UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

Vliv UVA záření na stárnutí kožních buněk

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Bc. Veronika Horáčková**
Studijní program: N1501 Experimentální biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: Doc. Ing. Alena Rajnochová Svobodová, Ph.D.
Termín odevzdání práce: 2019

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Veronika Horáčková
Název práce	Vliv UVA záření na stárnutí kožních buněk
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce	doc. Ing. Alena Rajnochová Svobodová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	UVA záření díky své nízké energii a dlouhé vlnové délce proniká do hlubších vrstev kůže, kde působí nepřímo masivní produkcí reaktivních sloučenin kyslíku a dusíku (ROS a RNS). Při nedostatečnosti nebo překročení kapacity antioxidačních systémů může docházet oxidačnímu stresu, který se mimo jiné podílí na procesu předčasného stárnutí buněk. Schopnost antioxidačních systémů eliminovat ROS/RNS a zabránit oxidačnímu poškození rovněž klesá s postupujícím věkem. Existuje pouze omezený počet studií zabývajících se vztahem mezi stárnutím a resistencí lidského organismu vůči oxidačnímu stresu. Cílem této diplomové práce bylo i) porovnat senzitivitu lidských kožních fibroblastů izolovaných z kožních fragmentů od dospělých a dětských dárců vůči působení UVA záření během dlouhodobé kultivace, a ii) porovnat senescenci a vybrané parametry oxidačního stresu u fibroblastů opakovaně ozářených UVA světlem a buněk nevystavovaných UVA světlu během dlouhodobé kultivace. Z výsledků vyplynulo, že životaschopnost a proliferace fibroblastů je srovnatelná u buněk od dětských i dospělých dárců. U parametrů oxidačního stresu (hladiny ROS a GSH) bylo nalezeno odlišné chování obou typů buněk. Senescence u neozařovaných buněk narůstala s každou pasáží (délkou kultivace), zatímco u ozařovaných buněk byla minimální. U

parametrů oxidačního stresu byl nalezen největší vliv UVA expozice na počátku experimentu a postupně se snižoval. Výsledky naznačují, že u kožních fibroblastů může docházet v průběhu dlouhodobé kultivace k adaptaci na působení UVA fotonů.

Klíčová slova	UVA záření, kůže, stárnutí kůže, předčasné stárnutí kůže, ROS, oxidační stres, senescence
Počet stran	69
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Veronika Horáčková
Title of thesis	Effect of UVA radiation on (photo)ageing of skin cells
Type of thesis	Diploma thesis
Department	Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc
Supervisor	doc. Ing. Alena Rajnochová Svobodová, Ph.D.
The year of presentation	2019
Abstract	UVA radiation, due to its low energy and long wavelength, penetrate deep to the skin and causes indirect damage via massive production of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS). When antioxidant systems have insufficient activity, or their capacity is exceeded, conditions of oxidative stress can occur. Oxidative stress may contribute among others to the aging process. However, the ability of antioxidant systems to eliminate ROS/RNS and prevent oxidative damage usually decrease with the increasing age. There is only a limited number of studies dealing with the relationship between aging and resistance to oxidative stress. The aim of this diploma thesis was i) to compare sensitivity of human dermal fibroblasts isolated from skin fragments obtained from adult and child donors to UVA radiation during long-term cultivation, and ii) to compare senescence and selected markers of oxidative stress in fibroblasts exposed repeatedly to UVA radiation and non-irradiated fibroblasts during long-term cultivation. Obtained results showed minimal difference between cells from adult´s and child´s donors in relation to cell viability and proliferation. In oxidative stress markers (ROS and GSH level) different behaviour between cell was found. Senescence in non-irradiated fibroblasts increased with increasing number of passage (time of cultivation), while in

UVA exposed cells number of senescent cells was low. In oxidative stress markers the highest effect of UVA radiation was found at the beginning of experiment and then step by step decreased. The results suggest that human dermal fibroblasts can adapt to UVA-stimulated effects during cultivation.

Keywords	UVA radiation, skin, aging, photoaging, ROS, oxidative stress, senescence
Number of pages	69
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Aleny Rajnochové Svobodové, Ph.D. za použití citované literatury.

V Olomouci dne

…….

Veronika Horáčková

Poděkování

Ráda bych mnohokrát poděkovala doc. Ing. Aleně Rajnochové Svobodové, Ph.D. za odborné vedení práce, nespočet rad a především za trpělivost a ochotu při vypracovávání diplomové práce. Dále bych chtěla velice poděkovat doc. RNDr. Jitce Vostálové, Ph.D za cenné rady a celému kolektivu Ústavu lékařské chemie a biochemie za poskytnutí přátelského kolektivu.

Tato diplomová práce byla finančně podporována granty GA CR 15-10897S, IGA_LF_2017_011 a IGA_LF_2018_012 a institucionální podporou Univerzity Palackého v Olomouci RVO 61989592.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK 13
1. CÍLE PRÁCE 13
2. ÚVOD 13
3. TEORETICKÁ ČÁST 14
3.1 Kůže 14
3.1.1 Fyziologie kůže 14
3.1.2 Anatomie kůže 14
3.2 Sluneční záření 20
3.2.1 UVA záření 21
3.2.2 UVB záření 22
3.2.3 UVC záření 23
3.3 Mechanismus působení UV fotonů 23
3.3.1 Biologické působení ROS a RNS 25
3.3.2 Antioxidační systém 26
3.4 Akutní a chronické změny kůže vyvolané působením UV záření 28
3.5 Stárnutí 29
3.5.1 Přirození stárnutí kůže 31
3.5.2 Předčasné stárnutí kůže (photoageing) 31
3.5.3 Biomarkery stárnutí kůže 32
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 34
4.1 Biologický materiál 34
4.2 Přístrojové vybavení 34
4.3 Ostatní materiál a pomůcky 34
4.4 Použité chemikálie a roztoky 35
4.5 Použité roztoky 36

4.5.1 Roztoky pro kultivaci kůže ... 36
4.5.2 Roztoky pro kultivaci a práci s fibroblasty ... 36
4.5.3 Roztoky pro barvení neutrální červení ... 36
4.5.4 Roztoky pro barvení pomocí MTT ... 36
4.5.6 Roztoky pro stanovení proteinů Lowryho metodou ... 37
4.5.7 Roztoky pro stanovení proteinů metodou dle Bradforda ... 37
4.5.8 Roztoky pro stanovení glutathionu ... 37
4.5.9 Roztoky pro stanovení ROS ... 38
4.5.10 Roztoky pro stanovení proliferace buněk metodou ELISA ... 38
4.5.11 Roztoky pro stanovení aktivity β-galaktosidasy ... 38
4.6 Použité metody a pracovní postupy ... 39
4.6.1 Izolace a kultivace fibroblastů ... 39
4.6.2 Ozařování buněk ... 39
4.6.3 Stanovení viability buněk pomocí MTT ... 40
4.6.4 Stanovení viability buněk pomocí neutrální červeně ... 40
4.6.5 Stanovení proliferace buněk metodou ELISA ... 41
4.6.6 Stanovení hladiny glutathionu v buňkách ... 41
4.6.7 Stanovení bílkovin Lowryho metodou ... 42
4.6.8 Stanovení produkce ROS v kožních buňkách ... 42
4.6.9 Stanovení proteinů v kožních buňkách pomoc metody dle Bradfordové ... 42
4.6.10 Stanovení aktivity β-galaktosidázy ... 43
4.6.11. Vyhodnocení a statistické zpracování dat ... 43
5. VÝSLEDKY ... 44
5.1 Porovnání buněk od dětských a dospělých dárců ... 44
5.1.1 Stanovení viability buněk ... 44
5.1.2 Stanovení proliferace buněk ... 46

5.2 Vliv opakované expozice UVA záření na senescenci a oxidační stres u kožních fibroblastů 49
5.2.1 Stanovení aktivity β-galaktosidasy 50
5.2.2 Stanovení hladiny ROS a glutathionu v buňkách 51
6. DISKUZE 53
6.1 Porovnání senzitivity fibroblastů od dětských a dospělých dárců vůči působení UVA záření během dlouhodobé kultivace 55
6.2 Vliv opakované expozice UVA záření na senescenci a oxidační stres u kožních fibroblastů 57
7. ZÁVĚR 59
POUŽITÁ LITERATURA 60

SEZNAM ZKRATEK

$^1O_2$	singletový kyslík
6-4PP	(6-4)-pyrimidin-pyrimidonové fotoprodukty
8-oxo-G	8-oxo-7,8-dihydroguanin
AP-1	aktivační protein-1
ATP	adenosintrifosfát
BrdU	5-bromo-2´-deoxyuridin
CDP	syn-cyklobutan-pirimidinový dimer
DNTB	2,2´dinitro-5,5´dithiobenzoová kyselina
ELISA	enzymaticky značená imunoanalýza
GPx	glutathionperoxidása
GSH	glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
GST	glutathion-S-transferása
GSR	glutathion reduktása
H_2O_2	peroxid vodíku
HO	hemoxygenása
KAT	katalasa
MED	minimální erytémová dávka
MMP	matrixové metaloproteinásy
mtDNA	mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
$O_2^{\bullet -}$	superoxidový aniont
$p16^{INK4a}$	tumor supresorový protein
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
SA-β-gal	SA-β-galaktosidasa

SAHF	ohniska heterochromatinu asociovaná se senescencí; senescence-associated heterochromatin foci
SOD	superoxid dismutasa
SOD2	superoxid dismutasa 2
TGF-β	transformační růstový faktor
TRx	thiredoxinreduktasa
UCA	kyselina urokanová
UV	ultrafialové záření
UVA	A složka ultrafialového záření
UVB	B složka ultrafialového záření
UVC	C složka ultrafialového záření
VIS	viditelné záření
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Heatlh Organization)

1. CÍLE PRÁCE

1. Porovnat primární lidské kožní fibroblasty izolované z kožní tkáně dospělých dárců a dětských dárců – vyhodnotit jejich senzitivitu vůči působení UVA záření během dlouhodobé kultivace.

2. Porovnat senescenci a vybrané parametry oxidačního stresu u primárních kožních fibroblastů dlouhodobě kultivovaných bez UVA ozáření a fibroblastů opakovaně vystavených UVA záření.

2. ÚVOD

Primárně lidská kůže poskytuje ochranu organismu proti vnějším vlivům (slunečnímu záření, mikroorganismům a toxinům a mechanickému poškození). Dále slouží ke komunikaci s okolním prostředím pomocí smyslových tělísek a nervových zakončení, udržuje teplotu těla a podílí se na imunitních procesech. Role kůže pro lidský organismus je tedy nenahraditelná. Nejhojnějším vnějším faktorem působícím na kůži je sluneční záření, jehož součástí je UV záření. Složka A UV má v porovnání v ostatními složkami UV záření (UVB a UVC) nejdelší vlnovou délku, tzn. má nejnižší energii, avšak proniká až do hlubších vrstev kůže, kde může poškodit nejen kožní buňky, ale také kožní cévy. Ačkoli je UVA záření pro organismus prospěšné, protože stimuluje tvorbu melaninu, který spolu s keratinocyty poskytuje přirozenou ochranu kůže nebo je možné jej použit k fototerapiím, je nyní známo především pro své negativní účinky na kůži. Díky své nízké energii UVA záření působí v kůži nepřímo masivní produkcí ROS a RNS. Pokud není aktivita antioxidačních systémů dostatečná pro eliminaci ROS, dochází k oxidačnímu poškození DNA, proteinů, lipidů. Následně expozice UVA záření vede k akutním i chronickým změnám kůže, jejichž rozsah závisí na intenzitě záření a době expozice UVA záření. Akutní účinky UVA záření na kůži, včetně vlivu na genovou expresi, nejsou tak dobře známy jako účinky UVB záření, proto nebylo UVA záření dlouho považováno za nebezpečné. V poslední době již bylo prokázáno, že UVA záření je biologicky aktivní a mutagenní a je považováno za zdraví škodlivé, proto je důležité pochopení biologického vlivu UVA záření na kůži. Při opakované expozici UVA záření dochází k nevratnému poškození kůže, a to jejímu předčasnému stárnutí. Dále dlouhodobé vystavení kůže UVA záření může vést až k rakovině kůže, která je celosvětově jednou z nejčastějších malignit. Přirozené (chronologické) stárnutí kůže je složitý degenerativní proces vedoucí k funkčním změnám kůže, naproti tomu předčasné stárnutí kůže (photoaging) vyvolané UVA zářením způsobuje výrazné morfologické a fyziologické změny kůže, jako je elatóza, hyperpigmentace nebo tvorba neoplastických změn.

Rozsah poškození kožních buněk lze stanovit měřením hladiny antioxidačního enzymu GSH nebo přímým stanovením ROS pomocí fluorescenční sondy. Dále lze stárnutí (senescenci) buněk stanovit pomocí biomarkerů stárnutí, např. pomocí β-galaktosidásy. Běžně používanými indikátory vitality buněk je stanovení hladiny proteinů, aktivity proteinů nebo měření proliferujících buněk enzymatickou imunoanalýzou.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Kůže

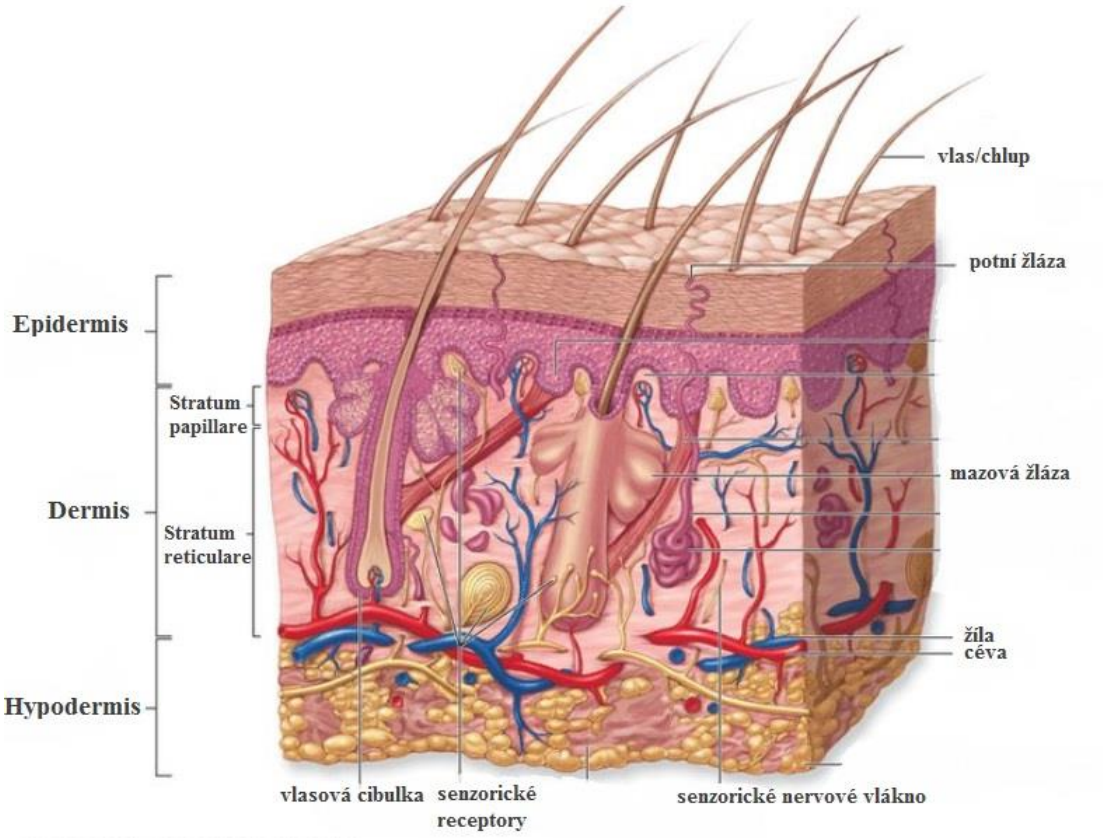
Kůže pokrývá celý vnější povrch lidského těla a je primárním místem interakce organismu s vnějším okolním. Kůže je největším a zároveň nejtěžším orgánem lidského těla. Tloušťka (síla) kůže se pohybuje v rozmezí pouze 0,1-0,4 mm v závislosti na věku, pohlaví, výživě a topografii, dosahuje plochy 1,2-2,2 m^2 a tvoří přibližně 10-15 % tělesné hmotnosti dospělého člověka. Barva kůže závisí na jejím prokrvení, množství pigmentu, zdravotním a emocionálním stavu (Marieb a kol., 2007; Rajnochová Svobodová, 2012).

3.1.1 Fyziologie kůže

Vlastnosti a funkce kůže úzce souvisí s její unikátní anatomií. Kůže slouží v první řadě jako bariéra vůči vnějšímu prostředí, zásadně omezuje pronikání ultrafialového (UV) záření, mikroorganismů či toxinů. Důležité je zapojení kůže do regulace tělesné teploty, vodní bilance a homeostázy celkově. Kůže hraje roli v imunologických reakcích, je zodpovědná za syntézu některých významných látek jako je melanin nebo vitamin D, či skladování látek rozpustných v tucích (zejména vitaminy A, D, E, K) (Lopez-Ojeda a kol., 2017). Díky přítomnosti receptorů pro vnímání mechanických, tepelných a tlakových (bolestivých) podnětů přenáší kůže smyslové informace z vnějšího prostředí a má zásadní smyslovou funkci. Také se podílí na sekreci odpadních produktů (Lopez-Ojeda a kol., 2017). V důsledku poranění nebo onemocnění se některé funkce kůže mohou zásadně měnit.

3.1.2 Anatomie kůže

Krycí soustava lidského těla je tvořena kůži a jejími deriváty (vlasy, nehty, potní žlázy, mazové žlázy). Kůže je tvořena ze tří základních vrstev: pokožky (*epidermis*), škáry (*dermis*) a podkožního vaziva (*hypodermis*) (Obr. 1). Vrstvy epidermis a dermis jsou v těsném spojení díky nepravidelným výběžkům, zvaným papily. Každá ze tří vrstev kůže má specifickou strukturu, buněčné a nebuněčné složení a úlohu.



Obr. 1: Stavba kůže (Mescher a kol., 2010).

3.1.2.1 Pokožka (*epidermis*)

Pokožka je vnější vrstva kůže, která je v přímém kontaktu s vnějším prostředím. Neobsahuje žádné krevní cévy a je zcela závislá na dodávání živin a eliminaci odpadních látek difúzí z přilehlé *dermis*. Pokožka je tvořena převážně z rohovějících epidermálních buněk keratinocytů (Amirlak a kol., 2013). Další méně četné buňky *epidermis* zahrnují melanocyty, Merkelovy a Langerhansovy buňky. V pokožce se dále zakládají kožní deriváty, jako jsou vlasové folikuly nebo nehty.

Keratinocyty tvoří přibližně 90 % všech buněk *epidermis* (Patton, 2015). Hlavní funkcí keratinocytů je produkce fibrilárního proteinu keratininu, který se významně podílí na ochranných vlastnostech pokožky. Jednotlivé keratinocyty jsou těsně propojeny desmozomy, které zvyšují odolnost pokožky proti mechanickému poškození. Keratinocyty vznikají neustálým dělení buněk bazální vrstvy v nejhlubší části *epidermis*. Keratinocyty se posunují se směrem vzhůru, při čemž dochází ke změnám v jejich morfologii a produkci proteinů keratinů. Svrchní rohová vrstva *epidermis*, je tvořena z mrtvých buněk (korneocytů), které se neustále odlupují z povrchu v podobě šupinek (Rajnochová

Svobodová, 2012; Chu, 2012). Migrace buňky z bazální vrstvy k rohové vrstvě až po její odloupnutí trvá 15-30 dnů v závislosti na věku a oblasti těla (Rajnochová Svobodová, 2012; Chu, 2012).

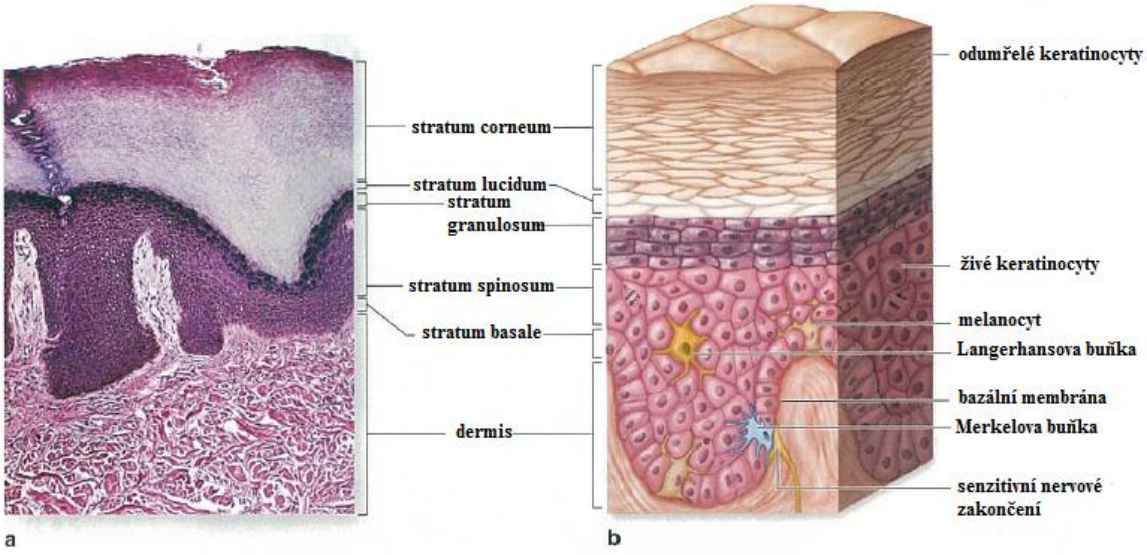
Melanocyty jsou dendritické buňky, které tvoří 10-25 % buněk bazální vrstvy *epidermis*. Dále se vyskytují ve vrstvě ostnité nebo vlasových folikulech. Melanocyty jsou zodpovědné za produkci pigmentu melaninu. Melanin je shromažďován ve speciálních váčcích nazývaných melanosomy, které postupně vyzrávají za vzniku melaninových granul. Melanocyty obsahuji nepravidelné výběžky, které vybíhají mezi buňky *stratum basale* a *spinosum* a transportují zralá melaninová granula do přilehlých keratinocytů (Rajnochová Svobodová, 2012). Melaninová granula se hromadí okolo jádra keratinocytu a přirozeně chrání DNA proti poškození slunečním zářením. UV záření, zejména UVB složka, stimuluje tvorbu melaninu v melanocytech a jeho přenosu do keratinocytů. Tato reakce, která má za následek tmavnutí kůže, zvyšuje schopnost buňky absorbovat UV záření a tím chránit genetickou informaci uloženou v jádře před poškozením (Kolarsick a kol., 2011). Nejvíce melanocytů se proto vyskytuje v těch částech kůže, které jsou nejčastěji vystaveny slunečnímu záření (obličej) (Scheibner a kol., 1983).

Langerhansovy buňky jsou migrující buňky imunitního systému. Mají hvězdicovitý tvar a nacházejí se v ostnité vrstvě. Vznikají v kostní dřeni a následně migrují krví do kůže. Tvoří 2-8 % všech buněk *epidermis*. Jejich funkcí je prezentace antigenu T-lymfocytům. Jsou nezbytné k vyvolání imunitní odpovědi proti antigenům vyskytujícím se v kůži. Jsou rovněž odpovědné za kožní hypersenzitivní reakce (Jaitley a kol., 2012).

Pokožka je na základě morfologie keratinocytů dělena na 5 vrstev: vrstva základní (*stratum basale*), vrstva ostnitá (*stratum spinosum*), vrstva zrnitá (*stratum granulosum*), vrstva světlá *(stratum lucidum*) a vrstva rohová (*stratum corneum*). Jednotlivé vrstvy pokožky jsou znázorněny na obrázku 2.

- **Bazální vrstva (*stratum basale*)**

S. basale představuje nejhlubší vrstvu *epidermis*, která přímo hraniční s *dermis*. *S. basale* je tvořena jednou vrstvou keratinocytů, které se vyznačují vysokou mitotickou aktivitou a jsou odpovědné za neustálou obměnu epidermálních buněk. Z tohoto důvodu mohou být považovány za epidermální kmenové buňky a poškození jejich DNA může vyvolat mutace a ovlivnit tak rychlost buněčného dělení, ale i další vlastnosti ostatních vrstev *epidermis* (Yarosh a kol., 2001; Chu, 2008).



Obr. 2: Stavba *epidermis*. **a**. Snímek ukazuje pořadí vrstev epidermis a přibližné velikosti a tvar keratinocytů v těchto vrstvách. Také zobrazuje svazky silných kolagenních vláken v dermis. Zcela vlevo je vývod potní žlázy. Zvětšení 100x. **b.** Schéma znázorňující pořadí vrstev epidermis také znázorňuje obvyklé umístění tří dalších důležitých, druhů buněk, které však nepatří ke keratinocytům, melanocytů, Langerhansových buněk a taktilních Merkelových buněk (Mescher a kol., 2018).

- **Ostnitá vrstva (*stratum spinosum*)**

S. spinosun je tvořena z 5-10 vrstev kubických buněk, které se směrem k povrchu kůže zplošťují. Keratinocyty *s. spinosum* jsou prostoupeny systémem intermediálních filament tvořící výběžky a dávají tak buňkám ostnitý vzhled. Buňky této vrstvy jsou stále velmi mitoticky aktivní. Díky vysoké proliferační schopnosti jsou vrstvy *s. basale* a s. *spinosum* společně nazývány zárodečnou vrstvou (*stratum germinativum Malpighii)* (Masarykova univerzita LF v Brně, Histologie – melanocyty, 2011).

- **Zrnitá vrstva (*stratum granulosum*)**

S. granulosum se skládá z několika vrstev zploštělých buněk, které obsahují ve své cytoplazmě velké množství keratohyalinových granulí. Tato granula obsahují především proteiny profilagrin, loricrin a keratinová vlákna. Tyto proteiny v buňkách *s. granulosum* postupně iniciují proces keratinizace (Chu, 2012).

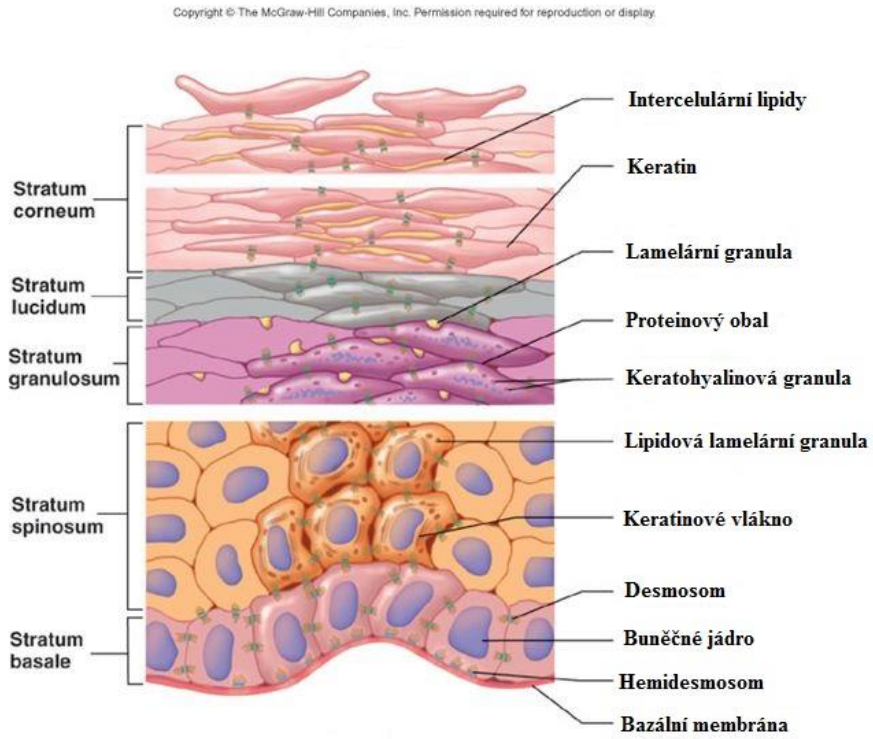
- **Světlá vrstva *(stratum lucidum*)**

S. lucidum je tvořena tenkými, velmi oploštělými buňkami. Organely ani jádra již nejsou moc zřetelná, cytoplasma je tvořena především hustou sítí keratinových filament. Tato vrstva

epidermis je patrná pouze u silnějšího typu kůže (např. bříška prstů) (Martínek a kol., 2009). Vrstva *s. lucidum* je zodpovědná za tzv. kožní bariéru, která nepropouští vodu a chemikálie včetně řady složek dermatologických přípravků (Rajnochová Svobodová, 2012).

- **Rohová vrstva (*stratum corneum*)**

S. corneum je tvořena 15-20 vrstvami bezjaderných plochých buněk (korneocytů), které jsou pevně spojeny desmozomy (Marieb a kol., 2007; Zhang, 1999). Korneocyty obsahují pouze amorfní a fibrilární proteiny zejména keratiny a jsou obklopeny lipidovou matrix, která je tvořena hlavně ceramidy, cholesterolem a volnými mastnými kyselinami. Díky svému složení rohová vrstva omezuje vstup hydrofilních látek a poskytuje bariéru proti ztrátám vody, pronikání mikroorganismů či UV záření (Rajnochová Svobodová, 2012).



Obr. 3: Proces keratinizace. Prostupná diferenciace keratinocytů a jejich vývoj v korneocyty. Ve *strarum basale* se buňky aktivně dělí, následně se zplošťují a tvoří keratohyalinová granula. Zvyšuje se obsah proteinů a ve *strarum corneum* dochází k apoptóze keratinocytu a vzniku korneocytů, které se postupně z povrchu kůže odlupují (Parks, 2016).

3.1.2.2 Škára (*dermis*)

Dermis je střední vrstva kůže zajišťující její ohebnost, pružnost a pevnost v tahu. Chrání organismus před mechanickým poškozením, váže vodu, pomáhá při tepelné regulaci

a obsahuje smyslové receptory (Freinkel a kol., 2001). *Dermis* je spojena s *epidermis* pomocí bazální membrány, která umožnuje výměnu látek mezi těmito vrstvami a transport živin do bezcévné *epidermis. Dermis* obsahuje mnoho krevních a lymfatických cév, jsou v ní uloženy mazové, potní a pachové žlázy, vlasové folikuly, svazky buněk hladké svaloviny, nervy a nervová zakončení (Rajnochová Svobodová, 2012). Škára se dělí na dvě vrstvy *stratum papillare* a *stratum reticulare.*

Stratum papillare tvoří řídké kolagenní vazivo, které je bohaté na kolagenní vlákna a buňky. Vedle majoritních fibroblastů jsou zde přítomny i makrofágy, žírné buňky a leukocyty. Vazivo vybíhá v kuželovité výběžky zvané papily, které zvětšují výživnou plochu pro *epidermis*, ale také zajišťují velmi těsné spojení obou vrstev. V papilách probíhají kličky krevních kapilár a jsou zde též v různém počtu rozmístěny exteroreceptory. Představují je jednak volná intraepitelová senzitivní nervová zakončení, jednak speciální opouzdřená nervová tělíska. Senzitivní nervová vlákna, reagující na bolest probíhají ve vazivových papilách a vybíhají mezi keratinocyty. Z nervových tělísek se zde nacházejí tělíska Ruffiniho (receptory tepla) a Meissnerova (receptory hmatu) (Martínek a kol., 2009).

Druhou vrstvu škáry, *stratum reticulare,* tvoří hustá síť kolagenních a elastických vláken, proto je zde méně buněk než ve vrstvě papilární. Kolagenní vlákna zajištují *dermis* pevnost a tuhost, elastická vlákna pružnost. S věkem se postupně snižuje množství elastických vláken a kůže tak ztrácí svou pružnost. V této vrstvě se nacházejí především tělíska Vater-Pacciniho (receptory tahu a tlaku).

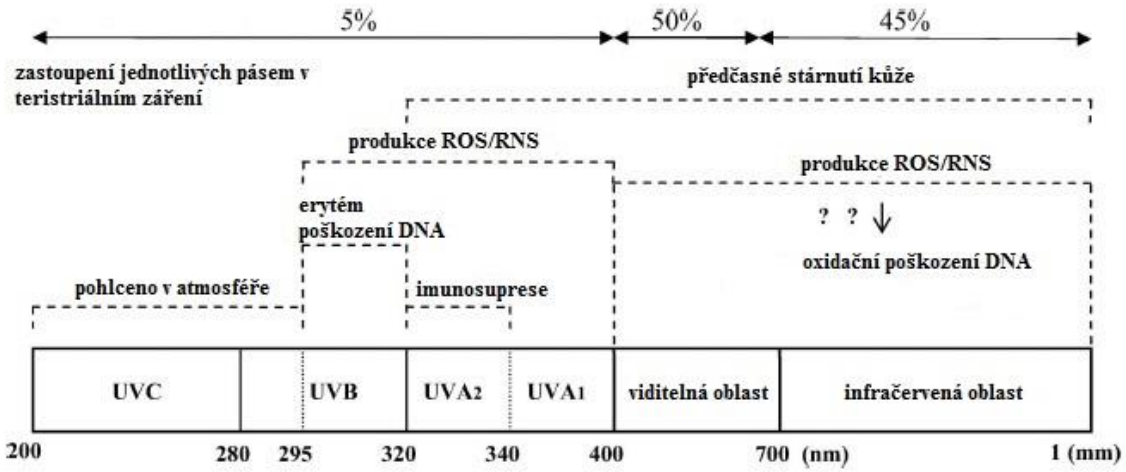
Hlavním typem buněk přítomných v dermální vrstvě jsou fibroblasty. Tyto protáhlé buňky mají výrazné drsné endoplazmatické retikulum, protože jsou zodpovědné za syntézu všech proteinových vláken obsažených v *dermis* (Rajnochová Svobodová, 2012).

3.1.2.3 Podkožní vazivo (*hypodermis*)

Podkožní vazivo je nejspodnější vrstva kůže, tvořená řídkým kolagenním vazivem a tukovou tkání. Podkožní vazivo volně přiléhá ke svalům a orgánům, a tak je kůže volně pohyblivá. Základními buňkami *hypodermis* jsou tukové buňky (adipocyty). Velké a zaoblené buňky s cytoplazmou obsahující lipidy (triglyceridy, mastné kyseliny), které pomáhají chránit orgány před mechanickým poškozením, slouží jako zásobárna energie a uchovávají teplo (Kanitakis, 2002). Tukové buňky tvořící podkožní vrstvu také uchovávají vitaminy rozpustné v tucích. Tloušťka *hypodermis* se mění v závislosti na výživě a úrovni aktivity organismu, na oblasti těla a pohlaví. V některých oblastech (např. nos, oční víčka a ušní boltce) zcela chybí (Paulsen, 1993).

3.2 Sluneční záření

Sluneční záření je elektromagnetické záření produkované Sluncem a představuje základní zdroj energie a tepla pro Zemi. Elektromagnetické záření můžeme dělit podle vlnové délky a energie na neionizující záření (radiofrekvenční, infračervené (IČ), viditelné (VIS), ultrafialové (UV)) a ionizující záření (rentgenové, gama, kosmické) (Obr. 4). Většina záření produkovaného Sluncem je pohlcena v zemské atmosféře. Na zemský povrch tak dopadá pouze záření infračervené (760-1000 nm), viditelné (390-760 nm) a část UV záření (400-295 nm) (Arnfield, 2005).



Obr. 4: Elektromagnetické spektrum slunečního záření a jeho biologické účinky. Upraveno (Rajnochová Svobodová, 2012).

UV záření vyvolává v lidském organismu řadu akutních a chronických změn, jejichž rozsah a intenzita jsou ovlivněny individuálními faktory, jako je geneticky podmíněná odolnost, aktuální stav organismu či dávka záření. Proto se studium účinků slunečního UV záření stalo v poslední době předmětem zájmu odborné i laické společnosti (Rostová a kol., 2006).

Množství či intenzita UV záření dopadajícího na zemský povrch je ovlivněna různými faktory. Jedním ze zásadních činitelů je ozonová vrstva, která ve stratosféře vytváří tenký ochranný filtr a absorbuje veškeré UVC a většinu UVB záření (Lautenschlager a kol., 2007). Další významný vliv na intenzitu UV záření mají geografické faktory, nadmořská výška a zeměpisná šířka, a postavení Slunce. Intenzita UV radiace roste s nadmořskou výškou, průměrný nárůst je 6-8 % na 1000 m. Tento růst intenzity souvisí s úbytkem

množství absorbujících látek v atmosféře. Vzhledem k zeměpisné šířce je intenzita UV záření nejsilnější u rovníku a směrem k pólům se snižuje. Při malých zenitových úhlech Slunce je intenzita UV záření větší, protože dráha paprsků v atmosféře je kratší a jejich absorpce přítomnými částicemi je menší (neplatí pro UVA oblast). Nejvyšší intenzita UV radiace je tedy v poledne (11-13 h), v létě a v tropických oblastech (Rajnochová Svobodová, 2012).

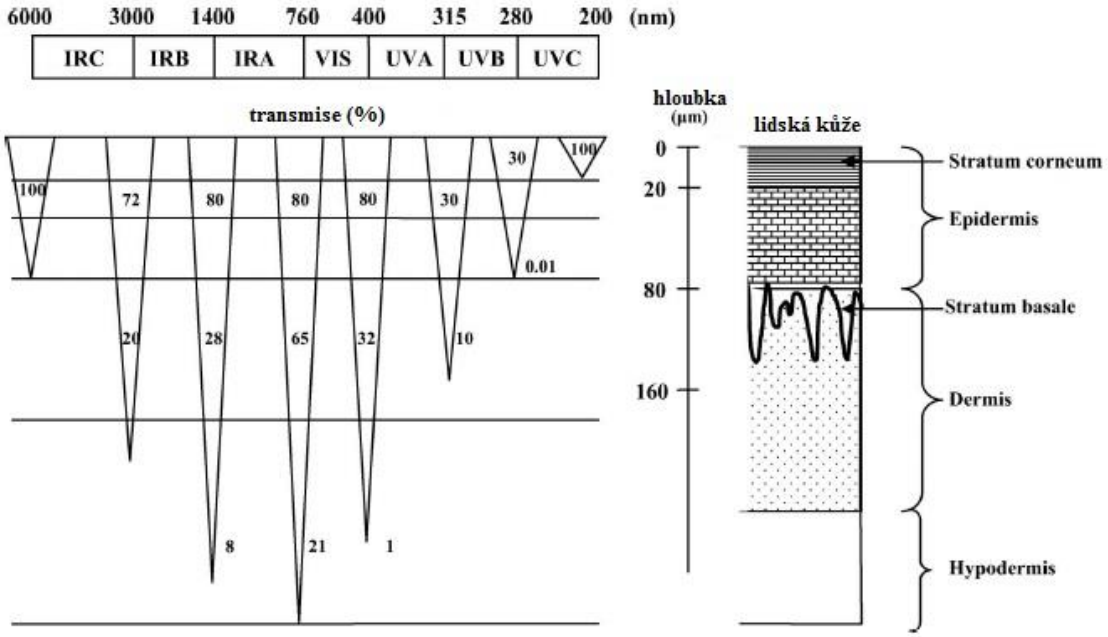
UV záření se formálně rozděluje podle vlnové délky na tři složky: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) a UVC (100-280 nm) (WHO, 2009). Jednotlivé složky se výrazně liší svými vlastnostmi a biologickými účinky.

3.2.1 UVA záření

Tvoří přibližně 90-99 % UV záření, které dopadá na zemský povrch. Vlnové délky UVA oblasti zahrnují rozsah 400-320 nm. UVA je dále členěno na UVA1 (340-400 nm) a UVA2 (315-340 nm). Při průchodu stratosférou nebo běžným okenním sklem není UVA záření téměř filtrováno. Toto záření je také označováno jako tzv. měkké UV záření, protože má nejnižší energii (Narayanan a kol., 2010). Z celého UV spektra je UVA záření nejméně škodlivé, nicméně může výrazně přispívat k účinkům UVB záření, například ke vzniku mutací a rozvoji kancerogeneze (Hazane-Puch a kol.., 2010). Ve srovnání s UVB složkou je UVA záření více pronikavé a velké množství UVA fotonů působí hluboko v *dermis*. Asi 10 % UVA záření může pronikat až k podkožní vazivové vrstvě, v důsledku toho může UVA záření poškodit nejen kožní buňky (keratinocyty, melanocyty, fibroblasty), ale způsobit i nekrózu endoteliálních buněk a narušit kožní cévy (Obr. 5).

Díky své nízké energii nejsou UVA fotony schopny vyvolat přímé poškození molekul. Mechanismus poškození kožních buněk vlivem UVA záření spočívá v iniciaci masivní produkce reaktivních sloučenin kyslíku (ROS) a dusíku (RNS). Reaktivní sloučeniny vznikají v důsledku interakce UVA fotonů s endogenními nebo exogenními molekulami zvanými chromofory (fotosenzitizéry). Mezi tyto fotosenzitivní molekuly jsou řazeny zejména báze nukleových kyselin, NAD(P)H, hem, chinony, flaviny porfyriny, karotenoidy, eumelanin, urokanová kyselina, 7-dehydrocholesterol. Vzniklé ROS a RNS poté atakují různé biomolekuly a způsobují jejich oxidační poškození. Výsledkem těchto interakcí je tvorba oxidovaných produktů lipidů (např. alkoxylové radikály, aldehydy, alkeny, (hydro)peroxidy či epoxidy), proteinů (např. karbonyly) a DNA (např. jednoduché zlomy DNA, modifikované báze DNA). Oxidované produkty biomolekul následně aktivují různé signální dráhy v buňkách nebo se postupně akumulují a negativně ovlivňují vlastnosti

kožní tkáně (Trautinger, 2001; Rajnochová Svobodová, 2012). Intenzivní nebo rozsáhlá expozice UVA záření může způsobit spálení citlivé pokožky. Opakované a dlouhodobé působení UVA způsobuje typické změny ve struktuře a funkci kůže, které jsou souhrnně označovány jako předčasné stárnutí kůže (viz. kapitola 3.4.2).



Obr. 5: Průnik jednotlivých složek slunečního záření do lidské kůže (Rajnochová Svobodová, 2012).

Vedle negativních účinků působí UVA fotony stimulačně na oxidaci melaninu již přítomného v melanocytech a jeho přesun z melanocytů do keratinocytů, čímž přispívají k přirozené ochraně kožní tkáně. UVA záření z umělých zdrojů je využíváno v kombinaci s léčivy ke speciálním dermatologickým terapiím (fototerapiím) při léčbě lupénky a vitiliga (Rajnochová Svobodová, 2012).

3.2.2 UVB záření

Vlnové délky UVB záření zahrnují rozsah 280-315 nm. Většina UVB záření je pohlcena ozonovou vrstvou. Proto z UV záření, které dosáhne zemského povrchu, pouze 1-10 % tvoří UVB záření. Díky své kratší vlnové délce UVB záření neprostupuje tak hluboko do kůže jako UVA a většina UVB fotonů je absorbována v *epidermis*. Kolem 70 % je pohlceno v rohové vrstvě, zbylé UVB záření působí zejména na buňky bazální vrstvy. Pouze minimální množství UVB (do 10 %) proniká až do dermis (Obr. 5). Díky výrazně vyšší energii, mají UVB fotony asi 1000krát vyšší mutagenní potenciál ve srovnání s UVA

zářením, a proto je UVB záření považováno za silný karcinogen (Porth, 2011). Oproti UVA, UVB záření stimuluje syntézu melaninu a způsobuje tak výrazné opálení kůže.

Díky vysoké energii UVB fotony vyvolávají přímé poškození molekul, zejména aromatických heterocyklických bází nukleových kyselin a aromatických aminokyselin, jejichž absorpční maximum se nachází mezi 260-280 nm. Z DNA fotoproduktů jsou nejhojnější cis, syn-cyklobutan-pyrimidinové dimery (CPD; 70-80 %) a (6-4)-pyrimidin-pyrimidonové fotoprodukty (6-4PP; 20-30 %). Takto se UVB podílí na vzniku mutací a iniciuje proces kancerogeneze. Modifikace aromatických aminokyselin (tryptofan, tyrosin, fenylalanin, histidin) ovlivňuje funkci proteinů a buněčnou signalizaci. UVB záření se také podílí na nepřímém poškození biomolekul, stimulací produkce ROS a RNS. Popsané účinky UVB se v kůži projevují vznikem edému, erytému, zánětlivých či alergických reakcí. UVB rovněž tlumí odezvu imunitního systému. Opakované expozice UVB záření vedou ke vzniku různých typů rakoviny kůže a přispívají i k předčasnému stárnutí kůže. UVB fotony mají výrazné nežádoucí účinky i na oči (Rajnochová Svobodová, 2012).

Vedle negativních účinků je UVB v nízkých dávkách zdraví prospěšné, neboť je nezbytné pro produkci aktivní formy vitaminu D. Pouze při absorpci záření o vlnových délkách kratších než 320 nm je 7-dehydrocholesterol v kůži přeměněn na provitamin D_3 (Rajnochová Svobodová, 2012).

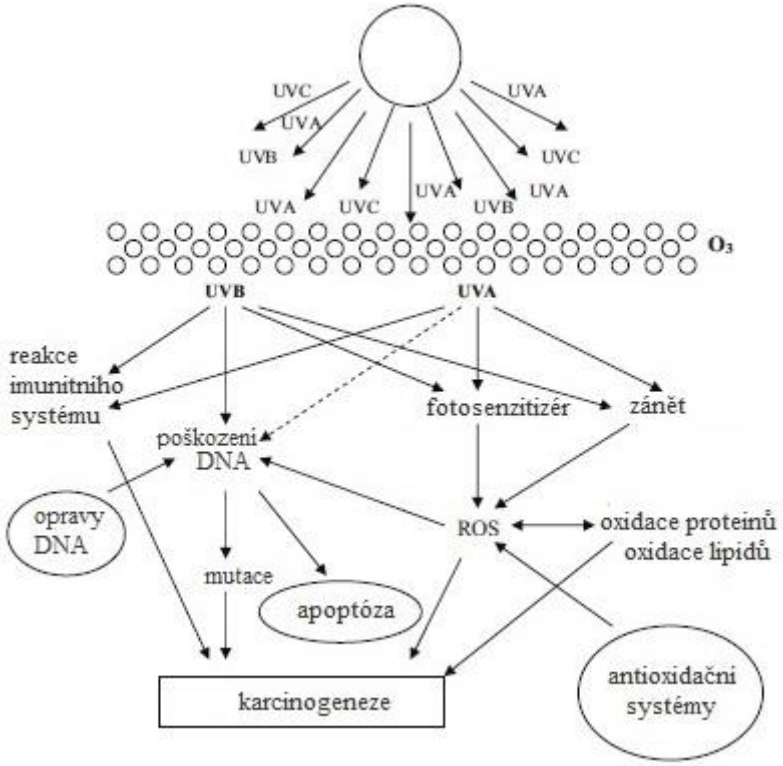
3.2.3 UVC záření

UVC záření s rozsahem vlnových délek 100-280 nm má v porovnání s UVA a UVB zářením nejvyšší energii. Díky tomu má UVC největší potenciál pro biologické poškození kožních buněk, a to i při velmi krátkých expozicích. Je vysoce mutagenní a toxické, neboť jeho vlnové délky zahrnují absorpční maximum DNA (260-265 nm). Ve stratosféře ale dochází k úplné absorpci UVC záření a energie UVC fotonů je využita k vytváření ozonu z molekulárního kyslíku. Díky ozonové vrstvě záření o vlnových délkách kratších než 295 nm na zemský povrch nedopadá. Pro své genotoxické účinky se UVC záření hojně využívá jako baktericidní prostředek k desinfekci zdravotnických zařízení nebo laboratoří pomocí germicidních lamp (Rajnochová Svobodová, 2012).

3.3 Mechanismus působení UV fotonů

K vyvolání biologického účinku slunečního záření musí být energie fotonů absorbována vhodnou endogenní nebo exogenní molekulou neboli chromoforem. Pohlcením

energie dochází k iniciaci biologických reakcí, které mohou probíhat dvěma různými mechanismy. První možností je přímá absorpce dopadajícího světla, což vede ke vzniku excitovaného stavu chromoforu a následné chemické reakci. Tento mechanismus je typický pro heterocyklické báze DNA a aromatické aminokyseliny. Druhou možností je nepřímý mechanismus, při kterém absorbovaná energie vyvolá změnu distribuce elektronů v molekule chromoforu, která tak přechází ze základního do excitovaného singletového stavu. V tomto stavu může molekula emitovat fluorescenci, vyzářit energii jako teplo, podstoupit fotochemickou reakci za vzniku fotoproduktu nebo přejít do tripletového excitovaného stavu. Nepřímý mechanismus fotosenzitizace může probíhat dvěma způsoby, které se nazývají typ I a typ II. Typ mechanismu, kterým proces proběhne, závisí na chemických vlastnostech chromoforu (Rajnochová Svobodová, 2012). Výsledkem obou mechanismů je tvorba reaktivních sloučenin a následné oxidační poškození DNA, proteinů a lipidů (Obr.6).



Obr. 6: Mechanismus působení UV záření na kožní buňky. Upraveno (Svobodová a kol., 2006).

Nepřímý mechanismus typu I zahrnuje jednoelektronový přenos z excitovaného fotosenzitizéru na jinou molekulu za vzniku volného radikálu. Primárním meziproduktem je radikál kationu, který podléhá rychlé hydrataci nebo deprotonizaci. Tento mechanismus

nevyžaduje přítomnost kyslíku pro vyvolání poškození biomolekuly a je typický pro báze DNA (Rajnochová Svobodová, 2012). Kvůli nízkému ionizačnímu potenciálu je nejčastěji atakovanou bází guanin. Nejprve dochází k tvorbě radikálu guaninu, který je dále přeměněn na 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidoguanin (za redukčních podmínek) nebo na 8-oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxo-G) (za oxidačních podmínek) (Ravanat a kol, 2001). 8-oxo-G představuje typický biochemický marker poškození DNA působením UVA záření (Panich a kol., 2016).

Nepřímý mechanismus typu II je založen na přenosu energie z excitovaného fotosenzitizéru na molekulární kyslík za vzniku ROS (Svobodová a kol., 2006). Majoritně dochází k přenosu energie z excitovaného fotosenzitizéru na molekulární kyslík za tvorby singletového kyslíku ($^1O_2$), velmi silného oxidačního činidla s dlouhým poločasem života, které je schopno reagovat s řadou molekul včetně DNA. Významná je reakce $^1O_2$ s guaninem, kdy mohou vznikat jednoduché zlomy a štěpení DNA. V menší míře může docházet při přenosu elektronu na molekulární kyslík ke vzniku superoxidového aniontu $O_2^{\bullet -}$ a jeho následné dismutaci na peroxid vodíku. Peroxid vodíku je stabilní molekula a sám o sobě není schopen vyvolat poškození. Avšak v přítomnosti iontů tranzitních kovů (Fe^{2+}, Cu^{+}) dochází ke generování velmi reaktivního hydroxylového radikálu (Fentonova reakce).

3.3.1 Biologické působení ROS a RNS

Reaktivní molekuly kyslíku a dusíku obsahující nepárový elektron, kvůli kterému velmi snadno reagují s okolními molekulami. ROS/RNS zahrnují volné radikály (hydroxylový radikál $\cdot OH$, superoxid $O_2^{\cdot -}$, oxid dusnatý $NO\cdot$), které jsou samy o sobě velmi reaktivní, kvůli nepárovému elektronu, a neradikálové reaktivní formy (peroxid vodíku H_2O_2, peroxinitrit $ONOO^-$), které jsou sice stabilní, ale dalšími reakcemi z nich mohou vznikat radikály.

ROS/RNS jsou běžně produkovány buňkami během aerobních metabolických procesů jako je tvorba ATP v dýchacím řetězci. Kromě toho je jejich produkce vyvolávána exogenními faktory, například znečištěním ovzduší, stresem nebo kouřením. Jedním z hlavních činitelů zvyšujících produkci ROS v lidském organismu je sluneční záření (Baumann, 2007). V organismu dochází k velmi rychlé neutralizaci ROS/RNS pomocí antioxidačních systémů. Pokud však produkce ROS překročí antioxidační kapacitu buňky, ROS/RNS nejsou efektivně eliminovány a začnou atakovat buněčné (makro)molekuly zejména DNA, lipidy a proteiny a způsobují jejich oxidační poškození.

Interakcí ROS/RNS s molekulami DNA může dojít k oxidaci bází i deoxyribosy. V důsledku těchto reakcí vznikají jedno, nebo dvouvláknové zlomy DNA nebo dochází k tvorbě křížových vazeb mezi DNA a proteiny. Interakcí s bázemi vzniká asi 20 oxidačně modifikovaných produktů. Díky nízkému ionizačnímu potenciálu je nejhojněji vznikajícím produktem 8-oxo-G. Oxidované báze DNA mají za následek translační chyby, mohou být významné při počátečním stádiu kancerogeneze a jsou spojovány i se vznikem maligního melanomu (Rajnochová Svobodová, 2012).

ROS/RNS mohou oxidovat nenasycené mastné kyseliny přítomné v buněčných membránách. V průběhu této neenzymatické reakce vznikají peroxylové radikály a hydroperoxidy mastných kyselin. Hydroperoxidy a cyklické peroxidy v přítomnosti tranzitních kovů (Fe^{3+}, Cu^{2+}) podléhají Fentonově reakci za vzniku peroxylového radikálu a následně dalších fragmentačních produktů (alkany, alkeny, alkoholy, aldehydy (malondialdehyd, 4-hydroxy-2-nonenal), epoxidy)). Oxidace lipidů ovlivňuje jednak jejich vlastnosti a funkce, ovlivňují propustnost buněčných membrán, ale současně působí i na genovou expresi v buňce (Rajnochová Svobodová, 2012).

Reaktivní sloučeniny také oxidují funkční skupiny aminokyselin v proteinech a peptidech, zejména SH-skupiny methioninu a cysteinu. Peroxinitrit způsobuje nitraci tyrosinu, tryptofanu a fenylalaninu. Řada aminokyselin je hydroxylována hydroxylovým radikálem. Aldehydy vzniklé lipidovou peroxidací se kovalentně váží na ε-NH_2 skupinu lysinu, čímž dochází k agregaci a zesíťování proteinů. 4-Hydroxy-2-nonenal reaguje s histidinem, lysinem a SH-skupinami a způsobuje jejich karbonylaci. Jako důsledek uvedených reakcí je změna mechanických vlastností (např. kolagen) a funkce proteinů (např. enzymy, membránové pumpy) (Rajnochová Svobodová, 2012).

3.3.2 Antioxidační systém

Kožní buňky obsahují systém antioxidantů, které slouží k inaktivaci ROS/RNS a předchází tak poškození volnými radikály. ROS/RNS produkované v kožních buňkách jsou rychle odstraňovány enzymovými a neenzymovými molekulami, které pracují společně a synergicky. Mezi významné neenzymové antioxidanty patří kyselina askorbová, koenzym Q, glutathion (GSH), thioredoxiny, tokoferol, karotenoidy či kyselina lipoová. Významné enzymové antioxidanty zahrnují katalasu (KAT), superoxiddismutasu (SOD), thiredoxinreduktasu (TRx), glutathionperoxidasu (GPx), glutathion-S-transferasu (GST),

glutathion reduktasu (GSR), NAD(P)H chinonoxidoreduktasu-1 (NQO-1) nebo hemoxygenasu (HO) (Svobodová a kol., 2006).

SOD představuje jeden z nejdůležitějších antioxidačních enzymů kůže. Její aktivita je vyšší v *epidermis* ve srovnání s *dermis*. Nachází se jak v cytosolu, tak v jádře. SOD katalyzuje přeměnu superoxidových anionů na kyslík a méně reaktivní peroxid vodíku. KAT pak detoxikuje peroxid vodíku na vodu a kyslík (Rajnochová Svobodová, 2012). KAT je lokalizována v mitochondriích a peroxisomech. Aktivita KAT je také výrazně vyšší v e*pidermis* oproti *dermis*. Je velmi citlivá k peroxidačním činidlům, což pravděpodobně souvisí s ireverzibilní oxidací enzymu. KAT je antioxidační enzym nejvíce postižený působením jak slunečního, tak UVA záření a při dlouhodobé expozici UVA záření se rychle vyčerpá. Protože se současně pomalu syntetizuje, je KAT používána jako marker akutního i chronického oxidačního stresu (Maresca a kol., 2006). GPx rovněž katalyzuje přeměnu peroxidu vodíku, ale také organických peroxidů na vodu / alkohol za využití GSH. Aktivita GPx není příliš ovlivněna slunečním či UV zářením ve srovnání s jinými antioxidačními enzymy (SOD a KAT) a z tohoto důvodu je GPx považována za jeden z nejvýznamnějších antioxidantů v kůži. TRx katalyzuje redukci disulfidů zejména thioredoxinů, ale i jiných endogenních a exogenních sloučenin včetně peroxidu vodíku, lipodových hydroperoxidů, či askorbylového radikálu zpět na vitamín C (Holeček a kol., 2004). Aktivita TRx v kůži koreluje s fototypem I-IV a při expozici UV záření dochází k intenzivní expresi TRx v keratinocytech, melanocytech i fibroblastech. GSR stejně jako TRx patří mezi disulfidové reduktasy a její hlavní substrát je oxidovaný glutathion (GSSG), který přeměňuje zpět na GSH. Aktivita GSR je jen málo ovlivňována působením slunečního záření a mírný pokles aktivity enzymu je vykompenzován během několika hodin po expozici. HO katalyzuje degradaci hemu, který je uvolňován z hemoproteinů v důsledku UVA ozáření. Hem je přeměňován na významné nízkomolekulární antioxidanty biliverdin a bilirubin. Exprese inducibilní formy HO-1 je aktivována vlivem různých produktů, které vznikají po UVA expozici (např. peroxid vodíku, GSSG, produkty peroxidace membránových lipidů) (Rajnochová Svobodová, 2012).

Nejdůležitějším intracelulárním neenzymovým antioxidantem je GSH. Vyskytuje se v cytosulu, mitochondriích i jádře. GSSG je tripeptid tvořený cysteinem, glycinem a kyselinou glutamovou. GSH přímo reaguje s hydroxylovými radikály a singletovým kyslíkem a dále funguje jako substrát v reakcích katalyzovaných různými detoxikačními enzymy včetně GPx a GST. GSH je rovněž nezbytný pro regeneraci vitaminů C a E, a účastní se i eliminace produktů lipidové peroxidace ve formě GSH-konjugátů. V buňkách se proto

GSH nachází v redukované i oxidované formě a rozdíly v poměru GSH/GSSG mohou naznačovat oxidační stres. Řada studií prokázala, že UV expozice způsobuje v buňkách snížení intracelulárního GSH (Lautier a kol., 1992).

3.4 Akutní a chronické změny kůže vyvolané působením UV záření

V důsledku expozice kůže UV záření dochází k různým akutním či chronickým změnám, jejichž rozsah závisí na intenzitě záření a době expozice, na tloušťce kůže i kožním fototypu (Rajnochová Svobodová, 2012). Mezi akutní změny kůže působením UV záření se řadí solární erytém, pigmentace, fotodermatózy a fotoimunosuprese, které se projevují do několika hodin až dnů po expozici UV záření. Pokud je expozice UV záření dlouhotrvající a opakovaná, mohou vznikat závažné chronické změny kůže jako předčasné stárnutí kůže a fotokancerogeneze. Akutní účinky UVA záření *in vivo*, včetně vlivu na genovou expresi, jsou mnohem méně známy než účinky UVB záření. Jedním z důvodů je fakt, že UVA záření nebylo po dlouho dobu pokládáno za zdraví škodlivé. Nové poznatky však prokázaly, že UVA záření je biologicky aktivní a mutagenní, což jen potvrzuje důležitost pochopení biologických účinků UVA záření na kožní tkáň (Tewari a kol., 2014).

Solární erytém neboli úžeh je typickým akutním projevem kůže po expozici UV záření, který se projevuje zarudnutím, přehřátím, bolestí kůže; při větších dávkách UV záření mohou vznikat otoky, puchýřky či puchýře. Mezi typické histologické znaky úžehu v epidermis jsou tzv. „sunburn cells“, které vznikají při apoptóze kožních buněk. Dále dochází k redukci počtu Langerhansových a žírných buněk, může být patrný edém cévního endotelu, T-lymfocytární infiltrát a další změny (Obstová, 2011). Dalším častým akutním pozorovatelným projevem UV expozice je pigmentace (tmavnutí kůže; opálení), jehož podstatou je oxidace již přítomného melaninu v kůži nebo syntéza melaninu *de novo* a přesun melanomových granulí z melanocytů do keratinocytů. Jak bylo uvedeno výše, syntéza a akumulace melaninu může být považována za ochrannou reakci melanocytů, která brání poškození jaderné DNA při následných expozicích (Wolber a kol., 2008).

Kromě těchto běžných reakcí může následkem UV záření dojít ke vzniku patologických reakcí, tzv. fotodermatóz. Do této skupiny chorob se řadí především různé exogenní a endogenní fototoxické fotodermatózy (95 % fotodermatóz), které vznikají v důsledku abnormální neimunologické reakce chemické látky (chromoforu) zejména s UVA fotony. Reakce je přímo závislá na koncentraci látky a může postihnout kohokoli bez ohledu na rasu a fototyp. Vzácnější jsou fotoalergické fotodermatózy, které postihují jen predisponované jedince a nejsou závislé na koncentraci látky. Principem je aktivace

chemické látky zejména UVA zářením a její vazba na protein, čímž se vytváří antigen. Při příští expozici je vyvolána typická kontaktní dermatitida (Obstová, 2011).

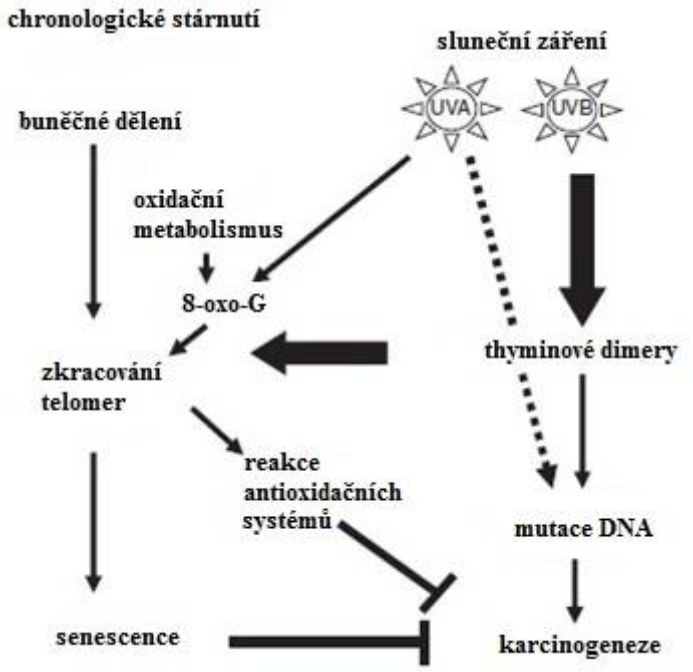
Opakované dlouhodobé expozice UV záření vedou k chronickému poškození kůže. V buňkách kůže se postupně akumuluje mnoho degenerativních změn, které jsou ovlivněny individuálními faktory. Mezi typické a nejzávažnější chronické změny kůže patří předčasné stárnutí kůže a fotokancerogeneze. Vznik nádoru je komplikovaný vícefázový proces. Jeho podstatou je poškození genetické informace, které není reparačními mechanismy rozpoznáno a opraveno. Následně dochází k přenosu poškozené DNA z mateřské buňky do buněk dceřiných a postupnému množení poškozených buněk. Kožní nádory patří celosvětově k nejčastějším typům malignit. Mezi zhoubné nádory kůže indukované UV zářením patří bazocelulární karcinom, spinocelulární karcinom a maligní melanom (Rostová a kol., 2006). Předpokládá se, že na vzniku nejagresivnějšího melanomu se podílí zejména UVB záření. Největší riziko vzniku melanomu je spojeno se spálením kůže v dětském věku. Maligní melanom kůže vzniká neoplastickou proliferací kožních melanocytů. Jedná se o tumor s nejrychleji vzrůstající incidencí na světě. V České republice se jedná o sedmé nejčastější nádorové onemocnění. V roce 2014 bylo v České republice diagnostikováno okolo 2 400 nových primárních melanomů kůže (Wiecker a kol., 2003; Kodet a kol. 2017).

3.5 Stárnutí

Stárnutí (senescence) je definováno jako dopad akumulace širokého spektra molekulárních a buněčných poškození organismu v průběhu času, vedoucímu k postupnému poklesu fyzické a psychické kapacity, rostoucímu riziku onemocnění, a nakonec až k smrti jedince (WHO, 2018). Existují dvě obecné teorie stárnutí. Dle první teorie je stárnutí geneticky předurčený proces a vychází ze zkracování koncových struktur chromozómů, tzv. telomer při každém buněčném dělení. Jakmile telomery dosáhnou kritické délky, dojde k zastavení buněčného cyklu nebo k apoptóze buňky. Podle druhé teorie je příčinou stárnutí zejména kumulativní poškození vlivem okolního prostředí. Během života dochází ke vzniku různých defektů v genetické informaci přirozenými chybami při replikaci nebo poškozením DNA volnými radikály vzniklými při energetickém metabolismu buňky nebo působením mutagenů z vnějšího prostředí. S věkem také klesá aktivita antioxidačních enzymů či množství neenzymových antioxidantů, a postupně tak dochází k akumulaci poškození, což se projevuje jako stárnutí (Rabe a kol., 2006).

Stárnutí je multisystémový degenerativní proces, který zahrnuje celý organismus včetně kůže a ostatních kompartmentů krycího systému. Kůže stejně jako ostatní orgány

prochází v průběhu času mnoha změnami. Zásadním rozdílem však je, že kůže pokrývá povrch těla, a proto na ni celý život neustále působí řada vnějších vlivů, které mohou proces stárnutí urychlit. Stárnutí kůže je složitý, dynamický proces, který závisí na mnoha endogenních (genetická výbava, hormonální a metabolické procesy) a exogenních (výživa, sluneční záření, chemikálie, toxiny) stresových faktorech a vede k řadě funkčních a strukturálních změn kožní tkáně. Stárnutí kůže probíhá prostřednictvím dvou odlišných a nezávislých mechanismů. Dle nich rozlišujeme chronologické stárnutím a předčasné stárnutí (photoaging) kůže. V minulosti bylo předčasné stárnutí považováno za urychlený proces chronologického stárnutí. Avšak v průběhu času byly objeveny zásadní rozdíly mezi přirozeným (chronologickým) stárnutím a předčasným stárnutím kůže (Obr.7) a následně byly tyto dva procesy kvalitativně a kvantitativně odděleny.



Obr.7: Proces senescence buněk u chronologického stárnutí a předčasného stárnutí kůže. Chronologické stárnutí zahrnuje částečnou senescenci buněk, důsledkem zkrácení telomer. Chronologické stárnutí je také způsobeno chronickým oxidačním poškozením např. aerobním metabolismem, kdy vzniká 8-oxo-G, který dále negativně ovlivňuje telomery. UVB způsobuje produkci thyminové dimery a UVA poškozuje DNA nepřímo oxidačním stresem. Takové poškození může vést k mutacím klíčových regulačních genů. Upraveno (Gilchrest, 2013).

3.5.1 Přirození stárnutí kůže

Přirozené stárnutí kůže je z velké části ovlivněno geneticky a je charakterizováno funkčními změnami kůže spíše než výraznými morfologickými změnami tkáně. Kůže starších lidí, která nebyla chronicky exponována slunečnímu záření je hladká, bez viditelnějších skvrn (hyperpigmentace) s prohloubením ohybových rýh. Typické jsou jemné vrásky. Postupně dochází ke ztrátě elasticity kůže a ztenčení epidermis. Histologicky dochází k atrofii epidermis a dermis, ztenčení epidermálního-dermálního spoje, snížení počtu fibroblastů, melanocytů, Langerhansových buněk (Helfrich a kol., 2008).

Na molekulární úrovni je chronologické stárnutí přisuzováno zejména působení ROS, jejichž eliminace s věkem klesá. V kůži starších lidí dochází typicky ke zvýšení hladiny aktivačního proteinu-1 (AP-1) a aktivity matrixových metaloproteináz, což je spojeno se zvýšenou degradací kolagenu. Současně dochází ke snížení syntézy prokolagenu typu I a III. Kombinace zvýšené degradace kolagenu a snížené syntézy nového kolagenu vede k celkovému poklesu množství kolagenu v dermis (Helfrich a kol., 2008).

3.5.2 Předčasné stárnutí kůže (photoageing)

Termín "photoaging" byl poprvé použit v roce 1986 a vysvětluje účinky chronické expozice UV záření na kůži (Kligman, 1986). Předčasné stárnutí je proces závažných změn v kožní tkáni v důsledku chronické a opakované expozice UV záření. Je charakterizováno často výraznými morfologickými a fyziologickými změnami kůže, které jsou nejvíce zjevné v oblasti obličeje, krku a rukou. Na rozdíl od chronologicky (přirozeně) zestárlé kůže je tkáň po působení UV záření sušší, hrubší, s nepravidelnou pigmentací (vznik hyperpigmentačních skvrn), větším počtem vrásek, které jsou hrubší. Mezi další příznaky patří elastóza (drsný, nažloutlý, „dlaždicový“ vzhled kůže a snížená elasticita kůže) a senilní (aktinová) purpura (podlitina způsobená křehkou stěnou cév *dermis*). Konečným důsledkem může být vznik neoplastických změn, jako jsou aktinická keratóza, bazaliomy, spinaliomy a lentiginoźní melanom, ale i benigní útvary (Ettler, 2004).

Na histologické úrovni je možné pozorovat úbytek fibroblastů, melanocytů a mastocytů, zvýšení počtu zánětlivých buněk, zpomalení obnovy keratinocytů a změna jejich tvaru, snížení schopnosti melanocytů syntetizovat melanin, vyhlazení spojení mezi epidermis a dermis (papily), změna struktury a úbytek vláken kolagenu a elastinu, vznik amorfní změti elastických vláken, změny ve stavbě kožních cév a atrofii vaziva v podkožní tkáni spojené s tvorbou hlubokých vrásek, snížení bariérové funkce *stratum corneum* a snížení hydratace kůže (Růžičková Jarešová, 2013).

Na molekulární úrovni je klíčovým faktorem předčasného stárnutí kůže narušení metabolismu kolagenu. Dermální fibroblasty syntetizují prokolagen, který se následně mění na kolagen. Pro syntézu kolagenu jsou důležité dva regulační proteiny, transformační růstový faktor (TGF-β) a AP-1. TGF-β je cytokin, který podporuje tvorbu kolagenu. AP-1 je transkripční faktor, který inhibuje syntézu kolagenu a urychluje jeho degradaci stimulací expresse degradačních enzymů nazvaných matrixové metaloproteinázy (MMP) (Helfrich a kol., 2008). Přítomné ROS/RNS oxidují štěpné produkty MMP, což má za následek zpomalení jejich normálně rychlé degradace a nahromaděné produkty degradace kolagenu rovněž podporují inhibici syntézy nového kolagenu (Rajnochová Svobodová, 2012).

3.5.3 Biomarkery stárnutí kůže

Mezi typické znaky senescence patří enzym β-galaktosidasa spojená se senescencí (senescence-associated β-galactosidase, SA-β-gal), jejíž aktivita představuje nejčastěji stanovovaný marker buněčné senescence. Většina buněk produkuje β-galaktosidasu, která se vyskytuje v lysozomech a její reakční optimum je pH 4 (Dimri a kol., 1995). Pro senescentní buňky je charakteristické reakční optimum tohoto enzymu při pH 6 a označuje se SA-β-gal. Tento enzym byl nalezen ve větším množství u starších lidských fibroblastů a senescentních keratinocytů, ale nebyl pozorován u imortalizovaných buněk, které nemají omezenou proliferační kapacitu (Hatina, 2001). Avšak SA-β-gal není univerzálním biomarkerem senescence buněk, protože specificita tohoto biomarkeru má své omezení. Jedním z omezení je falešně pozitivní barvení nesenescentních buněk za určitých podmínek (Debacq-Chainiaux a kol., 2009).

Dalším charakteristickým znakem senescentních buněk je změna ve struktuře chromatinu. Vytváří se charakteristické útvary zvané ohniska heterochromatinu asociovaná se senescencí (senescence-associated heterochromatin foci, SAHF). Tyto útvary připomínají DNA kondenzovanou s proteiny. Kondenzaci SAHF způsobuje metylace histonu H3 a heterochromatinový protein 1. SAHF inaktivují transkripční faktory E2F, které se podílejí na řízení buněčného cyklu. Pokud je znemožněna jejich exprese, je zastavena buněčná proliferace (Narita a kol., 2003; Funayama a kol., 2006). Funayama a kol. pozorovali tyto útvary u lidských senescentních fibroblastů. U těchto buněk byla také zjištěna ztráta histonu H1, který se podílí na stavbě nukleosomu při kondenzaci DNA.

Kromě jaderné DNA může být vlivem UV záření poškozena i mitochondriální DNA (mtDNA). Vzhledem k tomu, že opravy DNA jsou v mitochondriích méně účinné než v jádře, mutace mtDNA se akumulují rychle. V mtDNA byly identifikované zejména delece,

které mohou být způsobeny singletovým kyslíkem. Tyto mutace mohou měnit schopnost buněk provádět oxidativní fosforylaci (Svobodová a kol., 2006). Elektronový transportní řetězec v mitochondriích produkuje nejen energii ve formě ATP, ale zároveň může generovat ROS, které následně poškozují mtDNA. Hlavním antioxidačním enzymem, který eliminuje ROS v mitochondriích je superoxid dismutasa 2 (SOD-2). Na modelu myší s deficitem SOD-2 bylo pozorováno zhoršení aktivity komplexu II dýchacího řetězce, což vedlo k senescenci nikoliv apoptóze buněk epidermis. Dále bylo patrné snížení počtu buněk a tloušťky epidermis, což naznačuje souvislost mezi poškozením mtDNA, senescencí buněk a stárnutím kůže (Velarde a kol., 2012).

Dalším používaným biomarkerem stárnutí kůže je tumor supresorový protein $p16^{INK4a}$. Jeho exprese ve tkáních mladých zdravých jedinců je minimální, při stresu a s věkem dochází k jeho akumulaci. Protein $p16^{INK4a}$ reguluje buněčný cyklus inhibicí cyklin D/cdk 4,6 komplexu, nezbytného pro průchod restrikčním bodem G_1 fáze (Kanaki a kol., 2016). Exprese $p16^{INK4a}$ přímo koreluje se stárnutím lidské kůže *in vivo* a počet pozitivních buněk vzrůstá s věkem v epidermis i dermis (D'Arcangelo a kol., 2017).

Další molekuly, které se významně uplatňují v procesu stárnutí kůže, jsou matrixové metalloproteinasy (MMP). Tyto endopeptidasy jsou aktivované oxidačním stresem vyvolaným metabolismem nebo vnějšími faktory, zejména UV zářením. MMP hrají roli v buněčné komunikaci a signalizaci. Především jsou ale zodpovědné za štěpení proteinů extracelulární matrix, čímž urychlují proces stárnutí kůže, a jejich vliv se projevuje zejména zvýšením tvorby vrásek. MMP-1 (kolagenasa) degraduje kolagen typu I, MMP-2 a MMP-9 (gelatinasy) štěpí elastin a kolagen typu IV a VII, MMP-3 (stromelysin-1) vykazuje širokou substrátovou specifitu a degraduje kolagen typu IV, proteoglykany, fibronektin a laminin (Sárdy, 2009).

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Biologický materiál

Experimenty byly prováděny na primárních kulturách lidských kožních fibroblastů, které byly izolovány z kožní tkáně získané od dárců podstupujících chirurgický zákrok na Oddělení plastické a estetické chirurgie FN Olomouc.

Odběr kůže byl proveden s povolením Etické komise Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci (dne 6.4.2009, ref.č.: 41/09). Dárci podepsali informovaný souhlas.

Pro stanovení cíle 1 byly použity fibroblasty od 3 dospělých dárců (ženy, 19-55 let, kožní fragmenty z oblasti prsou) a 3 dětských dárců (dívky, 7-9 let, kožní fragmenty z oblasti uší). Pro stanovení cíle 2 byly použity fibroblasty od 6 dospělých dárců (ženy, 41-61 let, kožní fragmenty z oblasti prsou).

4.2 Přístrojové vybavení

Centrifuga MiniSpin® (Eppendorf, Německo), inkubátor Forma Direct Heat (Thermo Fisher Scientific, USA), digestoř R3.33 MF 10-3 MF 10-4 (Merci, ČR), elektromagnetická míchačka RH Basic KT/C (IKA® - Werke, Německo), fotoaparát Olympus, inverzní mikroskop Olympus CK2 (Olympus C&S, ČR), laminární box Jouan MSC 9 Standard (Jouan, Francie), odsávačka Gilson Safe Aspiration Station (Gilson, USA), pH-metr inoLab pH Level 1 s elektrodou SenTix41 (WTW, Německo), solární simulátor, UVA-filtr a detektor UVA záření (Dr.Hönle UV technology, Německo), spektrofotometr UV-2401PC (Shimadzu Corporation, Japonsko), spektrofotometr pro měření absorbance Infinite M200 Pro (Tecan, Švýcarsko), termomixer Comfort (Eppendorf, Německo), ultrazvukový homogenizátor UP200S (Hielscher, Německo), ultrazvuková vodní lázeň (Memmert Gmb, Německo), váhy AX105 Delta Range (Mettler Toledo, Švýcarsko), vortex Mixer VX-200 (Labnet International, USA)

4.3 Ostatní materiál a pomůcky

Běžné laboratorní sklo, Bürkerova komůrka, chladící destičky, dezinfekční roztok, gáza, buničina, filtrační papír, dezinfekční ubrousky, alobal, parafilm, váženky (Dispolab CZ, s.r.o.); krycí sklíčka 24 x 50 mm (Bamed, ČR); kultivační láhve, kultivační desky,

Petriho misky a centrifugační zkumavky (Biotech, ČR); nesterilní 96-jamkové a 6-jamkové destičky (Dispolab, ČR); plastové mikrozkumavky, pipety a špičky (Eppendorf, ČR).

4.4 Použité chemikálie a roztoky

Od firmy Sigma-Aldrich byly zakoupeny chemikálie: 2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol (Tris; $C_4H_{11}NO_3$), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT; $C_{18}H_{16}BrN_5S$, 98%), 5,5´-dithio-(bis-2-nitrobenzoová) kyselina (DTNB, ≥ 98%), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside (X-gal; $C_{14}H_{15}BrClNO_6$, ≥ 99,9%), amfotericin B, amoniak (NH_3, ≥ 99,95%), nikotinamidadenindinukleotid redukovaná disodná sůl (NADH, ≥ 96,5%), coomassie brilliant blue G-250, D-glukosa ($C_6H_{12}O_6$, ≥ 99,5%), dihydrofluorescein diacetát ($C_{24}H_{18}O_7$, ≥ 97%), dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4, ≥ 99%), dimethylsulfoxid (DMSO; $(CH_3)_2SO$, ≥ 99,9%), dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, ≥ 99%), Dulbecco´s Modified Eagles médium (DMEM), epidermální růstový faktor (EGF), ethanol (EtOH; C_2H_5OH p.a., 80%), fetální hovězí sérum (FBS), Ham´s F12 Nutrient Mixture, Folin-Ciocalteuovo fenolové činidlo, formaldehyd, glutaraldehyd 50% ($OHC(CH_2)_3CHO$), hexahydrát chloridu hořečnatého ($MgCl_2.6H_2O$, p.a.), hexakyanoželezitan draselný ($K_3[Fe(CN)_6]$, ≥ 99%), hovězí sérový albumin (BSA, ≥ 98%), chlorid draselný (KCl, ≥ 99%), chlorid sodný (NaCl, ≥ 99%), kyselina chloristá 10% ($HClO_4$, p.a.), kyselina chlorovodíková 37% (HCl, p.a.), kyselina octová 100% (CH_3COOH, p.a.), methanol (MeOH; CH_3OH, 99,8%), monohydrát kyseliny citronové ($HOC(COOH)(CH_2COOH)_2.H_2O$, p.a.), N,N-dimethylformamid ($HCON(CH_3)_2$, ≥ 99,8%), neutrální červeň (NČ; $C_{15}H_{17}ClN_4$, ≥ 90%), penicilin, pentahydrát síranu měďnatého ($CuSO_4.5H_2O$), pyruvát sodný ($CH_3COCOONa$, ≥ 99%), sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové ($EDTANa_2$; ≥ 98%), streptomycin, trihydrát hexakyanoželeznatanu draselného ($K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$, ≥ 99%), trypanová modř (0,4%, m/v, sterilní), trypsin-EDTA (0,25%), uhličitan sodný (Na_2CO_3, p.a.), vinan sodnodraselný ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$). Firma Penta dodala následující chemikálie: ethanol (70%, p.a.), ethanol (96%, p.a.), ethanol (absolutní, p.a.), hydroxid sodný (NaOH, p.a.), kyselina fosforečná (H_3PO_4, p.a., 85%). Firma Roche (Německo) dodala: Cell Proliferation ELISA BrdU Kit.

4.5 Použité roztoky

4.5.1 Roztoky pro kultivaci kůže

- Zásobní roztok fosfátového pufru (10krát PBS): NaCl (0,137 mol/l), KCl (0,00268 mol/l), $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$ (0,00896 mol/l), KH_2PO_4 (0,00147 mol/l), pH 7,4-7,5. Roztok byl sterilizován autiklávováním a pro experimenty 10krát ředěn.
- Transportní roztok: směs antibiotik amphotericinu B (0,25 μg/ml), penicilinu (100 U/ml), streptomycinu (100 μg/ml) v PBS.
- Směsi médií (DMEM a Ham F12, 1:3) obohacené o fetální hovězí sérum (FBS, 10%), penicilin (100 mg/ml), streptomycin (100 U/ml), amphotericin B (0,125 mg/ml), hydrokortison (0,8 μg/ml), adenin (24 μg/ml), insulin (0,12 U/ml), epidermální růstový faktor (1 ng/ml), 3,3',5-trijod-L-tyronin (0,136 μg/ml).

4.5.2 Roztoky pro kultivaci a práci s fibroblasty

- Médium se sérem: DMEM, fetální bovinní sérum (FBS, 10%), penicilin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/ml).
- Médium bez séra: DMEM, penicilin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/ml).
- PBS s glukosou (PBS-G): do 500 ml PBS bylo přidáno 500 mg bezvodé glukosy a sterilně přefiltrováno.

4.5.3 Roztoky pro barvení neutrální červení

- Zásobní roztok NČ: 100 mg NČ bylo rozpuštěno ve 100 ml deionizované vody a okyseleno 2 kapkami kyseliny octové.
- Pracovní roztok NČ: zásobní roztok NČ byl před každým experimentem připraven čerstvý, a to ředěním PBS-G v poměru 1:4 (NČ:PBS-G).
- Fixační roztok: formaldehyd (0,5%, v/v) byl smíchán s $CaCl_2$ (1%, m/v) v poměru 1:1.
- Extrakční roztok: 99 ml metanolu (50%, v/v) bylo smícháno s 1 ml kyseliny octové.

4.5.4 Roztoky pro barvení pomocí MTT

- Zásobní roztok MTT: 500 mg MTT bylo rozpuštěno ve 100 ml deionizované vody, roztok byl rozdělen na alikvoty a zamražen.

- Pracovní roztok MTT: pro aplikaci na buňky byl zásobní roztok ředěn médiem bez séra v poměru 1:10 (MTT:medium).
- Roztok pro extrakci MTT: dimethylsulfoxid (500 ml) byl alkalizován přídavkem amoniaku (5 ml).

4.5.5 Roztoky pro stanovení LDH

- LDH pufr: 50 mM fosfátový pufr (pH = 7,5) s 1,22 mM pyruvátem sodným; před měřením bylo přidáno 8,25 mg NADH na 25 ml pufru.

4.5.6 Roztoky pro stanovení proteinů Lowryho metodou

- Roztok A: 0,1 M NaOH
- Roztok B: 2% Na_2CO_3 v 0,1 M NaOH, čerstvý
- Roztok C: 1% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
- Roztok D: 2% vinan sodnodraselný
- Roztok E: Před stanovením smíchat C + D (1:1)
- Roztok F: Smíchat B + E (50:1)
- Folin-Ciocalteuovo činidlo: před použitím naředěno vodou 1:1.
- Standard bovinního sérového albuminu (BSA; sada v rozmezí koncentrací 0,125 – 2,0 mg/ml)

4.5.7 Roztoky pro stanovení proteinů metodou dle Bradforda

- Bradfordovo činidlo: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml 96 % EtOH, 100 ml 85% kyseliny fosforečné, doplněno do 1000 ml destilovanou vodou
- Standard bovinního sérového albuminu (BSA; sada v rozmezí koncentrací 0,125 – 4,0 mg/ml)

4.5.8 Roztoky pro stanovení glutathionu

- Roztok na zpracování buněk: 10% HClO4 (14,28 ml 70% HClO4 doplněno do 100 ml deionizovanou vodou). Před použití naředěno vodou na 1%.
- GSH pufr: 48,2 g TRIS a 3,72 g EDTANa2 rozpuštěno v destilované vodě, upraveno pH na 8,9 a doplněno do 500 ml.
- Roztok DTNB: 4 mg DTNB na 1 ml GHS pufru.

4.5.9 Roztoky pro stanovení ROS

- 1krát PBS
- Zásobní roztok sondy: 50 mM dihydrofluorescein diacetát v EtOH
- Pracovní roztok sondy: zásobní roztok sondy byl před použitím 100krát naředěn v PBS

4.5.10 Roztoky pro stanovení proliferace buněk metodou ELISA

- Všechny roztoky byly používány podle protokolu výrobce (Roche, Německo).

4.5.11 Roztoky pro stanovení aktivity β-galaktosidasy

- Fixační roztok – 2% formaldehyd a 0,2% glutaraldehyd v PBS pufru. Roztok byl připraven před každým experimentem čerstvý a chráněn před světlem.
- Barvící roztok – složky zásobních roztoků:
  - 0,1 M kyselina citronová
  - 0,2 M fosfátový pufr (35,8 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ na 500 ml)
  - Směs 0,2 M kyseliny citronové a fosfátového pufru: 239,535 ml roztoku kyseliny citronové smícháno s 410,475 ml fosfátového pufru; pH upraveno na 6,0 pomocí zbytku roztoku kyseliny citrónové
  - 100 mM roztok K4[Fe(CN)6]: 4,22 g K4[Fe(CN)6].3H2O rozpuštěno ve 100 ml destilované vody
  - 100 mM roztok K3[Fe(CN)6]: 3,29 g K_3[Fe(CN)6] rozpuštěno ve 100 ml destilované vody
  - 5 M NaCl: 29,2 g NaCl rozpuštěno ve 100 ml destilované vody
  - 1 M MgCl2: 20,33 g MgCl2.6H2O rozpuštěno ve 100 ml destilované vody
  - Roztok X-gal: 20 mg X-Gal rozpuštěno v 1 ml N,N-dimethylformamidu
- Barvící směs: připravena před každým experimentem čerstvá a chráněna před světlem, složení viz Tab. 1.

Tabulka 1: Složení barvící směsi.

	Zásobí roztok [na 10 ml]
Směs kyseliny citronové a fosfátu sodného (pH 6,0)	2 ml
100 mM roztok $K_4[Fe(CN)_6]$	0,5 ml
100 mM roztok $K_3[Fe(CN)_6]$	0,5 ml
5 M roztok NaCl	0,3 ml
1 M $MgCl_2$	20 µl
20 mg X-Gal rozpuštěno v 1 ml N,N-dimethylformamidu	0,5 ml
Deionizovaná voda	6,18 ml

4.6 Použité metody a pracovní postupy

4.6.1 Izolace a kultivace fibroblastů

Před použití byla tkáň 3krát promyta fosfátový pufrem (PBS). Poté byla nastříhána na čtverce velikosti přibližně 1x1 cm. Kousky tkáně byly přeneseny na Petriho misky a po fixování (5 min, na vzduchu) byly zality kultivačním médiem. Fragmenty kůže byly kultivovány v inkubátoru při 37 °C a v atmosféře obsahující 5 % CO_2. Kultivační médium bylo měněno 2krát týdně dokud fibroblasty nedosáhly vysokého procenta konfluence.

Přibližně po 2-3 týdnech byly buňky uvolněny z Petriho misky trypsinem a přeneseny do kultivační lahve s plochou 75 cm^2. Buňky byly kultivovány v DMEM se sérem při 37 °C a v atmosféře obsahující 5 % CO_2. Fibroblasty byly používány mezi 2.-4. pasáží. Pro provedení experimentů byly buňky vysety na 96-jamkové nebo 6-jamkové desky v koncentraci $0{,}5.10^5/cm^2$. Pro sledování β-galaktosidasy byly buňky vysety v koncentraci $0{,}33.10^5/cm^2$.

4.6.2 Ozařování buněk

Před UVA expozicí bylo z kultivační desky odstraněno růstové médium. Následně byly buňky 2krát opláchnuty 150 µl (96-jamková deska) nebo 1,5 ml (6-jamková deska) PBS. Poté bylo na buňky aplikováno 150 µl nebo 1,5 ml PBS s glukosou (0,5%, m/w) dle typu desky. Před ozářením byla změřena intenzita UVA záření solárního simulátoru SOL-500, pomocí UVA-metru. Poté byly buňky ozářeny dávkou 5 nebo 10 J/cm^2. Čas ozáření byl vypočítán podle vzorce 1. Po dobu ozařování byly kultivační desky chlazeny

pomocí chladících bloků. Současně byl experiment proveden s kontrolními buňkami, které byly po dobu ozařování inkubovány ve tmě v inkubátoru. Po ozáření bylo k buňkám napipetováno 200 µl nebo 1,5 ml média bez séra (dle typu desky) a buňky byly inkubovány v inkubátoru 1-24 h podle měřeného parametru, viz dále.

Vzorec 1: Výpočet doby ozáření

$$\text{doba ozáření [min]} = \frac{\text{dávka záření (J/cm2)} \cdot 1000}{\text{intenzita záření (W/cm2)} \cdot 60}$$

4.6.3 Stanovení viability buněk pomocí MTT

Tato metoda je založena na schopnosti buněčných dehydrogenázách redukovat žlutý ve vodě rozpustný 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid (MTT) na nerozpustný modrofialový formazan. Množství produkovaného formazanu je přímo úměrné počtu životaschopných buněk (Mosmann, 1983).

Viabilita fibroblastů byla sledována na 96-jamkových deskách 24 h po UVA ozáření. Nejprve bylo médium odstraněno. Následně bylo k buňkám napipetováno 100 µl pracovního roztoku MTT a buňky byly inkubovány 60 min v inkubátoru. Poté byl roztok z jamek odstraněn a vzniklý formazan byl rozpuštěn ve 150 µl roztoku pro extrakci MTT. Absorbance vzniklého roztoku byla měřena při 540 nm.

4.6.4 Stanovení viability buněk pomocí neutrální červeně

Neutrální červeň (NČ) je ve vodě rozpustné barvivo, které je akumulováno v lyzozomech živých buněk. Tento proces vyžaduje energii v podobě ATP (Maines a kol., 1998). Poškozené nebo mrtvé buňky ztrácí schopnost barvivo akumulovat, tudíž je množství inkorporované NČ přímo úměrné počtu živých buněk.

Po 24 hodinové inkubaci bylo z buněk odstraněno medium. K buňkám bylo pipetováno 100 µl pracovního roztoku NČ na jamku. Po inkubaci (60 min, inkubátor) byl roztok odstraněn a neinkorporoavné barvivo bylo odstraněno fixačním roztokem. Poté byla NČ v buňkách rozpuštěna ve 150 µl extrakčního roztoku. Desky byly třepány 5 min a poté byla měřena absorbance při 540 nm.

4.6.5 Stanovení proliferace buněk metodou ELISA

Metoda je založena na stanovení inkorporace pyrimidinového analogu 5-bromo-2´-deoxyuridinu (BrdU) namísto thymidinu do DNA proliferujících buněk. Následně je imunochemicky s kolorimetrickou koncovkou stanoveno množství BrdU v buňkách.

Stanovení bylo provedeno podle pracovního postupu výrobce ELISA kitu (Cell proliferation ELISA BrdU colorimetric kit, Roche Německo). Buňky na 96-jamkové desce byly po ozáření kultivovány 24 h. Poté bylo do každé jamky napipetováno 100 µl média bez séra s BrdU (1:100) a buňky byly inkubovány dalších 6 h v inkubátoru. Následně bylo médium s BrdU a buňky byly fixovány teplem (60 °C, 30 min). Poté bylo pipetováno na každou jamku 200 µl fixačního roztoku a deska byla inkubována 30 minut při laboratorní teplotě. Následně byl fixační roztok odstraněn, jamky byly opláchnuty 3krát 200 µl promývacího roztoku. V dalším kroku bylo do každé jamky pipetováno 100 µl pracovního roztoku protilátkou anti-BrdU-POD a deska byla inkubována 120 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla protilátka odstraněna vylitím a důkladným promytím (3x200 µl promývacího roztoku). Následně bylo pipetováno 100 µl substrátu do každé jamky. Po inkubaci (60 min, laboratorní teplota) byla měřena absorbance při 370 nm.

4.6.6 Stanovení hladiny glutathionu v buňkách

Glutathion (GSH) je významný intracelulární antioxidant, který je využíván jako marker oxidačního stresu. Za fyziologického stavu se většina GSH vyskytuje v redukované formě. Při zvýšené tvorbě kyslíkových radikálů nebo zátěži organismu toxickými látkami dochází k poklesu množství GSH v buňkách. Množství GSH může být stanoveno jeho reakcí s DTNB v alkalickém prostředí, za vzniku žlutého 5-thio-2-nitrobenzoátu, jehož absorbance je měřena při 412 nm (Carlberg a kol., 1985).

Po 24 hodinové kultivaci od ozáření bylo odebráno médium (stanovení LDH) a buňky byly opláchnuty 1 ml PBS. Následně bylo k buňkám pipetováno 350 µl roztoku 1% kyseliny chloristé. Fibroblasty byly seškrábnuty a přeneseny do 1,5 ml zkumavky. Vzorky poté byly sonikovány na ledu (10 impulzů, intenzita 0,5) a centrifugovány (10 min, 10 000 rpm, 4 °C). Následně byl supernatant použit pro stanovení GSH a množství bílkovin. Pro stanovení hladiny GSH bylo na 96-jamkové desce smícháno 50 µl supernatantu se 180 µl GSH pufru a 10 µl roztoku DTNB. Vzorky byly připraveny v tripletech. Blank obsahoval místo vzorku 50 µl 1% kyseliny chloristé. Po 4 a 8 min byla měřena absorbance při 412 nm.

4.6.7 Stanovení bílkovin Lowryho metodou

Lowryho metoda je kolometrická metoda, která vychází z principu biuretovy reakce. Pomocí Folin-Cicocalteauova činidla dochází ke zvýšení citlivosti biuretovy reakce a spolehlivému stanovení koncentrace bílkovin. V první kroku se jedná o reakci peptidové vazby s Cu^{2+} v alkalickém prostředí za vzniku fialového zbarvení. Ve druhém kroku dochází k redukci fosfomolybdenanů a fosfowolframanů tyrosinem a tryptofanem s následným měřením při 680 nm (Lowry a kol., 1951).

Na 96-jamkovou desku bylo pipetováno 10 µl supernatantu, který byl získán podle postupu uvedeného v bodě 4.6.6. Současně se vzorky byly na desku napipetovány kalibrační vzorku (hovězí sérový albumin, BSA) v rozsahu 0,0125-0,4 mg/l. Každý vzorek byl pipetován ve třech kopiích. Poté bylo ke všem vzorkům přidáno 100 µl roztoku F. Vzorky byly inkubovány 10 min při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 10 µl roztoku Folin-Ciocalteuova činidla. Po inkubaci (30 min, tma, laboratorní teplota) byla změřena absorbance při 680 nm.

4.6.8 Stanovení produkce ROS v kožních buňkách

Polární, nefluorescenční dichlordifluoresceindiacetát (H2DCFDA) podléhá deacetylaci esterásami v cytosolu buněk za vzniku dichlorodihydrofluoresceinu, který reaguje s ROS, čímž vzniká fluorescenční derivát dichlorfluoresceinu. Fluorescence je měřena při specifické excitaci/emisi při 488/525 nm (Nerge-Salvayre a kol., 2002).

Po 1 hodině od UVA expozice bylo k fibroblastům přidáno 15 µl roztoku dihyhrofluoresceinu diacetátu (500 µM, PBS), jehož výsledná koncentrace v kultuře byla 5 µM. Po inkubaci (20 min, inkubátor) byl roztok odstraněn a buňky byly opláchnuty 2krát 1 ml PBS. Buňky byly seškrábány do 0,8 ml PBS, přeneseny do eppendorf zkumavky a sonikovány na ledu (10 impulsů při intenzitě 0,5). Následně byla suspenze centrifugována (10 000 rpm, 4 ºC, 10 min). Na jamku 96-jamkové desky bylo pipetováno 200 µl supernatantu každého vzorku v tripletu a byla měřena fluorescence při 500/525 nm (emise/excitace). Obsah proteinu ve vzorcích byl stanoven metodou dle Bradfordové.

4.6.9 Stanovení proteinů v kožních buňkách pomoc metody dle Bradfordové

Stanovení je založeno na tvorbě komplexu mezi barvivem (Coomassie brilliant blue G-250) a proteiny ve vzorku. Barvivo se vyskytuje ve třech formách kation (470 nm; červený), neutrální molekula (650 nm; zelená), and anion (595 nm; modrý). Vazba proteinu

stabilizuje aniontovou formu a vyvolává změnu zbarvení, které je měřeno fotometricky (Bradford, 1976).

Ve vzorcích připravených dle postupu v kapitole 4.6.8. Na jamku 96-jamkové desky bylo pipetováno 10 µl každého vzorku v tripletu. Současně se vzorky bylo pipetováno 10 µl standardu BSA v koncentračním rozmezí 0,125-0,2 mg/l. Ke vzorkům i standardům bylo následně aplikováno 200 µl Bradfordova činidla. Poté byla měřena absorbance při 595 nm.

4.6.10 Stanovení aktivity β-galaktosidázy

Většina buněk produkuje enzym β-galaktosidasu, který se vyskytuje v lysozomech a jeho reakční optimum je pH 4 (Dimri a kol., 1995). Pro senescentní buňky je charakteristické reakční optimum tohoto enzymu při pH 6 a tento enzym se označuje SA-β-gal (senescence-associated β-galactosidase). Ke stanovení aktivity β-galaktosidasy byla použita cytochemická analýza za použití chromogenního substrátu 5-brom-4-chlor-3-indyl-β-D-galaktopyranosidu (X-gal). Při štěpení X-gal enzymem vzniká nerozpustná modrá sloučenina (Debacq-Chainiaux a kol., 2009).

Po 24 h od UVA ozáření byly fibroblasty na 6-jamkových deskách opláchnuty PBS (3krát, 30 s). Poté byly k buňkám aplikovány 2 ml fixačního roztoku. Po 5 min byl fixační roztok odstraněn a buňky byly opláchnuty PBS (3krát, 30 s). Následně byly k buňkám napipetovány 2 ml barvícího roztoku. Po inkubaci (16 h, 37 ºC, tma – termoblok) byly buňky opláchnuty PBS (3krát, 30 s) a fixovány metanolem (1 ml, 30 s). Po odstranění metanolu byly desky ponechány na vzduchu vyschnout. Suché desky bylo možné uchovat po několik měsíců ve tmě při 4 ºC, aniž by došlo ke znehodnocení barvení. Jednotlivé vzorky byly vyhodnoceny mikroskopicky. V každé jamce bylo analyzováno cca 100 buněk a poté bylo stanoveno % senescentních buněk (modře zbarvených).

4.6.11. Vyhodnocení a statistické zpracování dat

Všechny experimenty byly provedeny v tripletech ve třech nezávislých opakováních. Výsledky byly vyhodnoceny v programu MS Excel 2016 a jsou vyjádřeny jako průměr±směrodatná odchylka (SD). Statistická signifikance byla hodnocena pomocí t-testu ($p = 0,05$).

5. VÝSLEDKY

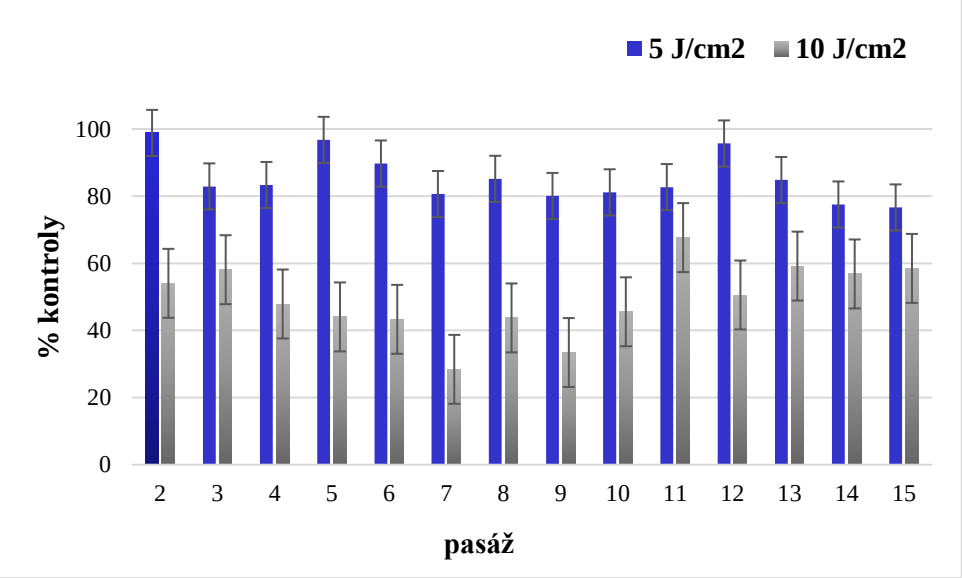
5.1 Porovnání buněk od dětských a dospělých dárců

V první sérii experimentů byla srovnávána citlivost primárních lidských fibroblastů izolovaných z kožních fragmentů od 3 dospělých dárců (19-55 let) a 3 dětských dárců (7-9 let). Experiment trval 15. pasáží (~ 5 měsíců). K poškození buněk bylo použito UVA záření v rozsahu 315-380 nm.

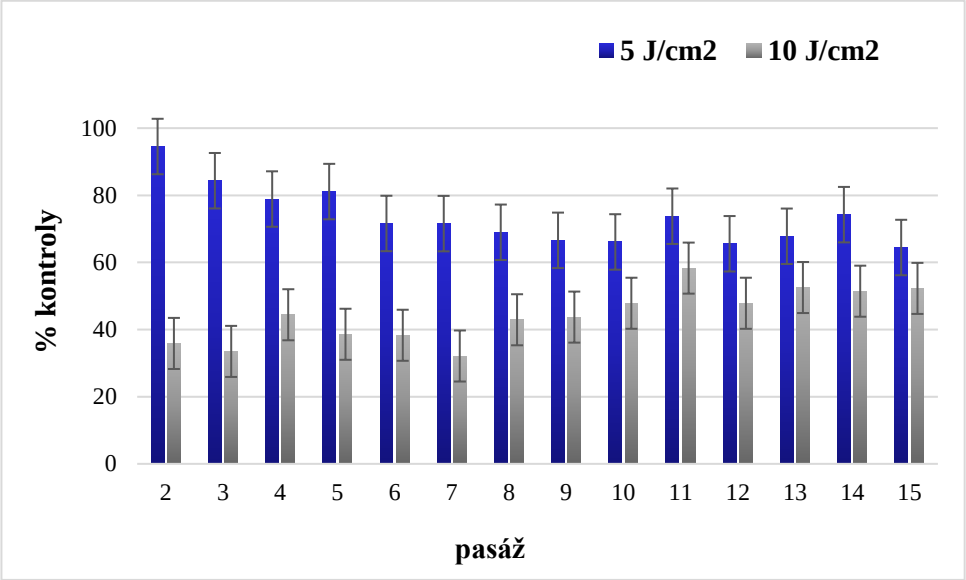
5.1.1 Stanovení viability buněk

Viabilita lidských fibroblastů od dospělých a dětských dárců byla stanovena v každé pasáži u buněk neozářených a u buněk ozářených dávkou 5 a 10 J/cm^2 UVA záření. Viabilita buněk byla hodnocena 24 hod po expozici pomocí metabolické přeměny tetrazoliového barviva MTT a inkorporace NČ.

Pomocí metody MTT byl u buněk od dospělých dárců zjištěn průměrný pokles viability o 14,6±6,9 % oproti kontrolním neozářeným fibroblastům při dávce ozáření 5 J/cm^2 a o 52,2±10,3 % při dávce ozáření 10 J/cm^2 (Graf 1). U buněk od dětských pacientů byl zjištěn průměrný pokles viability o 26,5±8,3 % při dávce ozáření 5 J/cm^2 a 55,7±7,6 % při dávce ozáření 10 J/cm^2 (Graf 2). Z profilů grafů vyplývá větší citlivost buněk od dětských dárců oproti fibroblastům od dospělých dárců na počátku experimentu při aplikaci dávky 5 J/cm^2, která se s rostoucí hodnotou pasáže snižovala. Opačný trend je patrný u dávky 10 J/cm^2. Nicméně rozdíl nebyl statisticky signifikantní.

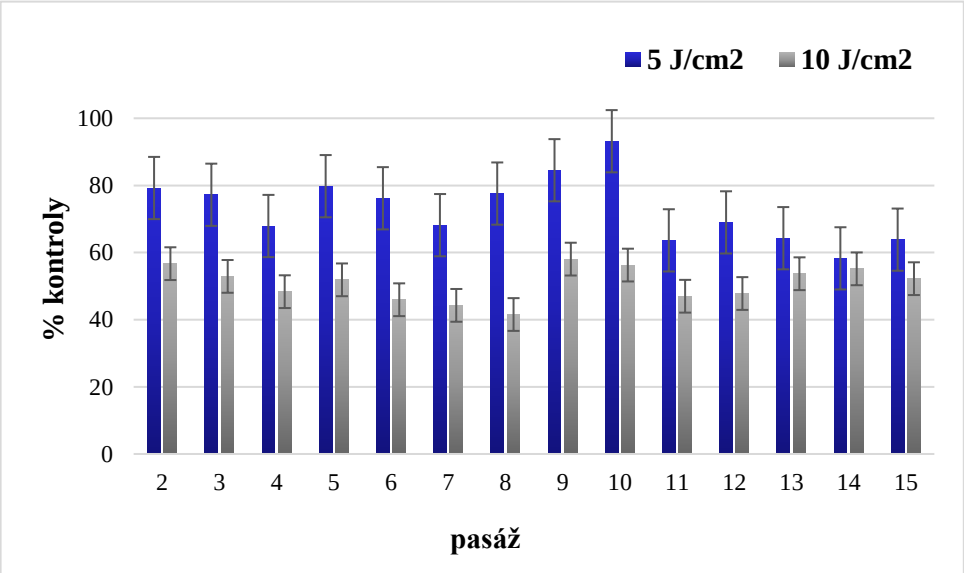


Graf 1: Stanovení viability fibroblastů dospělých dárců pomocí MTT. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr±SD (n = 3).

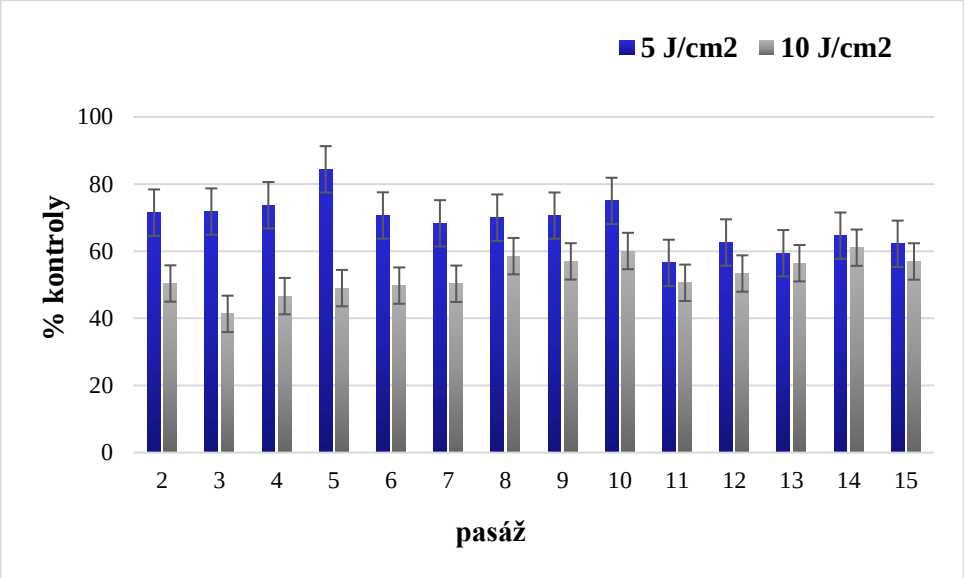


Graf 2: Stanovení viability fibroblastů dětských dárců pomocí MTT. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr±SD (n = 3).

Pomocí inkorporace neutrální červeně bylo u fibroblastů od dospělých dárců zjištěno snížení viability průměrně o 27±9,2 % oproti kontrolním neozářeným fibroblastům při dávce ozáření 5 J/cm^2 a o 49,2±4,9 % při dávce ozáření 10 J/cm^2 (Graf 3). U fibroblastů od dětských dárců byl zjištěn pokles viability o 31,3±6,9 % při dávce ozáření 5 J/cm^2 a o 47,1±5,4 % při dávce ozáření 10 J/cm^2 (Graf 4). Podle profilů grafů (1 a 2 vs. 3 a 4) se inkorporace NČ jeví jako citlivější ve srovnání s MTT metodou, neboť je patrný větší pokles viability zejména u dávky 5 J/cm^2 po 10. pasáži.



Graf 3: Stanovení viability fibroblastů dospělých dárců pomocí NČ. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr±SD (n = 3).

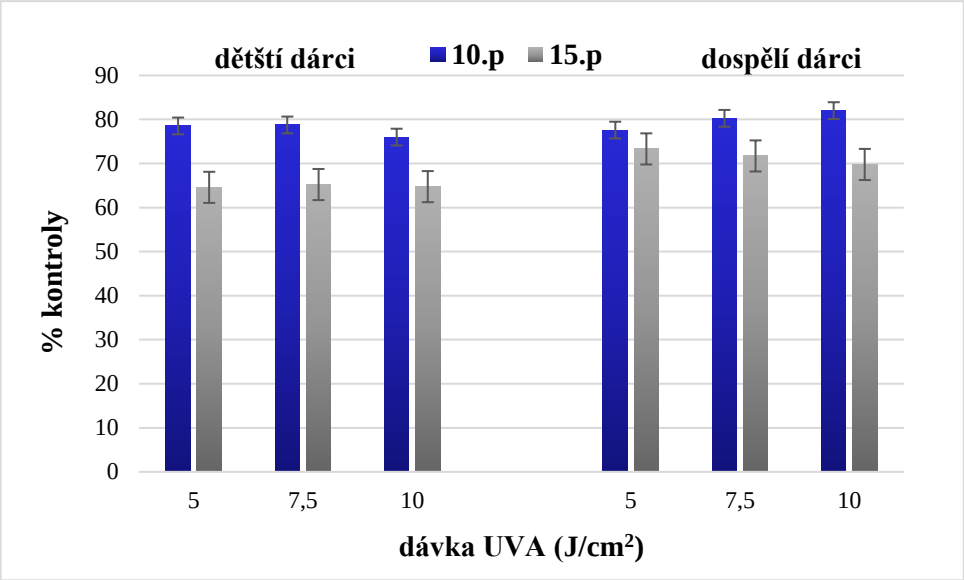


Graf 4: Stanovení viability fibroblastů dětských dárců pomocí NČ. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr±SD (n = 3).

5.1.2 Stanovení proliferace buněk

Vzhledem k limitovanému množství kultivovaných buněk byla proliferace sledována pouze v 10. a 15. pasáži. Kvůli vyšší citlivosti metody byly použity 3 dávky UVA záření (5, 7,5 a 10 J/cm^2).

Stanovením proliferace fibroblastů pomocí inkorporace modifikované báze BrdU byl zjištěn obdobný pokles proliferace buněk vlivem UVA záření u obou skupin dárců v 10. pasáži i 15. pasáži oproti příslušné neozářené kontrole. Efekt UVA záření byl větší u fibroblastů ve vyšší 15. pasáži. Z výsledků rovněž vyplynulo, že UVA dávka nemá výrazný vliv na proliferaci buněk, tj. se zvyšující se dávkou nedošlo k většímu poklesu proliferace (Graf 5).

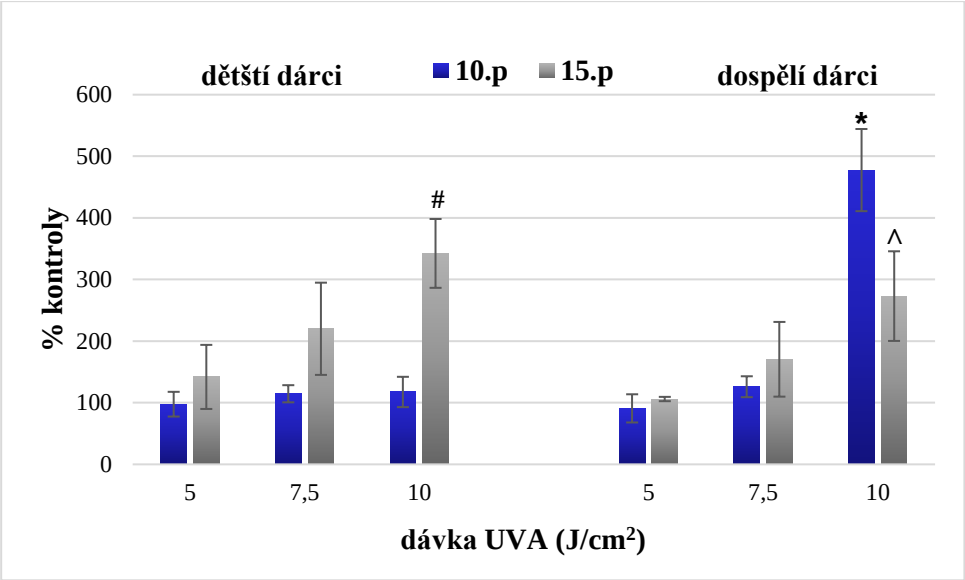


Graf 5: Stanovení proliferace buněk od dospělých a dětských dárců. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr±SD (n = 3).

5.1.3 Stanovení hladiny ROS a glutathionu v buňkách

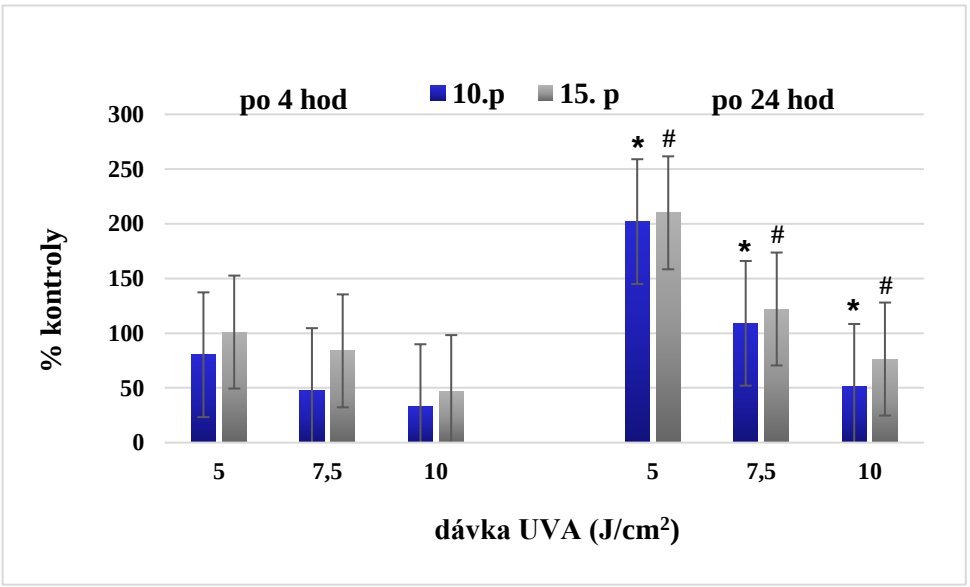
Podobně jako proliferace buněk byly markery oxidačního stresu, produkce ROS a množství GSH, sledovány pouze v 10. a 15. pasáži. Kvůli vyšší citlivosti metod byly použity 3 dávky UVA záření (5, 7,5 a 10 J/cm^2).

Hladina ROS v 10. pasáži byla u fibroblastů od obou skupin dárců srovnatelná pro dávky 5 a 7,5 J/cm^2. U nejvyšší dávky byla nalezena signifikantně vyšší produkce ROS u buněk od dospělých dárců ve srovnání s dětskými. V 15. pasáži byl nalezen dávkově závislý nárůst hladiny ROS u obou typů buněk. U ozářených fibroblastů od dětských dárců byla produkce ROS vyšší oproti buňkám od dospělých dárců. U fibroblastů od dospělých dárců ozářených dávkou 10 J/cm^2 byla produkce ROS v 15. pasáži výrazně nižší ve srovnání s produkcí v 10. pasáži.



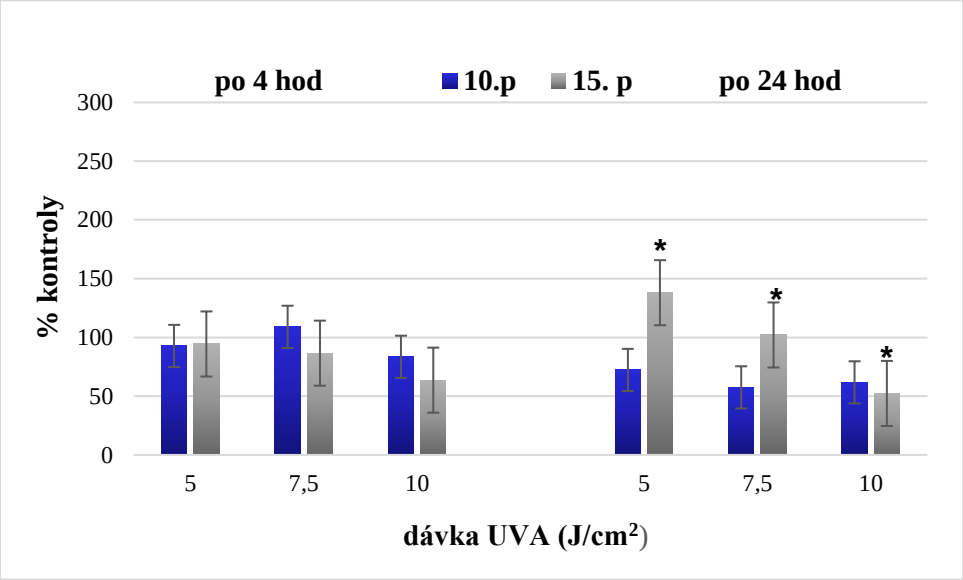
Graf 6: Stanovení produkce ROS ve fibroblastech od dospělých a dětských dárců. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr±SD (n = 3). * signifikantně odlišné od dětských dárců v 10. pasáži; # signifikantně odlišné od dětských dárců v 10. pasáži; ^ signifikantně odlišné od dospělých dárců v 10. pasáži.

U fibroblastů od dětských dárců došlo ke snížení hladiny GSH v závislosti na UVA dávce v 10. i 15. pasáži. Tento efekt byl vyšší v 10. pasáži, zejména 4 hod po UVA expozici ve srovnání s 15. pasáží. Z výsledků dále vyplývá, že po 4 hod po ozáření byla hladina GSH signifikantně nižší oproti měření po 24 hod (Graf 7).



Graf 7: Stanovení hladiny GSH ve fibroblastech dětských dárců. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr±SD (n = 3). * signifikantně odlišné od hladiny GSH stanovené po 4 hod v 10. pasáži; # signifikantně odlišné od hladiny GSH stanovené po 4 hod v 15. pasáži.

U fibroblastů od dospělých dárců v 10. pasáži nebyl patrný tak výrazný pokles hladiny GSH v závislosti na dávce UVA záření. U dávky 7,5 J/cm^2 byla hladina dokonce vyšší něž u dávky 5 J/cm^2. Současně nebylo pozorováno zvýšení hladiny GSH po 24 hod od expozice (Graf 8) ve srovnání s buňkami od dětských dárců (Graf 7). V 15. pasáži byl trend u buněk od dospělých dárců srovnatelný s fibroblasty od dětských dárců (Graf 8 vs. Graf 7).



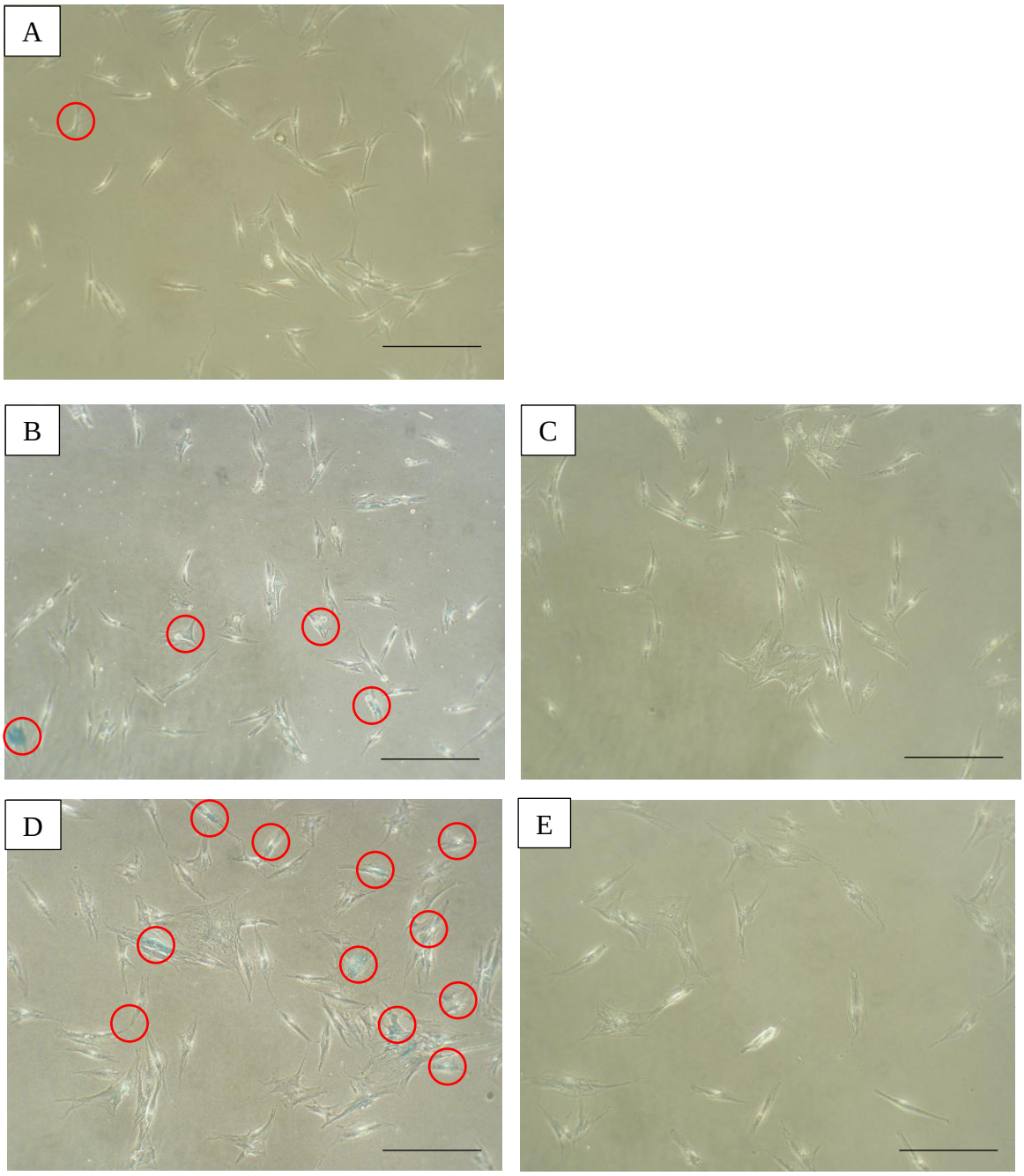
Graf 8: Stanovení hladiny GSH ve fibroblastech dospělých dárců. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr±SD (n = 3). * signifikantně odlišné od hladiny GSH stanovené po 4 hod v 15. pasáži

5.2 Vliv opakované expozice UVA záření na senescenci a oxidační stres u kožních fibroblastů

Ve druhé sérii experimentů byla srovnávána senescence a vybrané parametry oxidačního stresu u přirozeně stárnoucích primárních kožních fibroblastů (bez UVA expozice) a fibroblastů opakovaně vystavených nízké dávce UVA záření (2,5 J/cm^2). Pro tyto experimenty byly použity primárních lidské fibroblasty izolované pouze z kožních fragmentů 6 dospělých dárců (41-61 let), protože tkáně od dětských dárců nebyly k dispozici. Experiment trval ~ 3 měsíce a buňky byly postupně vystaveny 14 expozicím UVA záření (315-380 nm). Z důvodu kontaminace buněk musel být experiment předčasně ukončen (plánováno bylo 15 pasáží ~ 30 expozic UVA záření).

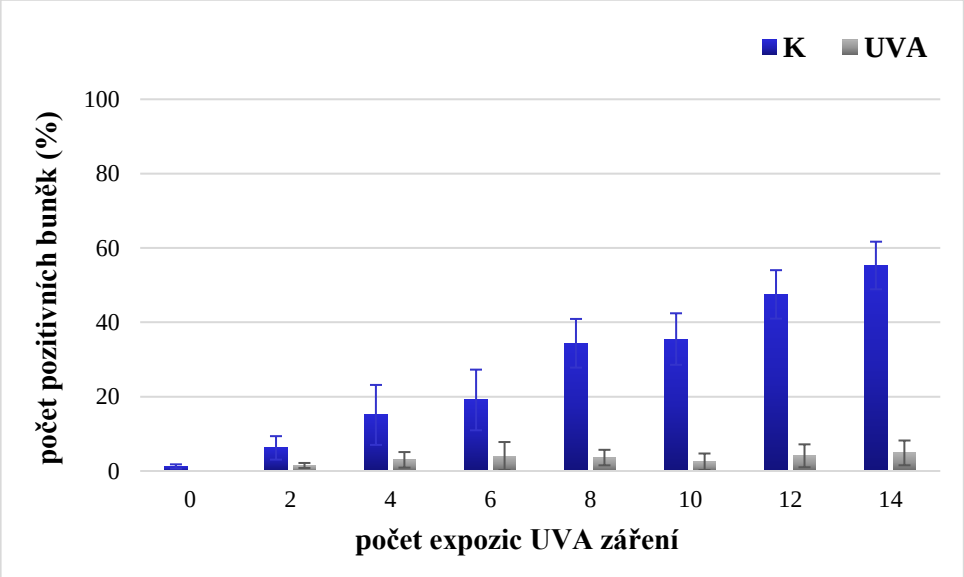
5.2.1 Stanovení aktivity β-galaktosidasy

Pro stanovení množství senescentních buněk byly pořízeny snímky fibroblastů (5 míst pro každý vzorek) a byl počítán podíl pozitivních buněk (modré zbarvení) k celkovému počtu buněk (Obr. 8).



Obr. 8: Stanovení aktivity β-galaktosidasy.
A) Fibroblasty na počátku experimentu; B) Kontrolní (neozařované) fibroblasty odpovídající kultivaci po 8 expozicích; C) Ozařované fibroblasty po 8 expozicích; D) Kontrolní (neozařované) fibroblasty odpovídající kultivaci po 14 expozicích; E) Ozařované fibroblasty odpovídající kultivaci po 8 expozicích; měřítko 100 µm. Data představují reprezentativní výsledky od jednoho z dárců.

U fibroblastů, které nebyly vystavovány působení UVA záření, se počet senescentních buněk zvyšoval v průběhu dlouhodobé kultivace. Na konci experimentu (14 expozic dávce 2,5 J/cm^2) bylo zaznamenáno téměř 9-ti násobné zvýšení počtu senescentních buněk oproti výchozí hodnotě (0 expozic UVA záření). U opakovaně ozařovaných fibroblastů byl počet senescentních buněk minimální (4,9±3,3 % na konci experimentu) ve srovnání s buňkami neozařovanými (55,3±6,4 % na konci experimentu) (Graf 9).



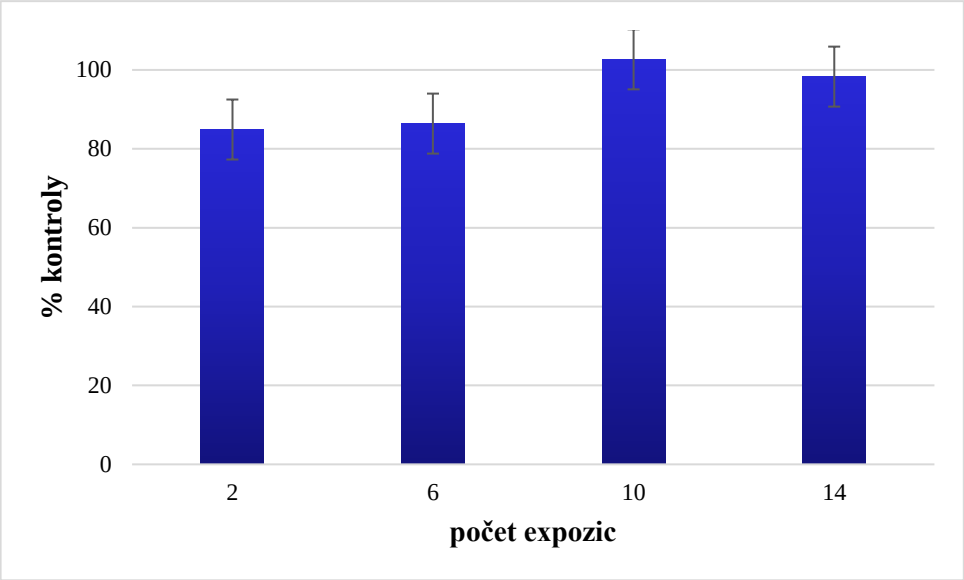
Graf 9: Stanovení aktivity β-galaktosidasy. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr±SD z fibroblastů od 6 dárců.

5.2.2 Stanovení hladiny ROS a glutathionu v buňkách

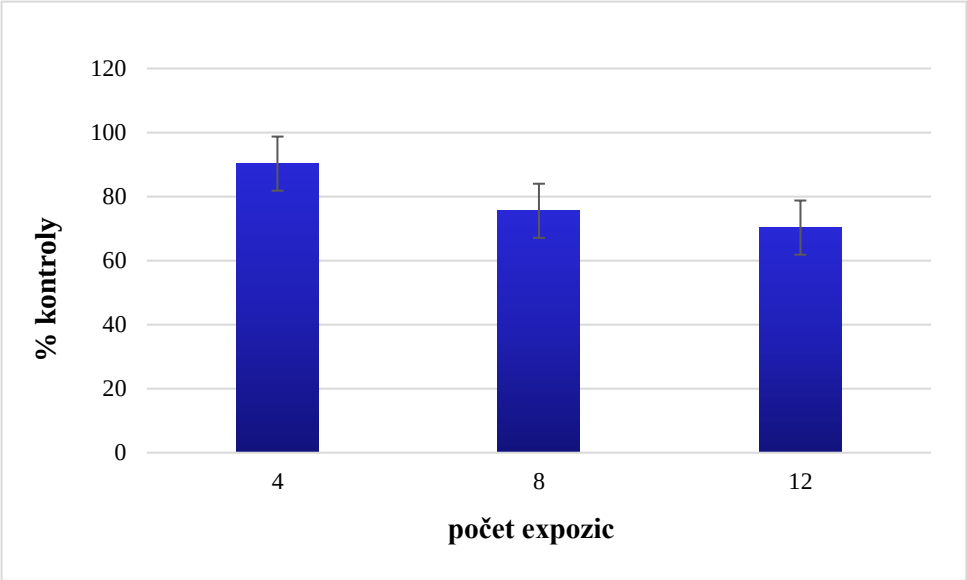
Vzhledem k limitovanému množství kultivovaných buněk byly tyto parametry stanovovány střídavě po pasáži, tj. v sudé pasáži hladina GSH a v liché pasáži hladina ROS.

Z výsledků stanovení hladiny GSH vyplynulo, že s rostoucím počtem expozic UVA záření se tato hladina zvyšovala, po 2 expozicích byla 84,9±7,6 %, po 6 expozicích 86,4±7,6 %, po 10 expozicích 102,7±7,6 % a po 14 expozicích 98,3±7,6 % ve srovnání s neozářenými fibroblasty (Graf 10).

Naopak množství ROS produkovaných vlivem UVA fotonů se s rostoucím počtem expozic UVA záření snižovalo. Po 4 expozicích bylo 90,3±8,5 %, po 8 expozicích 75.5±8,5 % a po 12 expozicích 70,3±8,5 % ve srovnání s neozářenými fibroblasty (Graf 11).



Graf 10: Stanovení hladiny GSH ve fibroblastech opakovaně ozářených dávkou 2,5 J/cm^2 UVA záření. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr±SD z fibroblastů od 6 dárců.



Graf 11: Stanovení hladiny ROS ve fibroblastech opakovaně ozářených dávkou 2,5 J/cm^2 UVA záření. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr±SD z fibroblastů od 6 dárců.

6. DISKUZE

Kvůli umístění na vnějším povrchu těla je kůže vystavena nejrůznějším faktorům vnějšího prostředí, jako je UV záření, jehož přirozeným zdrojem je sluneční záření. UVA záření je složkou UV záření s nejdelší vlnovou délkou, tzn. nejnižší energií, ve srovnání s ostatními složkami (UVB a UVC zářením). Tyto vlastnosti UVA záření umožňují jeho pronikání do nejhlubších vrstev kůže, kde mohou poškozovat vedle kožních buněk také buňky epitelů kožních cév (Rajnochová Svobodová, 2012). Vystavování kůže UV záření je hlavní příčinnou řady makroskopických i mikroskopických změn kůže, které se kumulují v průběhu života a jsou označovány jako předčasné stárnutí kůže (photoageing).

Stárnutí je složitý proces podmíněný nejen genetickými predispozicemi, ale také mnohými faktory vnějšího prostředí. Je charakterizováno postupnou ztrátou funkčnosti všech buněk vedoucích k jejich smrti. Navíc s postupujícím věkem se zvyšuje incidence rakoviny, neurogenereativních a kardiovaskulárních onemocnění. Stárnutí tudíž může představovat rizikový faktor výskytu těchto onemocnění (Walker, 2002). Proto je důležité rozumět vlivu procesu stárnutí na stav buněk s cílem lépe poznat mechanismus a molekulární podstatu onemocnění spojených se stárnutím.

Existuje několik důležitých aspektů studia stárnutí kůže. Neboť řada funkcí kůže s věkem degeneruje, tkáň se stává méně pružnou, křehkou, a tudíž více zranitelnou. Oslabení těchto vlastností narušuje primární funkci kůže, což je ochrana proti působení faktorů vnějšího prostředí (sluneční záření, teplo, mikroorganismy, toxiny či mechanické poškození). Viditelnými změnami kůže, které se projevují se zvyšujícím se věkem jsou zejména tvorba vrásek, nepravidelná pigmentace či poruchy hojení ran. Dochází také k narušení termoregulace, imunitních a nervových reakcí. Postupně se zpomaluje metabolismus kůže, klesá energetický potenciál a snižuje se syntéza lipidů. Tyto změny se netýkají pouze dermální tkáně (Zouboulis a kol., 2011). Vzhledem k tomu, že stárnutí hlubších vrstev kůže odráží degradační procesy celého organismu, může být kůže ideálním a nejpřijatelnějším modelem také studia stárnutí dalších tkání pocházejících z ektodermu, jako je nervový systém (Makrantonaki a kol., 2010). V neposlední řadě prevence onemocnění spojených s věkem, která je jedním z cílů současné medicíny, vyžaduje detailní pochopení mechanismů podílejících se na stárnutí kůže (Kanaki a kol, 2016).

Fibroblasty hrají klíčovou roli při udržování homeostázy pojivové tkáně kůže (Robert a kol, 1992). Mnoho humorálních a buněčných faktorů může aktivovat nebo inhibovat jednotlivé funkce fibroblastů a podílet se na fyziologii i patologii homeostázy pojivových tkání, jako je hojení ran, vzniku a průběhu zánětu nebo rakoviny. Kultivované fibroblasty

představují rozšířeně používaný *in vitro* model pro studování vrozených a získaných poruch a pro zkoumání významu specifických molekulárních cest vedoucích k diferenciaci, stárnutí a smrti buněk (van Gansen a kol., 1987). Bylo publikováno, že fibroblasty v *in vitro* podmínkách začínají rozvíjet progresivní morfologické změny krátce po založení kultur bez ohledu na věk dárců. Dále bylo pozorováno, že buněčné kultury fibroblastů získaných od dospělých a dětských dárců vykazují strukturální a metabolické rozdíly kvantitativně a kvalitativně odlišné v časných a pozdních pasážích. Bylo proto navrženo, že stárnutí *in vitro* může představovat vhodný systém pro zkoumání ztráty replikačního potenciálu, tedy fibroblasty odvozené od dospělých a dětských jedinců mohou být považovány za vhodné modely buněčného stárnutí (Robbins a kol., 1970; Schneider a kol., 1976). Dále bylo navrženo, že replikační schopnost fibroblastů v kultuře je nepřímo úměrná věku dárců. Nicméně novější výzkumy nepotvrdily tuto korelaci (Cristofalo a kol., 1998). Podle Boraldiho a kol. nebylo nikdy provedeno přímé srovnání lidských fibroblastů od mladých a starých dárců při dlouhodobé kultivaci (Boraldi a kol., 2010).

Téměř před půl stoletím bylo prokázáno, že normální somatické lidské buňky podstupují v *in vitro* podmínkách pouze omezený počet dělení před nevratným zastavením jejich proliferace procesem, který se nazývá replikační nebo buněčná senescence (Shay a kol., 2000). Následné studie ukázaly, že vedle zastavení buněčného dělení senescentní buňky získaly výrazné fenotypové změny včetně rezistence vůči apoptóze a došlo ke změnám v expresi. Další studie prokázaly, že senescentní fenotyp může být v buňkách indukován, pokud jsou vystaveny různým stresovým faktorům jako jsou oxidační činidla vyvolávající poškození DNA nebo expresi aktivovaných onkogenů (Campisi a kol., 2007). Nyní je zřejmé, že zastavení buněčné proliferace, nazývané buněčná senescence, je podstatou mechanismu potlačování růstu nádorů. Kromě toho existují důkazy, že senescentní buňky mohou akumulovat s věkem v obnovujících se tkáních a na místech patologických změn souvisejících s věkem, jako je osteoartritida a arterioskleróza (Campisi, 2005).

Na základě výsledků studií bylo navrženo, že v procesu stárnutí hraje klíčovou roli oxidační stres a rezistence organismu vůči oxidačnímu stresu může klesat se stoupajícím věkem (Matsuo a kol., 2004; Sohal a kol., 1996). ROS a RNS, k jejichž zvýšené produkci dochází vlivem působení UVA fotonů, v případě nedostatečné eliminace antioxidačními systémy oxidují biomolekuly, jako DNA, proteiny a lipidy. Oxidované produkty těchto biomolekul se postupně hromadí ve stárnoucím organismu a negativně ovlivňují řadu procesů probíhajících v buňkách/tkáních. Na modelu transgenní octomilky obecné

(*Drosophila melanogaster)* bylo prokázáno, že v zvýšená exprese antioxidačních enzymů (SOD a KAT) snižuje oxidační poškození molekul souvisejí s věkem a prodlužuje délku života (Orr a kol., 1994).

6.1 Porovnání senzitivity fibroblastů od dětských a dospělých dárců vůči působení UVA záření během dlouhodobé kultivace

Pomocí výše uvedených metod (kapitola 4.1) byla u fibroblastů získaných od tří dětských a tří dospělých dárců porovnána senzitivita těchto buněk vůči UVA záření v průběhu 15. pasáží.

Průběžně v každé pasáži byla zjištěna viabilita fibroblastů. Jako základní metoda byla použita metabolická přeměna MTT. Řada publikovaných prací upozorňuje na některé nevýhody metody využívající MTT. Například podle Chiba a kol. může formazan vznikající při metabolizaci MTT způsobovat poškození buněk, a tedy zkreslovat výpovědní hodnotu metody. Proto doporučují nízké koncentrace MTT a případně zkrátit dobu inkubace (Chiba a kol., 1998). Podle Viana a kol. některé typy buněk např. myší fibroblasty L929 vykazují nízkou aktivitu dehydrogenáz redukujících MTT, a proto u nich není vhodné viabilitu stanovovat touto metodou (Vian a kol., 1995). Z těchto důvodů byla paralelně pro sledování životnosti buněk použita také metoda inkorporace NČ. S využitím MTT byl pozorován pokles viability obou typů buněk se zvyšující se dávkou UVA záření. Nicméně nebyly zjištěny signifikantně odlišné rozdíly mezi fibroblasty od dětských a dospělých dárců. Pomocí inkorporace NČ byl zjištěn srovnatelný trend poklesu viability fibroblastů dětských a dospělých dárců se zvyšující se dávkou ozáření. Nicméně pomocí NČ byl zjištěn větší pokles viability u obou typů buněk po 10. pasáži u nižší dávky (5 J/cm^2) ve srovnání s metodou MTT, kde tento jen nebyl vůbec patrný. Inkorporace NČ se tak jeví jako citlivější metoda stanovení životnosti fibroblastů.

U obou typů buněk byla dále sledována a porovnána proliferace po delší době kultivace, konkrétně v 10. a 15. pasáži. Proliferace byla hodnocena pomocí inkorporace BdrU, což je nukleotidový analog thymidinu, který je začleněn do DNA během její syntézy a může být detekován s využitím specifické protilátky. Inkorporace BrdU je jednou z nejběžnějších metod detekce syntézy DNA v histologických nebo cytologických vzorcích (Trent a kol., 1986). Touto metodou nebyly rovněž zjištěny signifikantní rozdíly mezi fibroblasty od dětských a dospělých dárců. Tento výsledek je v souladu se studií Cristofala a kol., kteří popsali, že neexistuje významná změna v proliferaci fibroblastů v závislosti na věku dárce (Cristofalo a kol., 1998). Naměřená data rovněž ukázala, že pokles proliferace

fibroblastů se nezvyšoval s rostoucí dávkou UVA záření. Tyto výsledky se neshodují s prací Debacq-Chainiauxe a kol., kteří po 10 expozicích UVB záření (250 mJ/cm^2) pozorovali výrazně sníženou proliferaci kožních fibroblastů (Debacq-Chainiaux a kol., 2005). Rozdíl je pravděpodobně způsoben odlišným typem použitého UV záření. UVB záření má vyšší energii a je schopné vyvolat přímé poškození DNA buněk (je 1000krát více genotoxické) ve srovnání s UVA složkou. Proto i při malé dávce může UVB záření snižovat proliferaci a navozovat senescenci mnohem rychleji než UVA záření.

ROS jsou přirozeně neutralizovány antioxidačními systémy buňky. Pokud z nějaké příčiny nastane nerovnováha mezi produkcí ROS a jejich eliminací působením antioxidantů, buňka či tkáň se dostává do prooxidačního stavu, který se označuje jako oxidační stres. V důsledku oxidačního stresu může následně dojít k oxidačnímu poškození molekul. Modifikované molekuly či větší útvary se mohou hromadit v buňkách a urychlovat jejich stárnutí (Finkel a kol., 2000). Existují i studie, podle kterých resistence organismů proti oxidačnímu stresu může s rostoucím věkem stoupat (Lithgow a kol., 2002). Hladina ROS byla u fibroblastů od dětských a dospělých dárců porovnávána v 10. a 15. pasáži. V 10. pasáži byl signifikantní rozdíl nalezen pouze u nejvyšší dávky (10 J/cm^2), kdy hladina ROS u buněk od dospělých dárců byla 4krát vyšší ve srovnání s buňkami od dětských dárců. Tyto výsledky se shodují se studií Boraldiho a kol., jež při použití stejné fluorescenční sondy detekovali mnohonásobně vyšší hladinu ROS u buněk od dospělých dárců oproti dětským (Boraldi a kol., 2010). Oproti Boraldiho a kol. studii byl v této studii zjištěn nárůst hladiny ROS s rostoucí pasáží. Dle Boraldiho a kol. se hladina ROS v průběhu dlouhodobé kultivace neměnila (Boraldi a kol., 2010). Nalezený rozdíl může být způsoben odlišným genetickým pozadím dárců. V 15. pasáži byla dále byla zjištěna vyšší produkce ROS u fibroblastů od dětských dárců oproti buňkám od dospělých dárců. Toto zjištění koreluje s předchozími studiemi, podle kterých se zvyšující se pasáží a věkem dárců může dojít k poklesu tvorby ROS ve fibroblastech (Boraldi a kol., 2010; Matsuo a kol., 2004).

Posledním studovaným parametrem byla hladina GSH, nejvýznamnějšího neenzymového antioxidantu v buňkách. Hladina GSH klesala u buněk od dětských dárců úměrně rostoucí dávce UVA záření. U vyšší 15. pasáže byl patrný mírný nárůst hladiny GSH. Chování fibroblastů od dospělých dárců bylo výrazně odlišné ve srovnání s buňkami od dětských dárců zejména v 10. pasáži. Nebyl patrný jednoznačný pokles hladiny GSH s dávkou UVA záření a nedošlo ke zvýšení hladiny GSH po 24 h od ozáření. V 15. pasáži byl již trend u obou typů buněk srovnatelný. Přestože u buněk od dětských dárců došlo k většímu poklesu GSH v kratším časovém intervalu, regenerační schopnost těchto buněk

(hladina GSH po 24 hod) se jevila vyšší (Graf 7). Získané výsledky nelze relevantně srovnat s jinými studiemi, neboť zcela neodpovídají podmínkám tohoto experimentu. Nicméně Matsuo a kol. zjistili vyšší hladinu GSH u buněk od starších dárců oproti mladým dárcům (Matsuo a kol, 2004). Podobně Shindo a kol. popsali, že se zvyšujícím se věkem dárce se hladina GSH u fibroblastů vystavených UVA záření mírně navýšila (Shindo a kol., 1991). Na druhou stranu Lu a kol. popsali sníženou hladinu GSH se zvyšujícím se věkem dárce (Lu a kol., 1999). Rozdíly mezi výsledky studií mohou být způsobeny odlišným genetickým pozadím dárců, ale i environmentálním prostředím, v němž dárci žili.

6.2 Vliv opakované expozice UVA záření na senescenci a oxidační stres u kožních fibroblastů

Lidská kůže je opakovaně vystavována slunečnímu UV záření, a proto vzniklé poškození kožních buněk a struktur má kumulativní charakter a zvětšuje se s věkem. V tomto ohledu je zkoumání změn kožních fibroblastů po opakované expozici UV záření tedy smysluplnější než detekce změn po jedné expozici (Lavker a kol., 1995).

Ve druhé části experimentů byla proto srovnávána senescence a vybrané parametry oxidačního stresu u přirozeně stárnoucích primárních kožních fibroblastů (bez UVA expozice) a fibroblastů opakovaně vystavených nízké dávce UVA záření (2,5 J/cm^2). V obou skupinách buněk byla použity fibroblasty izolované z kožních fragmentů 6 dospělých dárců.

Senescence byla detekována pomocí aktivity β-galaktosidasy (SA-β-gal), jež je jedním z rozšířeně používaných markerů senescence. Boraldi a kol. popsali aktivitu SA-β-gal již v počátečních pasážích kultivace primárních fibroblastů od dospělých dárců, přičemž počet SA-β-gal-pozitivních čili senescentních buněk se postupně zvyšoval s dalšími pasážemi (Boraldi a kol, 2010). Z výsledků této práce vyplynulo, že u fibroblastů, které nebyly vystavovány působení UVA záření, se počet senescentních buněk zvyšoval v průběhu celé kultivace. Na konci experimentu (14 expozic dávce 2,5 J/cm^2) bylo zaznamenáno téměř 9násobné zvýšení počtu senescentních buněk oproti výchozí hodnotě (0 expozic UVA záření); toto je v souladu s výsledky Boraldiho a kol (2010). U opakovaně ozařovaných fibroblastů byl počet senescentních buněk minimální (4,9±3,3 % na konci experimentu) ve srovnání s buňkami neozařovanými (55,3±6,4 % na konci experimentu). V nedávné práci bylo popsáno, že opakovaná expozice kožních fibroblastů izolovaných z předkožky novorozenců nízké dávce UVA záření po 10 po sobě následujících dnů (celková dávka 36 J/cm^2) vedla ke zvýšení aktivity SA-β-gal v buňkách (Yoshimoto a kol., 2018).

Rozdíl výsledků může souviset s dárci buněk (dospělé ženy vs. novorození chlapci,) ale i uspořádáním experimentů. V našich podmínkách měly buňky mezi expozicemi delší dobu na regeneraci a poškozené buňky mohly být efektivněji eliminovány např. apoptózou. Debacq-Chainiaux a kol. ve své studii rovněž zjistili, že opakované expozice UVB záření (10 x 250 mJ/cm^2) stimulují u fibroblastů mimo jiné aktivitu SA-β-gal (53 % SA-β-gal-pozitivních buněk) (Debacq-Chainiaux a kol., 2005). Rozdíl výsledků je v tomto případě velmi pravděpodobně způsoben použitím odlišného typu UV záření. UVB záření má vyšší energii a působí na fibroblasty odlišnými mechanismy ve srovnání s UVA zářením, viz teoretická část.

Zvolené parametry oxidačního stresu ukázaly, že opakovaná expozice UVA záření vedla k postupnému mírnému nárůstu hladiny GSH, a naopak k mírnému snížení hladiny ROS oproti neozařovaným fibroblastům. Tyto výsledky naznačují schopnost kožních fibroblastů adaptovat se do určité míry na negativní působení vnějších faktorů. Zjištění této studie korelují s výsledky publikovanými Liuem a kol., kde opakovaná nízká dávka UVA záření vyvolala signifikantní ochranu kožních fibroblastů proti poškození. Mechanismy mohou zahrnovat opravu DNA a dočasné zastavení buněčného cyklu indukované nízkou dávkou UVA záření (Liu a kol., 2012). Výsledky taktéž korelují se studií Matsua a kol., kteří popsali souvislost mezi zvýšením hladiny GSH a vytvořením rezistence fibroblastů vůči oxidačnímu stresu (Matsuo a kol., 2004).

7. ZÁVĚR

Tato magisterská diplomová práce se zabývala porovnáním senzitivity primárních fibroblastů izolovaných z kožní tkáně dospělých dárců a dětských dárců během dlouhodobé kultivace (jako modelový stresový faktor bylo použito UVA záření) a porovnáním senescence a vybraných parametrů oxidačního stresu u primárních kožních fibroblastů dlouhodobě kultivovaných bez UVA ozáření a stejných buněk opakovaně vystavených UVA záření. Ze získaných výsledků vyplynuly tyto závěry:

- u obou skupin dárců byl zjištěn srovnatelný pokles viability buněk vlivem působení UVA záření; metoda inkorporace NČ se jevila citlivější ve srovnání s metabolickou přeměnou MTT
- u obou skupin dárců byl zjištěn srovnatelný pokles proliferace buněk po působení UVA záření
- u fibroblastů izolovaných z kůže dospělých dárců byl zjištěn pokles hladiny ROS s rostoucím počtem pasáží
- u fibroblastů izolovaných z kůže dospělých dárců byl v nižší pasáži detekován nižší poklesu hladiny GSH, ale současně nižší schopnost regenerace bazální hladiny GSH
- u fibroblastů opakovaně vystavených nízké dávce UVA záření byl nalezen výrazně nižší počet SA-β-gal-pozitivních (senescentních) buněk oproti buňkám neozařovaným
- opakovaná expozice UVA záření vedla k postupnému mírnému nárůstu hladiny GSH a mírnému snížení hladiny ROS ve srovnání s neozařovanými fibroblasty

Získané výsledky naznačují, že pro dermatologické studie je možné využít fibroblasty jak od dospělých, tak od dětských dárců, zejména pokud se jedná o základní stanovení, založené na metodách sledujících viabilitu buněk. U stanovení specifických parametrů jako je např. hladina antioxidantů, produkce reaktivních sloučenin, aktivita/exprese proteinů, poškození DNA, je nutné počítat s rozdílným chováním či citlivostí buněk.

V průběhu dlouhodobé kultivace může u kožních fibroblastů docházet minimálně k částečné adaptaci vůči působení stresových faktorů např. UVA záření a následnému oxidačnímu stresu v důsledku nekontrolované produkce reaktivních sloučenin. Objasnění detailního mechanismu bude předmětem dalšího zkoumání.

POUŽITÁ LITERATURA

AFANAS' EV, I. (2010). Signaling by reactive oxygen and nitrogen species in skin diseases. *Current drug metabolism*, 11.5: 409-414.

AMARO-ORTIZ, A., Yan, B., D'Orazio, J.A. (2014). Ultraviolet radiation, aging and the skin: prevention of damage by topical cAMP manipulation. *Molecules*, 19.5: 6202-6219.

AMIRLAK, B., Shahabi, L., Javaheri, S., Talavera, F., Stadelmann, W. (2013). Skin anatomy. *Medscape Ref*, *1*.

ARNFIELD, A.J. (2005) Terrestrial Radiation. In: Oliver J.E. (eds) *Encyclopedia of World Climatology. Encyclopedia of Earth Sciences Series*. Springer, Dordrecht

BAKER III, G. T., Sprott, R. L. (1988). Biomarkers of aging. *Experimental gerontology*, *23*(4-5), 223-239.

BAUMANN, L. (2007). Skin ageing and its treatment. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 211.2: 241-251.

BORALDI, F., Annovi, G., Tiozzo, R., Sommer, P., Quaglino, D. (2010). Comparison of ex vivo and in vitro human fibroblast ageing models. *Mechanisms of ageing and development*, *131*(10), 625-635.

BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, *72*(1-2), 248-254.

CAMPISI, J. (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*, *120*(4), 513-522.

CAMPISI, J., di Fagagna, F. D. A. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews Molecular cell biology*, *8*(9), 729.

CARLBERG, I., Mannervik, B. (1985). Glutathione reductase. *Methods in enzymology*, 113, 484-490.

CARLSON, B. M. (1994) Integumentary, skeletal, and muscular systems. *Human embryology and developmental Biology*, 153-181.

CICARMA, E., Juzeniene, A., Porojnicu, A. C., Bruland, Ø. S., Moan, J. (2010). Latitude gradient for melanoma incidence by anatomic site and gender in Norway 1966–2007. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *101*(2), 174-178.

CLYDESDALE, G. J., Dandie, G. W., Muller, H. K. (2001). Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunology and cell biology*, 79.6: 547.

CRISTOFALO, V. J., Allen, R. G., Pignolo, R. J., Martin, B. G., Beck, J. C. (1998). Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(18), 10614-10619.

D'ARCANGELO, D., Tinaburri, L., Dellambra, E. (2017). The role of p16INK4a pathway in human epidermal stem cell self-renewal, aging and cancer. *International journal of molecular sciences*, *18*(7), 1591.

DEBACQ-CHAINIAUX, F., Borlon, C., Pascal, T., Royer, V., Eliaers, F., Ninane, N., Remacle, J. (2005). Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-β1 signaling pathway. *Journal of cell science*, *118*(4), 743-758.

DEBACQ-CHAINIAUX, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J., Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-βgal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature protocols*, *4*(12), 1798.

DIMRI, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(20), 9363-9367

ETTLER, K. (2004). Fotoprotekce kůže. *Ochrana kůže před účinky ultrafialového záření. Triton*.

ETTLER, J., Ettler, K. (2016). Aktuální pohled na fotoprotekci kůže: Current view on skin photoprotection. *Dermatológia pre prax*. Bratislava: SOLEN **10**(3), 108-110. ISSN 1337-1746.

FINKEL, T., Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, *408*(6809), 239.

FREINKEL, R. K., Woodley. D. (2001). The biology of the skin. *New York: Parthenon Pub. Group*, ISBN 1-85070-006-0.

FUNAYAMA, R., Saito, M., Tanobe, H., Ishikawa, F. (2006). Loss of linker histone H1 in cellular senescence. *Journal of Cell Biology* Dec 18;175(6):869-80

GILCHREST, B. A. (2013). Photoaging. *The Journal of investigative dermatology*, *133*(E1), E2.

GODAR, D. E. (2005). UV Doses Worldwide. *Photochemistry and photobiology*, 81.4: 736-749.

GRAGNANI, A., Mac Cornick, S., Chominski, V., de Noronha, S. M. R., de Noronha, S. A. A. C., Ferreira, L. M. (2014). Review of major theories of skin aging. *Advances in Aging Research*, *3*(04), 265.

HALUZA, D., Simic, S., Moshammer, H. (2014). Temporal and spatial melanoma trends in Austria: An ecological study. *International journal of environmental research and public health*, 11.1: 734-748.

HARRAAN, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology.* 11:298-300.

HATINA, J. (2001) Molekulární biologie buněčné imortalizace a její vztah ke karcinogenezi. *Klinická onkologie*, 14, 145-153.

HAZANE-PUCH, F., Bonnet, M., Valenti, K., Schnebert, S., Kurfurst, R., Favier, A., Sauvaigo, S. (2010). Study of fibroblast gene expression in response to oxidative stress induced by hydrogen peroxide or UVA with skin aging. *European Journal of Dermatology*, *20*(3), 308-320.

HELFRICH, Y. R., Sachs, D. L., Voorhees, J. J. (2008). Overview of skin aging and photoaging. *Dermatology Nursing*, *20*(3), 177.

HOLEČEK, V., Racek, J., Rokyta, R. (2004). Thioredoxinreduktasa-významný antioxidant. *Klinická biochemie a metabolismus*, 12 (33), No. 4, p. 211–214.

CHIBA, K., Kawakami, K., Tohyama, K. (1998). Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology in vitro*, *12*(3), 251-258.

CHU, D. H. (2008). Development and structure of skin. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine. 7th ed. New York: McGraw-Hill*, 57-73.

CHU, D. H. (2012). Overview of Biology, Development, and Structure of Skin. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, 55–73.

ISHITSUKA, Y., Maniwa, F., Koide, C., Kato, Y., Nakamura, Y., Osawa, T., Miyachi, Y. (2012). Increased halogenated tyrosine levels are useful markers of human skin ageing, reflecting proteins denatured by past skin inflammation. *Clinical and Experimental Dermatology: Experimental dermatology*, *37*(3), 252-258.

JAITLEY, S., SARASWATHI, T. R. (2012). Pathophysiology of Langerhans cells. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*, 16.2: 239.

JAMES, W. D., Berger, T. G., Elston, D. M. (2006). Macrophage and monocyte disorders. Andrews' Diseases of the Skin: *Clinical Dermatology. 10th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier*, 714-24.

KANAKI, T., Makrantonaki, E., Zouboulis, C. C. (2016). Biomarkers of skin aging. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, *17*(3), 433-442.

KANITAKIS, J. (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European journal of dermatology: EJD*, 12.4: 390-9; quiz 400-1.

KLIGMAN, L. H. (1986). The nature of photoaging: its prevention and repair. *Photodermatology*, *3*, 215-227.

KODET, O., Krajsová, I. (2017). Maligní melanom, incidence, rizikové faktory a jeho časná diagnostika. *ONKOLOGIE*, *11*(3), 138-143.

KOLARSICK, P. A.J., Kolarsick, M. A., Goodwin, C. (2011). Anatomy and physiology of the skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3.4: 203-213.

LAUTENSCHLAGER, S., Wulf, H. Ch., Pittelkow, M. R. (2007). Photoprotection. *The Lancet*, 370.9586: 528-537.

LAUTIER, D., Luscher, P., Tyrrell, R. M. (1992). Endogenous glutathione levels modulate both constitutive and UVA radiation/hydrogen peroxide inducible expression of the human heme oxygenase gene. *Carcinogenesis*, *13*(2), 227-232.

LAVKER, R. M., Gerberick, G. F., Veres, D., Irwin, C. J., Kaidbey, K. H. (1995). Cumulative effects from repeated exposures to suberythemal doses of UVB and UVA in human skin. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *32*(1), 53-62.

LINDA, T. (2006). Elektromagnetické záření, pozitivní a negativní působení na zdraví, možnosti ochrany.

LITHGOW, G. J., Walker, G. A. (2002). Stress resistance as a determinate of C. elegans lifespan. *Mechanisms of ageing and development*, *123*(7), 765-771.

LIU, Z., Chen, H., Yang, H., Liang, J., Li, X. (2012). Low-dose UVA radiation-induced adaptive response in cultured human dermal fibroblasts. *International Journal of Photoenergy*.

LOWRY, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, *193*(1), 265-275.

LU, C. Y., Lee, H. C., Fahn, H. J., & Wei, Y. H. (1999). Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *423*(1), 11-21.

MAINES, M. D., Costa, L. G., Reed, D. J., Sassa, S., Sipes, I. G. (1999). *Current protocols in toxicology*. New York: John Wiley. ISBN 978-0-471-24106-5.

MAKRANTONAKI, E., Schönknecht, P., Hossini, A. M., Kaiser, E., Katsouli, M. M., Adjaye, J., Zouboulis, C. C. (2010). Skin and brain age together: The role of hormones in the ageing process. *Experimental gerontology*, *45*(10), 801-813.

MARESCA, V., Flori, E., Briganti, S., Camera, E., Cario-André, M., Taïeb, A., Picardo, M. (2006). UVA-induced modification of catalase charge properties in the epidermis is correlated with the skin phototype. *Journal of Investigative Dermatology*, *126*(1), 182-190.

MARIEB, E. N., HOEHN, K. (2007). Human anatomy & physiology. *Pearson Education.* ISBN 0-321-37294-8.

MARTÍNEK, J., Vacek, Z. (2009). Histologický atlas. *1. vyd. Praha: Grada, 134 s.* ISBN 978-802-4723-938.

MARZETTI, E., Hwang, J. C., Lees, H. A., Wohlgemuth, S. E., Dupont-Versteegden, E. E., Carter, C. S., Leeuwenburgh, C. (2010). Mitochondrial death effectors: relevance to sarcopenia and disuse muscle atrophy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *1800*(3), 235-244.

MASORO, E. J., Austad, S. N. (Eds.). (2010). *Handbook of the Biology of Aging*. Academic press. 119-139.

MATSUO, M., Kaneko T. (1999). Lipid peroxidation. *Yu PB (ed): Methods in Aging Research. Boca Raton, CRC Press*, 571-606.

MATSUO, M., Ikeda, H., Sugihara, T., Horiike, S., Okano, Y., Masaki, H. (2004). Resistance of cultured human skin fibroblasts from old and young donors to oxidative stress and their glutathione peroxidase activity. *Gerontology*, *50*(4), 193-199

MESCHER, A. L., JUNQUEIRA, L. C. U. (2010). Jungueira's basic histology: text & atlas. *12th edition. New York: McGraw Hill Medical*. 467. ISBN 978-007-127190-5.

MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, *65*(1-2), 55-63.

MURPHY, G. F. (1997). Histology of the skin. *Lever´s histopathology of the skin (8th ed., pp. 5Y45). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.*

NARAYANAN, D. L., Saladi, R. N., Fox, J. L. (2010). Ultraviolet radiation and skin cancer. *International journal of dermatology*, 49.9: 978-986.

NARITA, M., Nũnez S., Heard E., Narita M., Lin A. W., Hearn S. A., Spector D. L., Hannon G. J., Lowe S. W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell.* Jun 13;113(6):703-16

NERGE-SALVAYRE, A., Auge, N., Duval, C., Robbesyn, F., Thiers, J. C, Nazzal, D., Benoist, H., Salvayre, R. (2002) Detection of intracellular reactive oxygen species in cultured cells using fluorescent probes. *Methods of Enzymology*. 352, 62-71.

OBSTOVÁ, I. (2011). Péče o kůži po opalování. *Dermatologie pro praxi*, 79-80.

ORR, W. C., Sohal, R. S. (1994). Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in Drosophila melanogaster. *Science*, *263*(5150), 1128-1130.

PANICH, U., Sittithumcharee, G., Rathviboon, N., Jirawatnotai, S. (2016). Ultraviolet radiation-induced skin aging: the role of DNA damage and oxidative stress in epidermal stem cell damage mediated skin aging. *Stem cells international*.

PATTISON, D. I., DAVIES, M. J. (2006). Actions of ultraviolet light on cellular structures. *Cancer: cell structures, carcinogens and genomic instability*. Birkhäuser Basel, 131-157.

PATTON, K. T. (2015). Anatomy and Physiology -E-Book. Elsevier Health Sciences, ISBN 9780323083539

PAULSEN, D. F. (1993). Basic histology: examination & board review. *2nd ed. Norwalk, Conn.: Appleton and Lange.* ISBN 0-8385-0569-4.

PORTH, C. (2011). *Essentials of pathophysiology: concepts of altered health states*. Lippincott Williams & Wilkins.

RABE, J. H., Mamelak, A. J., McElgunn, P. J., Morison, W. L., Sauder, D. N. (2006). Photoaging: mechanisms and repair. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *55*(1), 1-19.

RAJNOCHOVÁ SVOBODOVÁ, A. (2012). Poškození kůže působením slunečního záření, možnosti ochrany a prevence.*Univerzita Palackého v Olomouci*. ISBN 978-80-244-3183-3.

RAVANAT, J. L., Douki, T., Cadet, J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63.1-3: 88-102

ROBBINS, E., Levine, E., Eagle, H. (1970). Morphologic changes accompanying senescence of cultured human diploid cells. *Journal of Experimental Medicine*, *131*(6), 1211-1222.

ROBERT, L., Jacob, M. P., Labat, R. J. (1992). Cell-Matrix Interactions in the Genesis of Arteriosclerosis and Atheroma. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 673.1: 331-341.

ROSTOVÁ, J., Borská, L., Fiala, Z., Krejsek, J. (2006). Chronický účinek ultrafialového záření na organismus. *Vojenské zdravotnické listy*. 3-4, 111-119.

RŮŽIČKOVÁ JAREŠOVÁ, L. (2013). Stárnutí kůže. *Dermatologie v praxi*. 7(2): 86–87.

SÁRDY, M. (2009). Role of matrix metalloproteinases in skin ageing. *Connective tissue research*, *50*(2), 132-138.

SHAY, J. W., Wright, W. E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature reviews Molecular cell biology*, *1*(1), 72.

SHIN, M. H., Seo, J. E., Kim, Y. K., Kim, K. H., Chung, J. H. (2012). Chronic heat treatment causes skin wrinkle formation and oxidative damage in hairless mice. *Mechanisms of ageing and development*, *133*(2-3), 92-98.

SHINDO, Y., Akiyama, J., Yamazaki, Y., Saito, K., Takase, Y. (1991). Changes in enzyme activities in skin fibroblasts derived from persons of various ages. *Experimental gerontology*, *26*(1), 29-35.

SCHEIBNER, A., McCarthy, W. H., Milton, G. W., Nordlund, J. J. (1983). Langerhans cell and melanocyte distribution in “normal” human epidermis: preliminary report. *Australasian Journal of Dermatology*, *24*(1), 9-16.

SCHNEIDER, E. L., Mitsui, Y. (1976). The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human age. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *73*(10), 3584-3588.

SOHAL, R. S., Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*, *273*(5271), 59-63.

STOJILJKOVIĆ, D., Pavlović, D., Arsić, I. (2014). Oxidative Stress, Skin Aging and Antioxidant Therapy/Oksidacioni Stres, Starenje Kože I Antioksidaciona Terapija. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*, *31*(4), 207-217.

SVOBODOVÁ, A., Walterová, D., Vostalová, J. (2006). Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomedical Papers-Palacky University in Olomouc*, *150*(1), 25.

TEWARI, A., Grys, K., Kollet, J., Sarkany, R., Young, A. R. (2014). Upregulation of MMP12 and its activity by UVA1 in human skin: potential implications for photoaging. *Journal of Investigative Dermatology*, *134*(10), 2598-2609.

TIGGES, J., Krutmann, J., Fritsche, E., Haendeler, J., Schaal, H., Fischer, J. W., Ventura, N. (2014). The hallmarks of fibroblast ageing. *Mechanisms of ageing and development*, *138*, 26-44.

TRAUTINGER, F. (2001). Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. *Clinical and experimental dermatology*, 26.7: 573-577.

TRENT, J. M., Gerner, E., Broderick, R., Crossen, P. E. (1986). Cell cycle analysis using bromodeoxyuridine: comparison of methods for analysis of total cell transit time. *Cancer genetics and cytogenetics*, *19*(1-2), 43-50.

VAN GANSEN, P. van Lerberghe, N. (1987). Possibilities and limitations of fibroblast cultures in the study of animal aging. *La Cellule*, 74: 317-373.

VEGA-AVILA, E., Pugsley, M. K. (2011). An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proc West Pharmacol Soc*. e4.

VELARDE, M. C., Flynn, J. M., Day, N. U., Melov, S., Campisi, J. (2012). Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin. *Aging (Albany NY)*, *4*(1), 3.

VIAN, L., Vincent, J., Maurin, J., Fabre, I., Giroux, J., Cano, J. P. (1995). Comparison of three in vitro cytotoxicity assays for estimating surfactant ocular irritation. *Toxicology in vitro*, *9*(2), 185-190.

WALKER, R. F. (2002). Is aging a disease? *The Aging Male*, 5.3: 147-169.

WIECKER, T. S., Luther, H., Buettner, P. (2003). Moderate sun exposure and nevus counts in parents are associated with development of melanocytic nevi in childhood. *Cancer*, 97, s. 628-638.

WOLBER, R., Schlenz, K., Wakamatsu, K., Smuda, C., Nakanishi, Y., Hearing, V. J., Ito, S. (2008). Pigmentation effects of solar-simulated radiation as compared with UVA and UVB radiation. *Pigment cell & melanoma research*, *21*(4), 487-491.

YAROSH, D., Klein, J., O'Connor, A., Hawk, J., Rafal, E., Wolf, P., Xeroderma Pigmentosum Study Group. (2001). Effect of topically applied T4 endonuclease V in liposomes on skin cancer in xeroderma pigmentosum: a randomised study. *The Lancet*, *357*(9260), 926-929.

YOKOO, S., Furumoto, K., Hiyama, E., Miwa, N. (2004). Slow-down of age-dependent telomere shortening is executed in human skin keratinocytes by hormesis-like-effects of trace hydrogen peroxide or by anti-oxidative effects of pro-vitamin C in common concurrently with reduction of intracellular oxidative stress. *Journal of cellular biochemistry*, *93*(3), 588-597.

YOSHIMOTO, S., Yoshida, M., Ando, H., Ichihashi, M. (2018). Establishment of Photoaging In Vitro by Repetitive UVA Irradiation: Induction of Characteristic Markers of Senescence and its Prevention by PAPLAL with Potent Catalase Activity. *Photochemistry and photobiology*, *94*(3), 438-444.

YU, B. P., Yang, R. (1996). Critical Evaluation of the Free Radical Theory of Aging: A Proposal for the Oxidative Stress Hypothesis a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *786*(1), 1-11.

YUE, Y., Zhou, H., Liu, G., Li, Y., Yan, Z., Duan, M. (2010). The advantages of a novel CoQ10 delivery system in skin photo-protection. *International journal of pharmaceutics*, *392*(1-2), 57-63.

ZHANG, S. X. (1999). An atlas of histology. *Springer Science & Business Media.* ISBN 0387949542.

ZOUBOULIS, C. C., Makrantonaki, E. (2011). Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. *Clinics in dermatology*, *29*(1), 3-14.

Internetové zdroje:

Arenbergerová, A. M. M. Maligní melanom kůže (článek pro širokou odbornou veřejnost). [online]. [cit. 2018-05-27]. Dostupné z: http://www.melanomy.cz/?touch=malignimelanom

Canadian Dermatology Association. Photoaging. [online]. [cit. 2018-06-11]. Dostupné z: https://dermatology.ca/public-patients/skin/photoaging/

Lopez-Ojeda W, Oakley AM. Anatomy, Skin (Integument) [online]. [cit. 2018-06-10]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441980/

Masarykova univerzita LF v Brně. (2011). *Histologie - melanocyty*. [online]. [cit. 2018-11-18]. Dostupné z http://www.med.muni.cz/histol/MedAtlas_2/MA_txt8-1-1-1.htm.

Parks, N. (2016). Anatomy & Physiology Chapter 6. [online]. [cit. 2018-06-11]. Dostupné z https://slideplayer.com/slide/6215827

Příručka k Cell proliferation ELISA BrdU colorimetric kit, Roche Německo, 2004 [online]. [cit. 2018-06-11] Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/Bulletin/1/11647229001bul.pdf

World Health Organization. Aging and Health [online]. [cit. 2018-09-22]. Dostupné z: http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health

World Health Organization, International Programm on Chemical Safety Biomarkers in Risk Assessment. Validity and Vlaidation. [online]. [cit. 2018-11-02]. Dostupné z: http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222

World Health Organization. Ultraviolet radiation and health [online]. [cit. 2018-12-12]. Dostupné z: http://www.who.int/uv/uv_and_health/en/