB zářením a tyto filtry jsou zahrnuty i v celé řadě kosmetických přípravků pro každodenní použití. (Roelandts 2009; Lim a kol. 2004)

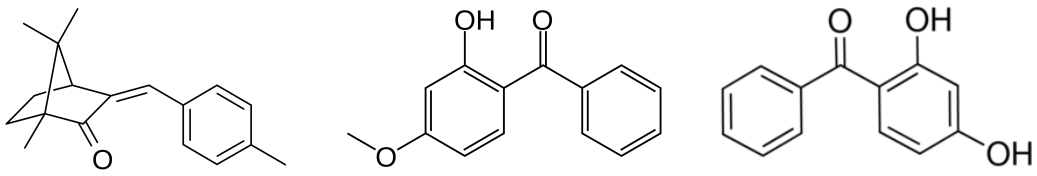
Bezpečnost a efektivita těchto produktů závisí zejména na typu a koncentraci UV filtru. Obecným požadavkem na dnešní opalovací krémy je schopnost chránit před UVA i UVB zářením, fotostabilita a voděodolnost (Krutmann a Yarosh 2006). Pravidelné používání opalovacích krémů ukázalo redukci nežádoucích efektů UV záření včetně těch chronických jako jsou aktinická keratóza, solární elastóza, imunosuprese či fotosenzitivita (Wilson a kol. 2012).

Složky opalovacích krémů historicky dělíme na organické (chemické) absorbéry a (anorganické) fyzikální blokátory podle jejich mechanismu působení (Rai a kol. 2012). Původní označení fyzikální a chemický filtr nahradily roku 1999 pojmy anorganický a organický (Lim a kol. 2004).

Anorganické látky jsou charakteristické tím, že odráží nebo rozptylují paprsky UV záření dopadající na kůži (Yin a kol. 2015). Nejčastěji využívanými fyzikálními UV filtry jsou anorganické mikropigmenty s velikostí částic 10–100 nm jako jsou ZnO či TiO_2 (Krutmann a Yarosh 2006). TiO_2 je širokospektrý UV filtr, jeho nanočástice poskytují fotoprotekci proti UVB a UVA2, nicméně propouští UVA1 (Rai a kol. 2012). Oproti tomu nanočástice ZnO jsou efektivní zejména v UVA oblasti (Rai a kol. 2012). Povrchová aplikace těchto mikropigmentů nevede k jejich pronikání do kůže, a tak mají jen nízký potenciál přivodit toxické efekty. Z tohoto důvodu

se využívají v kombinaci s organickými filtry za účelem zvýšit efektivitu, rozšířit spektrum působení a snížit množství organických filtrů (Krutmann a Yarosh 2006). Nevýhodou anorganických filtrů je, že reflektují zároveň i viditelné světlo, a tak tvoří na kůži nežádoucí viditelnou, neprůhlednou vrstvu (Dunaway a kol. 2018). Navíc kladou značné nároky na výrobu, protože mají tendenci aglomerovat, což snižuje efektivitu jejich fotoprotekce (Krutmann a Yarosh 2006).

Organické UV filtry absorbují krátkovlnné UV záření o vysoké intenzitě, excitují do vyššího energetického stavu a při návratu do základního stavu transformují absorbovanou energii na teplo emisí delší, méně energetické vlny. Většina chemických filtrů absorbuje v poměrně úzkém rozsahu vlnových délek, a tak je dělíme na filtry absorbující primárně v UVB oblasti a filtry absorbující primárně v UVA oblasti. Primárně v UVB oblasti absorbují deriváty kyseliny 4-aminobenzoové, oktyl salicylát, oktokrylen, deriváty kamforu jako enzacamen (3-(4-methylbenzyliden)kamfor) a estery kyseliny zinečnaté. Primárně v UVA oblasti absorbují meradimát a benzofenony. Mezi benzofenony absorbující primárně v UVA oblasti patří například oxybenzon (2-hydroxy-4-methoxybenzofenon), benzofenon 1 (2,4-hydroxybenzofenon) či avobenzon. (Krutmann a Yarosh 2006; Wilson a kol. 2012; Cantrell a kol. 2001)



(a) Enzacamen. (b) Oxybenzon. (c) Benzofenon-1.

Obr. 2.6: Strukturní vzorce vybraných organických filtrů.

Nejčastěji používanými organickými filtry jsou ethylhexyl metoxycinamát a avobenzon. Společná přítomnost těchto molekulárních filtrů však způsobuje fotonestabilitu a expozice UV způsobuje fotochemické reakce, které generují ROS a fototoxické a fotoalergické reakce kůže. Kombinací avobenzonu s dalšími UV filtry (oktokrylen, enzacamen) či non-UV filtry (diethyl-hexyl-2,6-naftalát) bylo dosaženo vyšší stability, což značně zlepšilo efektivitu fotoprotekce, které je možné dosáhnout pomocí organických UV filtrů. (Krutmann a Yarosh 2006)

2.3.3.2 Sekundární fotoprotekce

Na ochraně kůže před UV zářením se značně podílí endogenní komponenty, které tvoří bariéru pro UV záření, chrání cílové molekuly, opravují poškození DNA či potlačují buněčnou odpověď (Sies a Stahl 2004). Jako sekundární fotoprotektivní látky slouží antioxidanty (vitaminy, polyfenoly), osmolyty a DNA reparační enzymy (Rai a kol. 2012).

Kůže je vybavena celou řadou antioxidantů, které běžně slouží k ochraně před oxidativním stresem, který se vyvíjí v kontextu buněčné respirace. Tyto antioxidanty hrají obrannou roli i při zhášení ROS vyvolaných působením UV záření, nicméně jich zde není dostatečné množství pro eliminaci všech ROS produkovaných v důsledku působení UV záření (Friedman a kol. 2016). Z toho důvodu jsou antioxidanty, zejména vitaminy či polyfenoly, přidávány do opalovacích krémů. Nejčastěji zastoupený je lipofilní vitamin E, časté jsou též deriváty vitaminu C (Krutmann a Yarosh 2006). Povrchově aplikovaný vitamin C stimuluje tvorbu kolagenu v dermis, chrání proti poškození UVA a UVB zářením, opravuje problémy s pigmentací a působí protizánětlivě (Pandel a kol. 2013).

Kůže si evolučně vyvinula vlastní mechanismy, jak se bránit před dopadajícím UV zářením. Například vitamin D zvyšuje přežití keratinocytů po UVB ozáření, zvyšuje opravu DNA a snižuje produkci CPD. Tyto mechanismy je vhodné zkoumat a posilovat (Dunaway a kol. 2018). Podobné mechanismy si však vyvinula i řada rostlin a některé z látek, které se těchto mechanismů účastní, mají fotoprotektivní účinky též na lidskou kůži (Krutmann a Yarosh 2006). Botanické složky patřící mezi polyfenoly, monoterpeny, flavonoidy, organosulfidy a indoly mají protimutagenní a protikancerogenní účinky (Dunaway a kol. 2018).

Příkladem flavonoidu s fotoprotektivními vlastnostmi je α-glykosylrutin, jehož povrchová aplikace předchází tvorbě kožních lézí u pacientů s polymorfní světelnou erupcí a aplikace na fibroblastech vede k ochraně před nadměrnou produkcí MMP-1 a MMP-2 (Krutmann a Yarosh 2006). Epigallokatechin-3-galát obsažený v listech zeleného čaje zabraňuje při povrchovém i orálním podání poškození DNA, fotostárnutí, vzniku rakoviny a imunosupresi v důsledku UVB záření, a to prostřednictvím inhibice transkripce cytokinů (González a Gilaberte-Calzada 2009). Kurkumin zabraňuje aktivaci transkripčních faktorů AP-1 a NFκB. Povrchová aplikace sylimarinu

inhibicí NFκB redukuje edém, spálené buňky a vyčerpání antioxidačních systémů (Krutmann a Yarosh 2006). Mezi flavonoidy poskytující antioxidační ochranu patří i astragalin, který snižuje biologické odpovědi na ozáření UV jako jsou poškození DNA, formace spálených buněk, fotostárnutí a rakovina kůže. Astragalin má též potenciální využití při léčbě a prevenci aktinické keratózy vzniklé v důsledku působení UVB záření (Riaz a kol. 2018). Pachypodol a hyperosid jsou flavonoidy, které podporují endogenní antioxidační mechanismy v liském těle, a tak mají potenciál působit jako fotoprotektivní látky (Kim a kol. 2019; Nichols a Kariyar 2010).

Karoteinoidy jako β-karoten či lykopen jsou rostlinné pigmenty a efektivní antioxidanty, které neutralizují singletní kyslík a peroxyradikály formované během fotooxidativních procesů (González a Gilaberte-Calzada 2009). Ačkoliv některé studie poukazují na fotoprotektivní účinky karotenoidů vzhledem k akutnímu i chronickému poškození kůže, většina studií selhala při snaze tyto prospěšné účinky přesvědčivě demonstrovat. Kromě toho, že fotoprotektivních účinků je zřejmě dosaženo pouze při optimální koncentraci a době působení karotenoidů v kůži, příliš vysoká hladina může naopak způsobit prooxidativní účinky (Pandel a kol. 2013). Efektivita fotoprotekce navíc značně závisí na typu použitého karotenoidu (Krutmann a Yarosh 2006).

Vystavení buněk osmolytickému stresu vede k zvýšení výtoku organických solutantů a osmolytů s cílem zachovat konstantní objem buňky. Mezi osmolyty v lidských buňkách patří betain, taurin a myoinositol. Absorpce osmolytů je součástí přirozeného obraného systému kožních buněk proti škodlivým účinkům UV záření. UVA i UVB záření zvyšuje absorpci betainu, myoinositolu a zejména taurinu v lidských keratinocytech, zatímco výtok zůstává nezměněný. Inkubace primárních lidských epidermálních keratinocytů taurinem vedla k téměř kompletní ochraně před expresí prozánětlivých molekul a cytokinů v důsledku UVA i UVB záření. (Krutmann a Yarosh 2006)

V reakci na dopadající UV záření dochází k mutacím DNA a vzniku lézí. Opalovací krémy, které obsahují antioxidanty, mohou zabránit formaci 8oG, jelikož jde o lézi DNA, která vzniká nepřímým mechanismem působení UV záření, vzniku CPD či 6-4 PP však přítomné antioxidanty zabránit nemohou (Yarosh a Smiles 2009). Další možnou strategií fotoprotekce je podpořit opravu DNA s využitím cílení enzymů pro

opravu konkrétních lézí. V tomto případě sice dojde k poškození DNA, nicméně to je následně odstraněno, dříve než dojde k biologickým následkům (Krutmann a Yarosh 2006). T4 endonukleáza V (T4E5) z bakteriofága V rozpoznává CPD. S využitím lipozomálního doručení T4E5 do kůže vystavené působení UV záření byla zvýšena oprava CPD z 10 % na 18 % a redukována syntéza a uvolňování cytokinů jako IL-10 a TNF-α (Halliday a Hönigsmann 2009). Enzym fotolyáza, který přímo opravuje CPD, byl lipozomálně dopraven do lidských buněk, což vedlo k redukci apoptózy a snížení hladiny CPD (Krutmann a Yarosh 2006). Enzym oxoguanin glykosyláza 1 (OGG1) zahajuje excisní opravu 8oG a lipozomální doručení OGG1 enzymu z *Arabidopsis* do lidských epidermálních keratinocytů dramaticky zvýšilo opravu tohoto poškození (Krutmann a Yarosh 2006).

3 Cíl práce

1. Provedení literární rešerše v oblasti působení UV záření na lidský organismus.
2. Zhodnocení současného stavu znalostí v uvedené problematice, návrh metodiky experimentálního měření a vyhodnocení měřených dat s cílem ověřit a papsat účinky jednotlivých složek UV záření na buněčné kultury.
3. Zjistit vybrané morfologické a funkční změny buněčných kultur vystavených UVA a UVB záření společně s UV protektivními látkami. Provedení statistického vyhodnocení experimentálního měření a diskuze získaných výsledků.

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Experimenty byly prováděny na buněčné kultuře keratinocytů HaCaT, které byly poskytnuty Ústavem lékařské biofyziky Lékařské fakulty Univerzity Palackého.

4.2 Zdroje UV záření

Pro ozařování buněk byly použity zdroje UVA (Actinic BL Insect PL-L 36W/10 (Philips, Nizozemsko)) a UVB záření (UV-B Narrowband PL-L 36W/01/4P 1CT/25 (Philips, Nizozemsko)).

Pro zjištění homogenity ozařovaného pole bylo toto pole o rozměru 36×18 cm rozděleno na 72 menších polí o rozměru 3×3 cm. Hodnoty ozáření v jednotlivých menších polích byly změřeny pomocí měřiče intenzity UV-Meter se senzory UVA F0 a UVB F0 (Hönle Group, Německo).

4.3 Kultivace a pasážování buněk

Buněčné kultury lidských keratinocytů HaCaT byly kultivovány v kultivačním médiu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D5223-1L, Sigma-Aldrich, USA) s přídavkem hydrogenuhličitanu sodného (3,7 g/l), fetálního hovězího séra (S1810-500, 10 %, Biowest, Francie) a směs antibiotik penicilinu (100 U/ml) a streptomycinu (100 mg/ml) (P4333-100ML, Sigma-Aldrich, USA) v inkubátoru při 37°C a 5% CO_2.

Před provedením experimentu byly buňky umístěné ve 125ml kultivační lahvi vždy nejprve vyndány z inkubátoru. Přítomné kultivační médium bylo z kultivační lahve odstraněno a lahev byla 3× promyta pomocí fosfátového pufru PBS 1×. Ná-

sledně byly buňky trypsinizovány – bylo přidáno 7 ml TrypLE Express Enzyme (12604013, Gibco by Thermo Fisher Scientific, USA) a buňky v kultivační lahvi byly umístěny do inkubátoru. Po uplynutí 5 minut bylo průběžně mikroskopem kontrolováno, zda se buňky zcela uvolnily od dna lahve. Když byly buňky zcela uvolněny ode dna kultivační lahve, byla trypsinizace zastavena přidáním kultivačního média.

Zpasážované buňky byly následně rozděleny do kultivačních lahví pro další kultivaci nebo napipetovány do destiček pro přípavu experimentu. V případě pipetování do destiček bylo množství buněk určeno pomocí Bürkerovy komůrky a vysety v koncentraci 10 000–100 000 buněk do jamky. Kultivační lahve a destičky pak byly umístěny zpět do inkubátoru.

4.4 Měření absorpčních spekter

Pro měření absorpčních spekter byly UV protektivní látky zředěny v PBS. Absorpční spektra UV protektivních látek byla měřena pomocí UV-VIS spektrofotometru Cary 300 (Agilent Technologies, USA). Změřená absorpční spektra byla normována a odpovídající koncentrace pro normovaná absorpční spektra byly vypočteny z Lambert-Beerova zákona.

4.5 Inkubace UV protektivních látek

Před provedením experimentu zkoumajícího vlivy UV protektivních látek byly spolu s buňkami a kultivačním médiem přidány do jamek i UV protektivní látky astragalin (04500585, Sigma-Aldrich, USA), pachypodol (PHL83821, Sigma-Aldrich, USA), hyperoside (00180585, Sigma-Aldrich, USA), β-karoten (C9750-5G, Sigma-Aldrich, USA), transurokanová kyselina (859796-5G, Sigma-Aldrich, USA), nanočástice oxidu titaničitého (TiO_2; 637254, Sigma-Aldrich, USA), 2,4-dihydroxybenzofenon (126217, Sigma-Aldrich, USA), 2-hydroxy-4-methoxybenzofenon (H36206, Sigma-Aldrich, USA), 3-(4-methylbenzyliden)kafr (78551, Sigma-Aldrich, USA) tak, aby bylo dosaženo zvolené cílové koncentrace. Pro dosažení požadovaných koncentrací byly využity zásobní roztoky UV protektivní látky a zředěny v kultivačním médiu 100×. Látky byly s buňkami 24 hodin inkubovány.

4.6 Stanovení životaschopnosti buněk

MTT test je test stanovující životaschopnost buněk za využití předpokladu, že metabolická aktivita buněk je úměrná jejich počtu, protože každá z přítomných živých buněk metabolizuje. K buňkám je přidán substrát MTT (3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid), který je dehydrogenázovou aktivitou mitochondrií přeměněn na vodou nerozpustné, fialově zbarvené formazanové soli. Měřením intenzity absorpce světla o odpovídající vlnové délce je tak možné stanovit relativní počet buněk ve vzorku.

HaCaT buňky byly v destičkách inkubovány 24 hodin při 37°C a 5% CO_2. Kultivační médium v jamkách destičky bylo nahrazeno stejným množstvím PBS-G (PBS s přídavkem 5mM glukózy). Buňky byly ozářeny zdroji UVA či UVB a po ozáření bylo do jamek přidáno kultivační médium v poměru 3 díly kultivačního média : 1 díl PBS-G. Buňky byly následně 24 hodin inkubovány.

K buňkám byl přidán zásobní roztok MTT (M5655, Sigma-Aldrich, USA) tak, aby bylo dosaženo pracovní koncentrace MTT v kultivačním médiu 0,5 mg/ml. Destičky byly vloženy do inkubátoru na 3 hodiny. Médium se sérem bylo z jamek odsáto a bylo přidáno 100 μl rozpouštědla DMSO (dimethylsulfoxid). Absorbance při 570 nm odpovídající koncentraci produkovaných formazanových krystalů byla změřena pomocí spektrofotometru pro měření absorbance a fluorescence Tecan Infinite®200 PRO (Tecan, Švýcarsko).

4.7 Stanovení produkce ROS

Chlormetylový derivát 2′, 7′-dichlorodihydrofluorescein diacetátu (CM-H_2DCFDA) je nefluorescenční látka, která proniká do buněk, a slouží jako indikátor přítomnosti ROS uvnitř buňky. CM-H_2DCFDA proniká do buněk, kde intracelulární esterázy odštěpují její acetátové skupiny a chlormethylové skupiny reagují s glutathionem a dalšími thioly, čímž vzniká nefluorescenční 2′, 7′-dichlorodihydrofluorescein (H_2DCF). Jelikož tento meziprodukt je nefluorescenční, samotné proniknutí do buňky nemá na měřenou fluorescenci žádný vliv. V přítomnosti ROS, zejména H_2O_2 však dochází k oxidaci a nefluorescenční H_2DCF je změněna na vysoce fluorescenční 2′,

7′-dichlorofluorescein (DCF).

HaCaT buňky byly v destičkách inkubovány 24 hodin při 37°C a 5% CO_2. 50 μg fluorescenční značky CM-H2DCFDA bylo rozpuštěno v 87 μl DMSO. Médium v jamkách destičky bylo nahrazeno stejným množstvím PBS-G s 8μM CM-H_2DCFDA (C6827, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, USA) a buňky byly 20 minut inkubovány. Buňky byly ozářeny zdrojem UVA či UVB. Intenzita fluorescence DCF s excitační vlnovou délkou 480 nm a emisní vlnovou délkou 530 nm byla změřena pomocí spektrofotometru Tecan Infinite®200 PRO.

4.8 Stanovení poškození mitochondrií

5,5′,6,6′-tetrachloro-1,1′,3,3′-tetraethyl-benzimidazolylcarbocyanin iodid (JC-1) je kationtová, karbocyaninová značka. Při nízkých koncentracích tato značka emituje fluorescenci v zelené oblasti (525 nm), zatímco ve větších koncentracích tvoří tzv. J-agregáty, které emitují červenou fluorescenci (590 nm). V závislosti na membránovém potenciálu dochází k pronikání JC-1 do mitochondrií, kde se akumuluje a tvoří J-agregáty. Tato akumulace je indikována posunem emise fluorescence ze zelené oblasti do červené oblasti. Množství červené fluorescence tak závisí na membránovém potenciálu. Jsou-li mitochondrie nepoškozené a mají standardní membránový potenciál, JC-1 do nich proniká a tvoří červeně fluoreskující J-agregáty. V případě poškozených mitochondrií, jejichž membránový potenciál je méně záporný, sice také dochází k pronikání JC-1 dovnitř mitochondrií, nicméně ve značně menší míře. Tato nižší koncentrace pak nepostačuje ke vzniku J-agregátů, a tak fluorescence zůstává v zelené oblasti. (Sivandzade a kol. 2019)

HaCaT buňky byly v destičkách inkubovány 24 hodin při 37°C a 5% CO_2. Médium v jamkách destičky bylo nahrazeno stejným množstvím 2 μg/ml JC-1 (T3168, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, USA) v PBS-G. Buňky s JC-1 byly 30 minut inkubovány. Po inkubaci bylo JC-1 v PBS-G z jamek odstraněno, jamky byly 2× promyty 300 μl PBS-G a do jamek bylo přidáno 600 μl PBS-G. Následně byly buňky ozářeny zdrojem UVA či UVB. Intenzita fluorescence JC-1 s excitační vlnovou délkou 535 nm a emisní vlnovou délkou 590 nm byla měřena pomocí spektrofotometru Tecan Infinite®200 PRO.

4.9 Stanovení poškození lyzosomů

4.9.1 Značka Akridinová oranž

Akridinová oranž je metachromatická značka s luminiscenční vlnovou délkou závislou na koncentraci – v roztocích s nízkou koncentrací značky emituje zelenou fluorescenci, zatímco při vyšších koncentracích emituje červenou luminiscenci. Akridinová oranž je značka s vysokou afinitou k nukleovým kyselinám, nicméně v živých buňkách se akumuluje zejména v kyselých vezikulách a k nukleovým kyselinám se váže jen málo. Fluorescence v oranžové či červené oblasti světla je tedy úměrná množství lyzosomů v buňkách.

HaCaT buňky byly v destičkách inkubovány 24 hodin při 37°C a 5% CO_2. Médium v jamkách destičky bylo nahrazeno stejným množstvím 2,6μM Akridinivé oranže (A1301, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, USA) v PBS-G. Buňky s Akridinovou oranží byly 20 minut inkubovány. Po inkubaci byla Akridinová oranž v PBS-G z jamek odstraněna, jamky byly 2× promyty PBS-G. Následně byly buňky v PBS-G ozářeny zdrojem UVA či UVB. Intenzita fluorescence Akridinové oranž s excitační vlnovou délkou 460 nm a emisní vlnovou délkou 525 nm byla měřena pomocí spektrofotometru Tecan Infinite®200 PRO.

4.9.2 Značka LysoTracker Blue

LysoTracker Blue je fluorescenční, acidotropní značka, která je tvořena fluoroforem navázaným na slabou bázi. Slabě zásadité aminy se selektivně akumulují v buněčných organelách s nízkým vnitřním pH jako jsou například lyzosomy. LysoTracker Blue, který má vysokou selektivitu pro kyselé organely, volně proniká do buněčných membrán a koncentruje se zejména ve sférických organelách.

HaCaT buňky byly v destičkách inkubovány 24 hodin při 37°C a 5% CO_2. Médium v jamkách destičky bylo nahrazeno stejným množstvím 400nM LysoTracker Blue (L7525, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, USA) v PBS-G. Buňky s LysoTracker Blue byly 30 minut inkubovány. Po inkubaci byl LysoTracker Blue v PBS-G z jamek odstraněn, jamky byly 2× promyty PBS-G. Následně byly buňky v PBS-G ozářeny zdrojem UVA či UVB. Intenzita fluorescence LysoTracker Blue s excitační

vlnovou délkou 380 nm a emisní vlnovou délkou 422 nm byla měřena pomocí spektrofotometru Tecan Infinite®200 PRO.

4.10 Stanovení poškození DNA

Stanovení poškození DNA v důsledku ozáření buněk inkubovaných se zkoumanými látkami UVA či UVB zdrojem bylo provedeno pomocí Comet assay. Comet assay je metoda, která umožňuje sledovat, zda je DNA jedné konkrétní buňky poškozená či nikoliv. Tato metoda je založená na gelové elektroforéze a využívá skutečnosti, že záporně nabitá molekula DNA po připojení zdroje elektrického proudu putuje ke kladně nabité elektrodě. Nepoškozené molekuly DNA zůstávají v místě jádra a putují v gelu velmi pomalu, zatímco poškozené fragmenty migrují z místa jádra ven a tvoří ohon komety.

Pro experiment byly připraveny čtyři 12-jamkové destičky – dvě pro ozáření zdrojem UVA záření a dvě pro ozáření zdrojem UVB záření. Do každé jamky bylo připraveno 100 tisíc buněk v 1,2 ml kultivačního média. Následně bylo přidáno 30 μl zásobního roztoku zkoumaných látek tak, aby bylo dosaženo nejvyšší netoxické koncentrace, přičemž jedna látka se vyskytovala vždy ve dvou opakováních pro každý zdroj. 4 jamky na každé destičce slouží jako kontrolní, neobsahují žádnou ze zkoumaných látek, pouze bylo přidáno 30 μl ethanolu. Následně byly látky 24 hodin inkubovány.

Pro ozáření bylo kultivační médium v destičkách nahrazeno PBS-G (600 μl/jamka). Ozařování probíhalo po dobu 90 minut pro zdroj UVA záření a 8 minut pro zdroj UVB záření. Po ozáření bylo do každé jamky přidáno 2,4 ml kultivačního média. Ozářené buňky byly 24 hodin inkubovány.

Podložní sklíčka byla nejprve pokryta 1% agarózou s vysokým bodem tání (11407, SERVA Electrophoresis, Německo) rozpuštěnou v destilované vodě. Následně byla sklíčka umístěna do sušící trouby zapnuté na teplotu 60°C a sušena po dobu 30 minut.

Médium z jamek bylo odlito do centrifugačních zkumavek. Přisedlé buňky na dně jamek byly trypsinizovány přidáním TryPLE Express po dobu 10 minut, aby se uvolnily ze dna destičky. Trypsinizace byla zastavena přidáním buněk do centrifugačních

zkumavek s kultivačním médiem. Izolované buňky ve zkumavkách byly centrifugovány po dobu 5 minut při 150 g.

Na plotně nastavené na 120°C byla v kádince s magnetickým míchátkém připravena 1% agaróza s nízkým bodem tání (AGAL0050, Qbiogene, USA). Buněčný pelet byl rozpuštěn ve 25 μl fosfátového pufru PBS 1× a následně bylo přidáno 100 μl agarózy s nízkým bodem tání. 85 μl výsledné směsi bylo neprodleně naneseno na připravené podložní sklíčko a zakryto krycím sklíčkem. Po přípravě všech vzorků byla podložní sklíčka umístěna do ledničky, aby agaróza ztuhla.

Po ztuhnutí agarózy (asi po 1 hodině) byla krycí sklíčka jemně manuálně odstraněna a podložní sklíčka s buňkami zalitými v gelu byla ponořena do lyzačního roztoku (2,5M NaCl; 100mM EDTA; 10mM Tris; 1% Triton X-100; pH 10) při teplotě 4°C po dobu 60 minut. Po proběhnutí lýze byla podložní sklíčka umístěna do elektroforézní nádoby a ponořena do chladného elektroforézního roztoku (300mM NaOH; 1mM EDTA) po dobu 40 minut. Následně byla spuštěna elektroforéza s nastavenou hodnotou proudu 350 mA a hodnotou intenzity elektrického pole 0,8 V·cm^{-1} na 20 minut. Po elektroforetické separaci byla podložní sklíčka dvakrát opatrně ponořena do neutralizačního roztoku (0,4M Tris) na 10 minut při 4°C.

Na vzorek na podložním sklíčku bylo naneseno několik kapek barvícího roztoku SYBR Green I (S7563, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, USA) pomocí pipety tak, aby byl povrch vzorku zcela pokryt roztokem. Takto se vzorek inkuboval přibližně 7 minut. Po inkubaci byl vzorek omyt ve fosfátovém pufru PBS 1× a umístěn pod mikroskop Olympus IX 70 (Olympus, Japan). Vzorek byl mechanicky skenován a přítomné komety byly zachyceny CCD kamerou (Olympus, Japan). Snímky byly následně vyhodnoceny pomocí softwaru CometScore 2.0.

4.11 Statistické zpracování dat

Výsledné hodnoty byly určeny pomocí průměru a standardní odchylky z 6 (MTT test a produkce ROS pro neošetřené buňky), 3 (MTT test a produkce ROS pro buňky ošetřené UV protektivními látkami, poškození mitochondrií a lyzozomů pro neošetřené buňky) a 4 (poškození mitochondrií a lyzozomů pro buňky ošetřené UV protektivními látkami) nezávislých experimentů. Pro stanovení rozdílu mezi experimen-

tálními skupinami byla použita jednofaktorová analýza rozptylů (ANOVA). U Comet assay byla normalita rozdělení stanovena pomocí Wilk-Shapirova a d'Agostino-Pearsonova testu a pro stanovení rozdílu mezi experimentálními skupinami byl použit Mann-Whitney test. Pro všechny testy byla jako statisticky signifikantní uvažována p-hodnota menší než 0,05.

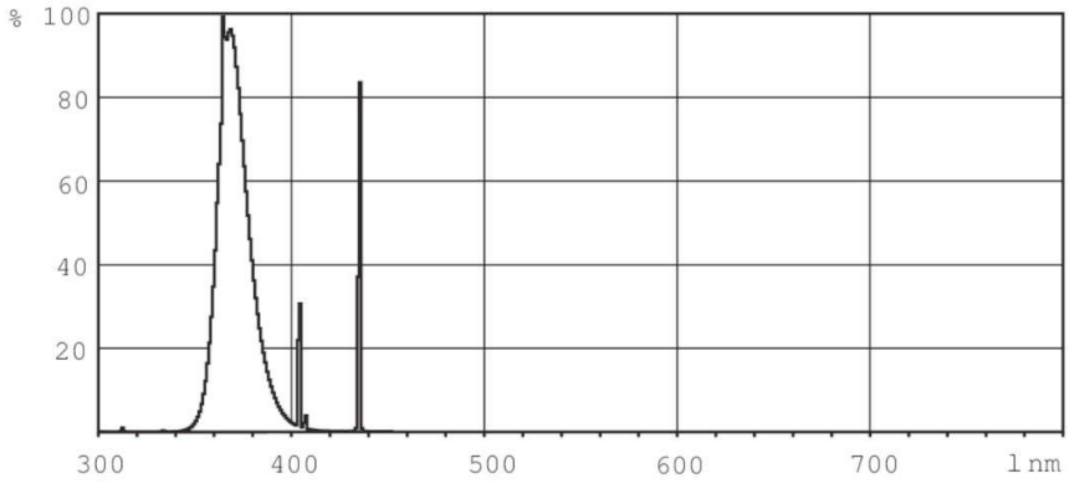
Výpočet průměrných hodnot, standardních odchylek a vyšetření normality byly provedeny v MS Excel. Stanovení rozdílu mezi experimentálními skupinami bylo provedeno v prostředí OriginPro. Data byla vizualizována pomocí nástroje gnuplot.

5 Výsledky

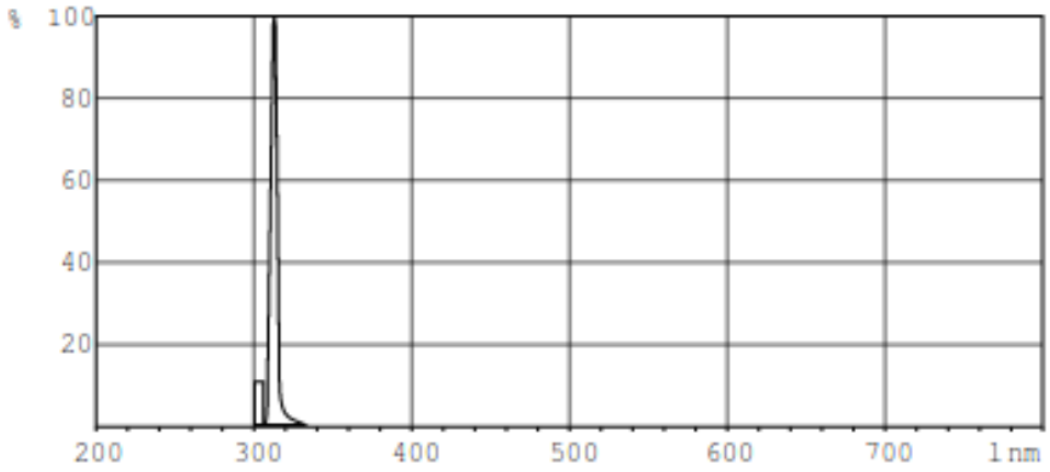
5.1 Charakteristiky zdrojů UV záření

5.1.1 Spektrum zdrojů

Vyzařovací charakteristiky zdrojů udané výrobcem jsou vyobrazeny na Obr. 5.1 pro zdroj UVA záření a na Obr. 5.2 pro zdroj UVB záření. Vyzařovací charakteristiky zdrojů byly experimentálně ověřeny v Chalupníková (2020) a v UV oblasti se změřená spektra zcela shodují se spektry udávanými výrobcem.



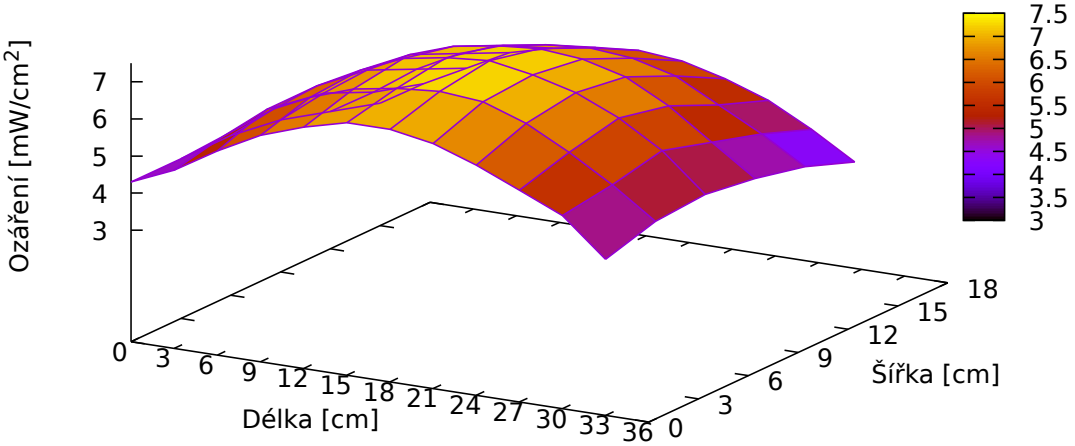
Obr. 5.1: Vyzařovací charakteristika zdroje UVA záření uváděná výrobcem. Převzato z `https://www.assets.signify.com/is/content/PhilipsLighting/fp927903421007-pss-global`.



Obr. 5.2: Vyzařovací charakteristika zdroje UVB záření uváděná výrobcem. Převzato z `https://www.assets.signify.com/is/content/PhilipsLighting/fp927903400121-pss-global`.

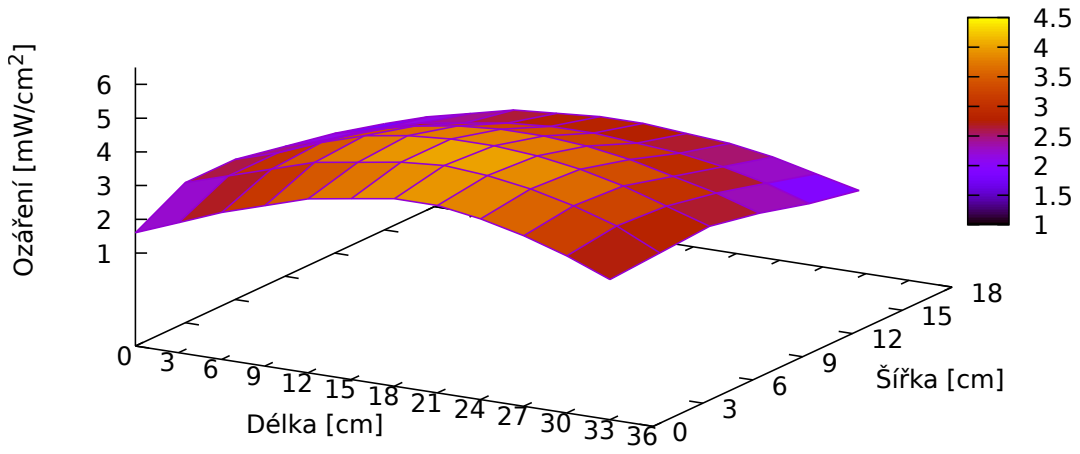
5.1.2 Homogenita vyzařování zdrojů

Pro vhodné rozmístění vzorků při ozařování tak, aby byly všechny vzorky vystaveny stejné dávce UV záření a byl eliminován vznik systematické chyby měření, byla proměřena homogenita vyzařování zdrojů.



Obr. 5.3: Ozáření plochy ve vzdálenosti 20 cm pod zdrojem UVA.

UVA, resp. UVB, sondou bylo proměřeno pole o rozměrech 36×18 cm ve vzdále-



Obr. 5.4: Ozáření plochy ve vzdálenosti 20 cm pod zdrojem UVB.

nosti 20 cm od zdroje záření. Sonda má rozměr 3×3 cm, a tak jsme obdrželi informaci o ozáření v 72 bodech plochy pod zdrojem. Ozáření měřeného pole zdrojem UVA je vyobrazeno na Obr. 5.3, zdrojem UVB pak na Obr. 5.4. V obou případech jsou jednotlivé naměřené hodnoty reprezentovány body mřížky.

Výsledky ukázaly, že rozložení ozáření zdroje není zcela homogenní, zejména v delším rozměru se vždy 2 krajní hodnoty lišily od ostatních. V kratším rozměru docházelo k poklesu hodnot pouze na jednom okraji pole. Z toho důvodu byla za dostatečně homogenní pro účely dalších experimentů označena plocha přibližně 24×15 cm. To v praxi odpovídá možnosti umístění necelých tří kultivačních destiček, jejichž rozměr je 8,6×12,8 cm. V následujících experimentech proto byly zároveň ozařovány 2–3 kultivační destičky.

Pomocí aritmetického průměru a směrodatné odchylky hodnot v dostatečně homogenní oblasti byla stanovena hodnota ozáření zdrojem UVA ve vzdálenosti 20 cm nad povrchem jako

$$E_A^{(20)} = 6,5 \pm 0,5 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}. \tag{5.1}$$

Obdobným způsobem byla stanovena hodnota ozáření zdrojem UVB ve vzdále-

nosti 20 cm nad povrchem jako

$$E_B^{(20)} = 3,4 \pm 0,4 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}. \tag{5.2}$$

Hodnoty ozáření zdroji ve vzdálenosti 11,5 cm nad povrchem byly stanoveny výpočtem průměru a standardní odchylky. Průměrné ozáření zdrojem UVA ve vzdálenosti 11,5 cm nad povrchem bylo stanoveno jako

$$E_A^{(11,5)} = 10,5 \pm 2,4 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2} \tag{5.3}$$

a zdrojem UVB ve vzdálenosti 11,5 cm nad povrchem jako

$$E_B^{(11,5)} = 5,6 \pm 1,3 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}. \tag{5.4}$$

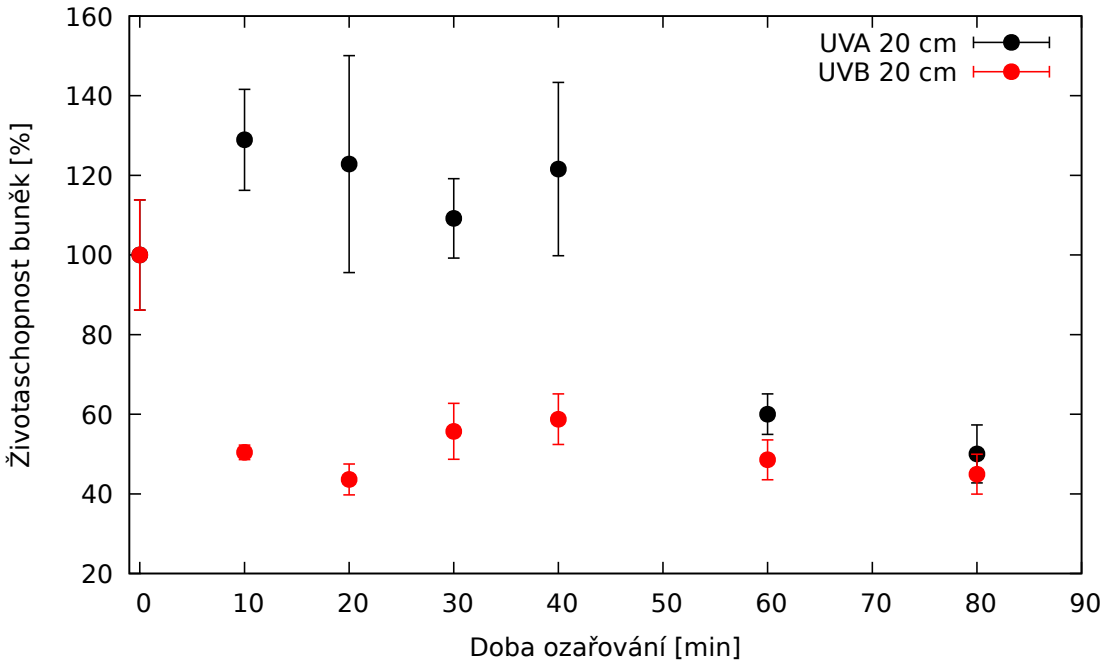
5.2 Studium poškození buněk UV zářením

5.2.1 Stanovení životaschopnosti buněk

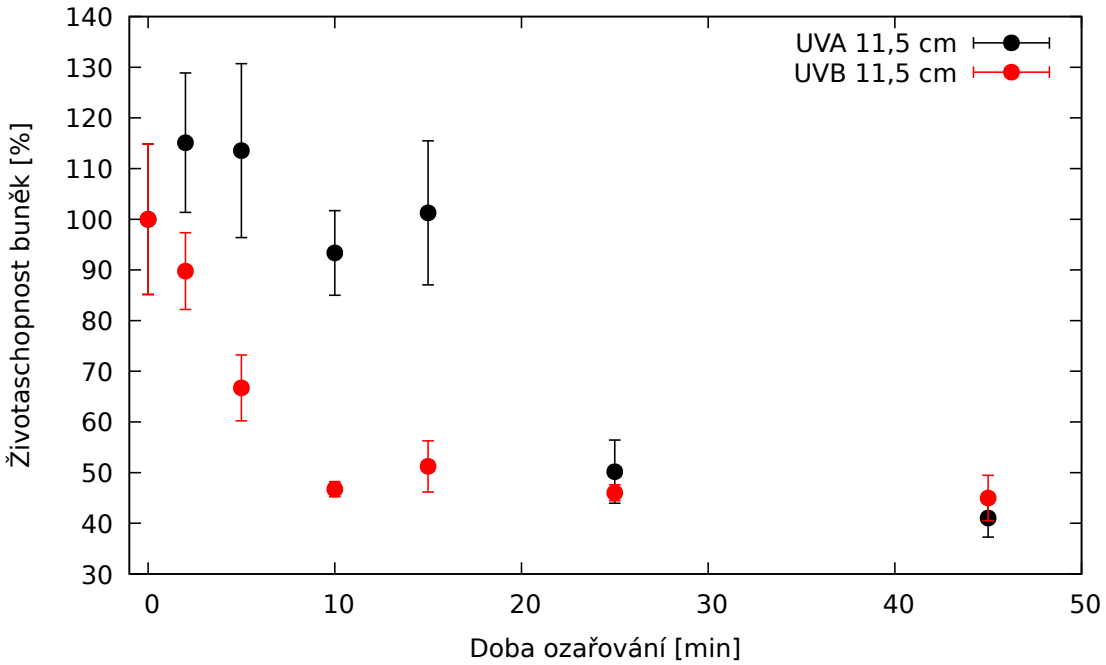
Cílem tohoto měření bylo stanovit vliv expozice UVA a UVB záření na životaschopnost HaCaT buněk v závislosti na ozáření, které je reprezentováno výškou umístění zdroje, a době ozařování. Měření bylo provedeno v 96-jamkových destičkách, přičemž jamky po obvodu destičky nebyly využity, aby bylo zamezeno vzniku artefaktů. Životaschopnost buněk byla stanovena pomocí MTT testu.

Na Obr. 5.5 můžeme pozorovat životaschopnost buněk, které byly ozařovány zdrojem UVA či UVB umístěným ve výšce 20 cm nad povrchem, a to po dobu 0, 10, 20, 30, 40, 60 a 80 minut. Z naměřených dat je zřejmé, že životaschopnost buněk po ozáření zdrojem UVA rapidně klesá v intervalu doby ozařování 40–60 minut, což ze vztahu (2.3) odpovídá intervalu dávek $D_{A,40}^{(20)} = 15,6 \pm 1,2 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ až $D_{A,60}^{(20)} = 23,4 \pm 1,8 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$, a při ozařování delším než 60 minut již dochází jen k mírnému poklesu. Životaschopnost buněk ozářených zdrojem UVB klesla na 50% úroveň již v průběhu prvních 10 minut, což ze vztahu (2.3) odpovídá dávce $D_{B,10}^{(20)} = 2,0 \pm 0,2 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$.

Na Obr. 5.6 můžeme pozorovat životaschopnost buněk, které byly ozařovány zdrojem UVA či UVB umístěným ve výšce 11,5 cm nad povrchem, a to po dobu 0, 2,



Obr. 5.5: Životaschopnost buněk ozářených zdrojem UVA a zdrojem UVB umístěným ve výšce 20 cm nad povrchem 24 hodin po ozáření. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a standardní odchylka ($n = 6$).



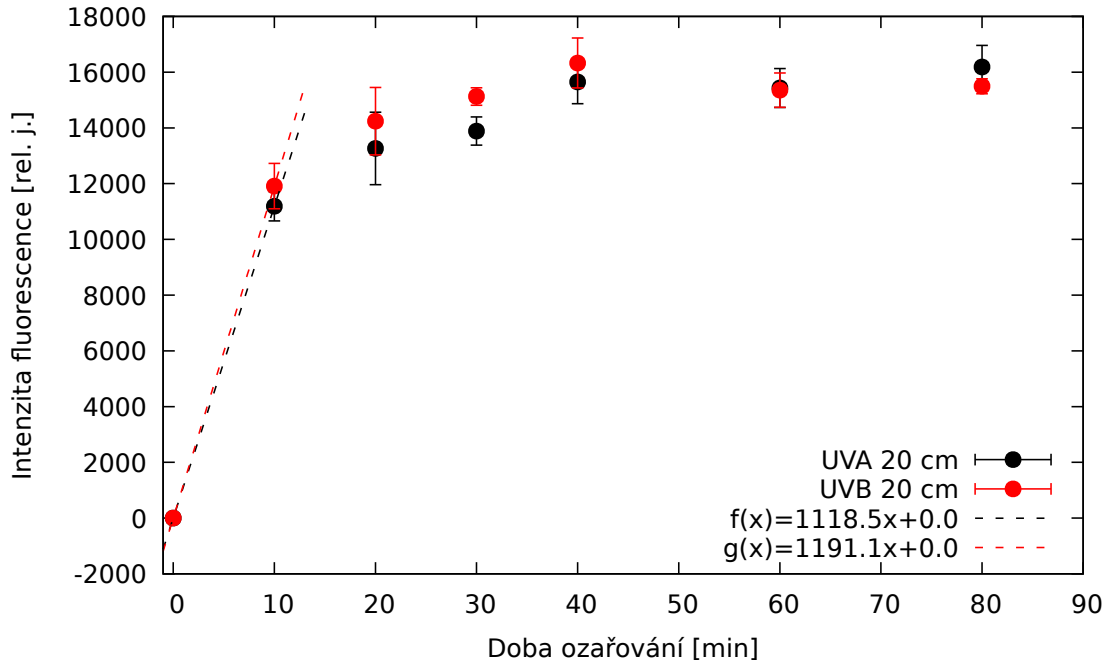
Obr. 5.6: Životaschopnost buněk ozářených zdrojem UVA a zdrojem UVB umístěným ve výšce 11,5 cm nad povrchem 24 hodin po ozáření. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a standardní odchylka ($n = 6$).

5, 10, 15, 25 a 45 minut. K poklesu životaschopnosti buněk ozářených zdrojem UVA dochází již po 10 minutách ozařování, pokles pod 50% hranici však nastává až v in-

tervalu 15–25 minut, tj. ze vztahu (2.3) při dávkách mezi $D_{A,15}^{(11,5)} = 9,5 \pm 2,2$ J $\cdot$ cm^{-2} a $D_{A,25}^{(11,5)} = 15,8 \pm 3,6$ J $\cdot$ cm^{-2}. Životaschopnost buněk ozářených zdrojem UVB postupně klesá v průběhu prvních deseti minut expozice, po 10 minutách, což ze vztahu (2.3) odpovídá dávce $D_{B,10}^{(11,5)} = 3,4 \pm 0,8$ J $\cdot$ cm^{-2}, dochází k poklesu pod 50% hranici a zůstává přibližně konstantní.

5.2.2 Stanovení produkce ROS

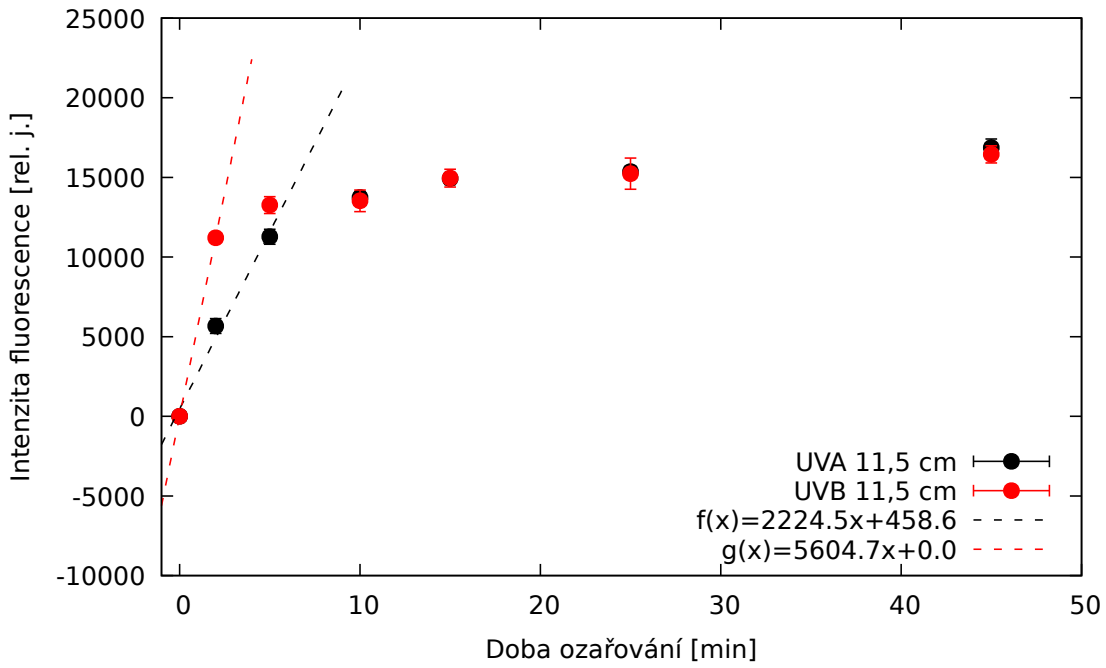
Cílem tohoto měření bylo stanovit vliv expozice UVA a UVB záření na produkci ROS v HaCaT buňkách v závislosti na ozáření, které je reprezentováno výškou umístění zdroje, a době ozařování. Měření bylo provedeno v 96-jamkových destičkách, přičemž jamky po obvodu destičky nebyly využity, aby bylo zamezeno vzniku artefaktů. Produkce ROS v buňkách byla stanovena měřením pomocí fluorescenční značky CM-H_2DCFDA.



Obr. 5.7: Stanovení produkce ROS v buňkách ozářených zdrojem UVA a zdrojem UVB umístěným ve výšce 20 cm nad povrchem pomocí fluorescenční značky DCF. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a standardní odchylka ($n = 6$).

Na Obr. 5.7 můžeme pozorovat produkci ROS v buňkách, které byly ozařovány zdrojem UVA či UVB umístěným ve výšce 20 cm nad povrchem, a to po dobu 0, 10, 20, 30, 40, 60 a 80 minut. Můžeme zde pozorovat prudký nárůst měřené intenzity fluorescence v průběhu prvních 10 minut při ozařování zdrojem UVA i UVB. Po dobu

dalších 20–30 minut fluorescenční signál roste. Po 40 minutách expozice došlo v obou případech k nasycení fluorescenční sondy. Produkce ROS v buňkách roste mírně rychleji při ozáření zdrojem UVB než při ozáření zdrojem UVA.



Obr. 5.8: Stanovení produkce ROS v buňkách ozářených zdrojem UVA a zdrojem UVB umístěným ve výšce 11,5 cm nad povrchem pomocí fluorescenční značky DCF. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a standardní odchylka ($n = 6$).

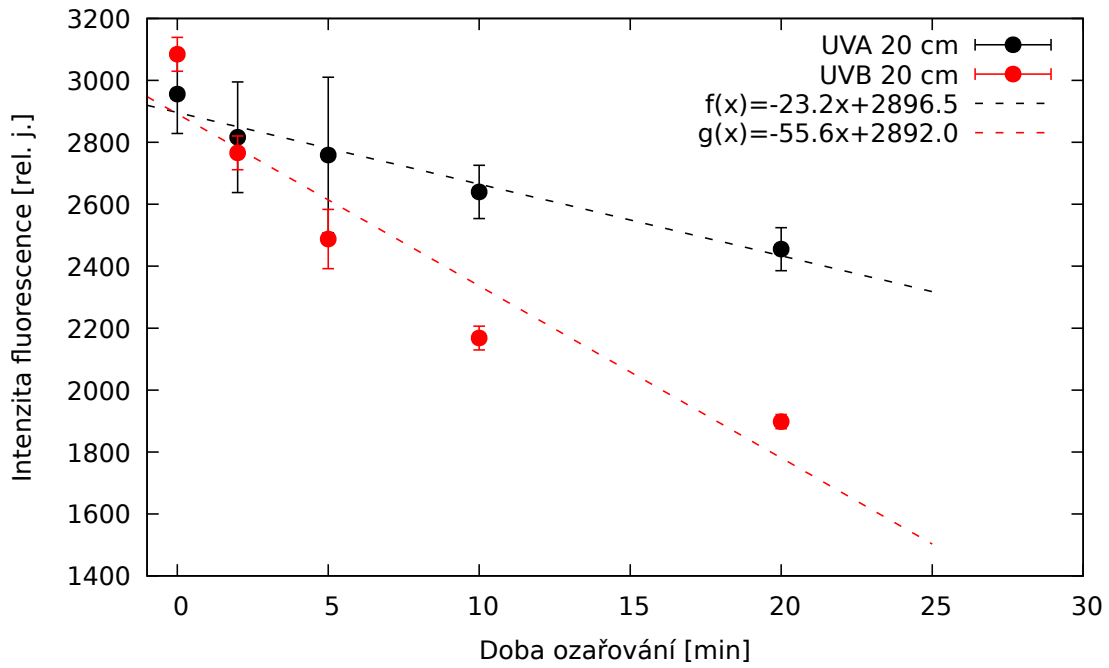
Získaný fluorescenční signál je přímo úměrný množství ROS produkovaných v buňkách. Na Obr. 5.8 můžeme pozorovat produkci ROS v buňkách, které byly ozařovány zdrojem UVA či UVB umístěným ve výšce 11,5 cm nad povrchem, a to po dobu 0, 2, 5, 10, 15, 25 a 45 minut. Fluorescenční signál měřený v buňkách ozářených zdrojem UVB dosahuje saturační hodnoty značky již po 5 minutách ozařování, u buněk ozářených zdrojem UVA dochází k saturaci značky po 10 minutách ozařování. Produkce ROS v buňkách roste rychleji při ozáření zdrojem UVB než při ozáření zdrojem UVA.

Změna intenzity fluorescence v čase pro oba typy záření je reprezentována regresní křivkou získanou proložením hodnot, u kterých nedochází ke zkreslení závislosti v důsledku nasycení fluorescenční značky. Pro zdroje ve výšce 20 cm nad povrchem na Obr. 5.7 dostáváme velmi podobné parametry křivky pro oba zdroje záření. Pro zdroje ve výšce 11,5 cm nad povrchem na Obr. 5.8 je křivka získaná pro UVB více než dvakrát strmější v porovnání s křivkou pro UVA.

5.2.3 Stanovení poškození mitochondrií

Cílem tohoto měření bylo stanovit vliv expozice buněk UVA a UVB záření na poškození jejich mitochondrií. Buňky ve 48-jamkových destičkách byly v obou případech vystaveny 6 různým dávkám záření, které jsou reprezentovány dobou ozařování. Ozařování bylo provedeno po 0, 2, 5, 10 a 20 minut pro UVA i UVB. Míra poškození mitochondrií (změna mitochondriálního membránového potenciálu) byla stanovena pomocí fluorescenční značky JC-1.

Výsledné hodnoty intenzity fluorescence JC-1 jsou vyobrazeny na Obr. 5.9. Získaný fluorescenční signál je přímo úměrný počtu nepoškozených mitochonidrií v buňce, a tak klesající signál představuje zvyšující se poškození mitochondrií. Na základě informací nabytých při studiu problematiky očekáváme, že s rostoucí dobou ozařování bude růst poškození mitochondrií. Regresní křivka byla stanovena proložením změřených hodnot. Získaná regresní křivka v obou případech potvrzuje předpoklad, že poškození mitochondrií s rostoucí dávkou UV záření narůstá.

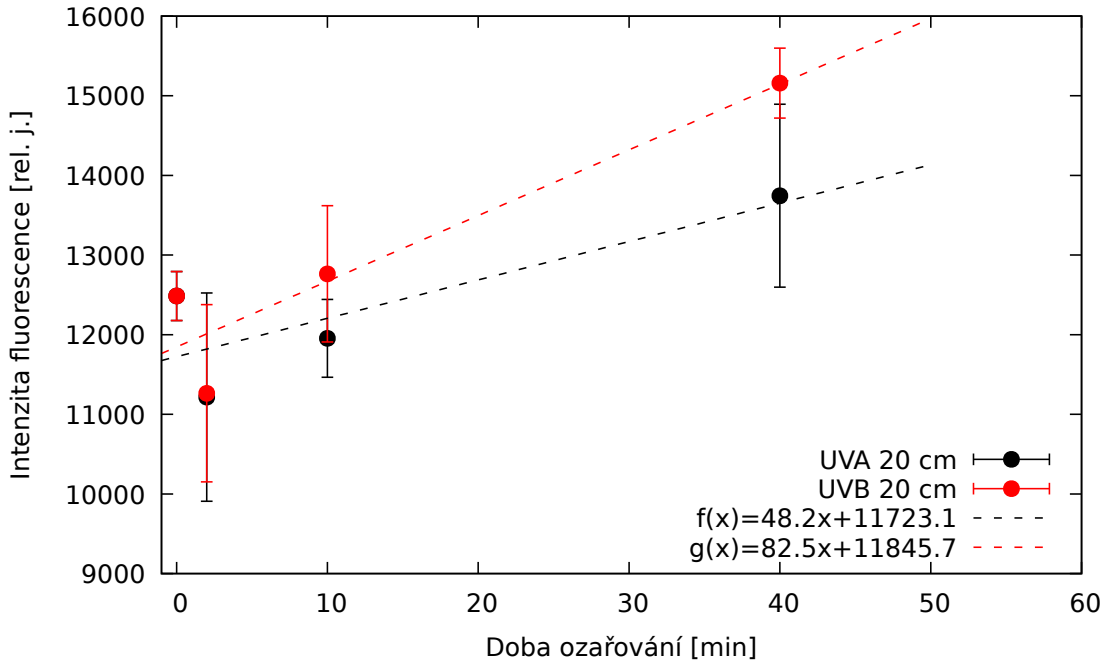


Obr. 5.9: Stanovení míry poškození mitochondrií v buňkách ozářených zdrojem UVA a zdrojem UVB umístěným ve výšce 20 cm nad povrchem pomocí fluorescenční značky JC-1. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a standardní odchylka ($n = 3$).

5.2.4 Stanovení poškození lyzosomů

Cílem toho měření bylo stanovit vliv UVA a UVB záření na poškození lyzosomů v HaCaT buňkách. Buňky ve 48-jamkových destičkách byly vystaveny UVA a UVB záření po dobu 0, 2, 10 a 40 minut. Míra poškození lyzosomů byla stanovena pomocí fluorescenční značky Akridinová oranž.

Výsledky pro poškození lyzosomů reprezentované jako intenzity fluorescence Akridinové oranže jsou vyobrazeny na Obr. 5.10. Jelikož s poškozením lyzosomů dochází k zesílení zelené fluorescence a poklesu červené fluorescence, představuje pozorovaný nárůst fluorescenčního signálu pro emisi při vlnové délce 525 nm (tj. v oblasti zeleného světla) nárůst poškození lyzosomů. Regresní křivky, které vznikly proložením dat pomocí lineární funkce, pro buňky ozářené UVA i UVB ukazují nárůst poškození, což je v souladu s předpokladem. Poškození v důsledku působení dávky UVB jsou rozsáhlejší v porovnání se stejnou dávkou UVA.



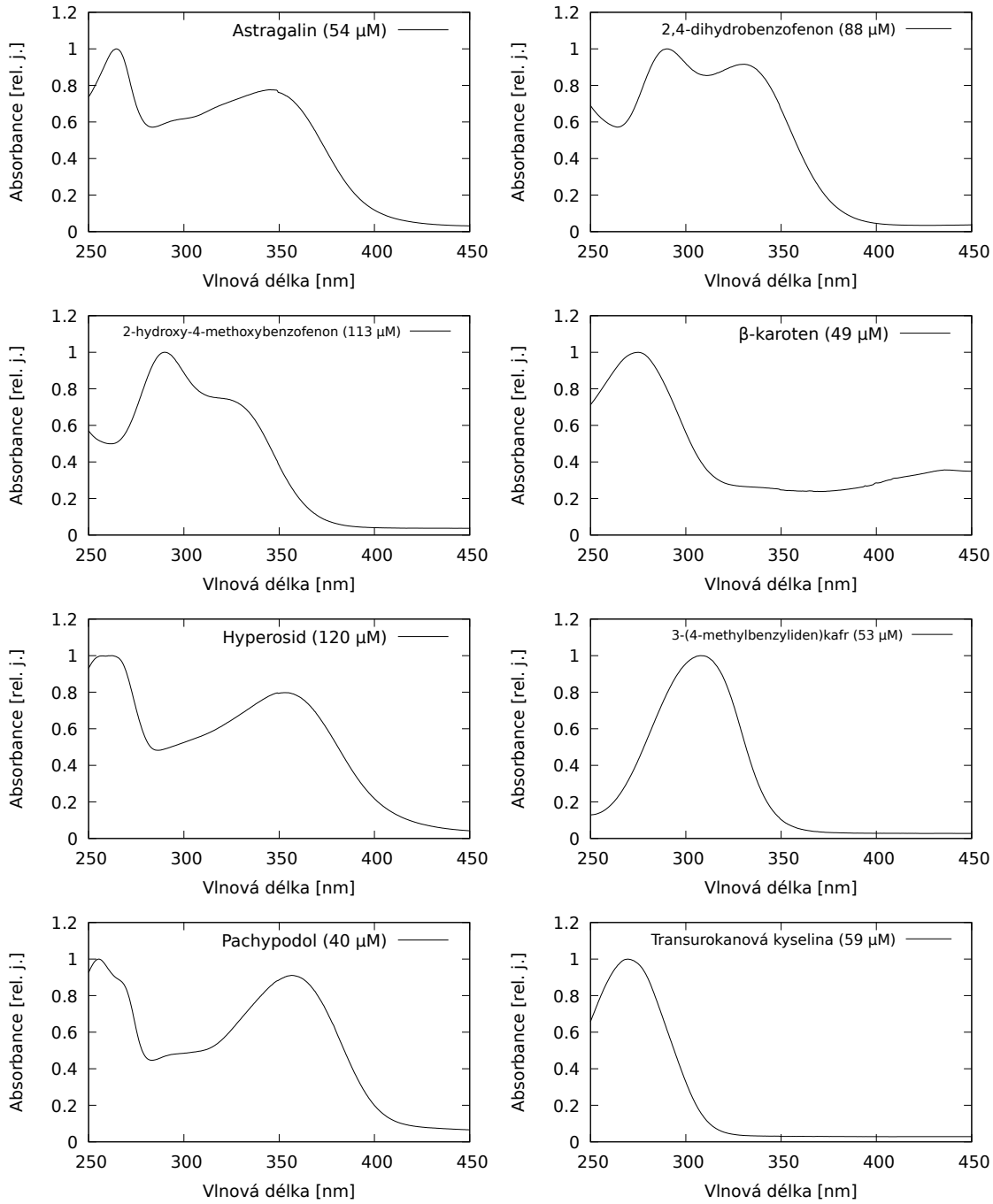
Obr. 5.10: Stanovení míry poškození lyzosomů v buňkách ozářených zdrojem UVA a zdrojem UVB umístěným ve výšce 20 cm nad povrchem pomocí fluorescenční značky Akridinová oranž. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a standardní odchylka ($n = 3$).

5.3 Studium účinku UV protektivních látek

5.3.1 Absorpční spektra studovaných látek

V případě organických UV protektivních látek je podstatou účinku absorpce záření v UV oblasti. Z toho důvodu je vhodné změřit absorpční spektra studovaných UV protektivních látek pomocí spektrofotometru a zjistit, zda zkoumané látky absorbují v UV oblasti, případně zda absorbují UVA nebo UVB. UVB záření je definováno jako elektromagnetické záření v rozsahu vlnových délek 280–315 nm, UVA1 odpovídá rozsahu 315–340 nm a UVA2 rozsahu 340–400 nm.

Transurokanová kyselina absorbuje pouze v UVB oblasti, v UVA oblasti absorbuje pouze zanedbatelné množství záření. Podobně i β-karoten má absorpční maximum v UVB oblasti, nicméně absorbuje i část UVA záření. Astragalin, 2,4-dihydroxybenzofenon a hyperosid absorbují v celém rozsahu vlnových délek UV záření. 2-hydroxy-4-methoxybenzofenon a 3-(4-methylbenzyliden)kafr absorbují v oblasti UVB a UVA1. Pachypodol absorbuje v celém rozsahu UVA, slaběji i v oblasti UVB.



Obr. 5.11: Normovaná absorpční spektra astragalinu, 2,4-dihydroxybenzofenonu, 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonu, β-karotenu, hyperosidu, 3-(4-methylbenzyliden)kafru, pachypodolu a transurokanové kyseliny v oblasti vlnových délek 250–450 nm.

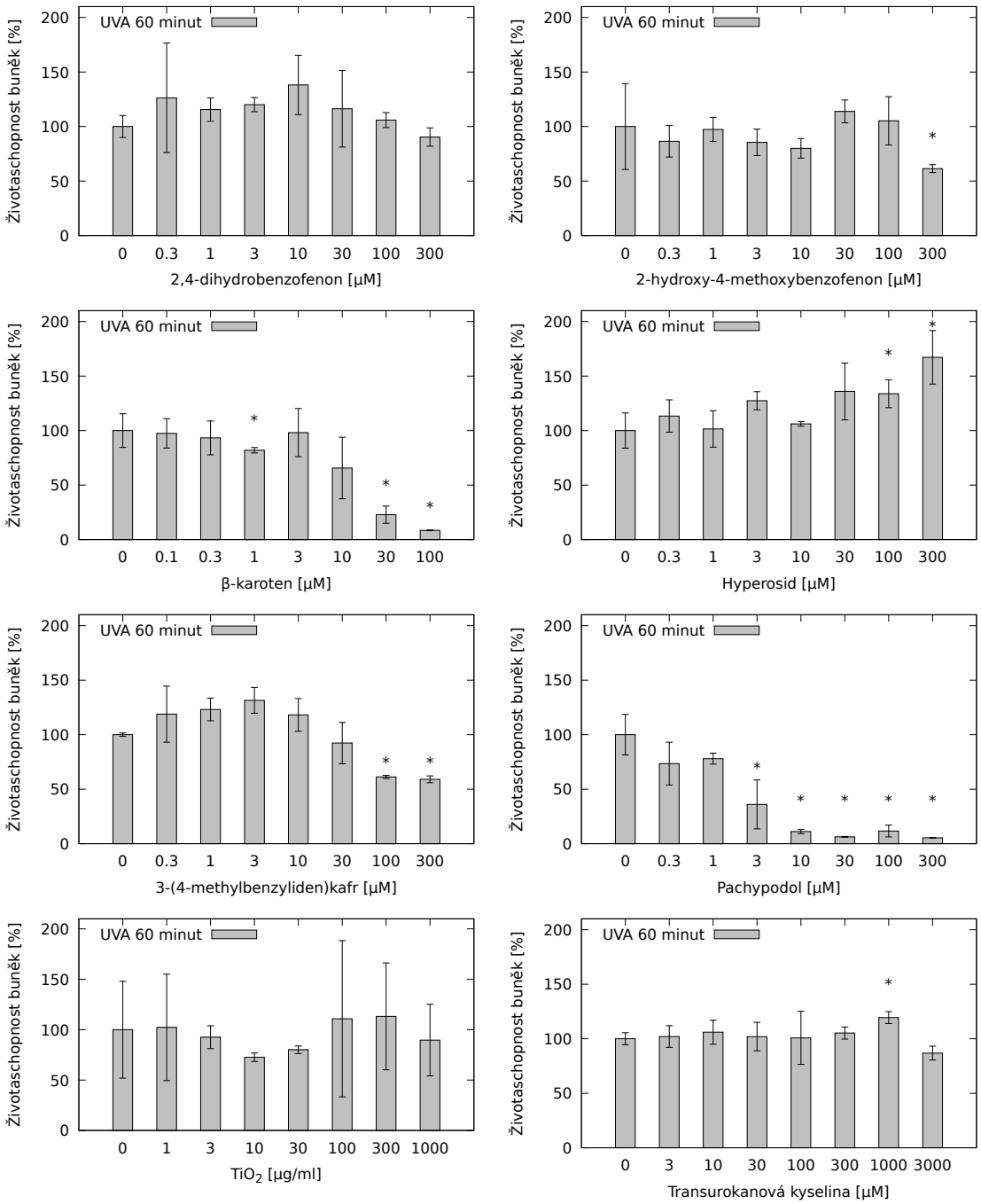
5.3.2 Stanovení životaschopnosti buněk

Cílem tohoto měření bylo stanovit vliv zvolených UV protektivních látek na míru poškození v důsledku expozice UV záření. Bylo studováno celkem 8 různých látek, přičemž každá byla aplikována v 7 různých koncentracích.

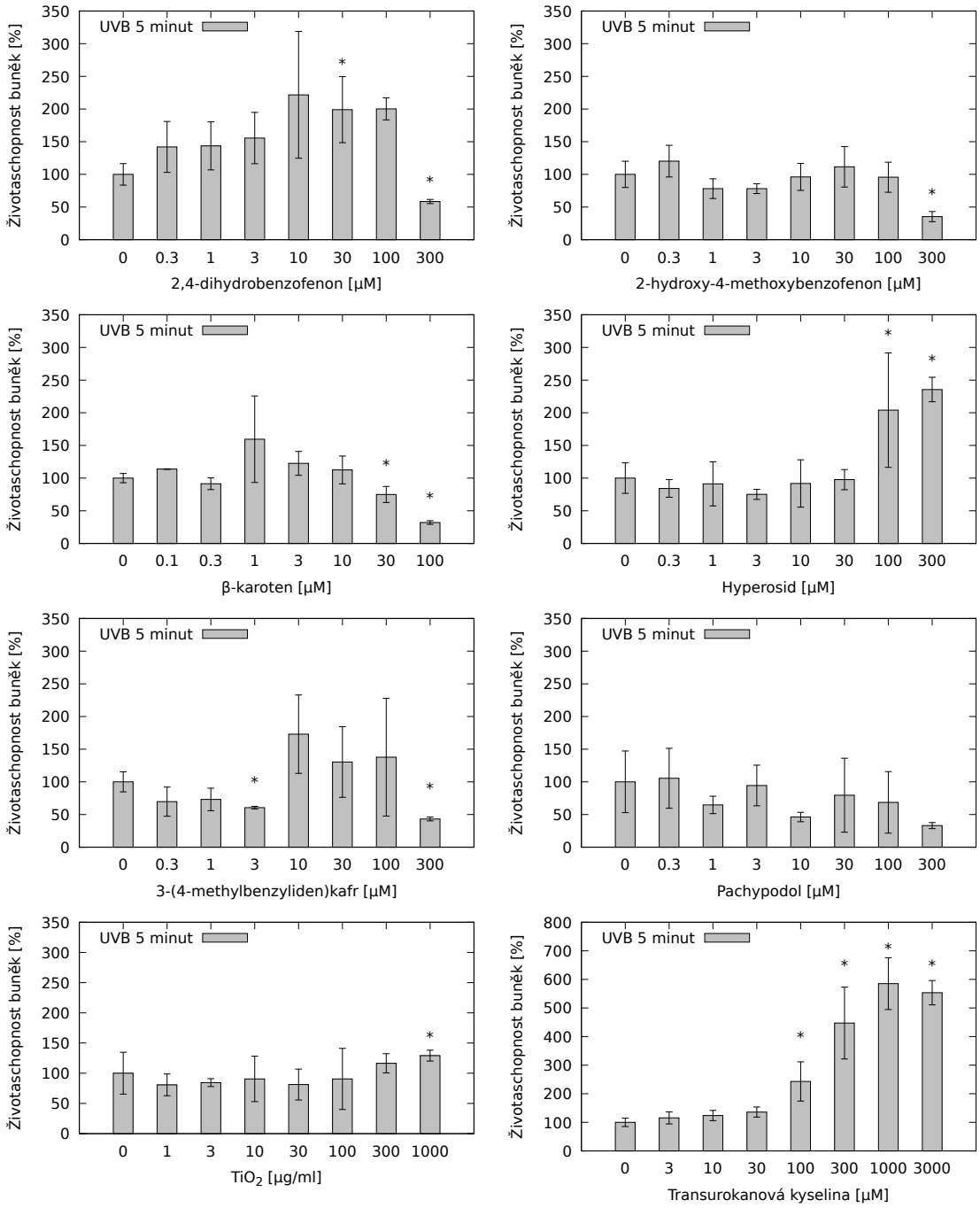
Měření bylo provedeno ve 48-jamkových destičkách, přičemž jamky po obvodu destičky nebyly využity, aby bylo zamezeno vzniku artefaktů. Ozařování zdrojem UVA probíhalo 60 minut, zdrojem UVB 5 minut. Životaschopnost buněk byla stanovena pomocí MTT testu.

5.3.2.1 Stanovení životaschopnosti po expozici UVA záření

Výsledné hodnoty absorpce formazanu reprezentující životaschopnost buněk ošetřených UV protektivními látkami v různých koncentracích po 60minutové expozici UVA jsou vyobrazeny na Obr. 5.12. Zkoumané UV protektivní látky mají vliv na životaschopnost buněk vystavených UVA záření. Ne ve všech případech však jejich aplikace vede k jejímu nárůstu, jako bychom v případě UVA protektivních látek předpokládali. Rostoucí životaschopnost buněk se zvyšující se koncentrací můžeme pozorovat pouze u buněk ošetřených hyperosidem, kde u pozorovaných koncentrací dochází k nárůstu životaschopnosti až na 170 % oproti neošetřeným buňkám. Ačkoliv je trend u buněk ošetřených hyperosidem zdánlivě rostoucí pro zvyšující se koncentraci látky, ke statisticky významnému nárůstu dochází pouze při aplikaci 100 μM a 300 μM hyperosidu. Statisticky významný nárůst životaschopnosti buněk pozorujeme také u buněk ošetřených 1000μM transurokanovou kyselinou. U všech ostatních látek nedochází ke statisticky významnému nárůstu životaschnopnosti buněk. Při aplikaci vyšších koncentrací některých látek – 300μM 2-hydroxy-4-methoxybenzofenon, 30μ a 100μM β-karoten, 100μM a 300μM 3-(4-methylbenzyliden)kafr, 3μM a koncentrovanější pachypodol – navíc dochází k poklesu životaschnopnosti buněk. Statisticky významné odchylky se také projevují v případě nanočástic TiO_2 při použití koncentrací od 100 μg/ml výše, nicméně pro velké chyby měření (až 77 %) zde není možné interpretovat, zda se jedná o rostoucí či klesající tendenci.



Obr. 5.12: Životaschopnost buněk ošetřených 2,4-dihydroxybenzofenonem, 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonem, β-karotenem, hyperosidem, 3-(4-methylbenzyliden)kafrem, pachypodolem, nanočásticemi TiO_2 a transurokanovou kyselinou, které byly ozařovány po dobu 60 minut zdrojem UVA umístěným ve výšce 20 cm nad povrchem. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a standardní odchylka ($n = 3$).



Obr. 5.13: Životaschopnost buněk ošetřených 2,4-dihydroxybenzofenonem, 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonem, β-karotenem, hyperosidem, 3-(4-methylbenzyliden)kafrem, pachypodolem, nanočásticemi TiO_2 a transurokanovou kyselinou, které byly ozařovány po dobu 5 minut zdrojem UVB umístěným ve výšce 20 cm nad povrchem. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a standardní odchylka ($n = 3$).

5.3.2.2 Stanovení životaschopnosti po expozici UVB záření

Výsledné hodnoty absorpce formazanu reprezentující životaschopnost buněk ošetřených UV protektivními látkami v různých koncentracích po 5minutové expozici UVB jsou vyobrazeny na Obr. 5.13. Ošetření zkoumanými UV protektivními látkami vede ke změnám v životaschopnosti buněk ozářených UVB. Ošetření buněk 100μ a 300μM hyperosidem, transurokanovou kyselinou o koncentraci 100 μM a vyšší a nanočásticemi TiO_2 o koncentraci 1000 μg/ml vedou k nárůstu životaschopnosti buněk. V případě aplikace hyperosidu pozorujeme nárůst na až 230 % hodnoty životaschopnosti nechráněných buněk při koncentraci 300 μM, v případě aplikace transurokanové kyseliny až na 580 % při koncentraci 1000 μM. Ostatní látky nemají na růst životaschopnosti buněk po 5minutovém ozáření UVB ve srovnání s kontrolním vzorkem žádný statisticky významný vliv. Podobně jako v případě ozařování zdrojem UVA však vyšší koncentrace některých zkoumaných látek vedou k poklesu životaschopnosti buněk. K tomu dochází při aplikaci 300μM 2,4-dihydroxybenzofenonu, 300μM 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonu, 30μM a 100μM β-karotenu a 300μM 3-(4-methylbenzyliden)kafru.

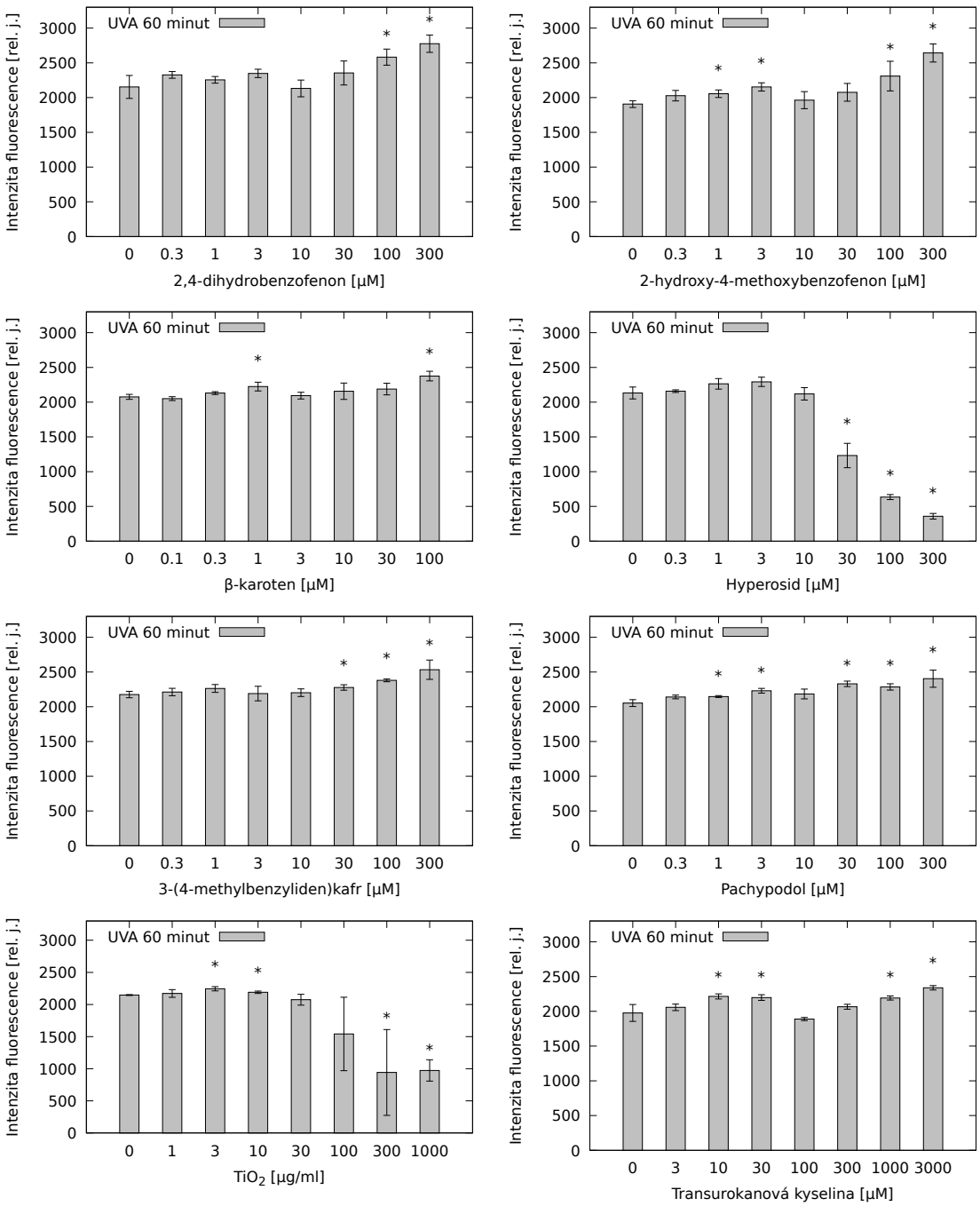
5.3.3 Stanovení produkce ROS

Cílem tohoto měření bylo stanovit vliv zvolených UV protektivních látek na produkci ROS v buňkách, ke které dochází v důsledku expozice UV záření. Bylo studováno celkem 8 různých látek, přičemž každá byla aplikována v 7 různých koncentracích.

Měření bylo provedeno ve 48-jamkových destičkách, přičemž jamky po obvodu destičky nebyly využity, aby bylo zamezeno vzniku artefaktů. Množství ROS v buňkách bylo stanoveno pomocí aplikace fluorescenční značky CM-H_2DCFDA.

5.3.3.1 Stanovení produkce ROS po expozici UVA záření

Za předpokladu, že zvolené látky skutečně působí UV protektivně a nezpůsobují sami o sobě fotooxidaci, bychom očekávali, že s rostoucí koncentrací UV protektivní látky bude množství ROS v buňkách klesat. Výsledné hodnoty intenzity fluorescence po 60minutovém ozáření buněk inkubovaných s UV protektivními látkami zdrojem



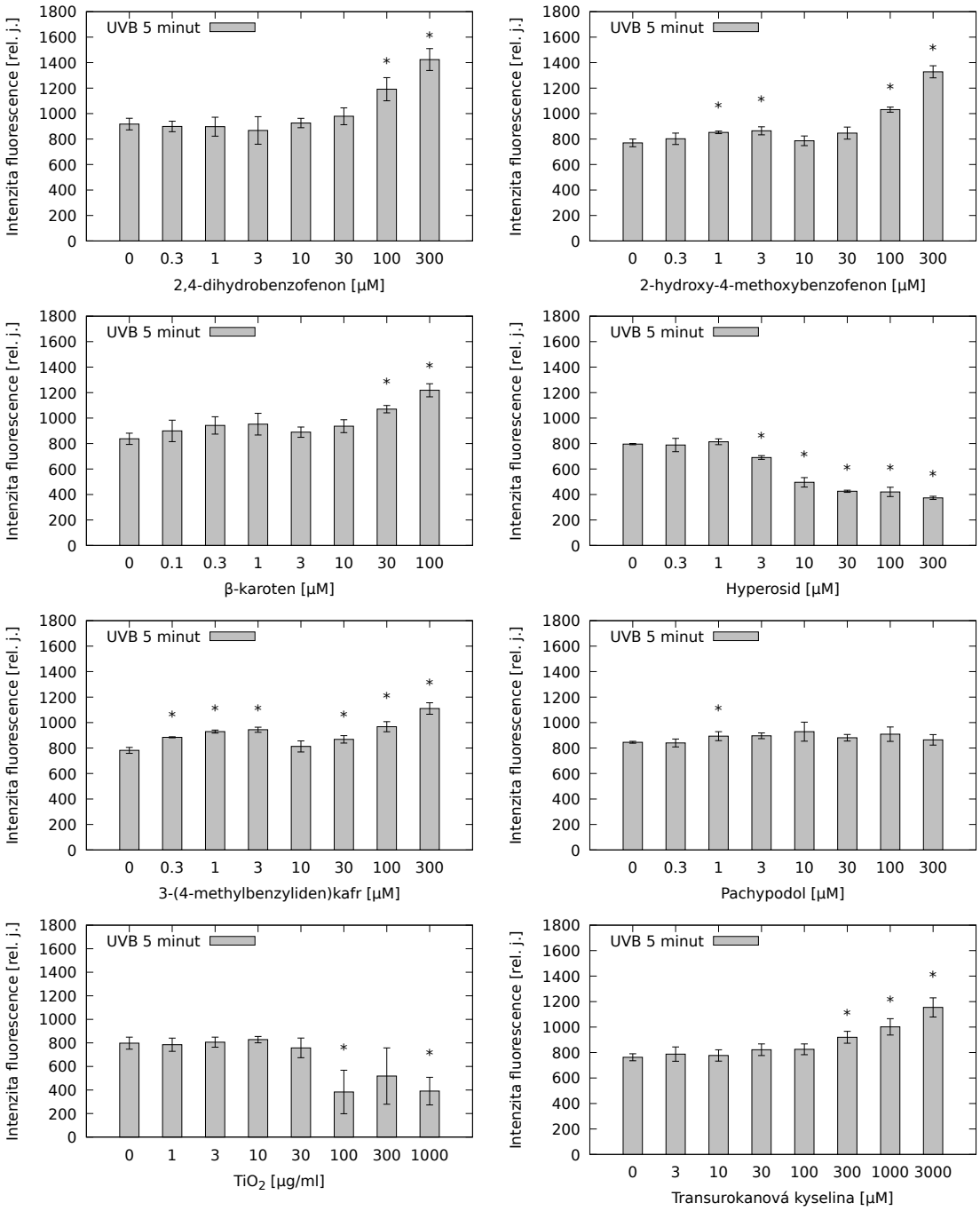
Obr. 5.14: Produkce ROS v buňkách ošetřených 2,4-dihydroxybenzofenonem, 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonem, β-karotenem, hyperosidem, 3-(4-methylbenzyliden)kafrem, pachypodolem, nanočásticemi TiO_2 a transurokanovou kyselinou, které byly ozařovány po dobu 60 minut zdrojem UVA umístěným ve výšce 20 cm nad povrchem. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a standardní odchylka ($n = 3$).

UVA, které reprezentují množství ROS produkované v buňkách, jsou vyobrazeny na Obr. 5.14.

Předpokládaný pokles zde pozorujeme pouze u buněk ošetřených hyperosidem a buněk ošetřených TiO_2. Ke statisticky významnému poklesu ROS dochází při aplikaci 30μM, 100μM a 300μM hyperosidu či při aplikaci nanočástic TiO_2 o koncentraci 300 μg/ml a 1000 μg/ml. Inkubace buněk 2,4-dihydroxybenzofenonem a β-karotenem do koncentrace 30 μM včetně a 3-(4-methylbenzyliden)kafrem do koncentrace 10 μM včetně nemá na produkci ROS v buňkách v důsledku působení UVA žádný vliv, při aplikaci vyšších koncentrací dochází k nárůstu produkce ROS v buňkách. Aplikace pachypodolu a 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonu vede k nárůstu generace ROS v buňkách již při koncentracích přesahujících 0,3 μM. Ošetření buněk transurokanovou kyselinou vede při aplikaci v koncentracích 10 μM a vyšších k mírnému zvýšení produkce ROS v buňkách oproti neošetřeným buňkám.

5.3.3.2 Stanovení produkce ROS po expozici UVB záření

Výsledné hodnoty intenzity fluorescence po ozařování buněk ošetřených UV protektivními látkami zdrojem UVB po dobu 5 minut, které reprezentují množství ROS produkované v buňkách, jsou vyobrazeny na Obr. 5.15. Trendy pro jednotlivé UV protektivní látky v případě produkce ROS v buňkách vlivem UVB záření jsou velmi podobné jako v případě UVA záření. Klesající hladina ROS v buňkách s rostoucí koncentrací UV protektivní látky je pozorovatelná pouze u buněk ošetřených hyperosidem a nanočásticemi TiO_2. Ke statisticky významnému poklesu produkce ROS v buňkách po ozáření UVB dochází při ošetření buněk 3μM a koncentrovanějším hyperosidem či při aplikaci 100 μg/ml a 1000 μg/ml nanočástic TiO_2. V řadě případů nemá ošetření UV protektivními látkami na produkci ROS v buňkách žádný vliv až do překonání určité hodnoty koncentrace, kdy dochází k nárůstu produkce ROS v buňkách. To platí pro β-karoten v koncentraci do 10 μM, 2,4-dihydroxybenzofenon v koncentraci do 30 μM a transurokanovou kyselinu v koncentraci do 100 μM. V případě aplikace 3-(4-methylbenzyliden)kafru dochází k mírnému nárůstu produkce ROS v buňkách již při ošetření koncentracemi od 0,3 μM, k masivnímu nárůstu množství ROS v buňkách pak vedou koncentrace vyšší než 100 μM. Podobný trend se projevuje při aplikaci 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonu, kdy v koncetracích od



Obr. 5.15: Produkce ROS v buňkách ošetřených 2,4-dihydroxybenzofenonem, 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonem, β-karotenem, hyperosidem, 3-(4-methylbenzyliden)kafrem, pachypodolem, nanočásticemi TiO_2 a transurokanovou kyselinou, které byly ozařovány po dobu 5 minut zdrojem UVB umístěným ve výšce 20 cm nad povrchem. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a standardní odchylka ($n = 3$).

1 μM dochází k mírnému zvýšení produkce ROS a v koncentracích od 100 μM produkce ROS v buňkách prudce narůstá. Inkubace pachypodolem v libovolné použité koncentraci nevede ke změnám v produkci ROS v buňkách.

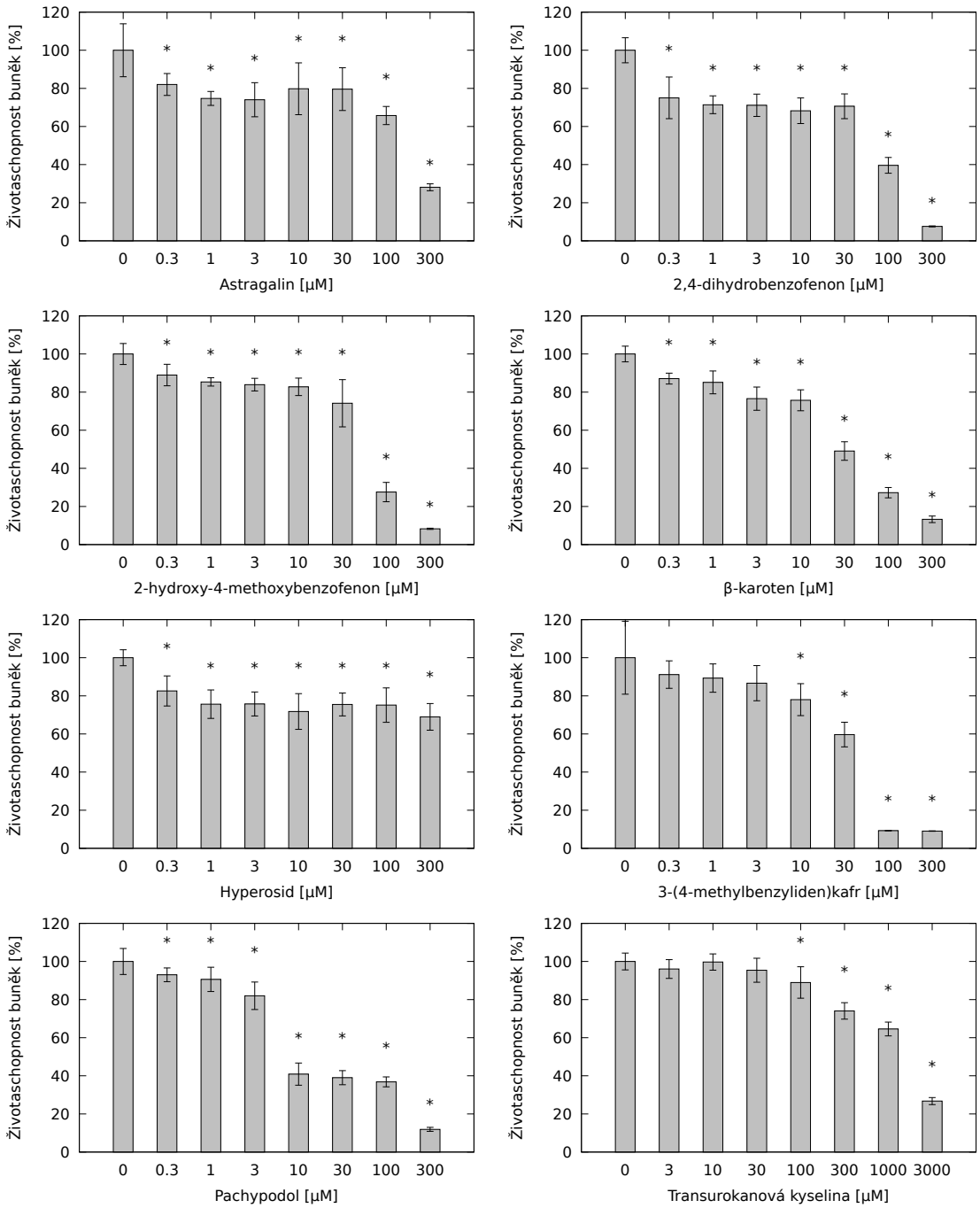
5.3.4 Toxicita UV protektivních látek

Cílem měření toxicity UV protektivních látek bylo zjistit, zda a případně v jaké míře jsou používané UV protektivní látky samy o sobě pro buňky toxické (tj. bez příspěvku UV záření).

V 96-jamkových destičkách byly HaCaT buňky inkubovány po dobu 72 hodin s 8 zkoumanými UV protektivními látkami, přičemž u každé bylo použito 7 různých koncentrací shodných s těmi, které byly použity v předcházejících experimentech. Následně byla stanovena životaschopnost buněk pomocí MTT testu.

Výsledné absorbance reprezentované jako procentuální hodnoty životaschopnosti buněk jsou vyobrazeny na Obr. 5.16. S výjimkou transurokanové kyseliny jsou všechny zkoumané UV protektivní látky i při nejnižších použitých koncentracích mírně cytotoxické. V případě transurokanové kyseliny dochází k toxickým vlivům na buňky a tímpádem ke snížení životaschopnosti až při koncentracích přesahujích 300 μM. Aplikace hyperosidu sice způsobuje mírný pokles v životaschopnosti buněk, nicméně v rozsahu zkoumaných koncentrací je tento pokles konstantní. U ostatních látek pozorujeme mírný pokles životaschopnosti buněk při inkubaci s nižšími použitými koncentracemi, který je následován prudkým poklesem životaschopnosti na hodnotu nižší než 50 % životaschopnosti kontrolního vzorku buněk. Tato koncentrace je pro astragalin 100 μM, pro 2,4-dihydroxybenzofenon 30 μM, pro 2-hydroxy-4-methoxybenzofenon 30 μM, pro β-karoten 10 μM, pro 3-(4-methylbenzyliden)kafr 30 μM, pro pachypodol 3 μM a pro transurokanovou kyselinu 1000 μM.

Abychom se v následujících experimentech vyvarovali zkreslení, které je vyvolané přirozenou cytotoxicitou zkoumaných látek, jsou ve všech následujích experimentech použity pouze koncentrace nedosahující výše uvedených hodnot.



Obr. 5.16: Životaschopnost buněk po 72hodinové inkubaci astragalinu, 2,4-dihydroxybenzofenonu, 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonu, β-karotenu, hyperosidu, 3-(4-methylbenzyliden)kafru, pachypodolu a transurokanové kyseliny. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a standardní odchylka ($n = 6$).

5.3.5 Stanovení životaschopnosti buněk

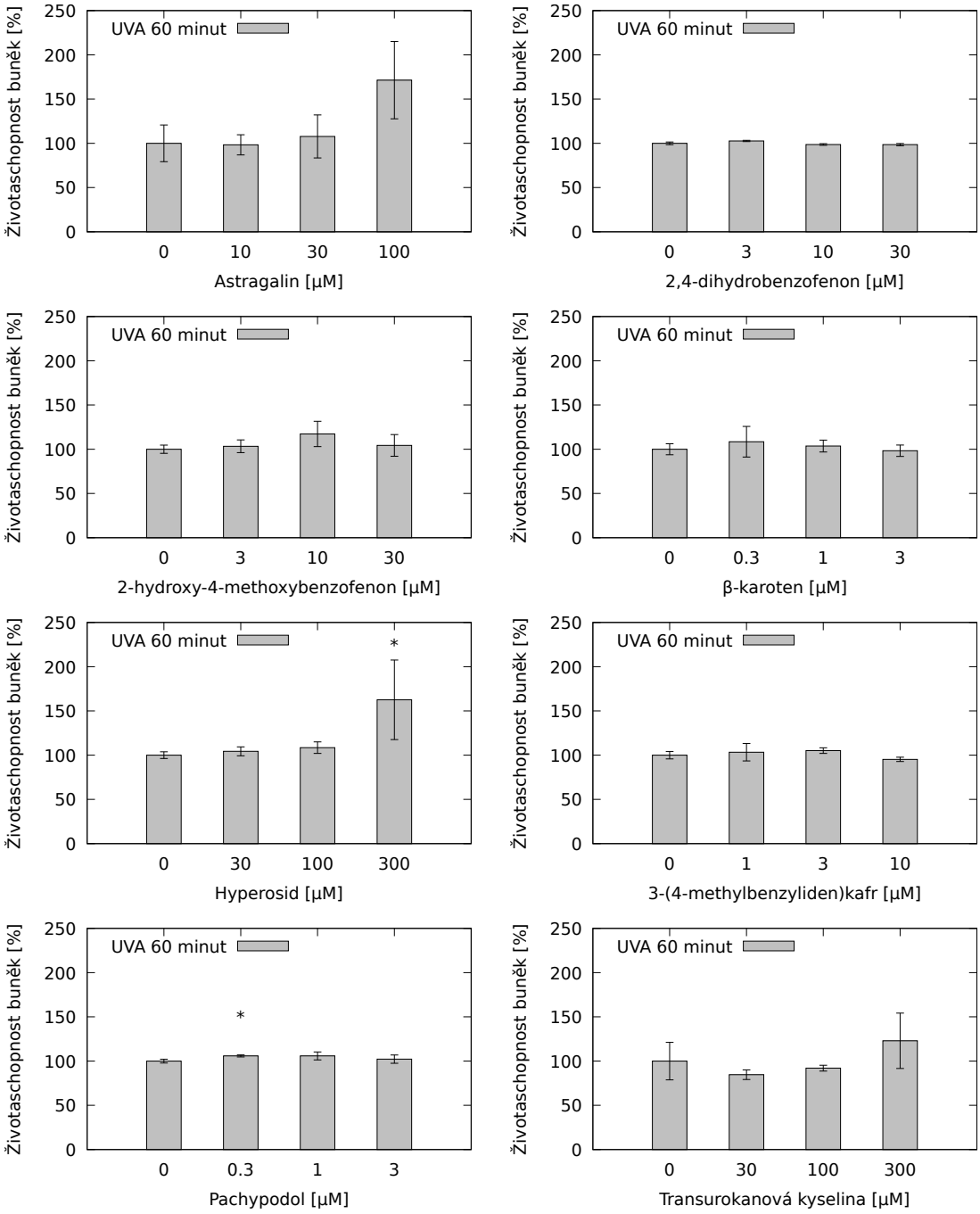
Cílem opakovaného měření životaschopnosti buněk ošetřených UV protektivními látkami po ozáření zdroji UV záření bylo zjistit, zda a v jaké míře chrání zkoumané látky HaCaT buňky před UV září, a to s aplikací již nabytých poznatků. Jelikož některé z použitých koncentrací zkoumaných UV protektivních látek působí cytotoxicky, byly tyto koncentrace pro další měření eliminovány. Dalším faktorem ovlivňujícím měření je stínění způsobené destičkami. Pro měření byly namísto 48-jamkových destiček použity nízké 12-jamkové destičky, což by mělo zajistit snížení nežádoucího efektu stínění. Ozařování zdrojem UVA probíhalo 60 minut, ozařování zdrojem UVB 3 minuty. Životaschopnost buněk byla stanovena pomocí MTT testu.

5.3.5.1 Stanovení životaschopnosti po expozici UVA záření

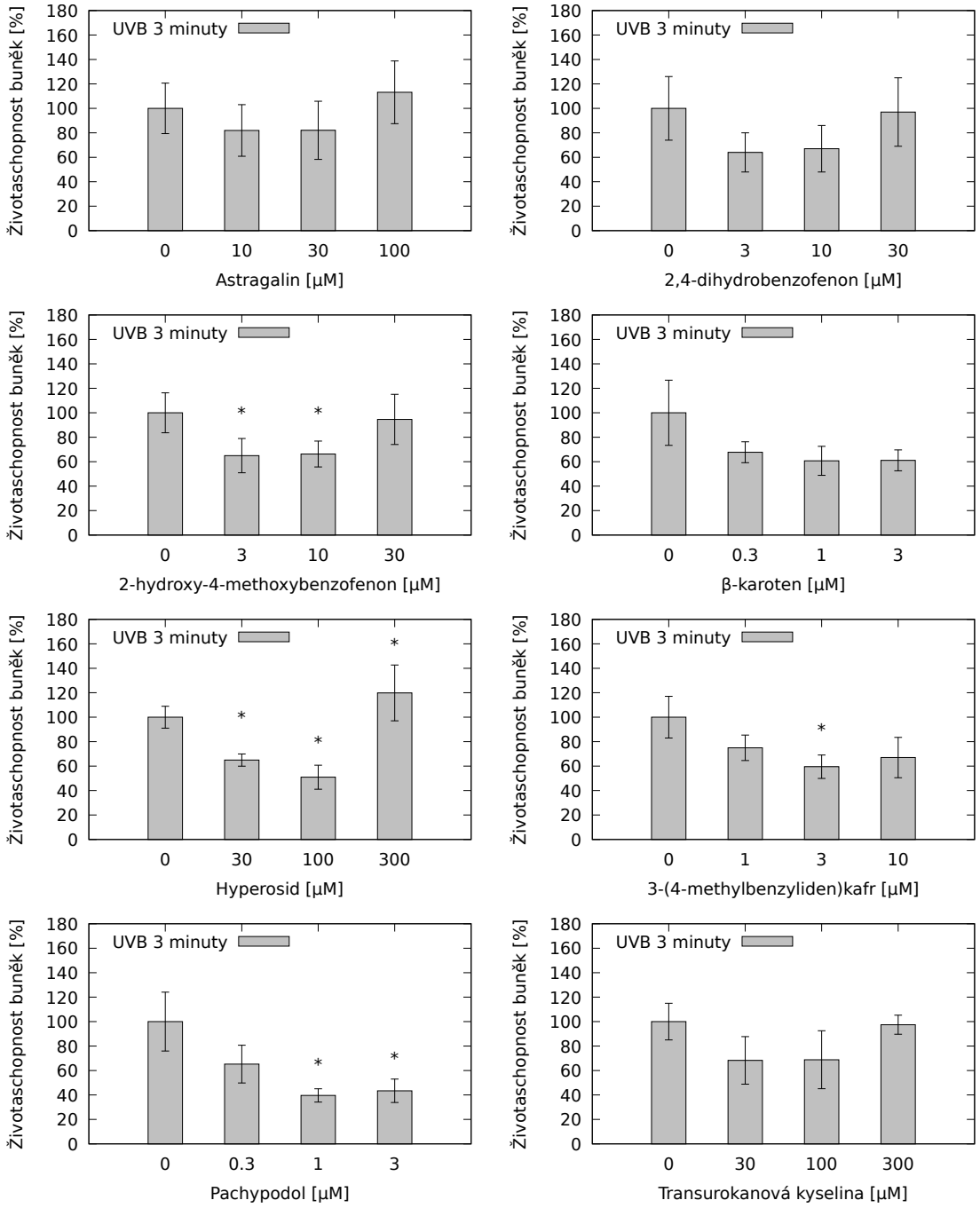
Na Obr. 5.17 jsou vyobrazeny výsledky pro měření životaschopnosti buněk, které byly ošetřeny netoxickými koncentracemi UV protektivních látek, po 60minutové expozici UVA. Podobně jako tomu bylo v předchozím měření vlivu UV protektivních látek na životaschopnost buněk vystavených působení UVA záření (Obr. 5.12) i zde pozorujeme nárůst životaschopnosti se zvyšující se koncentrací látky pouze pro hyperosid, přičemž k nárůstu životaschnopnosti oproti neošetřenému vzorku dochází při aplikaci koncentrace 100 μM a vyšší. U nově zařazené látky astragalin pozorujeme růst životaschopnosti při aplikaci vyšší koncentrace látky (100 μM) ve srovnání s nižší koncentrací 10 μM. U ostatních zkoumaných látek není při aplikaci netoxických koncentrací pozorován žádný efekt na životaschnopnost buněk ozářených zdrojem UVA.

5.3.5.2 Stanovení životaschopnosti po expozici UVB záření

Na Obr. 5.18 můžeme pozorovat výsledky stanovení životaschnopnosti buněk ošetřených netoxickými koncentracemi látek po 3 minuty trvající expozici UVB. Na rozdíl od předchozích výsledků pro 5minutovou expozici (Obr. 5.13) zde není možné pozorovat pozitivní vliv hyperosidu a transurokanové kyseliny na životaschnopnost buněk. V případě aplikace hyperosidu navíc dochází k nárůstu životaschnopnosti buněk až při aplikaci koncentrace 300 μM, nižší netoxické koncentrace vedou



Obr. 5.17: Životaschopnost buněk ošetřených astragalinem, 2,4-dihydroxybenzofenonem, 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonem, β-karotenem, hyperosidem, 3-(4-methylbenzyliden)kafrem, pachypodolem a transurokanovou kyselinou, které byly ozařovány po dobu 60 minut zdrojem UVA umístěným ve výšce 20 cm nad povrchem. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a standardní odchylka ($n = 3$).



Obr. 5.18: Životaschopnost buněk ošetřených astragalinem, 2,4-dihydroxybenzofenonem, 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonem, β-karotenem, hyperosidem, 3-(4-methylbenzyliden)kafrem, pachypodolem a transurokanovou kyselinou, které byly ozařovány po dobu 3 minut zdrojem UVB umístěným ve výšce 20 cm nad povrchem. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a standardní odchylka ($n = 3$).

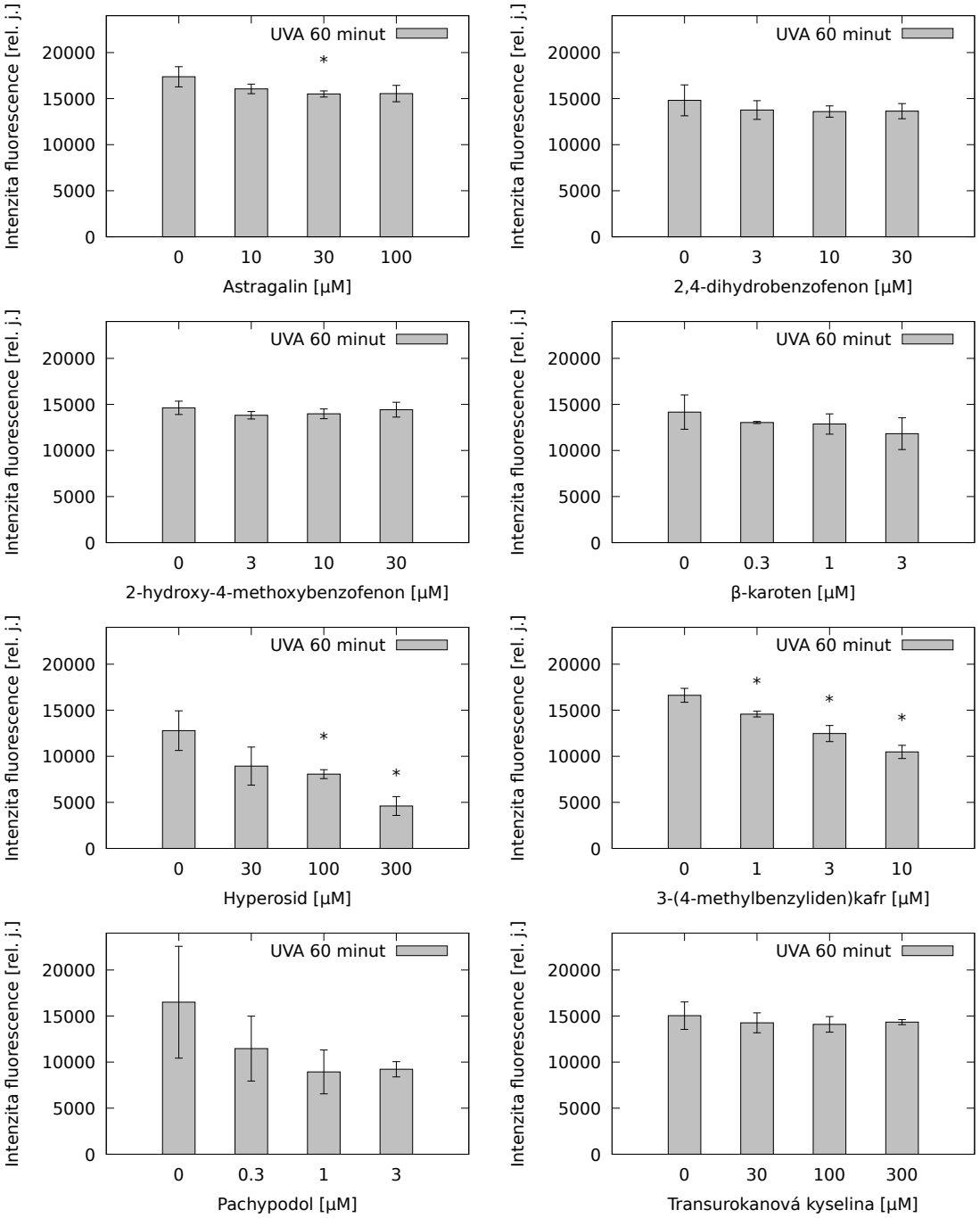
k poklesu životaschnopnosti buněk. U dalších látek jako je astragalin, 2,4-dihydroxybenzofenon, 2-hydroxy-4-methoxybenzofenon, β-karoten či transurokanové kyseliny nevede aplikace těchto látek k žádné změně životaschnopnosti buněk exponovaných UVB záření. Ošetření buněk 3-(4-methylbenzyliden)kafrem a pachypodolem vede k poklesu jejich životaschnopnosti po ozáření zdrojem UVB. V případě 3-(4-methylbenzyliden)kafru dochází k poklesu životaschnopnosti ošetřených buněk při aplikaci 3 μM látky a životaschnopnost buněk odpovídá přibližně 70 % hodnoty životaschnopnosti neošetřených buněk. U buněk ošetřených pachypodolem životaschnopnost buněk s rostoucí koncentrací pachypodolu klesá, a to až na hodnotu 40 % životaschnopnosti neošetřených buněk při aplikaci v koncentracích 1 μM a 3μM.

5.3.6 Stanovení produkce ROS

Cílem opakovaného měření produkce ROS v buňkách ošetřených UV protektivními látkami po ozáření zdroji UV záření bylo zjistit, zda a v jaké míře chrání zkoumané látky HaCaT buňky před UV zářením, a to s aplikací již nabytých poznatků. Jelikož některé z použitých koncentrací zkoumaných UV protektivních látek působí cytotoxicky, byly tyto koncentrace pro další měření eliminovány. Dalším faktorem ovlivňujícím měření je stínění způsobené destičkami. Pro měření byly namísto 48-jamkových destiček použity nízké 12-jamkové destičky, což by mělo zajistit snížení nežádoucího efektu stínění. Ozařování zdrojem UVA probíhalo 60 minut, ozařování zdrojem UVB 3 minuty. Množství ROS v buňkách bylo stanoveno pomocí fluorescenční značky H_2DCFDA.

5.3.6.1 Stanovení produkce ROS po expozici UVA záření

Výsledky měření produkce ROS v buňkách ošetřených UV protektivními látkami a vystavených působení UVA záření jsou vyobrazeny na Obr. 5.19. Inkubace buněk se zkoumanými látkami v netoxických koncentracích nevede u většiny zkoumaných látek ke změnám v produkci ROS v buňkách po ozáření zdrojem UVA. Výjimkou je inkubace buněk s hyperosidem a 3-(4-methylbenzyliden)kafrem. Ke statisticky významnému poklesu v produkci ROS vede ošetření buněk 100μM či 300μM hyperosidem či ošetření buněk 3-(4-methylbenzyliden)kafrem v libovolné z použitých

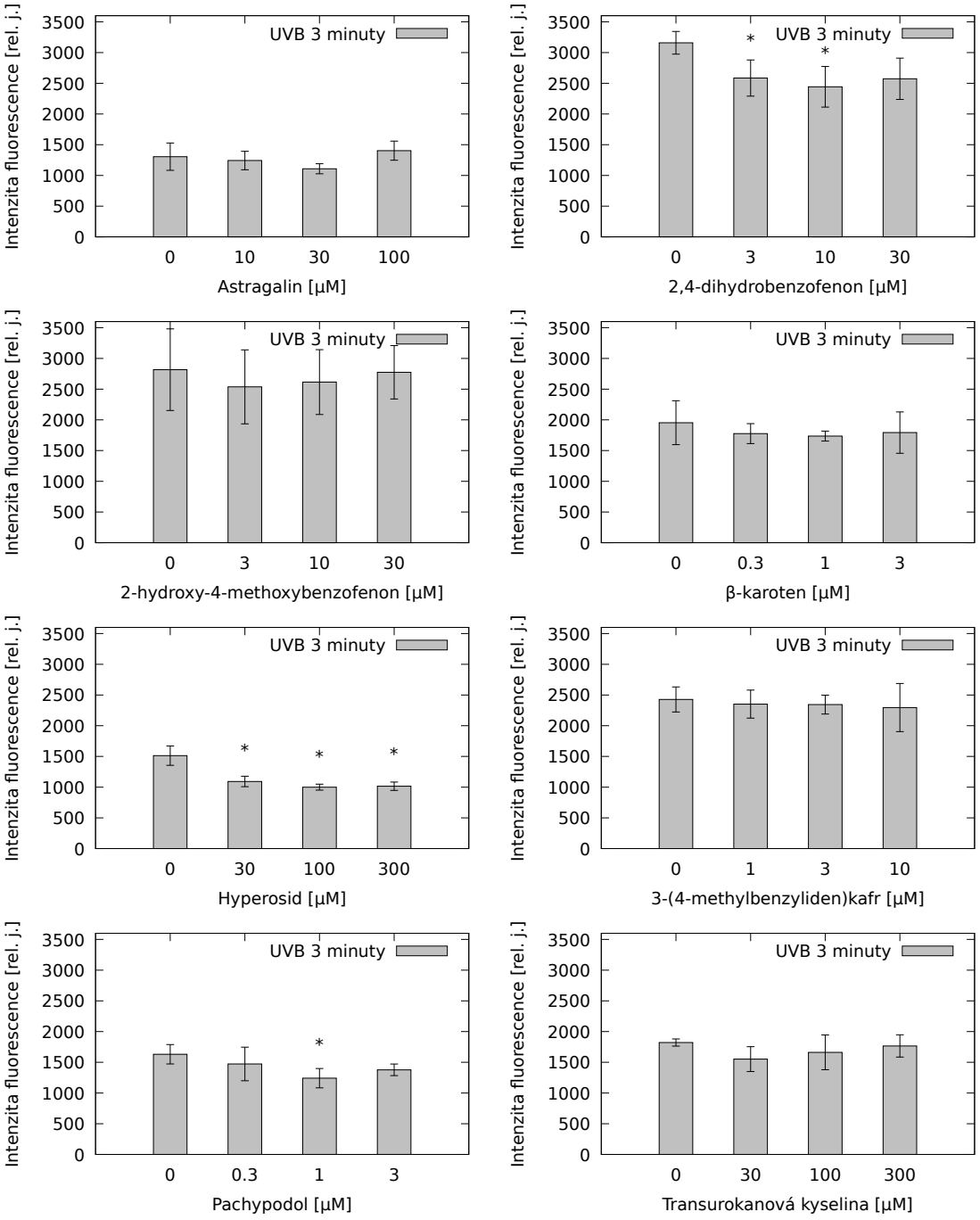


Obr. 5.19: Produkce ROS v buňkách ošetřených astragalinem, 2,4-dihydroxybenzofenonem, 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonem, β-karotenem, hyperosidem, 3-(4-methylbenzyliden)kafrem, pachypodolem a transurokanovou kyselinou, které byly ozařovány po dobu 60 minut zdrojem UVA umístěným ve výšce 20 cm nad povrchem. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a standardní odchylka ($n = 3$).

netoxických koncentrací. Graficky je pozorován i pokles produkce ROS po aplikaci pachydopolu, avšak pro velkou odchylku měření u kontrolního vzorku nelze tento pokles považovat za statisticky významný.

5.3.6.2 Stanovení produkce ROS po expozici UVB záření

Výsledky měření produkce ROS v buňkách ošetřených UV protektivními látkami a vystavených působení UVB záření jsou vyobrazeny na Obr. 5.20. Inkubace buněk s hyperosidem v použitých netoxických koncentracích (30 μM, 100 μM, 300 μM) vede k poklesu produkce ROS v buňkách po ozáření zdrojem UVB. Ošetření buněk všemi ostatními UV protektivními látkami v netoxických koncentracích nevedlo k žádným statisticky významným změnám v produkci ROS v buňkách.



Obr. 5.20: Produkce ROS v buňkách ošetřených astragalinem, 2,4-dihydroxybenzofenonem, 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonem, β-karotenem, hyperosidem, 3-(4-methylbenzyliden)kafrem, pachypodolem a transurokanovou kyselinou, které byly ozařovány po dobu 3 minut zdrojem UVB umístěným ve výšce 20 cm nad povrchem. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a standardní odchylka ($n = 3$).

5.3.7 Stanovení poškození mitochondrií

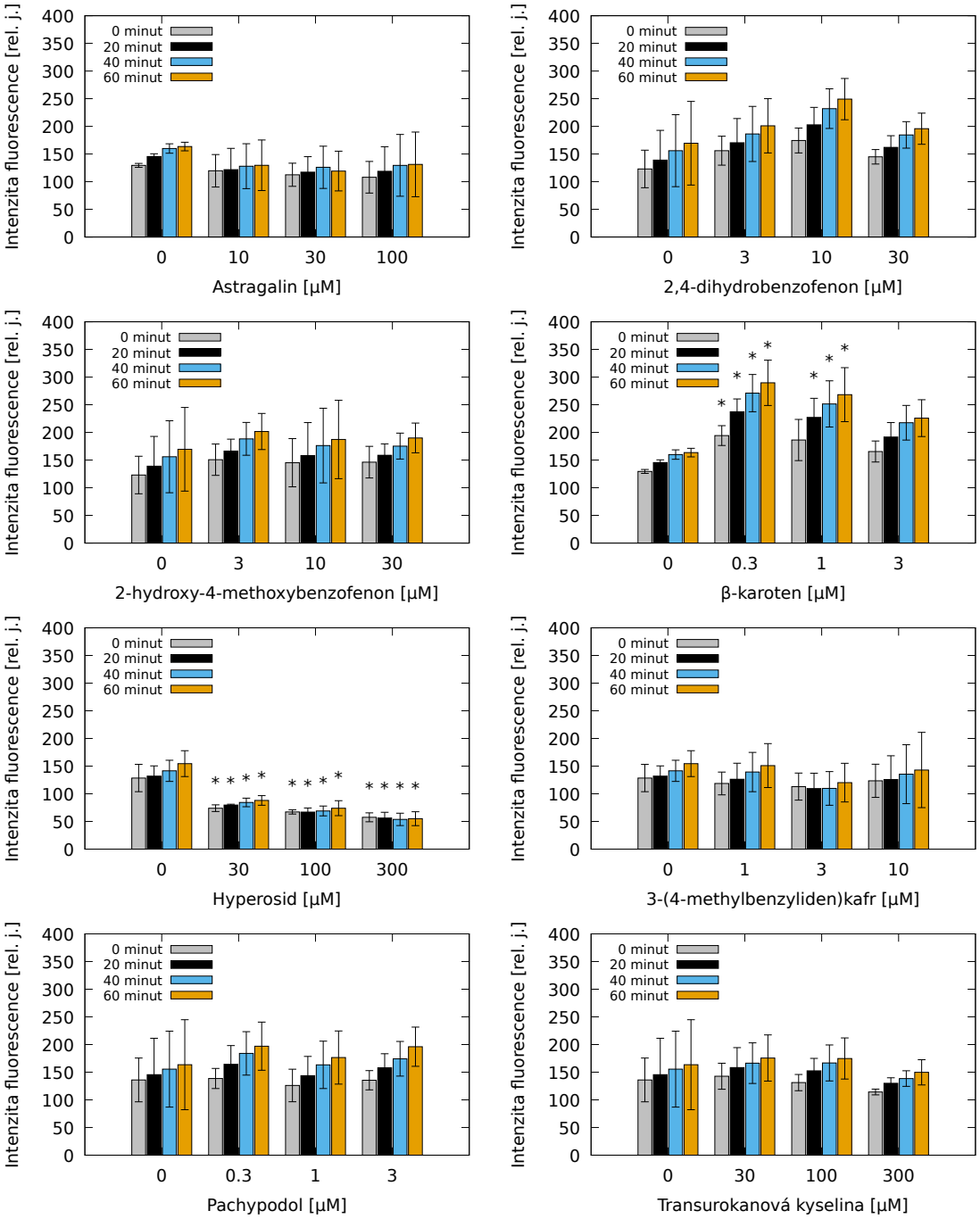
Cílem měření poškození mitochondrií v HaCaT buňkách ošetřených zkoumanými UV protektivními látkami a případně vystavených UVA či UVB záření bylo zjistit, zda zkoumané látky zabraňují poškození mitochondrií v důsledku působení UV záření, popřípadě zda samy o sobě mají na poškození mitochondrií vliv. Byl studován účinek 8 různých látek ve 3 různých, netoxických koncentracích a poškození bylo měřeno ve 4 časových intervalech. Měření byla provedena ve 24-jamkových destičkách. Změny membránového potenciálu mitochondrií bylo stanoveno pomocí značky JC-1.

5.3.7.1 Stanovení vlivu zkoumaných látek na poškození mitochondrií

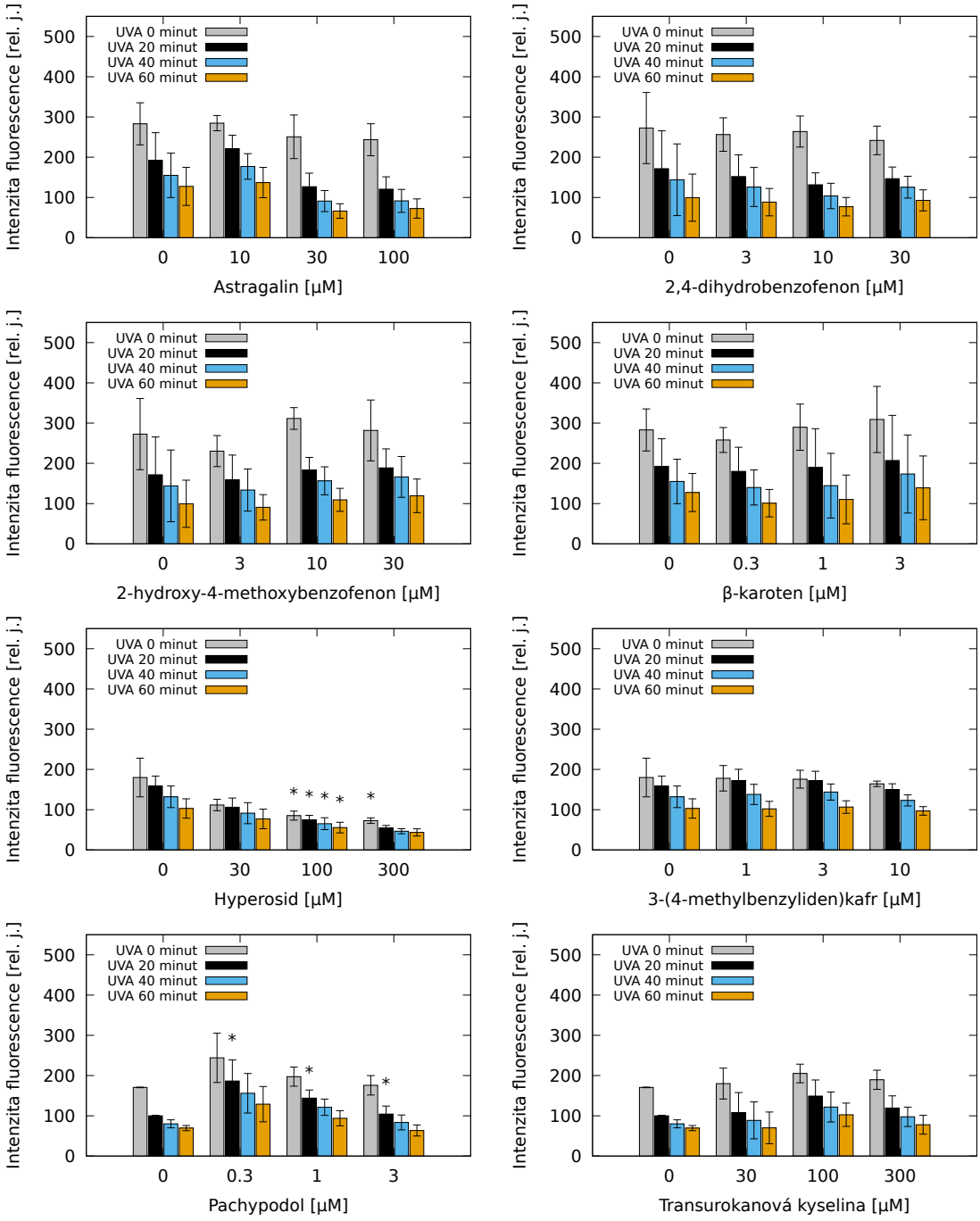
Výsledné hodnoty intenzity fluorescence reprezentující změny mitochondriálního membránového potenciálu pro buňky vystavené pouze působení zkoumaných UV protektivních látek bez efektu UV záření jsou vyobrazeny na Obr. 5.21. Pro všechny aplikované látky i pro všechny jejich koncentrace s výjimkou nejvyšších koncentrací hyperosidu platí, že míra signálu roste s časem. To poukazuje na skutečnost, že JC-1 proniká do mitochondrií v průběhu 60 minut měření postupně, což může pozitivně zkreslit obržené výsledky. Většina aplikovaných UV protektivních látek v netoxických koncentracích nevede ke změnám mitochondriálního membránového potenciálu v čase do 60 minut, a tedy nemá žádný vliv na poškození mitochondrií spojené se změnami mitochondriálního membránového potenciálu. Ke statisticky významným změnám mitochondriálního membránového potenciálu dochází pouze při aplikaci hyperosidu, který ve všech 3 zkoumaných netoxických koncentrací vede k jeho poklesu (depolarizaci), a β-karotenu, který v koncentracích 0,3 μM a 1 μM vede k nárůstu mitochondriálního membránového potenciálu (hyperpolarizaci). Měřená intenzita fluorescence po aplikaci netoxických koncentrací hyperosidu klesá téměř na polovinu intenzity fluorescence získané pro neošetřené buňky.

5.3.7.2 Stanovení poškození mitochondrií po expozici UVA záření

Výsledky pro měření změn mitochondriálního membránového potenciálu v buňkách inkubovaných s UV protektivními látkami a vystavené působení UVA záření



Obr. 5.21: Mitochondriální membránový potenciál v buňkách ošetřených astragalinem, 2,4-dihydroxybenzofenonem, 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonem, β-karotenem, hyperosidem, 3-(4-methylbenzyliden)kafrem, pachypodolem a transurokanovou kyselinou 0, 20, 40 a 60 minut po inkubaci JC-1. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a standardní odchylka ($n = 4$).

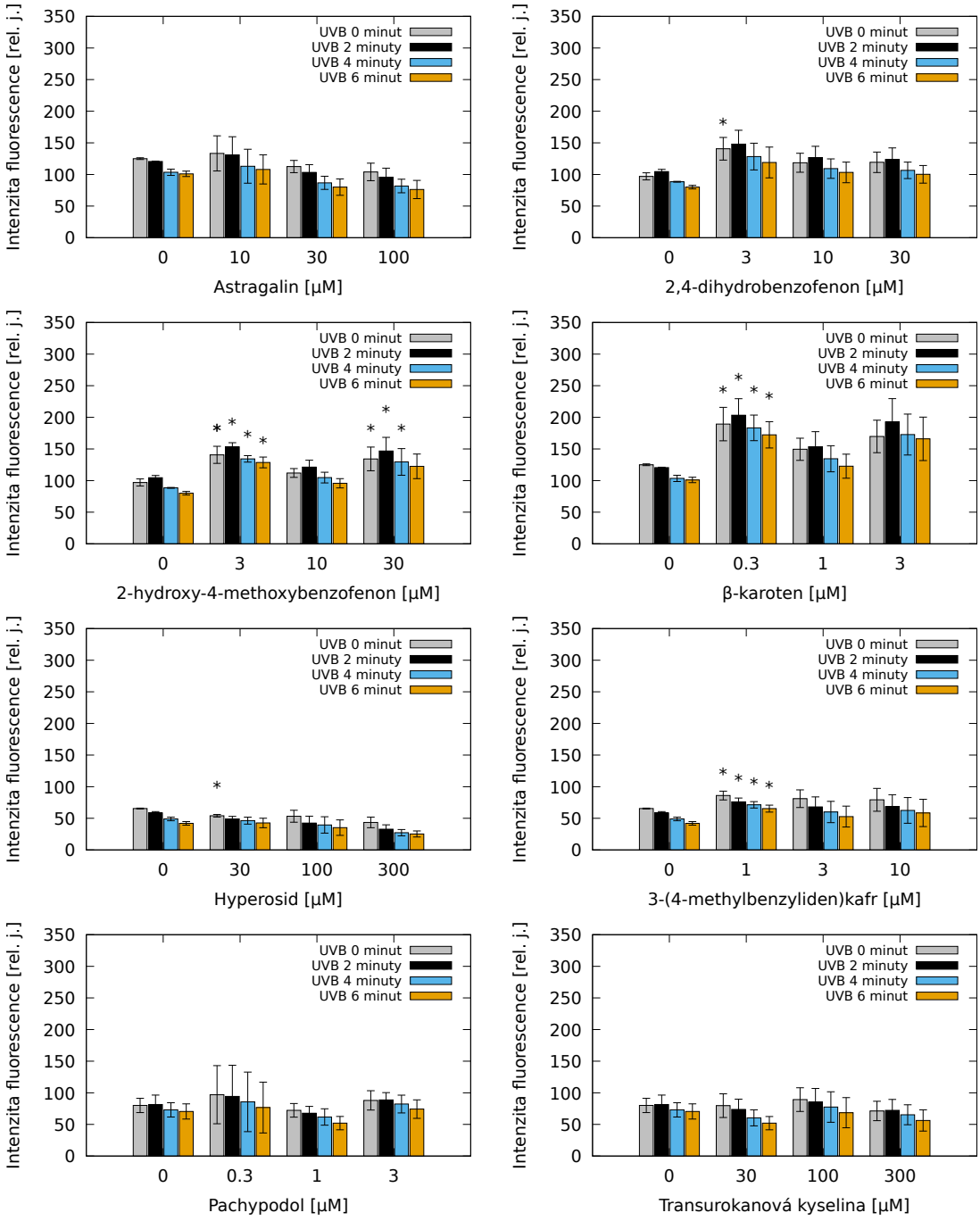


Obr. 5.22: Mitochondriální membránový potenciál v buňkách ošetřených astragalinem, 2,4-dihydroxybenzofenonem, 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonem, β-karotenem, hyperosidem, 3-(4-methylbenzyliden)kafrem, pachypodolem a transurokanovou kyselinou, které byly ozařovány po dobu 0, 20, 40 a 60 minut zdrojem UVA umístěným ve výšce 20 cm nad povrchem. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a standardní odchylka ($n = 4$).

po dobu 0, 20, 40 a 60 minut jsou na Obr. 5.22. Expozice buněk UVA vede k poklesu mitochondriálního membránového potenciálu v čase jak pro neošetřené buňky, tak pro buňky inkubované s UV protektivními látkami. Obecně při aplikaci UV protektivních látek v netoxických koncentracích nepozorujeme žádné statisticky významné změny mitochondriálního membránového potenciálu ve srovnání s mitochondriálním mebránovým potenciálem neošetřených buněk. Aplikace pachypodolu v netoxických koncentracích vede ke zvýšení mitochondriálního membránového potenciálu (hyperpolarizaci), která se projevuje při 20minutové expozici UVA.

5.3.7.3 Stanovení poškození mitochondrií po expozici UVB záření

Výsledky pro měření mitochondriálního membránového potenciálu v buňkách inkubovaných s UV protektivními látkami a vystavené působení UVB záření po dobu 0, 2, 4 a 6 minut můžeme pozorovat na Obr. 5.23. Inkubace buněk se zkoumanými UV protektivními látkami v netoxických koncentracích obecně nevede ke změnám v mitochondriálním membránovém potenciálu buněk exponovaných UVB. Ošetření buněk 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonem a β-karotenem v netoxických koncentracích vede po expozici UVB k hyperpolarizaci.



Obr. 5.23: Mitochondriální membránový potenciál v buňkách ošetřených astragalinem, 2,4-dihydroxybenzofenonem, 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonem, β-karotenem, hyperosidem, 3-(4-methylbenzyliden)kafrem, pachypodolem a transurokanovou kyselinou, které byly ozařovány po dobu 0, 2, 4 a 6 minut zdrojem UVB umístěným ve výšce 20 cm nad povrchem. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a standardní odchylka ($n = 4$).

5.3.8 Stanovení poškození lyzosomů

Cílem měření poškození lyzosomů v HaCaT buňkách ošetřených zkoumanými UV protektivními látkami a případně vystavených UVA či UVB záření bylo zjistit, zda zkoumané látky zabraňují poškození lyzosomů v důsledku působení UV záření, popřípadě zda samy o sobě mají na poškození lyzosomů vliv. Byl studován účinek 8 různých látek ve 3 různých, netoxických koncentracích a poškození bylo měřeno ve 4 časových intervalech. Měření byla provedena ve 24-jamkových destičkách. Poškození lyzosomů bylo stanoveno pomocí značky LysoTracker Blue.

5.3.8.1 Stanovení vlivu zkoumaných látek na poškození lyzosomů

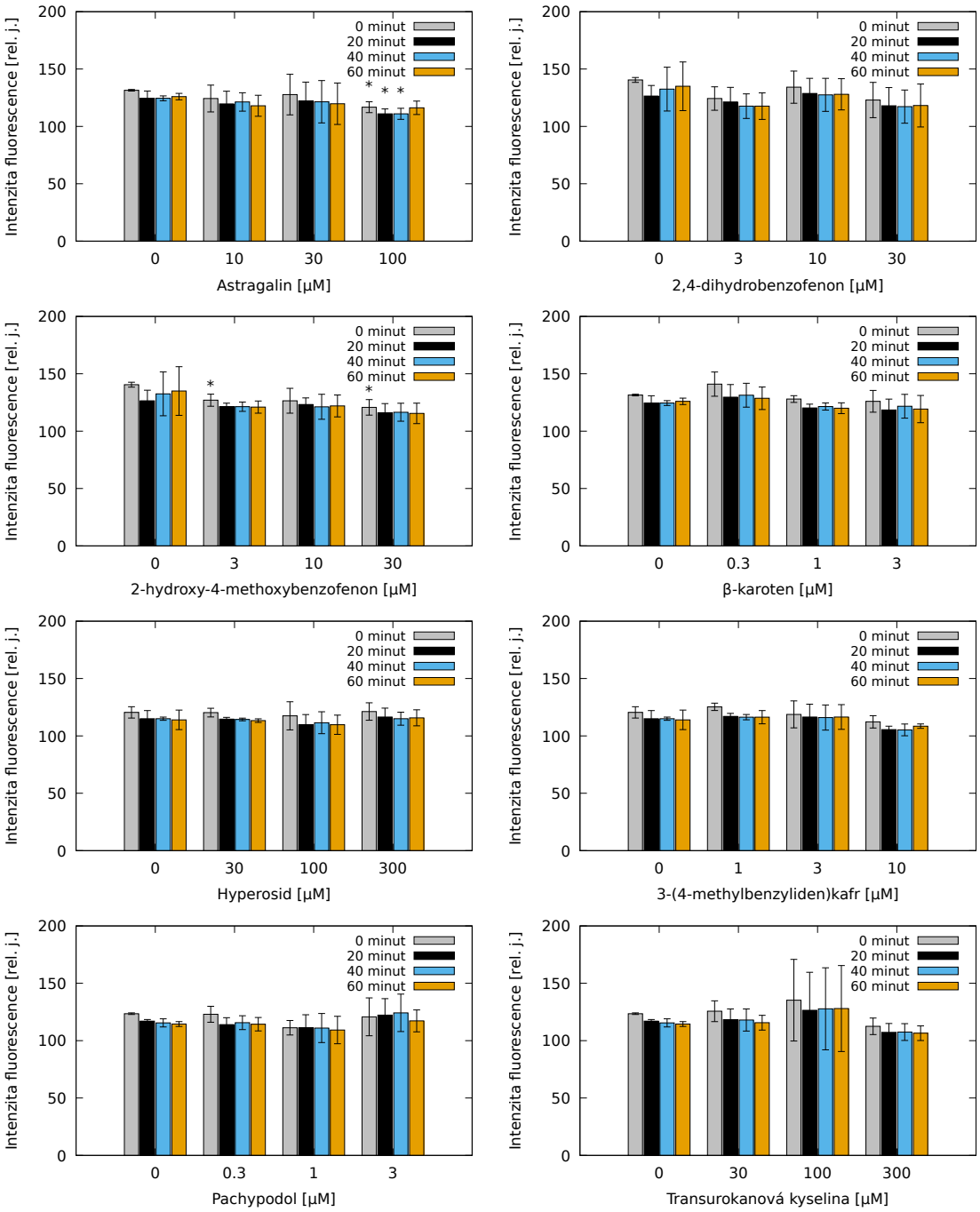
Výsledky měření vlivu inkubace buněk s UV protektivními látkami na poškození lyzosomů jsou vyobrazeny na Obr. 5.24. Měřené hodnoty se pro všechny látky, všechny doby inkubace a všechny měřené časy téměř shodují. Použité UV protektivní látky v netoxických koncentracích zjevně nemají žádný vliv na poškození lyzosomů. Pouze v případě buněk ošetřených 100μM astragalinem dochází ke statisticky významnému poklesu měřené intenzity fluorescence.

5.3.8.2 Stanovení poškození lyzosomů po expozici UVA záření

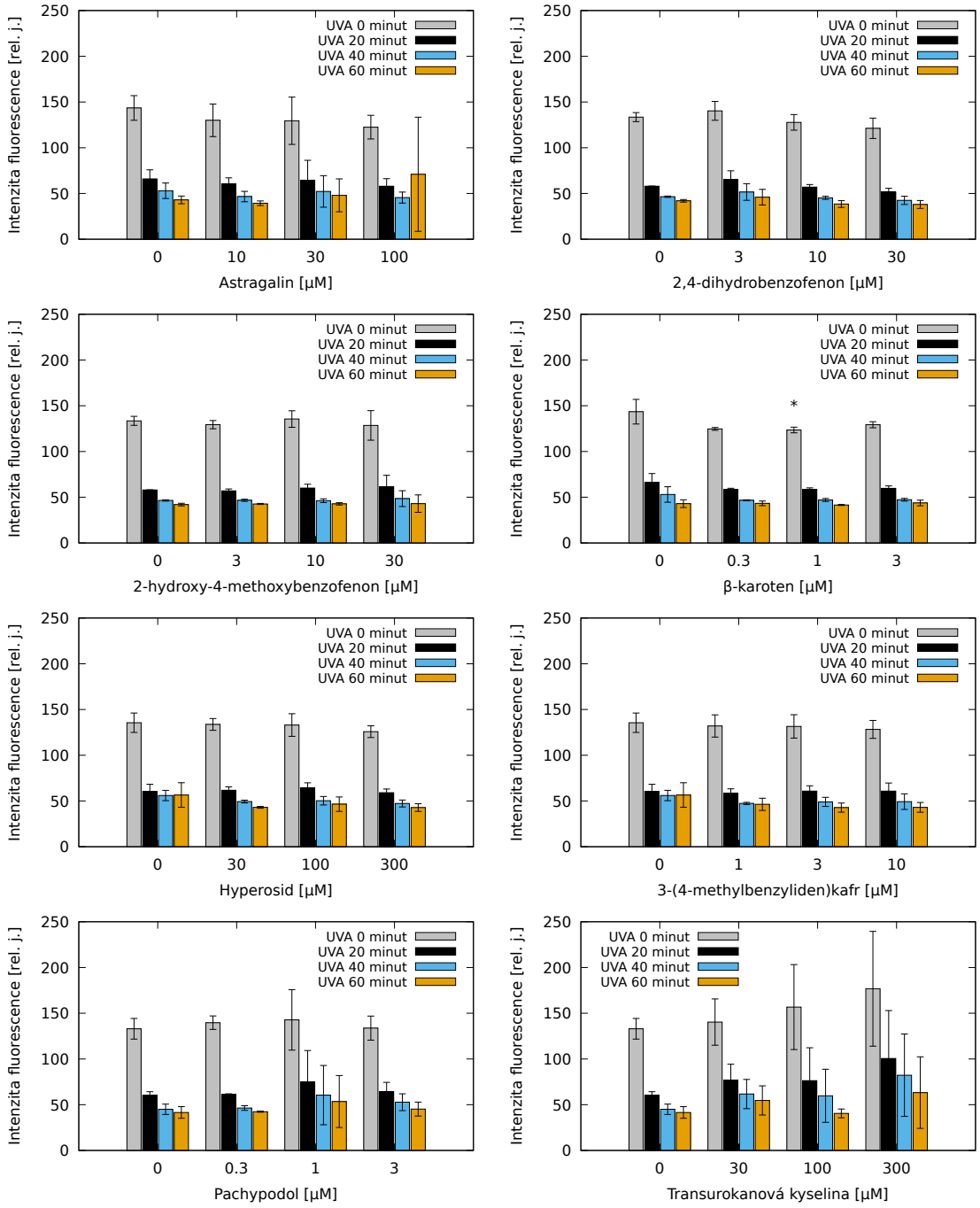
Výsledky měření poškození lyzosomů po expozici UVA v případě látek ošetřených UV protektivními látkami jsou vyobrazeny na Obr. 5.25. Z výsledků je patrné, že UVA záření způsobuje pokles intenzity fluorescence pod 50 % původní hodnoty již během prvních 20 minut expozice a s rostoucí dobou expozice intenzita dále klesá. Inkubace buněk se zkoumanými UV protektivními látkami v netoxických koncentracích ve většině případů nemá na hodnotu intenzity fluorescence žádný vliv. Pouze aplikace hyperosidu v koncentracích 100 μM a 300 μM vede k nárůstu intenzity bez ozáření a po 20minutové expozici UVA.

5.3.8.3 Vybělení značky LysoTracker Blue po expozici UVA záření

Protože značka LysoTracker Blue absorbuje v UVA oblasti, je třeba stanovit závislost měřené intenzity fluorescence značky v závislosti na době expozice UVA. Pro tyto účely byla připravena značka v PBS o 3 různých hodnotách pH (pH 5, 7

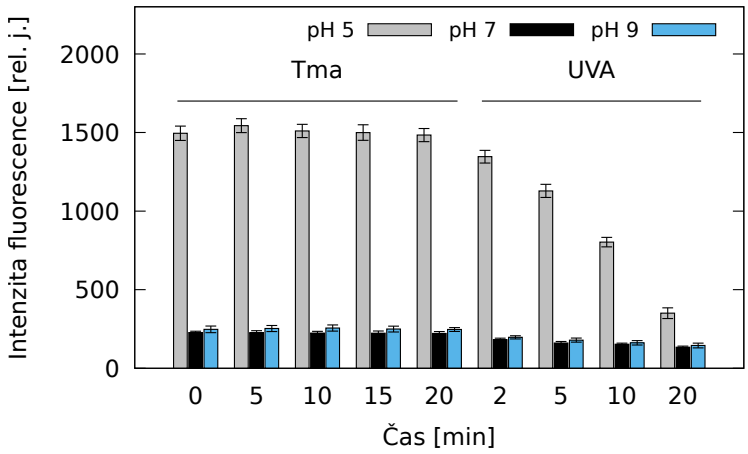


Obr. 5.24: Míra poškození lyzosomů v buňkách ošetřených astragalinem, 2,4-dihydroxybenzofenonem, 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonem, β-karotenem, hyperosidem, 3-(4-methylbenzyliden)kafrem, pachypodolem a transurokanovou kyselinou 0, 20, 40 a 60 minut po inkubaci LysoTracker Blue. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a standardní odchylka ($n = 4$).



Obr. 5.25: Míra poškození lyzosomů v buňkách ošetřených astragalinem, 2,4-dihydroxybenzofenonem, 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonem, β-karotenem, hyperosidem, 3-(4-methylbenzyliden)kafrem, pachypodolem a transurokanovou kyselinou, které byly ozařovány po dobu 0, 20, 40 a 60 minut zdrojem UVA umístěným ve výšce 20 cm nad povrchem. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a standardní odchylka ($n = 4$).

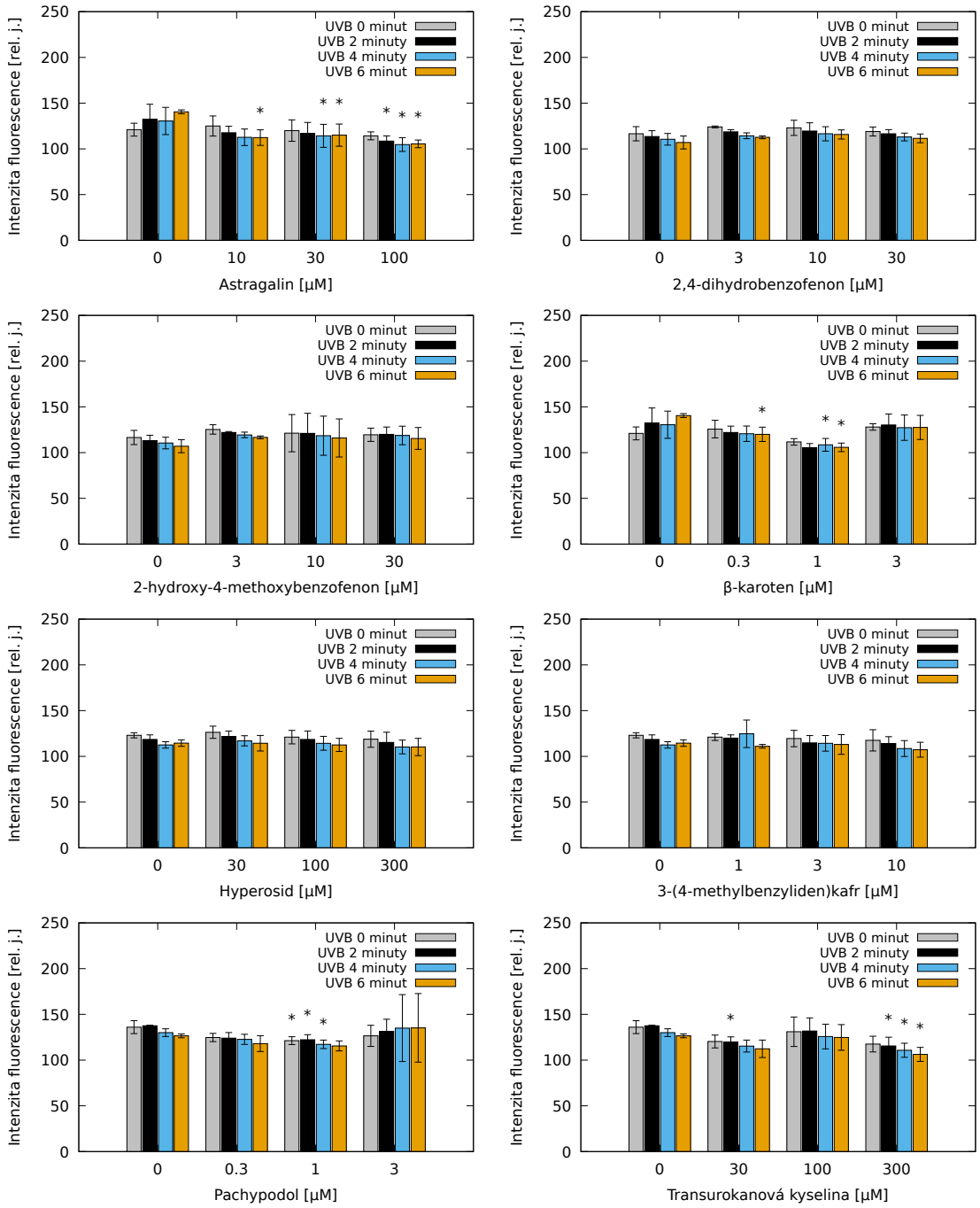
a 9) a měřena intenzita fluorescence po 5, 10, 15 a 20 minutách i po ozařování UVA po dobu 2, 5, 10 a 20 minut, což je znázorněno na Obr. 5.26. Můžeme zde vidět, že zatímco bez působení UVA zůstává intenzita fluorescence v čase konstantní pro všechny hodnoty pH, při vystavení UVA dochází v čase k vybělení značky a intenzita fluorescence klesá. Ačkoliv to díky velikosti signálu můžeme nejlépe pozorovat pro pH 5, dochází k vybělení značky rostoucí s dobou ozařování UVA pro všechny tři měřené hodnoty pH.



Obr. 5.26: Vybělení značky LysoTracker Blue v čase a po ozáření UVA po dobu 2, 5, 10 a 20 minut. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a standardní odchylka ($n = 3$).

5.3.8.4 Stanovení poškození lyzosomů po expozici UVB záření

Výsledky měření poškození lyzosomů buněk inkubovaných s UV protektivními látkami a vystavených působení UVB po dobu 0, 2, 4 a 6 minut jsou vykresleny na Obr. 5.27. Expozice UVB trvající do 6 minut má zřejmě na poškození lyzosomů jen mírný vliv, a to bez ohledu na ošetření UV protektivními látkami. Použité UV protektivní látky v netoxických koncentracích ve většině případů nemají žádný vliv na poškození lyzosomů v důsledku expozice UVB záření. Inkubace buněk s astragalinem vede k poklesu intenzity fluorescence, který se výrazněji projevuje s rostoucí dobou expozice a rostoucí koncentrací astragalinu. Také v případě buněk ošetřených β-karotenem v koncentraci 1 μM se projevuje pokles měřeného signálu.



Obr. 5.27: Míra poškození lyzosomů v buňkách ošetřených astragalinem, 2,4-dihydroxybenzofenonem, 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonem, β-karotenem, hyperosidem, 3-(4-methylbenzyliden)kafrem, pachypodolem a transurokanovou kyselinou, které byly ozařovány po dobu 0, 2, 4 a 6 minut zdrojem UVB umístěným ve výšce 20 cm nad povrchem. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a standardní odchylka ($n = 4$).

5.3.9 Stanovení poškození DNA

Cílem tohoto měření bylo stanovit vliv UV protektivních látek na vznik poškození DNA HaCaT buněk v důsledku působení UV záření. Míra poškození DNA byla stanovena pomocí comet assay. Byl studován vliv 8 UV protektivních látek vždy v jedné koncentraci, přičemž byly použity nejvyšší netoxické koncentrace látek.

Jak jsme si ověřili pomocí Wilk-Shapirova a d'Agostino-Pearsonova testu, obecně nenormální rozdělení fragmentů komet není normální ani v případě většiny našich souborů dat, a tak není možné hodnotit soubory pomocí průměru a standardní odchylky, nicméně je třeba soubory hodnotit na základě mediánu a 25% a 75% kvartilu.

Výsledky získané pro štěpení DNA HaCaT buněk v důsledku 90minutové expozice UVA jsou vyobrazeny v Tab. 5.1. Poškození DNA v důsledku působení UVA je pouze nepatrné, ani při dlouhodobém 90minutovém vystavení buněk UVA záření nedošlo k významné fragmentaci DNA. Navíc z vypočtených hodnot průměru i mediánu DNA v hlavě je zřejmé, že žádná z aplikovaných UV protektivních látek nevede ke zvýšení poškození DNA v důsledku expozice buněk k UVA. Statisticky významný nárůst DNA v hlavě jsme obdrželi po inkubaci buněk s astragalinem (4,5 %), 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonem (5,76 %), hyperosidem (3,94 %), 3-(4-methylbenzyliden)kafrem (4,54 %) a transurokanovou kyselinou (3,94 %).

Výsledky měření pro štěpení jaderné DNA HaCaT buněk v důsledku 8minutového působení UVB jsou vyobrazeny v Tab. 5.2. Bylo zjištěno, že UVB záření o dávce $1,6 \pm 0,2\ \mathrm{J \cdot cm^{-2}}$ navodí menší míru fragmentace DNA než UVA záření o dávce $35,1 \pm 2,7\ \mathrm{J \cdot cm^{-2}}$. Aplikace UV protektivních látek by měla vést ke snížení poškození DNA, tj. k procentuálnímu nárůstu množství DNA v hlavě. Ne pro všechny látky je možné tento efekt pozorovat, ošetření buněk 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonem, β-karotenem, hyperosidem, 3-(4-methylbenzyliden)kafrem, pachypodolem a transurokanovou kyselinou nemá na štěpení DNA v důsledku 8minutové expozice UVB žádný efekt. Ošetření buněk astragalinem a 2,4-dihydroxybenzofenonem vede ke vzniku rozsáhlejšího poškození DNA než v případě kontrolního vzorku, pokles DNA v hlavě odpovídá pro astragalin 20,43 % a pro 2,4-dihydroxybenzofenon 21,86 %. Ačkoliv hodnota mediánu poukazuje na pokles DNA v hlavě i při aplikaci pachypodolu, nebyl tento pokles stanoven jako statisticky významný.

Tab. 5.1: Tabulka reprezentuje míru štěpení DNA v buňkách ošetřených zkoumanou látkou o dané koncentraci po ozařování zdrojem UVA po dobu 90 minut. Procentuální hodnoty obsahu DNA v hlavě, procentuální hodnoty obsahu DNA v ocasu a olive tail momenty byly určeny jako průměr a standardní odchylka a jako median a 25% a 75% kvartil. Normálnost rozdělení byla stanovena pomocí Wilk-Shapirova a d'Agostino-Pearsonova testu.

Látka (koncentrace)	**DNA in head (%)** Průměr±SD Median (25%; 75%)	W-S test d'A-P test	**DNA in Tail (%)** Průměr±SD Median (25%; 75%)	W-S test d'A-P test	**Olive tail moment** Průměr±SD Median (25%; 75%)	W-S test d'A-P test
-	81,21±1,15 89,22 (76,59; 96,20)	p<0,05 p<0,05	18,79±1,15 10,78 (3,80; 23,41)	p<0,05 p<0,05	5,07±0,42 2,19 (0,85; 5,43)	p<0,05 p<0,05
Astragalin (100 μM)	89,62±1,23 93,72 (90,88; 96,09)	p<0,05 p<0,05	10,38±1,23 6,28 (3,91; 9,12)	p<0,05 p<0,05	2,70±0,50 1,10 (0,66; 1,61)	p<0,05 p<0,05
2,4-dihydroxybenzofenon (30 μM)	89,82±1,93 91,20 (87,62; 91,72)	p=0,3049 p=0,1865	10,18±1,93 8,80 (8,28; 12,38)	p=0,3049 p=0,1865	1,77±0,43 1,50 (0,95; 3,20)	p=0,1783 p=0,3847
2-hydroxy-4-methoxy-benzofenon (30 μM)	88,77±2,42 94,98 (88,78; 99,79)	p<0,05 p<0,05	11,23±2,42 5,02 (0,21; 11,22)	p<0,05 p<0,05	3,17±0,83 1,08 (0,04; 1,90)	p<0,05 p<0,05
β-karoten (3 μM)	86,56±2,04 91,94 (87.23; 95,44)	p<0,05 p<0,05	13,44±2,04 8,06 (4,56; 12,77)	p<0,05 p<0,05	3,71±0,76 1,37 (0,69; 2,93)	p<0,05 p<0,05
Hyperoside (300 μM)	88,69±1,10 93,16 (88,93; 97,54)	p<0,05 p<0,05	11,31±1,10 6,84 (2,46; 11,07)	p<0,05 p<0,05	3,31±0,46 1,38 (0,48; 2,23)	p<0,05 p<0,05
3-(4-methylbenzyliden)-kafr (10 μM)	88,86±1,34 93,76 (89,69; 98,16)	p<0,05 p<0,05	11,14±1,34 6,24 (1,84; 10,31)	p<0,05 p<0,05	3,54±0,60 1,20 (0,39; 2,05)	p<0,05 p<0,05
Pachypodol (3 μM)	88,44±2,19 94,04 (83,31; 95,76)	p<0,05 p<0,05	11,56±2,19 5,96 (4,24; 16,69)	p<0,05 p<0,05	3,20±0,75 1,22 (0,67; 4,32)	p<0,05 p<0,05
Transurokanová kyselina (300 μM)	88,27±1,63 93,16 (91,05; 95,23)	p<0,05 p<0,05	11,73±1,63 6,84 (4,77; 8,95)	p<0,05 p<0,05	3,28±0,62 1,18 (0,82; 2,00)	p<0,05 p<0,05

Tab. 5.2: Tabulka reprezentuje míru štěpení DNA v buňkách ošetřených zkoumanou látkou o dané koncentraci po ozařování zdrojem UVB po dobu 8 minut. Procentuální hodnoty obsahu DNA v hlavě, procentuální hodnoty obsahu DNA v ocasu a olive tail momenty byly určeny jako průměr a standardní odchylka a jako median a 25% a 75% kvartil. Normálnost rozdělení byla stanovena pomocí Wilk-Shapirova a d'Agostino-Pearsonova testu.

Látka (koncentrace)	**DNA in head (%)**		**DNA in Tail (%)**		**Olive tail moment**	
	Průměr±SD	W-S test	Průměr±SD	W-S test	Průměr±SD	W-S test
	Median (25%; 75%)	d'A-P test	Median (25%; 75%)	d'A-P test	Median (25%; 75%)	d'A-P test
-	77,42±1,84	p<0,05	22,58±1,84	p<0,05	8,46±0,81	p<0,05
	92,60 (57,41; 99,85)	p<0,05	7,40 (0,15; 42,59)	p<0,05	1,99 (0,02; 12,23)	p<0,05
Astragalin (100 μM)	67,97±4,57	p<0,05	32,03±4,57	p<0,05	12,61±2,09	p<0,05
	72,17 (44,33; 93,93)	p<0,05	27,83 (6,07; 55,67)	p<0,05	8,52 (1,82; 18,64)	p<0,05
2,4-dihydroxybenzofenon	67,79±5,74	p<0,05	32,21±5,74	p<0,05	13,48±2,75	p<0,05
(30 μM)	70,74 (43,71; 97,29)	p<0,05	29,26 (2,71; 56,29)	p<0,05	9,89 (1,07; 18,64)	p=0,1054
2-hydroxy-4-methoxy-	81,74±6,23	p<0,05	18,26±6,23	p<0,05	7,77±3,01	p<0,05
benzofenon (30 μM)	92,21 (79,08; 99,16)	p<0,05	7,79 (0,84; 20,92)	p<0,05	1,43 (0,25; 7,84)	p<0,05
β-karoten (3 μM)	93,22±2,44	p<0,05	6,78±2,44	p<0,05	2,61±1,48	p<0,05
	95,10 (90,97; 99,21)	p=0,0750	4,90 (0,79; 9,03)	p=0,0750	0,84 (0,16; 1,65)	p<0,05
Hyperoside (300 μM)	74,57±4,56	p<0,05	25,43±4,56	p<0,05	9,09±2,61	p<0,05
	92,00 (52,97; 99,97)	p=0,0672	8,00 (0,03; 47,03)	p=0,0672	2,25 (0,01; 12,31)	p<0,05
3-(4-methylbenzyliden)-	85,65±2,96	p<0,05	14,35±2,96	p<0,05	4,77±0,99	p<0,05
kafr (10 μM)	95,64 (77,32; 99,67)	p<0,05	4,36 (0,33; 22,68)	p<0,05	1,15 (0,06; 7,64)	p<0,05
Pachypodol (3 μM)	66,68±8,38	p=0,0842	33,32±8,38	p=0,0842	12,23±3,45	p<0,05
	72,77 (49,87; 96,47)	p=0,2473	27,23 (3,53; 50,13)	p=0,2473	7,34 (0,68; 19,01)	p=0,4295
Transurokanová	83,82±3,30	p<0,05	16,18±3,30	p<0,05	6,59±1,54	p<0,05
kyselina (300 μM)	94,83 (87,43; 99,75)	p<0,05	5,17 (0,25; 12,57)	p<0,05	1,18 (0,10; 3,78)	p<0,05

6 Diskuze

V diplomové práci byl nejprve zkoumán vliv UVA a UVB záření na buněčné kultury lidských keratinocytů HaCaT. Pomocí MTT testu byla stanovena životaschnopnost HaCaT exponovaných UVA a UVB (Obr. 5.5, Obr. 5.6). Ve shodě s předpokladem a výsledky jiných vědců se ukázalo, že v obou případech dochází ke snížení životaschnopnosti buněk (Jin a kol. 2007; Yang a kol. 2017), přičemž v případě expozice UVB je toto snížení větší než v případě expozice UVA. V obou případech došlo k poklesu životaschopnosti buněk na 60 % hodnoty životaschopnosti pro neozářené buňky. Dávka UVA záření, která způsobila pokles životaschnopnosti buněk na 60 % životaschopnosti neozářených buněk, při ozařování zdrojem ve výšce 20 cm odpovídala $D_{A,60}^{(20)} = 23,4\ \mathrm{J \cdot cm^{-2}}$, zatímco při ozařování zdrojem ve výšce 11,5 cm došlo ke shodnému poklesu životaschopnosti při vystavení UVA záření o dávce $D_{A,25}^{(11,5)} = 15,8\ \mathrm{J \cdot cm^{-2}}$. V případě ozáření UVB došlo k témuž poklesu životaschopnosti během prvních 10 minut ozařování při obou vzdálenostech zdroje od buněk, což odpovídá dávce $D_{B,10}^{(20)} = 2,0\ \mathrm{J \cdot cm^{-2}}$ pro zdroj ve výšce 20 cm a dávce $D_{B,10}^{(11,5)} = 3,4\ \mathrm{J \cdot cm^{-2}}$ pro zdroj ve výšce 11,5 cm. K dosažení 60% letality buněk dochází v případě UVB již při přibližně 10násobně menší dávce ve srovnání s UVA.

Hladina ROS v buňkách po ozáření UVA a UVB (Obr. 5.7, Obr. 5.8) byla stanovena pomocí fluorescenční značky CM-H_2DCFDA. Hladina ROS v buňkách po ozáření v obou případech rostla, což poukazuje na zvýšenou produkci ROS v buňce vyvolanou působením UV záření. Nárůst produkce ROS s rostoucí dávkou je ve shodě s očekáváním (Petersen a kol. 2000; Poljsak 2012). Měření dále ukázalo, že za předpokladu lineární odezvy fluorescenční značky CM-H_2DCFDA na množství ROS v buňkách vede UVB o přibližně poloviční intenzitě záření k více jak dvojnásobně větší produkci ROS v buňkách.

Poškození mitochondrií bylo stanoveno za použití fluorescenční značky JC-1 (Obr. 5.9). Po ozáření bylo pozorováno poškození mitochondrií spojené s depolarizací mitochondriálního membránového potenciálu, které se zvyšovalo s dobou ozáření. Depolarizace mitochondriálního membránového potenciálu s rostoucí dávkou byla popsána již v Paz a kol. (2008). Podobně jako u tvorby ROS, rozsáhlejší změny mitochondriálního membránového potenciálu byly pozorovány v reakci na expozici UVB záření. Poškození lyzosomů bylo stanoveno za pomoci fluorescenční značky Akridinová oranže (Obr. 5.10). Zde bylo pozorováno rostoucí narušení membránové integrity lyzozomů se zvyšující se dávkou, což je ve shodě s výsledky, které obdrželi Rodrigues a kol. (2016). Expozice buněk UVB vedla k rozsáhlejšímu poškození organel než expozice UVA. Příčinou by mohla být vyšší energie UVB fotonů ve srovnání s fotony UVA, vyšší míra produkce ROS v buňkách po expozici UVB záření nebo odlišnému zastoupení UVA a UVB chromoforů.

Ve druhé části bylo ověřeno, že všechny zkoumané UV protektivní látky absorbují v UV oblasti (Obr. 5.11). Obdržená spektra se nijak významně neodlišují od spekter látek uváděných v literatuře (Castro a kol. 2003; Ahmedova a kol. 2002; Cantrell a kol. 2001; Young 1997; Sagaradze a kol. 2017). S výjimkou transurokanové kyseliny absorpční spektra zkoumaných látek spadají do obou podoblastí UV záření, tj. do UVA i UVB. S ohledem na vyzařovací charakteristiky zdrojů, kdy zdroj UVB má maximum při vlnové délce 310 nm (FWHM 6nm) a zdroj UVA má maximum při vlnové délce 370 nm (FWHM 25 nm), můžeme zkoumané látky rozdělit na ty, které absorbují (především) v oblasti UVB zdroje, a látky, které absorbují přibližně shodně v oblasti vlnových délek obou zdrojů. Mezi látky absorbující primárně v oblasti UVB zdroje patří 2,4-dihydroxybenzofenon, 2-hydroxy-4-methoxybenzofenon, 3-(4-methylbenzyliden)kafr a transurokanová kyselina. Ostatní látky jako astragalin, β-karoten, hyperosid a pachypodol absorbují v oblasti vyzařování obou zdrojů přibližně shodně. Srovnáním normovaných absorpčních spekter dostáváme, že molární absorpční koeficienty s přihlédnutím k vlnové délce absorpčních maxim jsou podobné pro astragalin, β-karoten, 3-(4-methylbenzyliden)kafr, pachypodol a transurokanovou kyselinu. Absorpční molární koeficient 2,4-dihydroxybenzofenonu je ve srovnání s předchozími poloviční, absorpční molární koeficienty 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonu a hyperosidu třetinové.

Prvotní měření životaschopnosti buněk po ozáření zdrojem UVA (Obr. 5.5) ukázalo, že 60minutová expozice UVA vede k přibližně 40% snížení životaschopnosti buněk. Inkubace buněk s UV protektivními látkami (Obr. 5.12) vedla k potlačení tohoto snížení životaschopnosti buněk pouze při aplikaci hyperosidu o koncentraci 100 μM a vyšší a při aplikaci transurokanové kyseliny o koncentraci 1 mM. Nárůst životaschopnosti buněk inkubovaných s 300μM hyperosidem na téměř 170 % životaschopnosti kontrolního vzorku představuje přibližně 100 % životaschopnosti neozářených buněk. U ostatních látek se UVA protektivní účinek při použitých koncentracích neprojevil a při aplikaci vyšších koncentrací působí na buňky toxicky.

Prvotní měření životaschopnosti buněk po ozáření zdrojem UVB (Obr. 5.5) ukázalo, že 5minutová expozice UVB vede ke snížení životaschopnosti buněk o maximálně 30 %. Jak můžeme vidět na Obr. 5.13, pouze inkubace s hyperosidem v koncentraci 100 μM a vyšší a transurokanovou kyselinou v koncentraci 100 μM a vyšší byla schopna významně navýšit životaschopnost buněk ve srovnání s neošetřeným vzorkem. Jelikož 5minutová expozice UVB vede ke snížení životaschopnosti buněk do 30 %, již 150% nárůst životaschopnosti oproti kontrolnímu vzorku představuje 100 % životaschopnosti neozářených buněk. U buněk inkubovaných s hyperosidem však dochází k nárůstu životaschopnosti na 230 %, u buněk inkubovaných s transurokanovou kyselinou dokonce na 580 %. To znamená, že nejenže inkubace s těmito látkami vede k eliminaci snížení životaschopnosti buněk v důsledku působení UVB, ale dokonce dochází ke stimulaci proliferace buněk o 60 % v případě hyperosidu a o 300 % v případě transurokanové kyseliny. Jak ale můžeme vidět na Obr. 5.16, samotná přítomnost těchto látek nepostačuje k navození tohoto stimulačního efektu (při aplikaci 300μM a koncentrovanější transurokanové kyseliny dokonce dochází ke snížení životaschopnosti buněk). Stimulační efekt na růst a dělení buněk vyvolaný hyperosidem a transurokanovou kyselinou vyžadoval aktivaci UVB zářením.

Jak bylo ukázáno na Obr. 5.7 a Obr. 5.8, expozice buněk UV záření vede ke zvýšení produkce ROS v buňkách. UV protektivní látky by měly být schopny nadměrné produkci ROS v buňkách zabránit, a tedy snížit jejich hladinu v buňkách oproti kontrole. Na Obr. 5.14 a Obr. 5.15 můžeme pozorovat, že k významnému snížení produkce ROS uvnitř buněk vystavených UVA nebo UVB záření došlo pouze u buněk ošetřených hyperosidem (30μM a koncentrovanější pro UVA, 3μM a koncentrovanější pro

UVB) a nanočásticemi TiO_2 (v koncentraci 300 μg/ml a vyšší pro UVA, 100 μg/ml a vyšší pro UVB). U ostatních UV protektivních látek naopak při aplikaci vyšších koncentrací docházelo k nárůstu produkce ROS uvnitř buněk.

Jelikož se při vyšších koncentracích látek v některých případech projevil pokles životaschnopnosti buněk a zvýšení produkce ROS, byla stanovena toxicita látek pro buňky s cílem v dalších měření tyto jevy eliminovat (Obr. 5.16). Bylo zjištěno, že všechny UV protektivní látky při vyšších koncentracích vykazují určitý stupeň toxicity. Jako nejméně toxická látka při vyšších molárních koncentracích se ukázal hyperosid, který ani v koncetraci 300 μM nevede k výraznému snížení životaschopnosti buněk ve srovnání s nižšími koncentracemi.

Jak bylo ukázáno na Obr. 5.9, ozáření buněk pouze UVA nebo UVB zářením vede k depolarizaci mitochondriálního membránového potenciálu. Výsledky na Obr. 5.21 ukazují, že inkubace buněk s β-karotenem vede k hyperpolarizaci mitochondriálního membránového potenciálu, zatímco inkubace neozářených buněk s hyperosidem vede k depolarizaci mitochondriálního membránového potenciálu. Výsledky na Obr. 5.22 a Obr. 5.23 dále ukazují, že společné působení těchto dvou UV protektivních látek a UV záření není spojen s dalšími změnami. Samotná inkubace buněk s pachypodolem a 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonem nevede ke změnám mitochondriálního membránového potenciálu, nicméně aktivace pachypodolu UVA zářením a 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonu UVB zářením vede k hyperpolarizaci mitochondriálního membránového potenciálu.

Pomocí Akridinové oranži bylo prokázáno, že UVA i UVB záření vede ve vyšších dávkách k narušení integrity lyzosomů (Obr. 5.10). Ani při studiu pomocí fluorescenční značky LysoTracker Blue nebyly při kratší expozici UVB detekovány změny, které by mohly poukazovat na poškození lyzosomů (Obr. 5.27). V případě UVA ozařování se použití této značky ukázalo jako nevhodné. Jak je vyobrazeno na Obr. 5.26, expozice značky LysoTracker Blue k UVA vede k významnému vybělení značky, které znemožňuje hodnotit poškození lyzosomů spojené s jejich větší propustností a ztrátou pH v důsledku působení UVA záření (Obr. 5.25).

Pomocí Comet assay byla stanovena míra fragmentace jaderné DNA po ozáření buněk UVA a UVB (Tab. 5.1, Tab. 5.2). 90minutová expozice UVA záření (dávka $35,1\ \mathrm{J}\cdot\mathrm{cm}^{-2}$) navodila 11% fragmentaci, zatímco 8minutová expozice UVB (dávka

$1,6\ \mathrm{J \cdot cm^{-2}}$) vedla pouze k 7% fragmentaci jaderné DNA. Porovnáme-li získané výsledky s měřením životaschopnosti buněk, kdy obdobné dávky vedly k minimálně 60% snížení životaschopnosti v případě UVA a ke snížení životaschopnosti o 35 % v případě UVB, můžeme usuzovat, že poškození DNA se podílí na snížení životaschopnosti HaCaT buněk vystavených působení UV záření jen menší mírou. V případě UVA záření vedla inkubace s UV protektivními látkami obecně ke snížení fragmentace DNA až o téměř 6 %. V případě UVB záření inkubace buněk s UV protektivními látkami nejen nevedla ke snížení fragmentace, ale v případě aplikace astragalinu a 2,4-dihydroxybenzofenonu dokonce došlo k navýšení fragmentace DNA až o více než 20 %.

Jako zástupce anorganických filtrů byly pro studium zvoleny nanočástice TiO_2. V důsledku jejich aplikace byl pozorován pozitivní vliv na životaschnopnost buněk po ozáření UVB a pokles produkce ROS při ozáření UVA i UVB. Práce s nanočásticemi TiO_2 však byla v laboratorních podmínkách velmi obtížná, nanočástice měli tendenci sedimentovat ke dnu destiček a agregovat. Při aplikaci nanočástic TiO_2 jsme sice pozorovali zvýšení životaschopnosti buněk a pokles produkce ROS v buňkách po expozici UVA i UVB, nicméně zmíněné jevy mohly vést ke zkreslení výsledků a také vedly k velkým chybám měření. Z toho důvodu nebyly nanočástice TiO_2 zařazeny do dalších experimentů.

Dále byly zkoumány 4 organické filtry, které jsou již dobře prostudovány a běžně se využívají v kosmetických produktech. Těmi jsou 2,4-dihydroxybenzofenon, 2-hydroxy-4-methoxybenzofenon, 3-(4-methylbenzyliden)kafr a transurokanová kyselina. 2,4-dihydroxybenzofenon a 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonpatří mezi benzofenony, a tak by měly poskytovat UV protekci primárně v oblasti UVA. 3-(4-methylbenzyliden)kafr je derivátem kafru, a ten se vyznačuje primární absorpcí v UVB oblasti. Transurokanová kyselina je v kůži přirozeně se vyskytující UVB chromofor. Jak však ukázala absorpční spektra (Obr. 5.11), můžeme v případě 2,4-dihydroxybenzofenonu a 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonu očekávat i UVB protekci.

Ošetření buněk 2,4-dihydroxybenzofenonem v koncentracích do 30 μM nemá vliv na životaschopnost buněk, produkci ROS, mitochondriální membránový potenciál ani poškození lyzosomů po expozici UVA či UVB. Schopnost 2,4-dihydroxybenzofenonu absorbovat v UVA nebo UVB oblasti se v experimentech nikde neprojevila.

Inkubace buněk s 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonem v koncentracích do 30 μM nevede ke změnám v životaschopnosti buněk, produkci ROS v buňkách ani změnám v poškození lyzozomů po expozici UVA ani po expozici UVB. UVA protektivní efekt, ke kterému dochází v důsledku schopnosti 2,4-dihydroxybenzofenonu absorbovat v UVA oblasti, je schopnost redukovat poškození DNA vzniklé v důsledku působení UVA záření.

Aplikace 3-(4-methylbenzyliden)kafru v koncentracích do 10 μM vede k významnému poklesu produkce ROS v buňkách a zvýšení procentuálního zastoupení DNA v hlavě po expozici UVA. Zároveň však po expozici UVB dochází k poklesu životaschopnosti buněk oproti kontrolnímu vzorku. Změna životaschopnosti buněk po expozici UVB zřejmě souvisí s absorpcí 3-(4-methylbenzyliden)kafru v UVB oblasti. Změny po expozici UVA však nejsou způsobeny absorpcí, jelikož 3-(4-methylbenzyliden)kafr v oblasti vyzařování zdroje UVA neabsorbuje. Mechanismus UVA protekce 3-(4-methylbenzyliden)kafru tedy zřejmě není fyzikální, aplikace 3-(4-methylbenzyliden)kafru vede k sekundární UVA protekci – pokles v produkci ROS poukazuje na možný antioxidační účinek, který se následně projevuje jako redukce poškození DNA.

Transurokanová kyselina při koncentracích do 300 μM vede k nárůstu životaschnopnosti buněk exponovaných UVB. Tento nárůst se projevil u 5minutové expozice, u 3minutové expozice UVB pozorován nebyl. Jelikož životaschopnost buněk s dobou ozařování UVB klesá, je s rostoucí dobou ozařování možné lépe pozorovat UV protektivní efekty. Při expozici UVB po dobu 3 minut tedy zřejmě nedošlo k dostatečnému poškození buněk v kontrolním vzorku tak, aby bylo možné UVB protektivní efekt transurokanové kyseliny pozorovat. Tato UVB protekce může být důsledkem primární absorpce transurokanové kyseliny v UVB oblasti. Zároveň však inkubace s transurokanovou kyselinou po ozáření UVB vede k nárůstu produkce ROS v buňkách. To je zřejmě důsledkem izomerace transurokanové kyseliny pod vlivem UVB záření na svou *cis*-formu, která podléhá fotosenzitizačním reakcím a vede k produkci ROS (Wondrak a kol. 2006). Ošetření buněk transurokanovou kyselinou vedlo také ke zvýšení procentuálního zastoupení DNA v hlavě po expozici UVA.

Byly zkoumány 4 látky potenciálně poskytující sekundární fotoprotekci. Všechny 4 zkoumané látky jsou antioxidanty. β-karoten je karoteinoid a jeho fotoprotekce je

sporná (Pandel a kol. 2013; Stahl a Sies 2012). Astragalin, hyperosid a pachypodol jsou přírodní flavonoidy. Astragalin byl zkoumán v souvislosti s prevencí a léčbou aktinické keratózy (Riaz a kol. 2018), hyperosid a pachypodol byly s UV protekcí spojovány pouze hypoteticky v souvislosti se svou antioxidační povahou (Nichols a Kariyar 2010; Kim a kol. 2019).

Ošetření buněk β-karotenem v koncentraci do 3 μM vede k nárůstu mitochondriálního membránového potenciálu neozářených buněk. Přestože je β-karoten antioxidant, nepozorujeme po jeho aplikaci žádný pokles produkce ROS v ozářených buňkách.

V buňkách inkubovaných s astragalinem o koncentraci do 100 μM nedochází k poškození lyzosomů a ani následná expozice UVB nevede ke zmenám v integritě těchto organel, avšak po expozici UVB se ukazuje významné poškození DNA. Na druhé straně po expozici UVA dochází v důsledku aplikace astragalinu k její menší fragmentaci. Astragalin je flavonoid, a tak by měl mít antioxidační účinky. V našich měřeních se však při aplikaci netoxických koncentrací žádné takové účinky neprojevily.

Hyperosid ze všech látek zkoumaných v této práci vykazuje nejlepší výsledky jako UV protektivní látka. Aplikace hyperosidu v maximální použité koncentraci 300 μM vede k nárůstu životaschopnosti buněk a snížení produkce ROS v buňkách po expozici UVA i UVB. To je ve shodě s Park a kol. (2016), kde úspěšně aplikovali hyperosid na buňky HLE-B3 s cílem prokázat protektivní účinek hyperosidu ve vztahu k produkci ROS. Po expozici UVA můžeme také pozorovat procentuální nárůst DNA v hlavě. Jelikož 8minutovou expozicí UVB bylo dosaženo pouze 8% fragmentace DNA, nebylo možné zde pozorovat významnější UV protektivní efekty. Na rozdíl od jiných měřených látek však můžeme říci, že aplikace hyperosidu nevede ke zvýšení fragmentace DNA po expozici UVB. Pro stanovení, zda má či nemá UVB protektivní účinek na DNA by bylo třeba vystavit vzorky delší expozici UVB. Ošetření buněk hyperosidem vede samo o sobě k poklesu mitochondriálního membránového potenciálu. Jelikož z předchozích měření víme, že použité koncentrace hyperosidu nepůsobí na buňky toxicky, depolarizační účinek zřejmě nevede k poškození mitochondrií. Depolarizace však může vést ke snížení endogenní produkce ROS, a tak lépe eliminovat ROS vznikající v důsledku expozici UV záření. Snížení

produkce ROS může být jedním z faktorů zodpovědných za nárůst životaschopnosti buněk a (v případě expozice UVA) snížení fragmentace DNA po ozáření.

Inkubace pachypodolem v koncentracích do 3 μM vede k poklesu životaschopnosti buněk po expozici UVB oproti kontrolnímu vzorku. Ošetření buněk pachypodolem vede při následné expozici UVA k hyperpolarizaci mitochondriálního membránového potenciálu.

7 Závěr

V této diplomové práci byl zkoumán vliv UV záření na kožní buňky a možnosti ochrany před nežádoucími efekty UV záření. Byl zkoumán efekt UVA a UVB složky záření na buněčné kultury lidských keratinocytů HaCaT, konkrétně byl ověřován vliv na životaschopnost buněk, produkci ROS v buňkách, poškození mitochondrií a poškození lyzosomů. Dále byl studován vliv inkubace buněčných kultur lidských keratinocytů HaCaT s vybranými fotoprotektivními látkami na efekty vyvolané UV zářením. Byly studovány změny v důsledku aplikace fotoprotektivních látek na životaschopnost buněk, produkci ROS v buňkách, poškození mitochondrií, poškození lyzosomů a poškození jaderné DNA. Životaschnopnost buněk byla stanovena pomocí MTT testu. Množství ROS v buňkách bylo detekováno pomocí fluorescenční značky CM-H_2DCFDA. Ke studiu poškození mitochondrií (změny mitochondriálního membránového potenciálu) byla využita fluorescenční značka JC-1. Poškození lyzosomů (narušení integrity lyzosomální membrány) v buňce bylo určeno pomocí fluorescenčních značek Acridine Orange a LysoTracker Blue. Pro studium míry poškození DNA v buňkách byla využita metoda Comet assay.

V části mapující vliv UV záření na HaCaT buňky byly potvrzeny všechny předpoklady. UVA i UVB expozice buněk vede ke snížení životaschopnosti. Zatímco v případě UVA záření je potřeba k významné redukci životaschopnosti buněk dávka přesahující 15 $J \cdot cm^{-2}$, k redukci životaschopnosti buněk v důsledku působení UVB postačuje dávka 10× menší. Již malé dávky záření (1,2 $J \cdot cm^{-2}$ pro UVA, 0,6 $J \cdot cm^{-2}$ pro UVB) vedou k významnému nárůstu množství ROS v buňkách, přičemž produkce ROS je více než 2× vyšší v případě expozice UVB než v případě expozice UVA o stejné dávce. Vyšší dávky (4 $J \cdot cm^{-2}$ pro UVA, 2 $J \cdot cm^{-2}$ pro UVB) vedou k narušení membránové integrity lyzosomů a poloviční dávky UV záření vedou k depolarizačním změnám v membránovém potenciálu mitochondrií. Při stejných

dávkách záření dochází ke všem zmíněným jevům ve větší míře v důsledku expozice UVB ve srovnání s expozicí UVA.

V části mapující vliv UVA a UVB fotoprotektivních látek bylo podrobně studováno 8 fotoprotektivních látek – astragalin, 2,4-dihydroxybenzofenon, 2-hydroxy-4-methoxybenzofenon, β-karoten, hyperosid, 3-(4-methylbenzyliden)kafr, pachypodol a transurokanová kyselina. Úvodnímu studium byly podrobeny i nanočástice TiO_2. UV protektivní účinek byl zjištěn u 3-(4-methylbenzyliden)kafru, transurokanové kyseliny a hyperosidu. Ošetření buněk 3-(4-methylbenzyliden)kafrem působí UVA protektivně, dochází k poklesu produkce ROS a k nižší fragmentaci DNA ve srovnání s kontrolními vzorky. Mechanismus biologického účinku 3-(4-methylbenzyliden)kafru musí být jiný než fyzikální, neboť vykazuje jen minimální schopnost absorbovat fotony v oblasti použitého UVA záření. Transurokanová kyselina díky absorpci v UVB oblasti působí na buňky UVB protektivně a zvyšuje jejich životaschopnost po expozici UVB. Kromě UVB protektivního účinku transurokanová kyselina vede při vystavení působení UVB záření ke stimulaci buněk k proliferaci. Pozorovaný nárůst životaschopnosti buněk ošetřených transurokanovou kyselinou a vystavených UVB záření činil až 300 %. Nejlepších výsledků bylo dosaženo po inkubaci buněk s hyperosidem. Tato inkubace vede k nárůstu životaschopnosti buněk a poklesu v produkci ROS po expozici UVA i UVB zářením a ke snížení fragmentace DNA po expozici UVA. Hyperosid podobně jako transurokanová kyselina nevede pouze k ochraně buněk před UV zářením, ale v kombinaci s UV zářením také stimuluje buněčnou proliferaci. Inkubace s hyperosidem vede k významné depolarizaci mitochondriálního membránového potenciálu, aniž by vedla k významnému snížení buněčného růstu a dělení. Mechanismus UV protekce hyperosidu se zdá být spojený právě s depolarizací mitochondriálního membránového potenciálu, která může vést k menší celkové produkci ROS při vystavení buněk UV záření.

Seznam literatury

Ahmedova A., V. M., Enchev V., Mitewa M. (2002) 2-Acetylindan-1,3-dione and its Cu^{2+} and Zn^{2+} complexes as promising sunscreen agents. *International Journal of Cosmetic Science* **24**, 103–110.

Baier J., Maisch T., Maier M., Engel Eva nad Landthaler M., Bäumler W. (2006) Singlet Oxygen Generation by UVA Light Exposure of Endogenous Photosensitizers. *Biophys. J.* **91**, 1452–1459.

Bäumler W., Regensburger J., Knak A., Felgenträger A., Maisch T. (2012) UVA and endogenous photosensitizers – the detection of singlet oxygen by itsluminescence. *Photochem. Photobiol. Sci.* **11**, 107–117.

Beneš J., Kymplová J., Vítek F. (2015) *Základy fyziky pro lékařské a zdravotnické obory*. Grada Publishing, Praha, 166–168 stran.

Berneburg M., Plettenberg J., Krutmann J. (2000) Photoaging of human skin. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **16**, 239–244.

Birch-Machin M. A., Swalwell H. (2010) How mitochondria record the effects of UV exposure and oxidative stress using human skin as a model tissue. *Mutagenesis* **25**, 101–107.

Brand R. M., Wipf P., Epperly M. W., Greenberger J. S., Falo L. D. (2018) Targeting Mitochondrial Oxidative Stress to Mitigate UV-Induced Skin Damage. *Front. Pharmacol.* **9**, 1–10.

Buček M. (2003) *Kapitoly z dermatovenerologie*. 2nd ed., Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, 225 stran.

Cantrell A., McGarvey D. J., Truscott T. G. (2001) Photochemical and photophysical properties of sunscreens. In: *Sun Protection in Man.* (Giacomoni P. U. eds.), Elsevier Science, Amsterdam, 495–519.

Castro G., Blanco S., F.H. F. (2003) Characterization and structural study of the complex of Al(III) with 2,4-dihydroxy-benzophenone. Ionic strength and solvent effects. *Spectrochimica Acta Part A* **59**, 2685–2696.

Čihák R. (2016) *Anatomie 3*. 3rd ed., Grada Publishing, Praha, 832 stran.

Davies M. J., Truscott R. J. (2001) Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **63**, 114–125.

Dunaway S., Odin R., Zhou L., Ji L., Zhang Y., Kadekaro A. L. (2018) Natural Antioxidants: Multiple Mechanisms to Protect Skin From Solar Radiation. *Front. Pharmacol.* **9**, 1–14.

Encyclopedia Britannica: https://www.britannica.com/science/human-skin (24. 02. 2021).

Ettler J., Ettler K. (2016) Aktuální pohled na fotoprotekci kůže. *Dermatol. praxi* **10**, 54–59.

Friedman B. J., Lim H. W., Wang S. Q. (2016) Photoprotection and Photoaging. In: *Principles and Practice of Photoprotection.* (Wang S. Q., Lim H. W. eds.), Adis, Switzerland, 61–74.

Garmyn M., Van den Oord J. (2004) Clinical and Histological Changes of Photoaging. In: *Photoaging.* (Rigel D. S., Weiss R. A., Lim H. W., Dover J. S. eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, 33–54.

Glogau R. G. (2004) Photoaging and Aging Skin. In: *Photoaging.* (Rigel D. S., Weiss R. A., Lim H. W., Dover J. S. eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, 65–72.

González S., Gilaberte-Calzada Y. (2009) Oral and Other Non-sunscreen Photoprotective Agents. In: *Clinical Guide to Sunscreens and Photoprotection.* (Draelos Z. D., Lim H. W. eds.), Informa Healthcare, New York, 207–222.

Grimes D. R. (2015) Ultraviolet radiation therapy and UVR dose models. *Medical Physics* **42**, 440–455.

Halliday G. M., Hönigsmann H. (2009) Sunscreens, Photoimmunosuppression, and Photoaging. In: *Clinical Guide to Sunscreens and Photoprotection.* (Draelos Z. D., Lim H. W. eds.), Informa Healthcare, New York, 101–116.

Hart P. H., Norval M., Byrne S. N., Rhodes L. E. (2018) Exposure to Ultraviolet Radiation in the Modulation of Human Diseases. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **14**, 55–81.

Helfrich Y. R., Sachs D. L., Voorhees J. J. (2012) Overview of Skin Aging and Photoaging. *Dermatology Nursing* **20**, 177–183.

Huang A. H., Chien A. L. (2020) Photoaging: a Review of Current Literature. *Current Dermatology Reports* **9**, 22–29.

Chalupníková N. (2020) *Vliv UV záření na buněčné kultury.* Bakalářská práce, UP Olomouc, Česká republika.

Chung J., Cho S., Kang S. (2004) Why Does the Skin Age? Intrinsic Aging, Photoaging, and Their Pathophysiology. In: *Photoaging.* (Rigel D. S., Weiss R. A., Lim H. W., Dover J. S. eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, 1–13.

Jablonski N. G. (2004) The Evolution of Human Skin and Skin Color. *Annu. Rev. Anthropol.* **33**, 585–623.

Jin G. H., Liu Y., Jin S.-Z., Liu X.-D., Shu-Zheng L. (2007) UVB induced oxidative stress in human keratinocytes and protective effect of antioxidant agents. *Radiation and Environmental Biophysics* **46**, 61–68.

Kim E. K., Kim J. H., Jeong S., Choi Y. W., Choi H. J., Kim C. Y., Kim Y.-M. (2019) Pachypodol, a Methoxyflavonoid Isolated from Pogostemon cablin Bentham Exerts Antioxidant and Cytoprotective Effects in HepG2 Cells: Possible Role of ERK-Dependent Nrf2 Activation. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1–14.

Kligman L., Kligman A. (1986) The nature of photoaging: its prevention and repair. *Photodermatol.* **3**, 349–355.

Krutmann J., Gilchrest B. A. (2006) Photoaging of Skin. In: *Skin Aging.* (Gilchrest B. A., Krutmann J. eds.), Springer, Berlin, 33–43.

Krutmann J., Yarosh D. (2006) Modern Photoprotection of Human Skin. In: *Skin Aging.* (Gilchrest B. A., Krutmann J. eds.), Springer, Berlin, 103–112.

Lim H. W., Thomas L., Rigel D. S. (2004) Photoprotection. In: *Photoaging.* (Rigel D. S., Weiss R. A., Lim H. W., Dover J. S. eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, 73–88.

Marieb E. N., Hoehn K. (2016) *Human anatomy & Physiology.* 10th ed., Pearson Education, San Francisco, 1264 stran.

McGrath J. A., Uitto J. (2016) Structure and Function of the Skin. In: *Rook's Textbook of Dermatology.* (Griffiths C. E. M., Barker J., Bleiker T., Chalmers R., Creamer D. eds.), John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2.1–2.48.

Mitra S., Nguyen L. N., Akter M., Park G., Choi E. H., Kaushik N. K. (2019) Impact of ROS Generated by Chemical, Physical, and Plasma Techniques on Cancer Attenuation. *Cancers* **11**, 1–31.

Montagna W. (1974) *The structure and function of skin.* 3rd ed., Academic Press, New York, 448 stran.

Moyal D., Fourtanier A. (2004) Acute and Chronic Effects of UV on Skin: What Are They and How to Study Them? In: *Photoaging.* (Rigel D. S., Weiss R. A., Lim H. W., Dover J. S. eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, 15–32.

Mullenders L. H. F. (2018) Solar UV damage to cellular DNA: from mechanisms to biological effects. *Photochem. Photobiol. Sci.* **17**, 1842–1852.

Nguyen T. T. T. (2014) *Screening of mycosporine-like compounds in the Dermatocarpongenus. Phytochemical study of the lichen Dermatocarpon luridum.* Disertační práce, Université de Rennes, Francie.

Nichols J. A., Kariyar S. K. (2010) Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, anti-oxidant and DNA repair mechanisms. *Arch. Dermatol. Res.* **302**, 1–19.

Pandel R., Poljšak B., Godic A., Dahmane R. (2013) Skin Photoaging and the Role of Antioxidants in Its Prevention. *International Scholarly Research Notices* **2013**, 1–11.

Park J. Y., Han X., Piao M. J., Oh M. C., Fernando P. M. D. J., Kang K. A., Ryu Y. S., Jung U., Kim I. G., Hyun J. W. (2016) Hyperoside Induces Endogenous Antioxidant System to Alleviate Oxidative Stress. *Journal of Cancer Prevention* **21**, 41–47.

Pattison D. I., Davies M. J. (2006) Actions of ultraviolet light on cellular structures. In: *Cancer: Cell Structures, Carcinogens and Genomic Instability.* (Bignold L. P. eds.), Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, 131–157.

Paz M. L., Maglio D. H. G., Weill F. S., Bustamante J., Leoni J. (2008) Mitochondrial dysfunction and cellular stress progression after ultraviolet B irradiation in human keratinocytes. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **24**, 115–122.

Petersen A. B., Gniadecki R., Vicanova J., Thorn T., Wulf H. C. (2000) Hydrogen peroxide is responsible for UVA-induced DNA damage measured by alkaline comet assay in HaCaT keratinocytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **59**, 123–131.

Poljsak B. (2012) *Skin Aging, Free Radicals and Antioxidants.* Nova Science Publishers, New York, 409 stran.

Rai R., Shanmuga S. C., Srinivas C. (2012) Update on Photoprotection. *Indian J. Dermatol.* **57**, 335–342.

Rajnochová Svobodová A. (2012) *Poškození kůže působením slunečního záření, možnosti ochrany a prevence.* Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta, Olomouc.

Riaz A., Rasul A., Hussain G., Zahoor M. K., Jabeen F., Subhani Z., Younis T., Ali M., Sarfraz I., Selamoglu Z. (2018) Astragalin: A Bioactive Phytochemical with Potential Therapeutic Activities. *Adv. Pharmacol. Sci.* **2018**, 1–15.

Rodger A. (2013) UV Absorbance Spectroscopy of Biological Macromolecules. In: *Encyclopedia of Biophysics.* (Roberts G. C. K. eds.), Springer, Berlin.

Rodrigues D., Viotto A. C., Checchia R., Gomide A., Divinomar S., Itri R., Baptista M. S., Martins W. K. (2016) Mechanism of Aloe Vera extract protectionagainst UVA: shelter of lysosomal membraneavoids photodamage. *Photochem. Photobiol. Sci.* **15**, 334–350.

Roelandts R. (2009) History of Photoprotection. In: *Clinical Guide to Sunscreens and Photoprotection.* (Draelos Z. D., Lim H. W. eds.), Informa Healthcare, New York, 1–10.

Sagaradze V., Babaeva E., E.I. K. (2017) HPLC-UV Method for Determing Flavonoids in Hawthorn Flowers and Leaves. *Pharmaceutical Chemistry Journal* **51**, 277–280.

Sies H., Stahl W. (2004) Nutritional Protection Against Skin Damage from Sunlight. *Annu. Rev. Nutr.* **24**, 173–200.

Sinha R. P., Häder D.-P. (2002) UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**, 225–236.

Sivandzade F., Bhalerao A., Cucullo L. (2019) Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dyeas a Sensitive Fluorescent Probe. *Bio. Protoc.* **9**, 1–13.

Stahl W., Sies H. (2012) β-Carotene and other carotenoids in protection from sunlight. *The American Journal of Clinical Nutrition* **96**, 1179–1184.

Taylor C. R., Sober A. J. (1996) Sun exposute and skin disease. *Annu. Rev. Med.* **47**, 181–191.

Tulah A. S., Birch-Machin M. A. (2013) Stressed out mitochondria: The role of mitochondria in ageing and cancer focussing on strategies and opportunities in human skin. *Mitochondrion* **13**, 444–453.

Tyrrell R. M. (2012) Modulation of gene expression by the oxidative stress generated in human skin cells by UVA radiation and the restoration of redox homeostasis. *Photochem. Photobiol. Sci.* **11**, 135–147.

World Health Organization: https://www.who.int/health-topics/ultraviolet-radiation (07. 03. 2021).

Wezynfeld E. N., Goch W., Bal W., Fraczyk T. (2014) cis-Urocanic acid as a potential nickel(II) bindingmolecule in the human skin. *Dalton Trans.* **43**, 3196–3201.

Wilson B. D., Moon S., Armstrong F. (2012) Comprehensive Review of Ultraviolet Radiation and the Current Status on Sunscreens. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* **5**, 18–23.

Wondrak G. T., Jacobson M. K., Jacobson E. L. (2006) Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. *Photochem. Photobiol. Sci.* **5**, 215–237.

Yaar M. (2006) Clinical and Histological Features of Intrinsic versus Extrinsic Skin Aging. In: *Skin Aging.* (Gilchrest B. A., Krutmann J. eds.), Springer, Berlin, 9–22.

Yang S. a kol. (2017) Nrf2- and Bach1 May Play a Role in the Modulation of Ultraviolet A-Induced Oxidative Stress by Acetyl-11-Keto-β-Boswellic Acid in Skin Keratinocytes. *Skin. Pharmacol. Physiol.* **30**, 13–23.

Yarosh D. B., Smiles K. A. (2009) DNA Repair and Photoprotection. In: *Clinical Guide to Sunscreens and Photoprotection.* (Draelos Z. D., Lim H. W. eds.), Informa Healthcare, New York, 169–179.

Yin R., Chen Q., Hamblin M. R. (2015) *Skin Photoaging*. Morgan & Claypool Publishers, San Rafael, USA, 56 stran.

Young A. R. (1997) Chromophores in human skin. *Phys. Med. Biol.* **42**, 789–802.

Záruba F., Vosmík F., Záhejský J., Buchvald J., Jirásek L. (1994) *Dermatovenerologie*. Scientia Medica, Praha, 248 stran.