# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Fototoxický účinek UV záření BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Petra Klevcová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Ing. Alena Rajnochová Svobodová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	14.5.2010

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne:

Chtěla bych poděkovat své školitelce paní Ing. Aleně Rajnochové Svobodové, Ph.D. za trpělivost a ochotu při vedení práce. Paní doc. Jitce Vostálové děkuji za zajímavé téma, cenné připomínky a rady k práci. Poděkování patří také celému kolektivu Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP za možnost pokusy uskutečnit.

#### Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Petra Klevcová
Název práce:	Fototoxický účinek UV záření
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Biochemie
Vedoucí práce:	Ing. Alena Rajnochová Svobodová, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2010
Abstrakt:	

Teoretická část bakalářské práce se zabývá nejvýznamnějšími typy poškození DNA vyvolanými působením UVB zářením. UVB fotony iniciují přímé poškození DNA za tvorby cis, syn cyklobutanových pyrimidinových dimerů a pyrimidin-pyrimidonových (6-4) fotoproduktů a modifikaci proteinů, především interakcí s aromatickými aminokyselinami. UVB se podílí i na produkci reaktivních kyslíkových radikálů a reaktivních dusíkových radikálů které následně vyvolávají oxidační poškození biomolekul. Tato poškození se buňka snaží eliminovat pomocí reparačních mechanismů.

Cílem experimentální části práce bylo sledovat dynamiku vzniku a odstraňování poškození jaderní DNA vyvolané vlivem UVB záření a porovnat schopnost hlavních typů kožních buněk v epidermis a dermis, keratinocytů a fibroblastů, odstraňovat poškození DNA. K hodnocení byla použita alkalická varianta jednobuněční gelové elektroforézy, která umožňuje detekci poškození DNA v jednotlivých buňkách. Jako doplňující parametr bylo použito stanovení aktivity uvolněné laktátdehydrogenasy. Z výsledků vyplynulo, že fibroblasty jsou citlivější vůci poškození vlivem UVB záření než keratinocyty. Do dávky 200 mJ/cm<sup>2</sup> byl časový průběh eliminace DNA zlomů u obou typů buněk podobný. Při expozici dávce 400 mJ/cm<sup>2</sup> byl u fibroblastů po 24 hod od ozáření pozorován mírný pokles poškození DNA na rozdíl od keratinocytů. Jednobuněčná gelová elektroforéza se ukázalo jako velmi vhodná pro sledování účinků UVB, neboť již při nízkých dávkách a krátkých časových intervalech od expozice bylo možné pozorována až při vyšších dávkách UVB záření a po delších časových intervalech, což souvisí s nektrotickými procesy v buňce.

Klíčová slova: UVB, keratinocyty, fibroblasty, poškození DNA, Comet assay, laktátdehydrogenasa

Počet stran:	48
Počet příloh:	0
Jazyk:	Česky

#### **Bibliographical identification:**

Autor's first name and surname:	Petra Klevcová
Title:	Phototoxic effect of UV radiation
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Biochemistry
Supervisor:	Ing. Alena Rajnochová Svobodová, Ph.D.
The year of presentation:	2010
Abstract:	

Theoretical part of bachelor thesis deals with the most important types of DNA damage caused by exposure to UVB radiation. UVB photons initiate direct damage to DNA, forming cis, syn pyrimidine dimers and cyklobutan pyrimidine-pyrimidine (6-4) photoproducts and modification of proteins, especially interactions with aromatic amino acids. UVB radiation is also involved in the production of reactive oxygen species and reactive nitrogen radicals, which then cause oxidative damage to biomolecules. Cell tries to eliminate this damage using repair mechanisms.

The purpose of the experimental part of the thesis was to monitor the dynamics of formation and elimination of the nuclear DNA damage induced by UVB radiation and to compare the ability of the major types of skin cells in the epidermis and dermis, keratinocytes and fibroblasts, to remove the DNA damage. An alkaline version of single-cell gel electrophoresis was used for evaluation, which allows the detection of DNA damage in particular cells. Determination of activity of excluded lactate dehydrogenase was used as an additional parameter. The results showed that fibroblasts are more sensitive to damage from UVB radiation than the keratinocytes. The timing of elimination of DNA breaks was similar up to the dose of 200 mJ/cm<sup>2</sup> in both cell types. After exposure to dose of 400 mJ/cm<sup>2</sup> and after 24 hod of irradiation there was a slight decrease of DNA damage in fibroblasts in contrast to keratinocytes. Single-cell gel electrophoresis proved to be very suitable method for monitoring the UVB radiation effects, because even at low doses and short intervals after exposure, the DNA damage was observed. By contrast, increased lactate dehydrogenase activity was observed only at higher doses of UVB radiation and longer time intervals, which is related to nektrotic processes in the cell.

Keywords: UVB, keratinocyte, fibroblast, DNA damage, Comet assay, lactatedehydrogenaseNumber of pages:48Numper of appendices:0Language:Czech

# Obsah

Cíl	e bakal	ářské práce	7-
Teo	oretická	i část	8-
Ûv	od		8-
1	Slun	eční záření	8-
-	1.1	Infračervené záření	9-
-	1.2	Viditelné záření	9-
-	1.3	Ultrafialové záření	9-
	1.3.1	UVA (315-400 nm)	- 10 -
	1.3.2	UVB (280-315 nm)	- 10 -
	1.3.3	UVC (100-290 nm)	- 11 -
2	Kůže	9	- 11 -
-	2.1	Struktura kůže	- 12 -
	2.1.1	Pokožka (epidermis)	- 12 -
	2.1.2	Škára (dermis-corium)	- 13 -
	2.1.3	Podkožní vazivo (hypodermis - tela subcutanea)	- 13 -
3	DNA	٠	- 13 -
4	Pošk	ození DNA vyvolané UV zářením	- 14 -
2	4.1	Poškození vyvolané působením UVB	- 14 -
	4.1.1	Tvorba cyklobutan pyrimidinových dimerů	- 15 -
	4.1.2	Tvorba pyrimidin-pyrimidinových (6-4) fotoproduktů	- 15 -
	4.1.3	Tvorba 5-methylcytosinu	- 16 -
	4.1.4	Tvorba 8-hydroxyguanin	- 16 -
2	4.2	Poškození vyvolané působením UVA	- 17 -
5	Opra	vné mechanismy DNA	- 19 -
4	5.1	Oprava vystřižením nukleotidu	- 19 -
4	5.2	Oprava vystřižením base	- 21 -
4	5.3	Oprava jednovláknových zlomů DNA	- 23 -
4	5.4	Oprava chybného párování basí	- 23 -
4	5.5	Zástava buněčného cyklu	- 23 -
4	5.6	Apoptóza	- 24 -
6	Jedn	obuněčná gelová elektroforéza	- 24 -
6	5.1	Princip metody	- 25 -
6	5.2	Vizualizace a hodnocení poškození DNA	- 25 -
(	5.3	Alkalická jednobuněčná gelová elektroforéza	- 26 -
(	5.4	Neutrální jednobuněčná gelová elektroforéza	- 27 -
(	5.5	Použití specifických enzymů	- 28 -
Exi	perime		- 29 -
7	Mate	riál a metody.	- 29 -
	7 1	Biologický materiál	- 29 -
-	7.2	Přístroje:	- 29 -
-	7.3	Chemikálie -	- 30 -
-	74	Roztoky	- 30 -
-	75	Ostatní materiál	- 31 -
-	7.6	Pracovní postup	- 31 -
	7.6.1	Izolace a kultivace fibroblastů	- 31 -
	7.6.2	Kultivace keratinocytů	. 31 -
	7.6.2	Příprava huněk pro experimenty	. 32 -
,	, .0.3 7 7	Fototoxické působení UVB záření v kožních huňkách	. 32 -
-	78	Ozáření huněk	. 32 -
-	79	Jednobuněčná velová elektroforéza	. 32 -
	791	Vyhodnocení	. 33 -
-	7 10	Aktivita laktátdehvdrogenasy	. 34 -
8	0 Vúel	edky a diskuze	. 35 -
0	, y 51	cary a distance	55 -

Závěr	- 43 -
Použitá literatura	44 -

# Cíle bakalářské práce

Cílem teoretické části je vypracovat literární rešerši na téma:

- poškození DNA kožních buněk vyvolané slunečním UV zářením
- reparační mechanismy kožních buněk
- jednobuněčná gelová elektroforéza

Cílem experimentální části bakalářské práce je:

- sledovat dynamiku vzniku poškození DNA vyvolaného UVB zářením v keratinocytech a fibroblastech v závislosti na dávce záření
- porovnat schopnost reparace poškozené DNA v obou typech kožních buněk
- osvojit si techniku jednobuněčné gelové elektroforézy

# Teoretická část Úvod

Sluneční záření je předmětem zájmu lidí po staletí. Již staří Egypťané sledovali příznivé účinky slunečního světla na hojení poranění kůže, a proto ho začali využívat k léčebným účelům. Jeho pozitivní účinky na živý organismus byly prokázány například při léčbě tuberkulózy, kožních exémů, akné či lupénky. Sluneční terapie, odborně nazývaná helioterapie, byla velmi populární ve většině zemí až do 30. let dvacátého století (Liberman, 1991).

V posledních 40 letech se vědci začali zabývat i negativními vlivy slunečního záření na lidský organismus. V patogenezi různých onemocnění kůže včetně rakoviny je zapojena celá řada vnitřních a vnějších faktorů, z nichž akutní a chronická expozice slunečnímu záření hraje nejvýznamnější roli. Působením ultrafialového záření se v kůži tvoří vitamin D, který ovlivňuje metabolismus vápníku a fosforu.

# 1 Sluneční záření

Sluneční záření je součást elektromagnetického záření. Jeho šíření prostorem je způsobeno přenosem energie v podobě elektromagnetických vln. Je to hlavní zdroj energie nejen pro živé organismy, ale i pro většinu důležitých pochodů na Zemi a v atmosféře. Sluneční záření dopadající na zemský povrch se skládá z infračervené, viditelné a ultrafialové složky (Obr. 1) (Halliday et al., 2006).





(http://www.dnr.sc.gov/ael/personals/pjpb/lecture/lecture.html)

### 1.1 Infračervené záření

Infračervené záření (IR) zahrnuje vlnové délky 760 nm-1 mm, což odpovídá vlnovým délkám mezi nejkratšími radiovými délkami a viditelným světlem. IR tvoří 45 % slunečního záření. Podle vlnové délky se IR dělí na IRA (760-1400 nm), IRB (1400-3000 nm) a IRC (3000 nm-1 mm). IR má menší energii než světlo viditelné. IRB a IRC je pohlcováno především v epidermis, zatímco IRA proniká hluboko do dermis. IR vyvolává změny vibrací a rotací molekul, což se projevuje růstem teploty (Schroeder et al., 2008). IR může přispívat k produkci radikálů, které vznikají po reakcí s elektrony produkovanými jako sekundární produkty dýchacího řetězce. Přesný molekulární mechanismus ale zatím není známý (Zastrow et al., 2009). IR se využívá k terapeutickým účelům např. k hojení ran nebo k léčbě zánětlivých onemocnění kůže.

# 1.2 Viditelné záření

Rozsah vlnových délek viditelného záření je 400-760 nm. Viditelné záření je rostlinami využíváno při fotosyntéze a je nepostradatelné pro životní funkce organismů. Tvoří až 50 % dopadajícího slunečního záření (Halliday et al., 2006). Viditelné světlo proniká hluboko do kůže, kde je absorbováno celou řadou molekul tzv. chromoforů jako je melanin, riboflavin, hemoglobin či bilirubin. Zastrow a kol. popsali, že fotony, které jsou absorbovány chromofory, přispívají k produkci radikálů (Zastrow et al., 2009). Z tohoto hlediska může viditelné záření vyvolávat oxidační poškození biomolekul např. nukleové kyseliny a nenasycené mastné kyseliny. Exaktní mechanismus působení viditelného záření nebyl dosud objasněn. Předpokládá se ale, že může být podobný UVA záření, neboť rozhraní mezi UVA a viditelnými vlnovými délkami je formální (Mahmoud et al., 2008).

### 1.3 Ultrafialové záření

Ultrafialové záření (UV) tvoří přibližně 5 % dopadajícího slunečního světla. Dělí se na tři základní složky: krátké vlny (UVA; 315-400 nm), střední vlny (UVB; 280-315 nm) a dlouhé vlny (UVC; 100-280 nm).

#### 1.3.1 UVA (315-400 nm)

Více než 90 % UV záření emitovaného sluncem tvoří UVA záření. UVA není absorbováno ozonovou vrstvou. Intenzita UVA záření se v průběhu dne příliš nemění. Ve srovnání s UVB je UVA schopno procházet běžným okenním sklem. UVA fotony pronikají hluboko do kůže (až 1000  $\mu$ m) (Nichols et al., 2009). 80 % UVA proniká k rozhraní epidermisdermis a asi 10 % dosahuje až k podkožní vazivové vrstvě (viz kapitola 3 Kůže) (Verschooten et al., 2006).

Dle výsledků existujících studií energie UVA není dostatečná pro vyvolání přímého poškození molekul. UVA iniciuje masivní produkci reaktivních kyslíkových a dusíkový sloučenin (ROS, RNS) v důsledku interakce UVA fotonů s endogenními (i exogenními) chromofory neboli fotosenzitizéry. Kožní buňky obsahují celou řadu fotosenzitivních molekul např. base nukleových kyselin, NAD(P)H, hem, chinony, flaviny, porfyriny, karotenoidy, 7-dehydrocholesterol, eumelanin a urokanovou kyselinu. Vzniklé ROS a RNS atakují různé molekuly a způsobují jejích oxidační poškození. Výsledkem těchto interakcí je tvorba lipidových hydroperoxidů, karbonylovaných proteinů, jednoduchých zlomů DNA a modifikovaných DNA basí. Zejména oxidované base DNA pak mohou být významné při počátečním stádiu karcinogeneze. (Svobodová et al., 2006) Nedávné studie prokázaly, že UVA je schopno iniciovat rovněž produkci *cis, syn* cyklobutanových pyrimidinových dimerů (CPD), jejichž vznik byl dříve spojován pouze s UVB. (Mouret et al., 2006; Mouret et al., 2010)

UVA ovlivňuje imunitní reakce organismu. UVA se podílí na vzniku opálení kůže a Intenzivní UVA expozice vede ke vzniku erytému. Ve srovnání s UVB, vyvolává UVA pouze "okamžité tmavnutí", které se objevuje v řádech minut až hodin od expozice. Spočívá v jeho přesunu z melanocytů do keratinocytů a oxidací již vytvořeného melaninu (Routaboul et al., 1999). Opakované expozice způsobují řadu změn ve struktuře a funkci kůže, které jsou souhrnně označovány jako předčasné stárnutí kůže. UVA indukované poškození DNA je spojováno se vznikem maligního melanomu. (Trautinger, 2001)

V posledních asi 20 letech je UVA záření hojně využíváno v solárních studiích. Kromě toho je UVA využíváno v kombinaci s léčivy ke speciálním dermatologickým terapiím (fototerapiím) při léčbě psoriasi a vitiliga.

#### 1.3.2 UVB (280-315 nm)

UVB záření reprezentuje přibližně 5-10 % UV záření dopadajícího na zem. Potenciálně nejvíce nebezpečné vlnové délky 280-295 nm jsou absorbovány v atmosféře v ozonové vrstvě. Intenzita UVB je nejsilnější mezi 11. a 14. hodinou. Kromě denní doby je zastoupení UVB vs. UVA ovlivněno dalšími faktory jako je roční doba, zeměpisná šířka nebo nadmořská výška

(Young, 2006) UVB proniká do menší hloubky kůže ve srovnání s UVA. Většina UVB je absorbována v epidermis, přičemž kolem 70 % je pohlceno v rohové vrstvě. Zbylé záření působí zejména na buňky basální vrstvy. Jen minimální množství UVB (do 10 %) je schopno pronikat až do dermis (viz kapitola 2 Kůže). Kromě negativního působení na kůži má UVB škodlivé účinky i na oči (Ettler, 2004). UVB je považováno za silný karcinogen, asi 1000-krát účinnější než UVA. (Courdavault et al., 2005).

UVB vyvolává přímé poškození molekul, zejména nukleových kyselin a aromatických aminokyselin. Při expozici UVB záření s bázeni vzniká 12 DNA fotoproduktů. Mezi nejhojnější patří CPD a pyrimidin-pyrimidonové (6-4) fotoprodukty ((6-4)PP). Tyto dva typy poškození zahrnují 70-80 % a 20-30 % veškerých poškození DNA (Kim et al., 1993). Takto může UVB záření vystupovat jako agens, které iniciuje vznik i propaguje šíření nádorů. Rovněž může potencovat účinky jiných karcinogenů. UVB záření vyvolává i nepřímé poškození, neboť UVB fotony indukují zvýšenou produkci ROS a RNS (Ettler, 2004; Nichols & Katiyar, 2009).

Molekulární účinky UVB se projevují jako vznik edému, erytému, zánětlivých či alergických reakcí. UVB rovněž tlumí odezvu imunitního systému. UVB účinně stimuluje novou syntézu kožního pigmentu melaninu ve specializovaných buňkách melanocytech. Opakovaná expozice UVB záření vede i k předčasnému stárnutí kůže (Pattison, 2006). Kromě negativních účinků je UVB nezbytné pro aktivaci syntézy vitaminu D (Whiteman et al., 1999).

#### 1.3.3 UVC (100-290 nm)

UVC představuje nejtoxičtější část slunečního světla. Naštěstí vlnové délky 100-295 nm jsou kompletně pohlcovány ozonovou vrstvou uloženou ve stratosféře. Působí genotoxicky na všechny živé organismy i při velmi krátkých expozicích. Jeho vlnové délky zahrnují absorpční maximum DNA (260-265 nm). Z tohoto důvodu se používá jako účinný germicidní prostředek (Nichols, 2009).

# 2 Kůže

Lidská kůže je neustále se obnovující orgán, který pokrývá celé tělo. Kůže zaujímá u dospělého člověka plochu asi 1,6 až 1,8 m<sup>2</sup> a je považována za největší orgán. Její stavba ji umožňuje přizpůsobovat se pohybům těla. Tloušťka kůže závisí na lokalizaci, pohybuje se mezi 0,4-4 mm (Čihák, 2004).

Kůže plní řadu rozmanitých funkcí. Odděluje vnitřní prostředí organismu od vnějšího a chrání tělo před působením chemických a fyzikálních faktorů či pronikáním mikroorganismů. Spolu se slizničními vrstvami představuje nespecifickou první obrannou linii. Má rovněž

zásadní význam pro smyslové vnímání. Kůže má významný podíl na udržování homeostázy v těle. V kůži jsou obsaženy nervová zakončení pro vnímání teploty, tlaku a bolesti. Podílí se také na termoregulaci organismu, jelikož receptory pro vnímání teploty ovlivňují funkci cév a potních žláz přítomných ve struktuře kůže. Další významná funkce je vylučovací, díky které se organismus zbavuje škodlivých látek. Toto se uskutečňuje pomocí mazových a potních žláz. Díky resorpční funkci je možné přes kůži do těla vpravit látky rozpustné v tucích. Hlavní metabolickou aktivitu kůže představuje tvorba vitaminu D (Horáček et al., 1964).

#### 2.1 Struktura kůže

Kůže se skládá ze tří základních vrstev- pokožky, škáry a podkožního vaziva. Každá z těchto struktur obsahuje specifické buňky a má určitou funkci.

#### 2.1.1 Pokožka (epidermis)

Pokožka je vnější vrstva kůže, která přichází do přímého styku s okolím. Ve struktuře epidermis je možné rozeznat několik odlišných vrstev. Epidermis je tvořena převážně z rohovějících buněk dlaždicového epitelu, keratinocytů. Ve spodních vrstvách obsahuje i menší množství jiných typů buněk-melanocyty, Langerhansovy a Merklovy buňky.

Keratinocyty vznikají v mitoticky aktivní zárodečné (basální) vrstvě epidermis. kde mají charakter kmenových buněk. Jejich poškození vlivem slunečního záření má zásadní vliv na produkci nových buněk. Pokud nejsou eliminovány jejich případné DNA léze, může dojít ke vzniku basálních karcinomů nebo jiných nemelanových typů rakoviny kůže. Basální buňky rovněž produkují řadu signálních molekul jako odpověď na poškození vlivem slunečního záření odkud postupují směrem vzhůru k vrstvě rohové. Dochází k jejich postupné transformaci. Dojde ke změně struktur proteinů, odtranění jádra, snížení obsahu vody a změně tvaru až vzniknou sploštělé buňky (šupinky), které se odlupují. Tento proces trvá 15-20 dnů. Rohová vrstva je tvořena z oploštělých bezjaderných buněk, které jsou vyplněny skleroproteinem např. keratinem. Keratinocyty zárodečné a rohové vrstvy hrají zásadní roli při expozici slunečnímu záření. Buňky rohové vrstvy mají funkci obrannou, neboť absorbují značnou část UV záření, čímž snižují množství fotonů pronikajících do hlubších struktur kůže. Navíc sluneční UV záření vyvolává zvýšení proliferace buněk v basální vrstvě, což se projevuje zesílením rohové vrstvy a tedy zvýšenou schopností pohlcovat záření (Santa-Maria et al., 2010; Horáček et al., 1964).

Melanocyty tvoří asi 1-4 % buněčné populace epidermis. Tyto specializované buňky jsou zodpovědné za produkci pigmentu, melaninu. Mají výběžky, díky kterým transportují melanin do přilehlých keratinocytů. Největší výskyt melanocytů je v částech kůže, které jsou

nejvíce vystavovány slunečnímu záření (obličej, hřbet ruky). Melanin se v keratinocytech hromadí kolem jádra, kde funguje jako přirozená ochrana genetické informace buňky před slunečním zářením (Linc, 2003).

Langerhansovy buňky mají funkci u imunitních reakcích kůže, tedy při rozpoznání antigenu a jeho zpracování. Po expozici slunečnímu záření obsah těchto buněk klesá.

Merkelovy buňky slouží jako kožní mechanoreceptory. U člověka zastupují 4-6 % buněk v basální vrstvě. Vyskytují se především ve hmatových lištách (Čihák, 2004).

### 2.1.2 Škára (dermis-corium)

Škára je střední vrstva kůže. Hlavním typem buněk přítomných v dermální vrstvě jsou fibroblasty. Tyto protáhlé buňky mají výrazné drsné ednoplasmatické retikulum, protože jsou zodpovědné za syntézu všech proteinových vláken obsažených ve škáře. Tyto vlákna jsou převážně kolagenní a elastická, která jsou zodpovědná za pevnost a pružnost dermis. V této vrstvě jsou také uloženy mazové, potní a pachové žlázy, lymfatické a krevní cévy, nervy a nervová zakončení a svazky buněk hladké svaloviny (Čihák, 2004).

#### 2.1.3 Podkožní vazivo (hypodermis - tela subcutanea)

Je nejspodnější vrstva kůže, která obsahuje ve větší nebo menší míře tukové buňky, které slouží jako zásobárna energie a vitaminů rozpustných v tucích D, A, K, E. Hypodermis reguluje teplotu samotné kůže i těla. Rovněž důležitá je její mechanická funkce (Čihák, 2004).

## 3 DNA

DNA buněk je hlavně obsažena v buněčném jádře a mitochondriích. DNA je chemickým podkladem dědičnosti. Je organizována do genů, což jsou základní jednotky genetické informace.

Skládá se ze tří typů základních jednotek: sacharidu -deoxyribosy, fosfátového zbytku a z nukleových básí. Nukleové báze se rozdělují do dvou skupin; purinové báse-adenin a guanin, a pyrimidinové báse-cytosin a thymin. Pořadí jednotlivých deoxyribonukleotidů v řetězci přímo určuje primární strukturu. Monomerní jednotky DNA jsou spojeny v polymerní formu pomocí 3',5'-fosfodiesterových můstků. Dva opačně orientované deoxyribonukleotidové řetězce jsou fixovány pomocí vodíkových vazeb, které se tvoří na základě komplementarity básí. Mezi adeninem a thyminem se tvoří 2 vodíkové vazby a mezi guaninem a cytosinem se tvoří 3 vodíkové vazby. Deoxyribonukleotidový řetězce se tímto spojením formuje do pravotočivé

dvoušroubovice (Campbel & Reece, 2006). V eukaryotních buňkách je chromosomální DNA spojena s různými proteiny, čímž se vytváří složitá struktura zvaná chromatin. Toto uspořádání umožňuje DNA tvořit řadu konformací. Velkou část proteinů vázaných na DNA tvoří tzv. histony, jejichž hlavní funkcí je kondenzovat molekuly DNA za tvorby kulovitých částic zvaných nukleosomy (Murray et al., 1993).

Genetická informace uložená v nukleotidové sekvenci DNA má dvě hlavní funkce: a) je zdrojem informace pro syntézu veškerých proteinů, které jsou nezbytné pro fyziologické a morfologické vlastnosti organismu, b) zajišťuje předání informace z buňky mateřské do buňky dceřiné. K oběma funkcím DNA slouží jako matrice (templát) pro přepis (transkripci) informace do RNA a pro replikaci informace pro budoucí dceřinou buňku. Každá ze dvou dceřiných molekul DNA obsahuje jeden řetězec původní a jeden nově syntetizovaný. Toto zajišťuje, že obě molekuly DNA obsahují identickou informaci (Murray et al., 1993).

Poškození DNA je pro buňky i celý organismus velmi nebezpečné, protože může vést k mutacím a genetické nestabilitě. Nadměrná expozice slunečnímu záření zvyšuje riziko vzniku rakoviny kůže. Poškození DNA slunečním světlem často zahrnuje specifické odpovědi pro kůži např. melanogenezi, vznik erytrému nebo potlačení imunitních reakcí (Marrot et al., 2008).

# 4 Poškození DNA vyvolané UV zářením

### 4.1 Poškození vyvolané působením UVB

UVB záření primárně účinkuje v epidermální vrstvě, kde je přímo absorbováno buněčnými komponenty (DNA a proteiny). UVB proniká až k basální vrstvě keratinocytů, které jsou zodpovědné za kontinuální obnovování epidermis. Jedním z nejčastějších typů DNA lézí jsou CPD a (6-4)PP, které zabraňují správnému párování jednotlivých básí a tím dochází i ke změně genetického kódu. Taková záměna může vést k významným mutacím a eventuálně ke vzniku karcinomu, pokud není rozpoznána reparačními systémy.

Existují dva způsoby jak vysvětlit většinu mutací cytosinu na thymin v dipyrimidinových místech. První způsob zahrnuje přímou spojku, kdy se začlení adenin naproti cytosinu nebo 5-methylcytosinu v CPD. Druhý způsob zahrnuje výkonnou deaminaci 5-methylcytosinu uvnitř CPD a dříve než může být toto poškození opraveno reparačním systémem dojde k tvorbě spojky, která vede k mutacím. Tento způsob hraje důležitou roli při UVB stimulované mutagenesi v savčích buňkách (Pfeifer et al., 2005).

#### 4.1.1 Tvorba cyklobutan pyrimidinových dimerů

CPD vznikají při interakci dvou sousedních pyrimidinů na stejném řetězci DNA. Dochází k vytvoření kovalentních vazeb mezi  $C_5$ - $C_5$  a  $C_6$ - $C_6$  uhlíkem na skeletu. Tímto spojením se formuje čtyřuhlíkatý tzv. cyklobutanový kruh a vznikají CPD (Obr. 2a). Tvorba těchto dimerů vede k zániku dvojné vazby mezi  $C_5$ - $C_6$  a tím ke ztrátě aromatických vlastností původního pyrimidinového kruhu. Přesné určení distribuce CPD ukazuje, že thymin-thymin a thymin-cytosin sekvence jsou fotoreaktivnější než sekvence cytosin-cytosin. (Fremuth, 1981) Cytosin-cytosin CPD jsou sice vytvářeny v minimálním množství, ale jejich mutagenní potenciál je nejvyšší, který vede ke vzniku UV-indukovaným tandemovým mutacím cytosincytosin  $\rightarrow$  thymin-thymin. UVB indukuje vznik tří hlavních dimerických produktů v DNA v následujícím pořadí: thymin-thymin CPD > (6-4)PP > thymin-cytosin CPD (Cadet et al., 2005).



Obr. 2a. DNA léze vyvolané interakcí UVB záření s DNA básemi (Ichihashi et al., 2003).

#### 4.1.2 Tvorba pyrimidin-pyrimidinových (6-4) fotoproduktů

(6-4)PP vznikají interakcí sousedních pyrimidinů na stejném řetězci. Rozrušením dvojné vazby mezi pátým a šestým uhlíkem pyrimidinového kruhu dojde k tvorbě můstku mezi polohou C<sub>6</sub> thyminu a polohou C<sub>4</sub> druhého thyminu a ke vzniku (6-4)PP (Obr. 2b). (Fremuth, 1981) Po následném ozáření mohou (6-4)PP reverzibilně konvertovat na Dewarovy valenční isomery, které jsou sice méně mutagenní než (6-4)PP, ale přispívají k mutagenezi (Runger et al., 2008). Tato fotoisomerizace navrhuje vysvětlení, jak dochází ke zmenšení počtu (6-4)PP neenzymatickou cestou (Cadet et al., 2005).

(6-4)PP fotoprodukty mají nižší mutagenní účinek ve srovnání s CPD. Bylo zjištěno, že 90 % (6-4)PP je opraveno už po 3 hodinách od ozáření (Ichihashi et al., 2003).



Obr. 2b. DNA léze vyvolané interakcí UVB záření s DNA básemi (Ichihashi et al., 2003).

#### 4.1.3 Tvorba 5-methylcytosinu

Dinukleotidy obsahující cytosin jsou častým cílem mutací způsobené UV zářením. 5-Methylcytosin (5-MeCyt) (Obr. 3) má v porovnání s cytosinem vyšší schopnost pohltit delší vlnové délky. 5-MeCyt patří ke kvantitativně minoritním bázím. Jeho deaminace je 2-3 krát rychlejší než nemodifikovaného cytosinu (Gates, 2009). 5-MeCyt báse jsou výrazně zastoupeny v cytosin-guanin dinukleodidech. Tyto sekvence jsou častým místem mutací v genech spojených s lidskými geneticky podmíněnými chorobami. Dva mechanismy podmiňují jejich náchylnost podléhat mutacím: a) spontánní deaminace 5-meCyt, kdy vzniká thymin a b) obvyklé působení karcinogenů v této pozici. U lidských keratinocytů je 5-meCyt zastoupen v sekvenci 5'- PyCG genu p53. Tato sekvence je častým místem tranzice cytosin za thymin v karcinomech kůže navozených slunečním zářením. U genu p53 je známo 8 často mutovaných oblastí (Pfeifer et al., 2005).



5-methylcytosin

Obr. 3. Chemická struktura 5-methylcytosinu.

#### 4.1.4 Tvorba 8-hydroxyguanin

Některé studie poukazují na to, že UVB záření rovněž indukuje tvorbu 8hydroxyguaninu (8-OHdG; Obr. 4) v DNA kožních buněk *in vitro* a *in vivo*. Mechanismus vzniku 8-oxoG působením UVB není stále přesně znám (Cadet et al., 2005). Pravděpodobně vzniká nepřímo interakcí s ROS. Nedávno byl navrženo, že k tvorbě dochází vlivem oxidace •OH radikálem. Toto vyplývá z faktu, že po expozici UVB záření se vytvoří jednoduché zlomy na DNA, které vznikly díky reakci •OH radikálu na 2-deoxyribose v pozicích  $C_3$ ,  $C_4$  a  $C_5$ . V izolované i buněčné DNA byl sledován vznik 8-OHdG po působení singletového kyslíku (Cadet et al., 2005).



8-hydroxyguanin

Obr. 4. Chemická struktura 8-hydroxyguaninu (Evans et al., 2004).

### 4.2 Poškození vyvolané působením UVA

UVA záření proniká hluboko do kůže, kde dosahuje dermální vrstvy a v menší míře dokonce i podkoží (hypodermis). UVA záření nezpůsobuje přímé poškození DNA, jelikož jeho fotony nejsou dostatečně energeticky bohaté. K nepřímému poškození dochází prostřednictvím ROS a RNS. Tyto velmi nestabilní a reaktivní sloučeniny sekundárně poškozují DNA tvorbou jednoduchých zlomů, DNA-protein spárováním a tvorbou modifikovaných basí (Marrot & Meinuer, 2008).

V důsledku nízkého ionizačního potenciálu jsou gauninové báse nejcitlivější k oxidačnímu poškození ROS/RNS, dále následuje adenin a pyrimidinové báse (thymin a cytosin), které jsou atakovány přibližně stejnou měrou. Singletový kyslík reaguje s guaninem za vzniku 8-OHdG, který je považován charakteristický marker oxidativního stresu. Vzniká po špatném spárování guaninu, při transverzi na thymin, s vedlejším adeninem po dávce UVA záření (Ichihashi et al., 2003). Interakcí DNA s ROS vznikají i další produkty poškození (Obr. 5), ale v mnohem menším množství než 8-OHdG.

V posledních letech byla rovněž prokázána schopnost UVA indukovat tvorbu CPD *in vitro* a *in vivo*. Mechanismus vzniku je ale odlišný od působení UVB záření. Distribuce CPD naznačuje, že dochází k fotosenzitizační reakci a následnému přenosu energie z chromoforu v tripletovém stavu. Množství vytvořených CPD vlivem UVA je mnohonásobně menší ve srovnání s UVB zářením (Mouret et al., 2006).



Obr. 5. Další produkty oxidace DNA basí (Evans et al., 2004).

## 5 Opravné mechanismy DNA

Během vývoje si buňky vyvinuly různé reparační mechanismy, které neustále kontrolují DNA a odstraňují případná poškození.

### 5.1 Oprava vystřižením nukleotidu

Vystřižení modifikovaného nukleotidu (nukleotid excision repair; NER) je hlavním obranným mechanismem při odstraňování poškození DNA indukované UVB zářením v savčích buňkách. Tento opravný systém eliminuje převážně CPD a (6-4)PP v DNA. O komplexnosti procesu svědčí i to, že se ho účastní nejméně 25 proteinů. NER zahrnuje dvě cesty odstranění poškozeného nukleotidu. Léze, které vznikly v aktivně přepisovaných oblastech genetické informace jsou odstraňovány velmi rychlým mechanismem nazývaným transkripčně vázaná oprava (transcription-coupled repair; TRC). Poškození ostatních částí dvoušroubovice DNA je odstraňováno pomalejší cestou globální genomové opravy (global genome repair; GGR) (Balajee & Bohr, 2000). I když se hlavní proteiny, které se obou opravných drah účastní, liší, poškození genomu je odstraňováno obdobnými kroky.

Lze rozeznat základní kroky opravy:

- rozpoznání poškození DNA
- rozpojení DNA vlákna na obou stranách léze
- odstranění DNA fragmentu s poškozením
- syntéza vystřiženého úseku DNA
- spojení vláken

V případě GGR je DNA poškození rozpoznáno proteinovým komplexm XPC-hHR23, který označí konce mutovaného úseku DNA. U TCR je poškození indikováno blokádou RNA polymerasy. Následně se vytváří multiproteinový komplex tvořený transkripčním faktorem TFIIH, proteinovým komplexem XPA-RPA a endonukleasami (XPG a XPF-ERCC1). Následným působením helikas a endonukleas dochází k vyříznutí poškozeného úseku DNA a poté DNA polymerasa syntetizuje chybějící úsek DNA, přičemž nepoškozené vlákno slouží jako templát (Mullenders & Berneburg, 2001). Mechanismus vystřižení nukleotidu je znázorněn na Obr. 6.

Rychlost jakou je oprava prováděna závisí nejen na lokalizaci léze, ale i na jejím typu. (6-4)PP jsou zcela eliminovány během 6 hod, zatímco odstranění CPD trvá podstatně déle (nejméně 24 hod). Toto souvisí s množstvím obou typů lézí, neboť výskyt CPD je asi 5-10 větší než (6-4)PP. (Costa et al., 2003) Bylo také zjištěno, že rychlost opravy souvisí s typem kožních buněk. D'Errico a kol. porovnávali opravu DNA poškození v keratinocytech a fibroblastech ozářených UVB. Zatímco rychlost odstranění (6-4)PP byla v obou typech buněk stejná, eliminování CPD bylo signifikantně rychlejší v keratinocytech. Tento efekt pravděpodobně souvisí s rozdílnou schopností keratinocytů a fibroblastů aktivovat protein p53, který se významně ovlivňuje reparační proces (D'Errico et al., 2003).



Obr. 6. Mechanismus opravy pomocí NER v savčích buňkách (Ichihashi et al., 2003).

### 5.2 Oprava vystřižením base

Jak vyplývá z názvu, oprava vystřižením base (base excision repair; BER) slouží k odstraňování oxidačně modifikovaných basí. Reparace je iniciována DNA glykosylasou. mají schopnost rozeznat oxidované/redukované, alkylované (nejčastěji Glykosylasy methylované) a deaminované base. Glykosylasy nejprve hydrolyzují glykosidickou vazbu vazbu následně rozštěpí fosfodiesterovou poškozené base, za vzniku tzv. apurinového/apyrimidinového (AP) místa. Cukerné residuum je přemístěno AP endonukleasou (APE 1) za vzniku mezery, která je vyplněna DNA polymerasou Da následně spojena DNA ligasou (Aburatani et al., 1997; Mistry & Herbert, 2003).

V savčích buňkách se rozlišují dva typy BER opravy dle přesného mechanismu a zúčastněných proteinů (enzymů). Jeden typ se nazývá "short-patch" a využívá DNA pol  $\beta$ , APE 1 a DNA ligasy III-XRCC1(X-ray repair cross-complementingprotein 1). Alternativního mechanismu "long-patch" se účastní glykosylasa, APE I, replikační faktor C, proliferující jaderný antigen (PCNA), DNA polymerasa  $\delta$  nebo  $\varepsilon$ , flap-endonukleasa 1 (FEN1) a DNA ligasa I. Použití jednoho z mechanismů závisí na typu tkáně (Sancar et al., 2004). Mechanismus působení jednotlivých způsobů BER je schematicky vyobrazen na Obr. 7.



Obr. 7. Mechanismy opravy pomocí BER (Fortini et. al., 2007).

#### 5.3 Oprava jednovláknových zlomů DNA

Jednovláknové zlomy se vytváří buď přímo poškozením cukerné složky DNA působením exogenního či endogenního činitele nebo nepřímo v důsledku BER mechanismu. Oprava jednovláknových zlomů DNA (single strand breaks repair) má mnoho společných kroků a enzymů společných s BER mechanismem. Stěžejní roli v obou způsobech opravy hraje protein XRCC1, který interaguje s dalšími klíčovými proteiny. Sám o sobě nemá katalytickou funkci, ale stabilizuje a modifikuje aktivitu ostatních proteinů (Ridley et al., 2009).

### 5.4 Oprava chybného párování basí

Odstranění chybně spárovaných basí (mismatch repair) je kritické pro udržování genetické stability. Mechanismus zahrnuje řadu proteinů s širokým spektrem enzymatických funkcí. Tyto proteiny rozpoznají a opraví chybně inkorporované base během replikace DNA. Studie ukazují, že enzymy této reparační dráhy rovněž přispívají k ochraně před oxidačním poškozením vyvolaným UV zářením (Seifert et al., 2008; Pitsikas et al., 2007; Shin-Darlak et al., 2005).

#### 5.5 Zástava buněčného cyklu

Vzhledem k tomu, že uvedené reparační systémy nejsou neomylné a nemusí odstranit veškeré DNA poškození, jsou buňky vybaveny dalším ochranným mechanismem. Jde o kontrolu DNA během buněčného cyklu, která je zajišťována kontrolními body buněčného cyklu. Pokud je zjištěno poškození, buněčný cyklus je dočasně zastaven, dokud není poškození odstraněno. (Zhou & Elledge, 2000).

Prodloužení buněčného cyklu v G1 fázi je typické pro buňky poškozené UVB zářením. Tato zástava je vyvolána akumulací aktivovaného proteinu p53. Současně dochází ke změně exprese regulačních proteinů buněčného cyklu; exprese cyklinů a cyklin-dependentních kinas je zvýšena a naopak množství inhibitorů cyklin-dependentních kinas je sníženo. (Matsumura et al., 2004)

### 5.6 Apoptóza

Pokud je vzniklé poškození DNA velmi rozsáhlé nebo není opravitelné, buňka je z organismu odstraněna řízeným, striktně kontrolovaným procesem zvaným apoptóza. Tento pochod představuje další obranný mechanismus buněk, neboť zabraňuje množení buněk s poškozenou genetickou informací, které by mohly vést ke vzniku karcinomu. Bohužel, ale právě geny řídící apoptózu bývají častým cílem mutací a důsledkem tohoto dochází k přenosu mutací na další generace buněk.

První známky apoptózy v buňce vystavené UV záření se objevují už po 30 minutách od expozice. Dochází k agregaci chromatinu, jádro má pyknotický tvar nebo může předčasně vymizet. Buňka je svraštělá díky vypuzení vody. Na cytoplazmatické membráně vznikají puchýřky a později se oddělují jako apoptotická tělíska.

Morfologické změny jsou dány aktivací kaspas, které zajišťují efektní rozpad buňky. Tyto proteasy jsou aktivovány dvěma způsoby. Vnější cesta je zahájena navázíním Fas ligandu na membránový "Fas receptor smrti" s následnou aktivací signalizačního komplexu, který navozuje buněčnou smrt. Uvedený komplex dává vzniknout aktivním kaspasam -8, -10, které následně aktivují efektorové prokaspasy -3, -6, -7.

Vnitřní cesta apoptózy je aktivována poškozením vnější mitochondriální membrány s následným uvolněním mitochondriálních proteinů. Jedním z nich je cytochrom c, který v cytosolu spouští tvorbu apoptosomu - molekulární základny složené z Apaf-1 (Apoptosis proteases-activating faktor 1), ATP, cytochromu c. Uvedené děje ústí v aktivaci kaspasy-9, která aktivuje efektorové prokaspasy (-3, -6, -7). Vnitřní cesta apoptózy je regulována pro- (Bax, bak, Bad, Bid a Bim) a anti-apoptotickými (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>) geny z rodiny Bcl-2 (Frank et al., 2006; Laethem et al., 2005; Yarosh, 2005).

## 6 Jednobuněčná gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza jednotlivých buněk neboli kometová analýza, známá pod anglickým názvem Comet assay, byla poprvé publikována O. Östlingem a K. J. Johansnem v roce 1984 (Östling & Johansn, 1984), ale její vznik sahá až do 70. let 20. století. Od té doby byla mnohokrát modifikována a zdokonalena. Jedná se o mikroelektroforetickou techniku pro přímou vizualizaci poškození DNA v jednotlivých buňkách. Metoda se používá ve dvou základních modifikacích – alkalická a neutrální. Alkalická modifikace slouží ke sledování jednořetězcových zlomů DNA, zatímco neutrální umožňuje detekci dvouřetězcových zlomů. Ve spojení s použitím enzymů dovoluje detekovat jednotlivé typy DNA lézí, jako jsou CPD, oxidované base (zejména 8-OHdG) a alkylační poškození. Techniku lze využít pro monitorování poškození DNA *in vitro* i *in vivo* (Faibairn et al., 1995; Collins et al., 1997; Klaude et al., 1996). Výhodami kometové analýzy je jednoduchost, rychlost, citlivost, nutnost malého množství vzorku, nenáročnost na vybavení a nízká cena.

#### 6.1 Princip metody

Vzhledem k možnému poškození DNA buněk světlem, je doporučováno provádět všechny kroky až po elektroforézu za červeného osvětlení. Při typickém uspořádání je na mikroskopická sklíčka nanesena tenká vrstva agarosy s vysokou teplotou tuhnutí (kolem 50 °C). Po zatuhnutí je na základní vrstvu nanesena směs agarosy (0,5-1%) s nízkou teplotou tuhnutí (35-45 °C) s buňkami, což snižuje riziko poškození buněk vlivem teploty. Po zakotvení buněk v agarose, jsou sklíčka vložena do lyzačního roztoku. Složení roztoku se může lišit, ale převážně obsahuje soli a různé detergenty. Působením tohoto roztoku dojde k rozrušení membrány, odstranění cytoplasmy a většiny jaderných proteinů. Samotná DNA ale stále zůstává ve formě dvoušroubovice. U alkalické modifikace následuje inkubace v silně alkalickém roztoku (Angelis et al., 1999). Poté se provádí elektroforéza buď v alkalickém (pH 12-13) nebo neutrálním (pH 7-8) pufru. Záporný náboj DNA při elektroforéze způsobuje, že fragmentů vzniklé poškozením DNA migrují k anodě. Migrace fragmentů způsobí vytvoření charakteristické uspořádání tzv. "ocas komety". Čím větší je počet zlomů, tím větší množství DNA putuje do "ocasu". Maximální délka je hlavně definována podmínkami, při kterých probíhá elektroforéza, nikoli velikostí fragmentů. Po elektroforetické separaci jsou skla neutralizována (u alkalické formy), opláchnuta v deionizované vodě a usušena. (Faibairn et al., 1995).

#### 6.2 Vizualizace a hodnocení poškození DNA

Poškození DNA je analyzováno a vyhodnoceno nejčastěji s využitím fluorescenčních barviv a mikroskopu. DNA je nejčastěji vizualizovaná pomocí ethidium bromidu. Toto interkalační barvivo se efektivněji váže na dvouřetězcovou DNA než na jednořetězcovou DNA. Dalším často používaným barvivem je 4,6-diamino-2-fenylindol (DAPI), které se váže do velkého zářezu na struktuře dvoušroubovice DNA a fluorescenční aktivita je hlavně ovlivněna dvoušroubovicovou strukturou. Rovněž může být použita akridinová oranž, propidium iodid či Sybr Green® (Collins, 2004).

K samotnému vyhodnocování komet se používají dva základní způsoby: obrazová analýza pomocí speciálního počítačového softwaru nebo vizuální hodnocení.

Existuje řada počítačových programů, které komety zpracovávají. K hodnocení používají mnoho parametrů, ale nejpoužívanější jsou délka ocasu a relativní zastoupení DNA v hlavě/ocasu. Délka ocasu komet se provádí při relativně nízké úrovní poškození. Intenzita

ocasu roste se zvyšující se dávkou poškození, ale délka nikoliv. Relativní intenzita fluorescence ocasu je nejužitečnějším parametrem, který dodává lineární závislost s frekvencí zlomů a umožňuje rozlišit stupeň poškození v nejširší škále od 0 do 100 % DNA v ocase. Toto dává velice přesné informace o tom, jak kometa vypadá. Je doporučováno sledovat 50 buněk na sklíčku. Nevýhodou tohoto způsobu hodnocení je vysoká cena programů a časová náročnost analýzy.

Stupeň poškození DNA je možné určit i bez použití sofistikovaných programů. Lidské oko je schopno velice rychle rozeznat stupeň poškození u jednotlivých buněk podle jejich vzhledu. Vizuální hodnocení představuje rozdělení komet do několika kategorií poškození. Obvykle se používá pět tříd poškození (viz Obr. 8) od 0 (bez ocasu) do 4 (veškerá DNA v ocasu), které poskytují dostatečné rozdělení. Většinou se hodnotí 100 buněk na sklíčku. Každá buňka je zařazena do jedné ze skupin 0 až 4 a poté je spočítáno celkové poškození DNA. Teoreticky může celkové poškození nabývat hodnot mezi 0 až 400 arbitrárních jednotek. Vizuální počítání je rychlé a jednoduché, ale může být subjektivně ovlivněno. Proto je potřeba, aby poškození klasifikoval zkušený hodnotitel. (Collins, 2004)



Obr. 8. Komety reprezentující třídy poškození 0-4 pro vizuální hodnocení (Collins, 2004).

### 6.3 Alkalická jednobuněčná gelová elektroforéza

Alkalická forma jednobuněčné elektroforézy produkuje lépe definované komety. Jsou jednodušeji analyzovány jak vizuálně (zařazení komet do jednotlivých kategorií podle stupně

poškození), tak přes počítačovou analýzu (procenta DNA obsažených v "ocasu" komety) (Angelis et al., 1999).

Tato forma zahrnuje postupy, kde se pracuje v silně alkalickém pH. Před elektroforézou jsou buňky lyzovány v alkalickém elektroforetickém roztoku s nízkým obsahem solí s detergentem o pH > 12,3. V alkalickém prostředí dochází k narušení nekovalentních vazebných interakcí mezi bázemi a následnému rozvolnění obou vláken dvoušroubovice. Navíc v oblastech AP míst, která jsou citlivá vůči působení vysokého pH, dochází ke vzniku dalších zlomů v DNA řetězcích.

Následuje elektroforéza při pH vyšším než 13. Požadované napětí a doba elektroforézy souvisí s úrovní poškození DNA a koncentrací solí v elektroforetickém roztoku. Signifikantní migrace vláken DNA, které vedou k formaci komet, je možná již při velmi nízkém napětí (0,5-5 V/cm) a při krátkém čase probíhající elektroforézy (5-30 minut). Větších komet může být dosaženo při použití většího napětí nebo prodloužení doby separace. Senzitivita může být zvýšena při prodloužení inkubace v alkalickém roztoku před samotnou elektroforézou. Běžně je doporučena doba 40 minut, jelikož umožňuje dostatečné rozvolnění DNA a zviditelnění zlomů. Zvýšení teploty při inkubaci v lyzačním a elektroforetickém roztoku a elektroforéze zvyšuje citlivost metody, ale také možnost tvorby komet v kontrolních buňkách, což je nežádoucí. Maximální rozlišovací schopnost má metoda do 15 °C. Takováto kombinace teploty a 40 minut v elektroforetickém roztoku dává maximální citlivost, ale je na hranici akceptovatelných výsledků kontrolních vzorků (Rojas et al., 1999; Collins et al., 2008).

### 6.4 Neutrální jednobuněčná gelová elektroforéza

Neutrální jednobuněčná elektroforéza má schopnost detekovat i malé množství DNA zlomů. Na rozdíl od alkalického prostředí, při inkubaci v neutrálních podmínkách nedochází k rozvolnění dvoušroubovice na jednotlivá vlákna a přítomnost jednovláknových zlomů se neprojeví. Podle Collinse však k detekci jednovláknových zlomů není nutný účinek alkalického pH a projevuje se přítomnost obou typů zlomů (Collins, 2004).

Pro detekci pouze dvouřetězcových zlomů bez interference jednořetězcových bylo nutné protokol dále modifikovat tak, aby jaderná matrix byla co nejvíce narušena. Olive a kol. v roce 1991 představili upravenou techniku, založenou na lyzování buněk v agarose rozšířenou o inkubaci s proteinasou K při 50 °C(Olive et al., 1991).

## 6.5 Použití specifických enzymů

Jednobuněčná gelová elektroforéza samotná neumožňuje rozpoznat konkrétní typy poškození DNA. Ke zvýšení přesnosti a citlivosti byla technika rozšířena o použití specifických enzymů, které rozpoznávají poškození ve struktuře DNA a vytvářejí další zlomy, které zvýší intenzitu ocasu komety. Nejpoužívanějšími enzymy je endonukleasa III (detekuje oxidované pyrimidiny), formamidopyrimidin-DNA-glykosylasa (detekuje oxidované puriny, zejména 8-oxoG), T4 endonukleasa V (detekuje CPD) a AlkA glykosylasa (detekuje alkylací poškozené báze) (Collins, 2004).

# Experimentální část

# 7 Materiál a metody

## 7.1 Biologický materiál

Linie lidských imortalizovaných keratinocytů (HaCaT) byla zakoupena od firmy CLS (Německo).

Vzorky kožních tkání pro izolaci lidských kožních fibroblastů byly získány z Oddělení plastické a estetické chirurgie, Fakultní nemocnice v Olomouci. Odběr se uskutečnil při chirurgických zákrocích se souhlasem pacienta. Odběr a zpracování tkání bylo prováděno s povolením etické komise v souladu s českou legislativou.

# 7.2 Přístroje:

Váhy AX105 DeltaRange (Mettler Toledo, Greifensee, Švýcarsko)

pH metr inoLab pH Level 1 s kombinovanou elektrodou Sentix 41(WTW, Weilheim, Německo)

Chlazená centrifuga Micro 22R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Německo)

Termomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg, Německo)

Inverzní fluorescenční mikroskop Olympus IX 70 S8F (Olympus Optical, Japonsko)

Fotometr pro měření absorbance v 96-jamkových deskách *Sunrise Remote* (Tecan, Salzburg, Rakousko)

Horizontální vana pro elektroforesu Sub Cell® Model 192 (Bio-Rad Laboratories, USA)

Zdroj pro elektroforesu PowerPac 200 (Bio-Rad Laboratories, USA)

Zařízení pro přípravu deionizované vody *Ultrapur* (Watrex, ČR)

Kamera Camedia Olympus (Olympus Optical, Japonsko)

Biohazard box CA/RE(S) (Clean Air, Holandsko)

UVB-metr (Dr. Hönle UV technology, Německo)

Solární simulátor SOL-500 (Dr. Hönle UV technology, Německo)

Mikroskop Olympus CK2-TR (Olympus Optical, Japonsko)

### 7.3 Chemikálie

Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM), inaktivované fetální telecí sérum, roztok penicilinu-streptomycynu a 0,25% roztok trypsinu-EDTA byly zakoupeny od firmy Invitrogen/Gibco (USA). Stemline<sup>TM</sup> médium pro keratinocyty II, extrakt z hovězí hypofýzy, epidermální růstový faktor, insulin, hydrokortison, transferin, epinefrin, agarosa typ I a typ VII, ethidium bromid, sodná sůl pyruvátu, NADH a všechny ostatní chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (USA).

### 7.4 Roztoky

**Kultivační médium pro kožní explantáty:** Stemline<sup>TM</sup> médium pro keratinocyty II, extrakt z hovězí hypofýzy (0,4 %), epidermální růstový faktor (0,125 ng.m l<sup>-1</sup>), insulin (5  $\Box$ g.ml<sup>-1</sup>), hydrokortison (0,33  $\Box$ g.ml<sup>-1</sup>), transferin (10  $\Box$ g.ml<sup>-1</sup>), epinefrin (0,39  $\Box$ g.ml<sup>-1</sup>)

Kultivační médium pro HaCaT a fibroblasty: DMEM, penicilin (100 U.ml<sup>-1</sup>), streptomycin (100 mg.l<sup>-1</sup>), fetální telecí sérum (10 %, v/v)

**Experimentální médium:** DMEM, penicilin (100 U.ml<sup>-1</sup>), streptomycin (100 mg.l<sup>-1</sup>), L-glutamin (2 mmol.l<sup>-1</sup>)

**10x fosfátový pufr (PBS):** NaCl  $(0,137 \text{ mol.l}^{-1})$ , KCl  $(0,00268 \text{ mol.l}^{-1})$ , Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  $(0,00896 \text{ mol.l}^{-1})$ , KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  $(0,00147 \text{ mol.l}^{-1})$ ; pH 7,4-7,5; pro experimenty byl zásobní roztok 10krát zředěn

**PBS-EDTA:** EDTA (0,05 %; m/v) v PBS

**LDH pufr:** Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,05 mol.l<sup>-1</sup>), pH 7,5; pyruvát sodný (0,00122 mol.l<sup>-1</sup>)

**Reakční směs pro stanovení aktivity LDH:** do LDH pufru byl těsně před stanovením přidán NADH (0,0004 mol.l<sup>-1</sup>)

**Lyzační roztok:** NaCl (2,5 mol.l<sup>-1</sup>), EDTA (100 mmol.l<sup>-1</sup>), Tris (10 mmol.l<sup>-1</sup>), pH 10; před použitím přidán triton X-100 (1 % v/v)

Neutralizační pufr: Tris (400 mmol.l<sup>-1</sup>), pH 7,5

**Roztok pro elektroforesu:** NaOH (300 mmol.l<sup>-1</sup>), EDTA (1 mmol.l<sup>-1</sup>)

Barvící roztok: ethidium bromid (2% m/v)

### 7.5 Ostatní materiál

Podložní sklíčka, krycí sklíčka, sterilní Petriho misky o ploše 9,4 cm<sup>2</sup>, špičky, kultivační láhve, centrifugační zkumavky, mikrozkumavky

### 7.6 Pracovní postup

#### 7.6.1 Izolace a kultivace fibroblastů

Po promytí kožní tkáně ve sterilním roztoku PBS a byla tkáň rozřezána na kousky o velikosti ~ 1 cm<sup>2</sup> a přenesena na Petriho misky se 7 ml kultivačního média pro kožní explantáty. Petriho miska byla vložena do inkubátoru nasyceného vodními parami při 37 °C a v atmosféře 5 % CO<sub>2</sub>. Každých 48-72 hod byla prováděna kontrola růstu buněk a výměna média. Pokrytí plochy Petriho misky buňkami trvalo přibližně 3-4 týdny. Po dosažení monovrstvy byly fibroblasty opláchnuty sterilním PBS (5 ml) a uvolněny inkubací 0,25% roztokem trypsinu s EDTA (0,5 ml; 2-3 min; 37 °C). Poté bylo přidáno 5 ml kultivačního média pro HaCaT a fibroblasty a buňky byly centrifugovány (10 min, 1300 rpm, pokojová teplota). Pelet byl resuspendován v 20 ml kultivačního média pro HaCaT a fibroblasty a buňky byly přeneseny do 75 cm<sup>2</sup> kultivační láhve. Po dosažení monovrstvy byly buňky stejným postupem uvolněny a použity do experimentů.

#### 7.6.2 Kultivace keratinocytů

Kryoprezervované buňky byly vyjmuty z hlubokomrazícího boxu a ponechány 1 min při pokojové teplotě a poté byly sterilně přeneseny do 25 cm<sup>2</sup> láhve s 10 ml kultivačního média. Buňky byly uchovány v inkubátoru nasyceném vodními parami při 37 °C a v atmosféře 5 % CO<sub>2</sub>, médium bylo měněno každých 48-72 h. Po dosažení monovrstvy byly buňky inkubovány v roztoku PBS-EDTA (5 min) a uvolněny inkubací s 0,25% roztokem trypsinu s EDTA (0,5 ml; 7-10 min; 37 °C). Poté bylo přidáno 5 ml kultivačního média pro HaCaT a fibroblasty a byla provedena centrifugace (10 min, 1300 rpm, pokojová teplota). Následně byl buněčný pelet resuspendován v 10 ml kultivačního média pro HaCaT a fibroblasty a použit do pokusů. Buňky byly v experimentech používány po 6. pasáži od rozmražení.

#### 7.6.3 Příprava buněk pro experimenty

Koncentrace buněk byla stanovena na základě barvení trypanovou modří. Buňky byly naředěny příslušným kultivačním médiem na požadovanou koncentraci a vysety na Petrino misky (1.10<sup>5</sup> buněk/cm<sup>2</sup>). Po dosažení 95 % monovrstvy (fibroblasty - 24 hod; HaCaT - 48 hod) byly buňky použity pro experimenty.

#### 7.7 Fototoxické působení UVB záření v kožních buňkách

Hlavním cílem práce bylo sledovat dynamiku vzniku a odstranění poškození DNA kožních buněk vyvolané UVB zářením. K tomuto účelu byla použita jednobuněčná gelová elektroforéza, která umožňuje detekovat zlomy DNA. Jako doplňující parametr buněčného poškození byla sledována aktivita laktátdehydrogenasy (LDH), která je při poškození buněčné membrány uvolněna do kultivačního média.

### 7.8 Ozáření buněk

Před započetím experimentu byla mikroskopicky zkontrolována kvalita buněk. Poté bylo odstraněno příslušné kultivační médium, buňky byly opláchnuty sterilním PBS a poté bylo aplikováno čisté PBS. Buňky byly ozářeny pomocí solárního simulátoru SOL 500 vybaveného filtrem, který propouští UVB záření v rozsahu 295-315 nm. Keratinocyty byly vystaveny působení dávek 100-400 mJ/cm<sup>2</sup>. U fibroblastů byla předpokládána větší citlivost k UVB, proto bylo rozmezí rozšířeno (50-400 mJ/cm<sup>2</sup>). Během ozařování byly Petriho misky s buňkami chlazeny, aby bylo zabráněno nadměrnému zahřívání buněk. Kontrolní buňky byly po dobu ozařování (1-5 min) umístěny v inkubátoru.

### 7.9 Jednobuněčná gelová elektroforéza

Podložní sklíčka byla očištěna roztokem etanolu a po uschnutí byla potažena základní vrstvou agarosy (1%), rozpuštěné v deionizované vodě. Po zatuhnutí agarosy byla sklíčka důkladně usušena (60 °C; 30 min). Takto připravená sklíčka byla uchovávána v suchu nebo byla ihned použita.

Na podložní sklíčko se základní vrstvou agarosy bylo naneseno 85 μl agarosy typu I (vysoká teplota tuhnutí; 1% v PBS), která byla ihned přikryta krycím sklíčkem a umístěna na chlazenou desku. Následně byl připraven roztok agarosy typu VII s nízkou teplotou tuhnutí (1%

v PBS), která byla rozpipetována na po 85  $\mu$ l do mikrozkumavek a vložena do termomixeru vytemperovaného na 37 °C.

Po uplynutí určitého časového intervalu od UVB ozáření (2; 4; 6; 8 a 24 hod) bylo z kultivační misky odebráno kultivační médium, buňky byly opláchnuty PBS a uvolněny z povrchu Petriho misky 0,25% roztokem trypsinu-EDTA (150 μl). Uvolněné buňky byly vyizolovány centrifugací (1300 ot./min; 10 min; 4 °C). Po centrifugaci byly buňky rozsuspendovány v čistém PBS. Z této suspenze bylo odebráno 20 μl (přibližně 10 000 buněk) a smícháno s agarosou typu VII (85 μl; 37°C). Poté bylo 85 μl této směsi naneseno na podložní sklíčko v místě mikrogelu agarosy typu I, ihned přikryto krycím sklíčkem a umístěno na chlazenou desku.

Krycí sklíčka byla po zatuhnutí vrchní vrstvy agarosy s buňkami odstraněna. Preparáty s mikrogely byly vloženy do kyvety s vychlazeným lyzačním roztokem a lyzovány (tma; 4 °C; 1 hod) Sklíčka byla následně umístěna do čerstvého vychlazeného (4°C) pufru pro elektroforézu (tma; 40 min; 4 °C). Po alkalickém rozleptání byla provedena elektroforetická separace DNA (20 min; 20 V; 4 °C). Po skončení elektroforézy byla sklíčka inkubována v neutralizačním roztoku 3 x 5 min a volně usušena.

#### 7.9.1 Vyhodnocení

Sklíčka byla analyzována a vyhodnocena s využití fluorescenčnímu mikroskopu. Pro zviditelnění DNA buněk bylo použito interkalační fluorescenční barvivo – ethidium bromid. Jednotlivé buňky byly zařazeny to příslušné třídy poškození DNA podle škály poškození DNA (viz Obr.8). Poškození bylo hodnoceno u 100 jader/sklíčko. Pro každé sklíčko bylo spočítáno celkové poškození, které se pohybovalo v rozmezí od 0 – 400 arbitárních jednotek. Ke kvantifikaci byl použit následující vztah (Li Y et al., 2004):

Celkové poškození = 
$$\frac{(N_0 \cdot 0 + N_1 \cdot 1 + N_2 \cdot 2 + N_3 \cdot 3 + N_4 \cdot 4)}{N_0 + N_1 + N_2 + N_3 + N_4} \cdot 100$$

N<sub>0</sub>, N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, a N<sub>4</sub> ... množství buněk v jednotlivých skupinách od 0 do 4

## 7.10 Aktivita laktátdehydrogenasy

LDH (EC 1.1.1.27) je cytoplazmatický enzym a jeho zvýšená aktivita v médiu se používá jako indikátor buněčného poškození. Metoda je založena na redukci pyruvátu na laktát katalyzované LDH. Úbytek NADH, který je nezbytný pro průběh reakce, je monitorován při 340 nm. (Maines et al., 1998)

K 50 µl média bylo přidáno 150 µl reakční směsi a ihned po promíchání byl měřen pokles absorbance po dobu 3 min. Relativní aktivita LDH (%) byla stanovena podle následujícího vztahu:

Aktivita LDH (%) = 
$$100 \cdot \left(\frac{A_V}{A_K}\right)$$

 $A_V$ ... změna absorbance vzorku za min (ozářené buňky)

A<sub>K</sub>... změna absorbance kontroly za min (neozářené buňky)

# 8 Výsledky a diskuze

Analýza poškození jaderné DNA keratinocytů s využitím jednobuněčné gelové elektroforézy ukazuje, že k poškození DNA dochází již při expozici nízkým dávkám UVB záření. U keratinocytů vystavených působení dávky 100 mJ/cm<sup>2</sup> (Obr. 9.) lze pozorovat maximální poškození v prvních dvou časových intervalech (2 a 4 hod) od ozáření. V následujících intervalech (6, 8 a 24 hod) došlo k postupnému poklesu celkového poškození. Tvorba DNA zlomů vlivem dávky 200 mJ/cm<sup>2</sup> (Obr. 10.) měla podobnou časovou závislost, ale celkové poškození DNA bylo po 2 a 4 hod o 100 % a 50 % vyšší. Dynamika poškození po ozáření dávkou 400 mJ/cm<sup>2</sup> (Obr. 11.) vykazovala jiný průběh než byl sledován u nižších dávek. Množství jednovláknových zlomů postupně vzrůstalo ve všech časových intervalech a celkové poškození DNA bylo výrazně vyšší ve srovnání s nižšími dávkami (100 a 200 mJ/cm<sup>2</sup>). Pozorovaný nárůst zlomů DNA může souviset i s reparačnímy procesy v buňce. Při opravách DNA vystřižením báze (BER) dochází k tvorbě AP míst, která jsou citlivá vůči působení vysokého pH. Použitá alkalická forma jednobuněčné elektroforézy může vyvolat tvorbu dalších zlomů v řetězcích a tím intenzivnější tvorbu komet. (Collins et al., 2008)



**Obr. 9.** Poškození DNA keratinocytů po UVB ozáření dávkou  $100 \text{ mJ/cm}^2$ . Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka ze tří nezávislých experimentů.



**Obr. 10.** Poškození DNA keratinocytů po UVB ozáření dávkou 200 mJ/cm<sup>2</sup>. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka ze tří nezávislých experimentů.



**Obr. 11.** Poškození DNA keratinocytů po UVB ozáření dávkou 400 mJ/cm<sup>2</sup>. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka ze tří nezávislých experimentů.

V Tab.1-4 je znázorněno zastoupení keratinocytů v jednotlivých třídách poškození DNA (0-4). U dávek 100 a 200 mJ/cm<sup>2</sup> je patrné, že ve třídách s největším stupněm poškození (3 a 4) se keratinocyty vyskytovaly v největší míře v prvních dvou časových intervalech (2 a 4 hod) a poté došlo k jejich poklesu/vymizení a přetrvávalo pouze mírné poškození (třída 1 a 2). Naproti tomu u nejvyšší použité dávky 400 mJ/cm<sup>2</sup> počet jader ve 4. třídě narůstal a v ostatních skupinách (zejména 0 a 1) klesal s časem. Nárůst zlomů (400 mJ/cm<sup>2</sup>) může souviset s produkcí ROS/RNS a následným oxidačním poškozením DNA. Poškození jaderné DNA bylo již takového rozsahu, že reparační systémy keratinocytů nebyly schopny tyto změny opravit.

**Tabulka 1**. Zastoupení keratinocytů v jednotlivých třídách poškození DNA po 2 hod od UVB ozáření.

Dávka		Celkové				
[mJ/cm <sup>2</sup> ]	0	1	2	3	4	poškození
0	95	2	1	0	0	9
100	65	16	5	9	5	73
200	2	44	34	9	11	181
400	3	26	30	29	12	221

Data představují reprezentativní výsledky ze tří nezávislých pokusů.

**Tabulka 2**. Zastoupení keratinocytů v jednotlivých třídách poškození DNA po 4 hod od UVB ozáření.

Dávka		Celkové				
[mJ/cm <sup>2</sup> ]	0	1	2	3	4	poškození
0	88	8	3	0	0	17
100	9	70	11	2	0	131
200	2	47	27	6	18	190
400	2	28	43	8	20	216

Data představují reprezentativní výsledky ze tří nezávislých pokusů.

**Tabulka 3**. Zastoupení keratinocytů v jednotlivých třídách poškození DNA po 8 hod od UVB ozáření.

Dávka		Celkové				
[mJ/cm <sup>2</sup> ]	0	1	2	3	4	poškození
0	83	17	1	0	0	18
100	44	51	1	1	2	66
200	17	36	25	4	19	172
400	3	9	21	12	57	311

Data představují reprezentativní výsledky ze tří nezávislých pokusů.

Dávka		Celkové				
[mJ/cm <sup>2</sup> ]	0	1	2	3	4	poškození
0	93	5	1	1	1	10
100	61	32	5	2	0	47
200	37	48	14	1	1	82
400	2	9	20	22	47	304

**Tabulka 4**. Zastoupení keratinocytů v jednotlivých třídách poškození DNA po 24 hod od UVB ozáření.

Data představují reprezentativní výsledky ze tří nezávislých pokusů.

Při použití lidských fibroblastů bylo zjištěno, že již velmi malá dávka 50 mJ/cm<sup>2</sup> (Obr. 12.) je schopna vyvolat tvorbu jednovláknových zlomů jaderné DNA. Převažovalo však mírné poškození DNA odpovídající zařazení do třídy 1 a 2 (Tab. 5-8). Díky malému množství DNA lézí, bylo poškození rychle eliminováno reparačními systémy. Účinek dávky 100 mJ/cm<sup>2</sup> (Obr. 13.) na fibroblasty byl srovnatelný s vlivem na keratinocyty a DNA defekty byly buňkami rovněž rychle odstraňovány. Ozáření fibroblastů dávkami 200 a 400 mJ/cm<sup>2</sup> (Obr. 14. a 15.) vyvolalo výrazné poškození jaderné DNA. Množství jednovláknových zlomů narůstalo s časem (2-8 hod). Dávky 200 a 400 mJ/cm<sup>2</sup> vyvolaly u fibroblastů (Obr. 12. a 13.) větší celkové poškození DNA ve srovnání s keratinocyty (Obr. 10. a 11.). Po 24 hod od ozáření dávkou 400 mJ/cm<sup>2</sup> byl u fibroblastů pozorován mírný pokles poškození DNA na rozdíl od keratinocytů. Tento pokles by mohl souviset s tím, že fibroblasty s rozsáhlým nebo neopravitelným poškozením DNA (třída 4) byly eliminovány (apoptózou nebo nekrózou). Při mikroskopické kontrole buněk byl pozorován zvýšeným výskyt zbytků buněk (drť) v kultivačních jamkách.



**Obr. 12**. Poškození DNA fibroblastů po UVB ozáření dávkou 50 mJ/cm<sup>2</sup>. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka ze tří nezávislých experimentů.



**Obr. 13**. Poškození DNA fibroblastů po UVB ozáření dávkou  $100 \text{ mJ/cm}^2$ . Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka ze tří nezávislých experimentů.



**Obr. 14**. Poškození DNA fibroblastů po UVB ozáření dávkou 200 mJ/cm<sup>2</sup>. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka ze tří nezávislých experimentů.



**Obr. 15**. Poškození DNA keratinocytů po UVB ozáření dávkou 400 mJ/cm<sup>2</sup>. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka ze tří nezávislých experimentů.

Zastoupení fibroblastů v jednotlivých třídách poškození DNA (Tab. 5-8) demonstruje, že fibroblasty jsou více citlivé vůči působení UVB záření než keratinocyty, což se projevilo vyšší produkcí jednovláknových zlomů. 2 hod po ozáření dávkou 200 a 400 mJ/cm<sup>2</sup> bylo 50 a 100 % fibroblastů zastoupeno ve třídách poškození 3 a 4 (u keratinocytů jen 20 a 30 %). V dalších časových intervalech došlo k nárůstu počtu jader ve třídě 3 (pro dávku 200 mJ/cm<sup>2</sup>) a třídě 4 (pro dávku 400 mJ/cm<sup>2</sup>).

Dávka		Celkové				
[mJ/cm <sup>2</sup> ]	0	1	2	3	4	poškození
0	94	1	3	1	0	11
50	45	42	13	0	0	69
100	10	39	31	19	0	161
200	3	7	41	47	2	238
400	0	0	0	97	3	303

**Tabulka 5**. Zastoupení fibroblastů v jednotlivých třídách poškození DNA po 2 hod od UVB ozáření.

Data představují reprezentativní výsledky ze tří nezávislých pokusů.

Dávka		Celkové				
[mJ/cm <sup>2</sup> ]	0	1	2	3	4	poškození
0	94	2	3	1	1	14
50	74	17	8	0	1	39
100	18	57	21	3	1	113
200	1	4	12	71	12	189
400	0	0	0	67	33	333

**Tabulka 6**. Zastoupení fibroblastů v jednotlivých třídách poškození DNA po 4 hod od UVB ozáření.

Data představují reprezentativní výsledky ze tří nezávislých pokusů.

**Tabulka 7**. Zastoupení fibroblastů v jednotlivých třídách poškození DNA po 8 hod od UVB ozáření.

[mJ/cm²] 0 1 2 3 4 poškoz   0 92 0 4 2 1 19	Celkové
0 92 0 4 2 1 19	zení
	)
50 67 25 5 1 0 42	
100 58 20 18 3 0 68	5
200 0 0 1 48 51 350	C
400 0 0 0 17 83 383	3

Data představují reprezentativní výsledky ze tří nezávislých pokusů.

**Tabulka 8**. Zastoupení fibroblastů v jednotlivých třídách poškození DNA po 24 hod od UVB ozáření.

Dávka	Třída poškození					Celkové
[mJ/cm <sup>2</sup> ]	0	1	2	3	4	poškození
0	95	1	2	2	0	11
50	89	5	4	2	0	19
100	94	5	1	0	0	7
200	37	38	23	2	0	90
400	0	9	5	76	22	289

Data představují reprezentativní výsledky ze tří nezávislých pokusů.

Vedle sledování poškození DNA vlivem UVB záření byla stanovena aktivita LDH v médiu. K uvolnění LDH z buněk dochází při poškození buněčné membrány. Poškození buněčné membrány u obou typů buněk, tedy zvýšení aktivity LDH v médiu, bylo patrné až po delší době od ozáření. V případě keratinocytů bylo výrazné zvýšení aktivity tohoto enzymu zaznamenáno po 6 hodinách od ozáření u dávky 200 a 400 mJ/cm<sup>2</sup> (190 a 250 % oproti neozářeným buňkám), které dále narůstalo s časem (po 24 hod na 250 a 430 % oproti neozářeným buňkám). Nejnižší dávka záření vyvolala pouze nevýrazné změny v aktivitě LDH ve všech časových intervalech.



Obr. 16. Aktivita LDH uvolněná působením UVB z keratinocytů.

U lidských fibroblastů byla zvýšená aktivita LDH pozorována také až po 6 hodinách, ale jen u nejvyšší dávky (175 % oproti neozářeným buňkám). Po 8 hodinách bylo zvýšení aktivity LDH patrné i u dávky 200 mJ/cm<sup>2</sup> a po 24 h u všech dávek. Ve srovnání s keratinocyty byl u fibroblastů ozářených nejvyšší dávkou 400 mJ/cm<sup>2</sup> nárůst aktivity LDH výrazně vyšší (640 a 1540 % oproti neozářeným buňkám po 8 a 24 hod). K uvolnění LDH dochází až při poškození membrány, což je spojeno se závažnými ireversibilními změnami v buňce.



Obr. 17. Aktivita LDH uvolněná působením UVB z fibroblastů.

# Závěr

Sledování fototoxického působení UVB záření na lidské keratinocyty a fibroblasty s využitím jednobuněčné gelové elektroforézy a stanovení aktivity LDH prokázalo že:

- kožní fibroblasty jsou citlivější vůči poškození vlivem UVB záření než keratinocyty. Tato skutečnost pravděpodobně souvisí s uložením obou typů buněk v kůži. Keratinocyty se nachází v horní vrstvě kůže a jsou více vystaveny působení UVB záření
- dynamika vzniku a eliminace poškození DNA byla u obou typů buněk podobná do dávky 200 mJ/cm<sup>2</sup>. U nejvyšší dávky 400 mJ/cm<sup>2</sup> byl u keratinocytů zaznamenán vzrůstají trend poškození DNA ve všech časových intervalech. U fibroblastů došlo po 24 hodinách k poklesu DNA poškození, který pravděpodobně souvisí s eliminací buněk s vážně poškozenou DNA
- jednobuněčná gelová elektroforéza je mnohem citlivější pro sledování účinků UVB záření než stanovení aktivity LDH. Pomocí jednobuněčné gelové elektroforézy bylo možné zachytit poškození při nižších dávkách a v kratších časových intervalech od ozáření. Oproti tomu výrazné zvýšení aktivity LDH bylo pozorováno při expozici vyšším UVB dávkám a po delších časových intervalech, což odpovídalo výraznému poškozením buněk
- dynamika vzniku poškození DNA a buněčné membrány (uvolnění LDH) potvrzuje, že UVB záření vyvolává primárně přímé poškození molekul (DNA) a sekundárně produkci reaktivních sloučenin, které způsobují poškození membrány a jiných buněčných komponent.

# Použitá literatura

Aburatani H., Hippo Y., Ishida T., Takashima R., Matsuba C., Kodama T., Takao M., Yasui A., Yamamoto K., Asano M. (1997) Cloning and characterization of mammalian 8-hydroxy-guanine-specific DNA glycosylase / apurinic, apyrimidinic lyase, a functional mutM homologue. *Cancer Res.* **57**, 2151-2156.

Angelis K. J., Dušinská M., Collins A. R. (1999) Single cell gel electrophoresis: Detection of DNA damage at different levels of sensitivity. *Electrophoresis* **20**, 2133-2138.

Balajee, A. S., Bohr V. A. (2000) Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair. *Gene* **250**, 15-30.

Cadet J., Sageb E., Doukia T. (2005) Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA *Mutat. Res.* **571**, 3-17.

Cambel N. A., Reece J. B. (2006) Biologie-struktura a funkce makromolekul, pp. 62-85, Computer press, Brno, Česká republika.

Collins A. R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair. Mol. Biotechnol. 26, 249-251.

Collins A. R., Dobson V. L., Dušinská M., Kennedy G., Štětina R. (1997) The comet assay: what can it really tell us? *Mutat. Res.* **375**, 183-193.

Collins A. R., Oscoz1 A. A., Brunborg G., Gaivão I., Giovannelli L., Kruszewski M., Smith C. C., Štětina R. (2008) The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23, 143-151.

Costa M. R., Chiganeas V., Galhardo R. S., Calvarho H., Menck C. F. (2003) The euraryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochemie* **85**, 1083-1099.

Courdavault S., Baudouin C., Charveron M., Canguilhem B., Favier A., Cadet J., Douki T. (2005) Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations. *DNA Repair* **4**, 836-844.

Čihák R. Anatomie 3, pp. 559-571, Grada publishing, Praha, Česká republika.

D'Errico M., Teson M., Calcagnile A., De Santis P. L., Nikaido O., Botta E., Zambruno G., Stefanini M., Dogliotti E. (2003) Apoptosis and efficient repair of DNA damage protect human keratinocytes against UVB. *Cell Death Differ*. **10**, 754-756.

Ettler K. (2004) Fotoprotekce kůže. Ochrana kůže před účinky ultrafialového záření. Triton, pp. 10-61, Praha, Česká republika.

Evans M. D., Dizdaroglu M., Cooke M. S. (2004) Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat. Res.* 567, 1-61.

Fairbairn D. W., Olive P. L., O'Neill K. L. (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* **339**, 37-59.

Frank S., Menezes S., De Coster C. L., Oster M., Dubertret L., Coulomb B. (2006) Infrared radiation induces the p53 signaling pathway: role in infrared prevention of ultraviolet B toxicity. *Exp. Dermatol.* **15**, 130–137.

Fremuth F. (1981) Účinky záření a chemických látek na buňky a organismus, pp. 40-62, Státní pedagogické nakladatelství, Praha, Česká republika.

Gates K. S. (2009) An overviev od chemical processes that damage cellular DNA: spontaneous hydrolysis, alkylation and reaction with radicals. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 1747-1760.

Horáček J., Rovenský J., Záhejský J. (1964) Vybrané kapitoly z dermatologie, pp.12-22, Státní pedagogické nakladatelství, Praha, Česká republika.

Halliday D., Resnick R., Walker J. (2001) Fyzika, Vutium, Brno, Česká republika

Ichihashi M., Ueda M., Budiyanto A., Bito T., Oka M., Fukunaga M., Tsuru K., Horikawa T. (2003) UV-induced skin damage. *Toxicology* **189**, 21-39.

Kim S., Malhotra K., Colin A., Taylor J. S., Sancar A. (1994) Characterization of (6-4) photoproduct DNA photolyase. *J. Biol. Chem.* **11**, 8535-8540.

Klaude M., Eriksson S., Nygren J., Ahnstrijm G. (1996) The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat. Res.* **363**, 89-96.

Laethem A., Claerhout S, Garmyn M, Agostinis P. (2005) The sunburn cell: regulation of death and survival of the keratinocyte. *J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 1547-1553.

Li Y., Yao J., Chang M., Cuendet M., Bolton J. L. (2004) Altered apoptotic response in MCF 10A cells treated with the equine estrogen metabolite, 4-hydroxyequilenin. *Toxicol. Lett.* **54**, 225-233.

Liberman J. (2006) Světlo lék budoucnosti, pp. 161-176, Blue step, Praha, Česká republika.

Linc R. (2003) Anantomie a fyziologie člověka - Vylučování, Nový přehled biologie, pp. 562-564, Scientia, spol. s.r.o., Praha.

Mahmoud B. H., Hexsel C. L., Hamzavi I. H. (2008) Effects of visible light on the skin. Photochem. Photobiol. 84, 450-462.

Maines M. D, Costa L. G, Reed D. J, Sassa S, Sipes I. G. (1998) Current protocols in toxicology. John Wiley & Sons, New York, USA.

Marrot L., Meunier J. R. (2008) Skin DNA photodamage and its biological consequences. J. Am. Acad. Dermatol. 58, 139-148.

Matsumura Y., Ananthaswamy H. N. (2004) Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **195**, 298-308.

Mistry P., Herbert K. E. (2003) Modulation of hOGG1 DNA repair enzyme in human cultured cells in response to pro-oxidant and antioxidant challenge. *Free Radic. Biol. Med.* **35**, 397-405.

Mouret S., Baudouin C., Charveron M., Favier A., Cadet J., Douki T. (2006) Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **37**, 13765-13770.

Mouret S., Philippe C., Gracia-Chantegrel J., Banyasz A., Karpati S., Markovitsi D., Douki T. (2010) UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers in DNA: a direct photochemical mechanism? *Org. Biomol. Chem.* **7**, 1706-1711.

Mullenders L. H., Berneburg M. (2001) Photoimmunology and nucleotide excision repair: impact of transcription coupled and global genome excision repair. J. *Photochem. Photobiol. B* **2**/**3**, 97-100.

Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W. (2002) Struktura a funkce nukleových kyselin. Harperova biochemie pp 395-405. H&H Jihlava, Česká republika.

Nichols J. A., Katiyar S. K. (2010) Skin photoprotection by natural polyphenols: antiinflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch. Dermatol. Res.* **302**, 71-83.

Olive P. L., Wlodek D., Banath J. P. (1991) DNA double-stran breaks measured in individual cells subjected to gel-electrophoresis. *Cancer Res.* **51**, 4671-4676.

Östling, O., Johanson K.J. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual cells. Biochem. *Biophys. Res. Commun.* **123**, 291-298.

Pattison D. I, Davies M. J. (2006) Actions of ultraviolet light on cellular structures. *EXS* 96, 131-57.

Pfeifer G. P., You1 Y. H., Besaratinia A. (2005) Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat. Res.* 57,119–31

Pitsikas P., Lee D., Rainbow A. J. (2007) Reduced host cell reactivation of oxidative DNA damage in human cells deficient in the mismatch repair gene hMSH2. *Mutagenesis* **22**, 235-243.

Ridley A. J., Whiteside J. R., McMillan T. J., Allinson S. L. (2009) Cellular and sub-cellular responses to UVA in relation to carcinogenesis. *Int. J. Radiat. Biol.* **85**, 177-195.

Rojas E., Lopez M. C., Valverde M. (1999) Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **722**, 225-254.

Routaboul C., Denis A., Vinche A. (1999) Immediate pigment darkening: description, kinetic and biological function. *Eur. J. Dermatol.* **9**, 95-99.

Runger T. M., Kappes U. P. (2008) Mechanisms of mutation formation with long-wave ultraviolet light (UVA). *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **24**, 2-10.

Sancar A., Lindsey-Boltz L. A., Unsal-Kacmaz K., Linn S. (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 39-85.

Santa-María C., Revilla E., Miramontes E., Bautista J., García-Martínez A., Romero E., Carballo M., Parrado J. (2010) Protection against free radicals (UVB irradiation) of a water-soluble enzymatic extract from rice bran. Study using human keratinocyte monolayer and reconstructed human epidermis. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 83-88.

Seifert, M., Scherer S.J., Edelmann W., Böhm M., Meineke V., Löbrich M., Tilgen W., Reichrath J. (2008) The DNA-mismatch repair enzyme hMSH2 modulates UV-B-induced cell cycle arrest and apoptosis in melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 203-213.

Shin-Darlak, C. Y., Skinner A. M., Turker M. S. (2005) A role for Pms2 in the prevention of tandem CC  $\rightarrow$  TT substitutions induced by ultraviolet radiation and oxidative stress. *DNA Repair (Amst).* **4**, 51-57.

Schroeder P., Calles C., Benesova T., Macaluso F., Krutmann J. (2010) Photoprotection beyond ultraviolet radiation – effective sun protection has to include protection against infrared a radiation-induced skin damage. *Skin Pharmacol. Physiol.* **23**, 15-17.

Svobodová A., Walterová D., Vostálová J. (2006) Ultraviolet light induced alteration to the skin. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub. **150**, 25-38.

Trautinger F. (2001) Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin agening. Clin. *Exp. Dermatol.* **26**, 573-577.

Verschooten L. S., Claerhout S., Van Laethem A., Agostinis P., Garmyn M. (2006) New strategies of photoprotection. *Photochem. Photobiol.* **82**, 1016-1023.

Whiteman, D. C., Parsons P. G., Green A. C. (1999) Determinants of melanocyte density in adult human skin. Arch. Dermatol. Res. 291, 511-516.

Yarosh D. B, Pena A. V., Nay S. L., Canning M. T., Brown D. A. (2005) Calcineurin inhibitors decrease DNA repair and apoptosis in human eratinocytes following ultraviolet B irradiation. *J. Invest. Dermatol.* **125**,1020-1025.

Young A. R. (2006) Acute effects of UVR on human eyes and skin. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **92**, 80-85.

Zastrow L., Groth N., Klein F., Kockott D., Lademann J., Renneberg R., Ferrero L. (2009) The missing link - light-induced (280-1,600 nm) free radical formation in human skin. *Skin Pharmacol. Physiol.* **22**, 31-44.

Zhou, B. B., Elledge J. S. (2000) The DNA damage response: Putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**, 433-439.

# Seznam použitých zkratek

5-meCyt	5-Methylcytosin
6-4 PP	Pyrimidin-pyrimidonové (6-4) fotoprodukty
8-OHdG	8-Hydroxydeoxyguanosin
AP	Apurinové/apyrimidinové místo
Apaf-1	Apoptosis proteases-activating faktor 1
APE I	AP endonukleasa 1
BER	Oprava vystřižením báze (base excision repair)
CPD	Cyklobutanpyrimidinové dimery
DAPI	4,6-diamino-2-fenylindol
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
FEN1	Flapendonukleasa 1
GGR	Global genome repair
HaCaT	Imortilizovaná linie keratinocytů
IR	Infračervené záření
IRA	A složka infračerveného záření
IRB	B složka infračerveného záření
IRC	C složka infračerveného záření
LDH	Láktátdehydrogenasa
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NER	Oprava vystřižením nukleotidu (nukleotid excision repair)
PCNA	Proliferující jaderný antigen
Pol β	Polymerasa β
PyCG	Pyrimidin - cytosin - guanin sekvence
RNA	Ribonukleová kyselina
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SSBR	Oprava jednovláknových zlomů DNA (single strand breaks repair)
TFIIH	Transkripční faktor
TCR	Transcription-coupled repair
UV	Ultrafialové záření
UVA	A složka ultrafialového záření
UVB	B složka ultrafialového záření
UVC	C složka ultrafialového záření
XRCC1	X-ray repair cross-complementingprotein 1