

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vliv UV záření na buněčné kultury



Wypracovala: Nela Chalupníková

Studijní obor: Biofyzika

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Roman Kubínek, CSc.

Olomouc 2020

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Nela Chalupníková
Název práce:	Vliv UV záření na buněčné kultury
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra biofyziky, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Pracoviště odborného konzultanta:	Ústav lékařské biofyziky, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Roman Kubínek, CSc.
Odborný konzultant:	MUDr. Mgr. Robert Bajgar, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2020
Abstrakt:	<p>UVA a UVB záření jsou jediné složky z celého UV spektra dopadající na zemský povrch a v lidském organismu mohou způsobovat řadu akutních či chronických onemocnění. UVA záření je charakteristické svou nízkou energií a relativně dlouhými vlnovými délkami pronikající až do hlubších vrstev kůže, kde způsobují masivní produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), jež mohou atakovat ostatní buněčné molekuly. Naopak UVB fotony o větší energii a kratších vlnových délkách, nejen způsobují masivní produkci těchto reaktivních forem kyslíku, ale mohou i iniciovat vznik nádorů. Dlouhodobá expozice slunečnímu záření vyvolává v organismu řadu změn, jež jsou ovlivněny individuálními faktory. Tento proces nazýváme fotostárnutí neboli předčasné stárnutí, které nastává po překročení kapacity antioxidantních systémů vedoucích k oxidačnímu stresu. Cílem této bakalářské práce bylo (i) pomocí literární rešerše definovat pojmy UVA a UVB záření. (ii) Studium působení UV záření na lidské keratinocyty HaCaT pomocí</p>

fluorescenčních značek DCF, Singlet Oxygen Sensor Green a Amplex Red, které hodnotí produkci ROS. MitoTracker Orange pro hodnocení změn mitochondriálního membránového potenciálu a MTT test ke stanovení buněčné viability. (iii) Porovnání účinků vlivu UVA a UVB záření u použitých metod. Naše výsledky ověřily téměř všechny předpoklady fluorescenčních sond až na výjimku fluorescenční značky MitoTracker Orange. S přibývajícím časem expozice dochází ke vzrůstající produkci ROS, jež byla výrazně větší v případě UVB záření, podobně jako vliv na samotnou viabilitu keratinocytů.

Klíčová slova:

UVA záření, UVB záření, keratinocyty, Reaktivní formy kyslíku, předčasné stárnutí kůže, senescence, kůže

Počet stran:

53

Počet příloh:

0

Jazyk:

Český

Bibliographical identification

Author's first name and Surname:	Nela Chalupníková
Title of thesis:	Effect of UV radiation on tissue cultures
Type of thesis:	Bachelor thesis
Department:	Department of Biophysics, Faculty of Natural Science, Palacký University, Olomouc
Department of specialist tutor:	Department of Medical biophysics, Faculty of medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc
Supervisor:	doc. RNDr. Roman Kubínek, CSc.
Specialist tutor:	MUDr. Mgr. Robert Bajgar, Ph.D.
The year of presentation:	2020
Abstract:	<p>UVA and UVB radiation are the only components from the entire UV spectrum falling on the Earth's surface and they can cause a number of acute or chronic diseases in the human body. UVA radiation is characterized by its low energy and comparatively long wavelengths penetrating into the deeper layers of the skin, where they cause massive production of reactive forms of oxygen (ROS) that can attack other cellular molecules. Conversely, UVB photons with higher energy and shorter wavelengths not only cause massive production of these reactive forms of oxygen, but can also initiate tumour formation. Long-term exposure to sunlight in the body produces a number of changes that are influenced by individual factors. We call this process photoaging, or premature aging, which occurs after overcapacity of antioxidant systems leading to oxidative stress. The aim of this bachelor thesis was (i) to define the terms UVA and UVB radiation through a literature review. (ii) Study</p>

of UV radiation exposure to human keratinocytes HaCaT using DCF fluorescent labels, Singlet Oxygen Sensor Green, Amplex Red, which evaluates the production of ROS. MitoTracker Orange to evaluate changes in mitochondrial membrane potential and MTT assay to determine cell viability. (iii) Comparison of the effects of UVA and UVB radiation from the used methods. Our results verified almost all fluorescent probe assumptions with the exception of the fluorescent MitoTracker Orange label. With increasing exposure time, there is an increasing production of ROS, which was significantly greater in the case of UVB radiation, similar to the effect on the viability of keratinocytes themselves.

Keywords:	UVA and UVB radiation, Photoaging, Reactive oxygen species, oxidative stress, skin, senescence
Number of pages:	53
Number of appendices:	0
Language:	Czech

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala doc. RNDr. Romanovi Kubínkovi za odborné vedení práce a MUDr. Mgr. Robertovi Bajgarovi, Ph.D. za ochotu, trpělivost a čas, který mi věnoval při práci v laboratoři. Nelze opomenout poděkování kolektivu na Ústavě lékařské biofyziky za vytvoření přátelské atmosféry a v neposlední řadě děkuji Samuelovi Tomkovi, který mě nejen během vypracovávání mé práce, ale i po celou dobu studia podporoval i v těch nejtěžších chvílích.

OBSAH

1.	ÚVOD	1
2.	TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1	Kůže.....	2
2.1.1	Pokožka (<i>epidermis</i>).....	2
2.1.1.1	Buňky pokožky (<i>epidermis</i>)	2
2.1.2	Škára (<i>dermis – corium</i>).....	4
2.1.2.1	Nervová čidla škóry.....	5
2.1.2.2	Nervová zakončení pokožky a škóry.....	5
2.1.3	Podkožní vazivo (<i>Hypodermis</i>).....	6
3.1	Elektromagnetické spektrum záření	7
3.2	UV záření.....	8
3.2.1	UVA záření	8
3.2.2	UVB záření.....	9
3.2.3	UVC záření.....	10
3.3	Molekulární podstata působení UV fotonů	11
3.3.1	Nepřímý mechanismus biologického působení UV fotonů typu I a typu II	11
3.4	ROS a jejich biologické působení	12
3.5	Antioxidační systémy	13
3.6	Reparační mechanismy.....	14
3.6.1	Poškození lipidů a proteinů	14
3.6.2	Reparační mechanismus DNA	14
3.6.2.1	Oprava vystřížením nukleotidu	15
3.6.2.2	Oprava jednovláknových zlomů DNA	15
3.6.3	Buněčná smrt.....	15
3.6.4	Buněčné přežití a proliferace.....	17
3.7	Stárnutí kůže	17
3.7.1	Chronologické stárnutí kůže.....	17
3.7.2	Předčasné stárnutí kůže – fotostárnutí.....	19
3.7.2.1	Mechanismus předčasného stárnutí.....	19
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
4.1	Přístrojové vybavení	21
4.2	Použitý biologický materiál:.....	21
4.3	Použité materiály a pomůcky	21

4.4	Použité chemikálie a roztoky:.....	22
4.5	Použité zásobní a pracovní roztoky	22
4.5.1	Roztoky pro kultivaci HaCaT buněk.....	22
4.5.2	Roztoky pro fluorescenční značku DCF	22
4.5.3	Roztoky pro stanovení viability pomocí testu MTT	23
4.5.4	Roztoky pro fluorescenční značku SOSG	23
4.5.5	Roztoky pro fluorescenční značku MitoTracker Orange	23
4.5.6	Roztoky pro fluorescenční značku Amplex Red.....	23
4.6	Použité metody a pracovní postupy:.....	24
4.6.1	Kultivace a pasážování buněk	24
4.6.2	Měření spekter UV zdrojů.....	24
4.6.3	Ozařování buněk	24
4.6.4	Pozorování viability buněk po dobu 9 dnů.....	25
4.6.5	Stanovení produkce peroxidu vodíku.....	27
4.6.6	Stanovení produkce ROS v buňkách.....	27
4.6.7	Stanovení produkce singletového kyslíku v buňkách	28
4.6.8	Stanovení změn mitochondriálního membránového potenciálu	28
5.	VÝSLEDKY:.....	29
5.1	Měření spektra UV zdrojů	29
5.1.1	Spektrum UVA zdroje.....	29
5.1.2	Spektrum UVB zdroje	30
5.2	Pozorování viability buněk po dobu 9 dnů.....	32
5.3	Detekce produkce peroxidu vodíku	35
5.4	Stanovení produkce ROS v buňkách	37
5.5	Stanovení produkce singletového kyslíku v buňkách.....	39
5.6	Stanovení změn mitochondriálního membránového potenciálu	40
6.	DISKUZE:	42
6.1	Pozorování viability buněk po dobu 9 dnů.....	43
6.2	Detekce reaktivních forem kyslíku pomocí fluorescenčních značek	44
6.3	Srovnání expozice UVA a UVB záření a jejich následky	47
7.	ZÁVĚR	49
8.	POUŽITÁ LITERATURA	51

SEZNAM ZKRATEK

$^1\text{O}_2$	Singletový kyslík
6-4PP	(6-4) -pyrimidin-pyrimidinové fotoprodukty
Akt	Kinasa B
AMPK	5'-adenosinmonofosfát kinasa
AR	Amplex Red (N-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin)
ATP	Adenosintrifosfát
Bad	Protein-přidružený agonista buněčné smrti
Bax	Apoptický člen rodiny proteinů Bcl-2
Bcl-2	Genová rodina bcl proteinů
CPD	Syn-cyklobutan-pyrimidinový dimer
CYP1A1	Izoforma cytochromu
CYP1B1	Izoforma cytochromu
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DCF	2', 7' – dichlorfluorescinu diacetát
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteron sulfát
EGFR	Receptor epidermálního růstového faktoru
GPX	Glutathionperoxidasa
GSH	Glutathion
GSR	Glutathionreduktasa
GST	Glutathion-S-transferaza
HaCaT	Lidské keratinocyty
HClO	Kyselina chlorná
H ₂ O ₂	Peroxid vodíku
IČ	Infračervené záření
KAT	Katalasa
mTOR	Threoninová kinasa inhibovaná rapamycinem
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol – 2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid

MTS	Tetrazoliová sloučenina
NAD(P)H	Redukovaný nikotinamidadeninukleotid (fosfát)
NQO-1	NAD(P)H chinonoxidoreduktasa-1
O ₃	Ozon
O ₂ •-	Superoxid
•OH	Hydroxylový radikál
•OH ₂	Hydroperoxyl
p38	Mitogenem aktivovaná proteinová kinasa
P450	Skupina cytochromu
p53	Nádorový supresorový gen
PI3K	Protein fofatidylinositol-3-kinasa
RO•	Alkoxy
ROO•	Peroxy
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RSF	Resorufin
S ₀	Singletní stav
S ₁	První excitovaný singletní stav
SOD	Superoxiddismutasa
UV	Ultrafialové záření
UVA	A složka ultrafialového záření
UVB	B složka ultrafialového záření
UVC	C složka ultrafialového záření
VIS	Viditelné záření
WST-1	Tetrazoliová sloučenina
XTT	Tetrazoliová sloučenina

CÍL PRÁCE

1. Studium působení UV záření na lidský organismus především se zaměřením na oblast UVA a UVB v působnosti na buněčné kultury či tkáňové modely kůže.
2. Zhodnocení současného stavu znalostí v uvedené problematice a návrh metodiky experimentálního měření a vyhodnocení naměřených dat.
3. Souhrn vybraných morfologických a funkčních změn buněčných kultur vystavených UV záření. Provedení statistického vyhodnocení experimentálního měření a diskuze získaných výsledků.

1. ÚVOD

Dlouhodobá expozice ultrafialovým zářením (UV) vyvolává v organismu řadu chronických změn či akutních onemocnění, jejichž intenzita a závažnost je dána individuálními faktory jedince. Sluneční záření se pokládá za vnější činitel a největší zátěž lidského organismu však klade na nejrozsáhlejší orgán těla, a to kůži. Mnoho lidí bere tento důležitý orgán za samozřejmost a neuvědomuje si, kolik životních funkcí plní a jak moc je pro nás důležitý. Lidská kůže pokrývá celkový povrch těla a tvoří bariéru vůči okolí, podílející se na ochraně organismu proti působení nejrůznějších chemických, fyzikálních a biologických faktorů. Nejen, že zajišťuje udržování stálé teploty těla, ale podílí se i na imunitních systémech.

UV záření má tři složky UVA, UVB a UVC, přičemž na zemský povrch dopadají pouze složky A a B. Nejškodlivější část slunečního záření z celého UV spektra, jež může způsobovat různé patologické procesy v kůži, složka C, je zcela pohlcena ozonovou vrstvou. Pokud tato ozonová vrstva je oslabená, může taktéž přispívat patologii kůže. Přesto však nachází své využití jako účinný germicidní prostředek k dezinfekci operačních sálů a laboratoří. Zbylé dvě podsložky, tedy UVA a UVB mají své charakteristické vlastnosti a liší se jak energií fotonů, tak i hodnotou vlnových délek. UVA záření, díky své nízké energii a dlouhé vlnové délce, proniká do hlubších vrstev kůže. Působení UVA fotonů spočívá především v produkci reaktivních forem (ROS), které následně atakují ostatní buněčné molekuly. K přímému poškození molekul však nemá dostatečnou energii. UVB záření má naopak dostatečnou energii k vyvolání přímého poškození molekul. Z důvodu kratších vlnových délek, pronikne pouze do svrchních vrstev kůže, zejména pokožky a v menší míře do škáry. Je opět iniciátorem masivní produkce reaktivních forem kyslíku, ale studie dokazují, že podporuje také vznik nádorů a jejich šíření. Vedle negativních účinků, má UV záření i pozitivní stránky. UVA zajišťuje stimulaci oxidace melaninu a je často využíváno k léčbě speciálních dermatologických onemocnění.

V současné době, ve spojení se solárními zařízeními, začíná narůstat zájem o pojem „fotostárnutí“ (photoaging) neboli předčasné stárnutí kůže. Fotostárnutí je vyvolané dlouhodobou expozicí slunečního záření a má za následek řadu viditelných změn, jež jsou zcela rozdílné od fyziologického stárnutí, které si mnoho lidí spojuje dohromady. Mezi hlavní znaky patří zejména vysušení kůže, zdrsnění, časté vrásky, zažloutlá barva a další. Dlouhodobá expozice kůže může vést ke vzniku nádorů. Naopak chronologické stárnutí kůže je složitý fyziologický proces vyvíjející se pomocí účinků času. Mezi histologické rysy přirozeného stárnutí patří zejména depigmentace vlasů, úbytek fibroblastů a kolagenu, úbytek melanocytů a zploštění dermo-epidermálního rozhraní.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kůže

Kůže je nejrozsáhlejší orgán lidského těla, jež tvoří zevní povrch a tím i bariéru vůči okolí. Celkový povrch zaujímá plochu 1,2–2,3 m². Specifická stavba umožňuje kůži přizpůsobení pohybům a tvarové změny těla. Plní funkci účinné ochrany před chemickými, fyzikálními a mikrobiologickými vlivy z okolí. Nepovažuje se za vhodný vodič tepla, proto jejím prostřednictvím dochází k regulaci stálé tělní teploty a ovládá tak tepelné ztráty do okolí pomocí činnosti potních žláz a změn průtoku krve v cévním řečišti. Dále se podílí na imunitním systému organismu, neboť obsahuje imunokompetentní buňky, v kterých se mohou tvořit protilátky. Vlivem slunečního světla, zejména ultrafialového záření se v kůži vytváří z ergosterolu vitamín D, podílející se na zlepšení imunitních funkcí lidského organismu (Čihák 2016).

Její složení tvoří tři základní vrstvy: pokožka (*epidermis*), škára (*dermis*) a subkutánní tkáň neboli podkožní vazivo (*hypodermis*) (Obr.1) (Kanitakis 2002 cit. v Kolarsick a kol. 2011).

2.1.1 Pokožka (*epidermis*)

Pokožka je součástí povrchové vrstvy kůže a je tvořená vrstevnatým epitelem ektodermového původu. Její hlavní funkce spočívá v ochraně před potenciálně nebezpečnými hrozbami z vnějšího prostředí a poskytnutí fyzikální, chemické, biochemické a adaptivní imunologické bariéry. Pokožka se obvykle rozděluje do pěti vrstev, dle morfologie a polohy keratinocytů, na vrstvu základní (*stratum basale*), vrstvu ostnitou (*stratum spinosum*), vrstvu zrnitou (*stratum granulosum*), vrstvu světlou (*stratum lucidum*) a v poslední řadě vrstvu rohovou (*stratum corneum*) (Rajnochová Svobodová 2012).

Pokožka se majoritně skládá ze dvou typů buněk, epidermálně z rohovějících keratinocytů a dendritických buněk. Keratinocyty se liší od „čistých“ dendritických buněk především tím, že keratinocyty mají mezibuněčné můstky a dostatečné množství zbarvené cytoplazmy. V minoritním počtu se zde objevují také melanocyty, Merkelovy buňky a Langerhansovy buňky (Kolarsick a kol. 2011).

2.1.1.1 Buňky pokožky (*epidermis*)

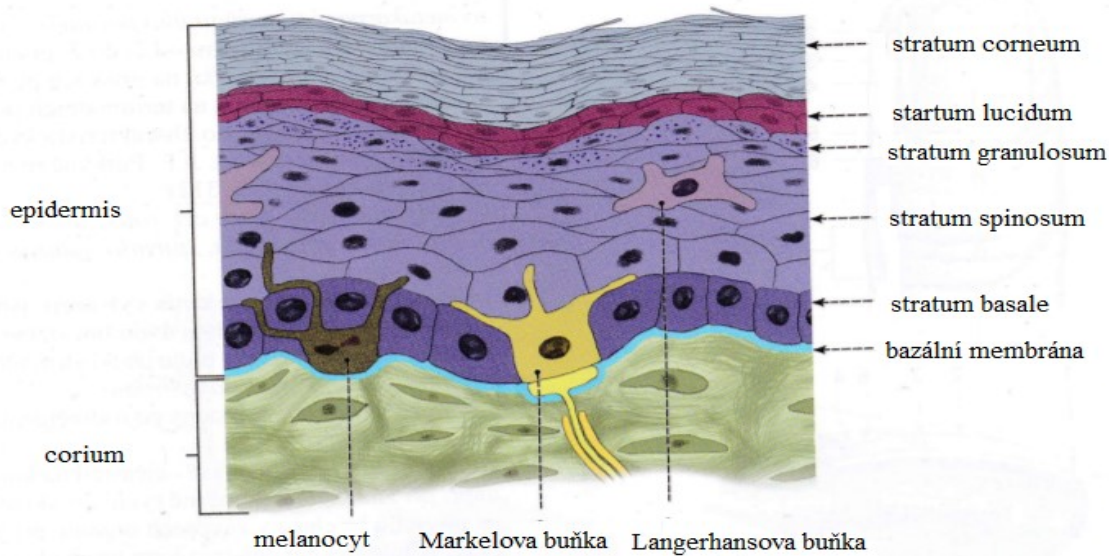
Keratinocyty jsou vysoce specializované epitelové buňky oddělující organismus od vnějšího prostředí a produkující fibrilární keratin podílející se na ochranných vlastnostech

pokožky. Tvoří přibližně 80 % buněk v *epidermis* a jsou zodpovědné za proces zvaný keratinizace, při kterém keratinocyty nejprve prochází syntetickou fází a poté degradační. V syntetické fázi buňky vytváří cytoplazmatickou zásobu keratinu a během degradace, buňky ztrácí organely (Kolarsick a kol. 2011). Keratinocyty z počátku vznikají jako bazální buňky ve vnitřní vrstvě *epidermis*, po buněčném dělení část buněk zůstává v bazální vrstvě jako kmenové buňky, zatímco druhá část migruje do horní vrstvy *epidermis*. Část migrujících buněk se nakonec diferencuje na vytvoření tzv. mrtvé povrchové vrstvy kůže (*stratum corneum*). Tato vrstva je tvořena z mrtvých buněk (korneocytů), které se neustále odlupují v podobě šupinek (Eckert a Rorke 1989).

Melanocyty představují heterogenní skupinu buněk v lidském těle. Tvoří 4 % buněčné populace a největší množství se nachází v trvale osvětlených částí těla (Čihák 2016). Během embryologického vývoje migrují a lokalizují se především ve vlasových folikulech ve *stratum basale* a *stratum spinosum*. Melanocyty a jejich produkce melaninového pigmentu (proces zvaný melanogeneze) mají v kožní fyziologii důležitou roli. Nejviditelnější a nejstudovanější funkcí melanocytů je syntéza melaninu, který propůjčuje kůži a vlasům kůru a chrání epidermální buňky před změnami struktury DNA vyvolané ultrafialovým zářením. Odborné studie taktéž dokázaly, že melanocyty jsou také aktivními faktory v imunitním systému kůže, účastní se imunitních odpovědí a mají imunomodulační vlastnosti (Hong a kol. 2015).

Langerhansovy buňky jsou buňky mesodermového původu, uložené v ostnitě vrstvě v pravidelném uspořádání. Tvoří přibližně 2–8 % buněk *epidermis* a představují tak nejmenší populaci buněk v celé *epidermis*. Vznikají v kostní dřeni z monocytů a do kůže jsou vpraveny krevní cestou. Hlavní funkce Langerhansových buněk spočívá v rozpoznávání antigenu a jeho zpracování. Patrně zprostředkovávají alergické reakce *epidermis*, a především jsou velmi citlivé na ultrafialové záření (Čihák 2016).

Merkelovy buňky a Merkelova nervová zakončení představují kožní mechanoreceptory nacházející se v bazální vrstvě pokožky ve hmatových lištách. U člověka činí 4-6 % buněk bazální vrstvy *epidermis* a jsou tvořeny velkými, světlými buňkami synapticky spojené s terminálami sensitivních nervů. Mechanická stimulace Merkelových nervových zakončení je doprovázena vstupováním vápníku do Merkelových buněk a následným uvolňováním iontů vápníku. Poté nastává exocytóza mediátoru ve formě glutamátu (Čihák 2016).



Obr. 1: Schéma buněk epidermis a jejich uspořádání. Upraveno (Čihák 2016).

Z tohoto důvodu je nezbytně nutné Markelovy buňky a Markelova nervová zakončení považovat za sekundární smyslové buňky přispívající k homeostáze kůže a rozvoji kožních nervů. Četné peptidy, které Markelovy buňky syntetizují, jim umožňují komunikovat s mnoha jinými buňkami, než jsou neurony (Boulais a Misery 2007).

2.1.2 Škára (*dermis – corium*)

Dermis je střední strukturální vrstva pod *epidermis*, oddělené od sebe bazální vrstvou. Je přibližně 15 až 40krát silnější než *epidermis* a zajišťuje tak kůži pružnost, ohebnost a pevnost v tahu. Skládá se především z vaziva se zvlněnými kolagenními a elastickými vlákny, která jsou spojena v navzájem proplétající se snopce. Chrání tělo před mechanickým poškozením, podílí se při regulaci teploty a obsahuje receptory senzoryckých podnětů. Hlavní složkou *dermis* je fibrilární kolagen obsahující velké množství proteinů. Škáru tvoří dvě vrstvy s odlišnými charakteristikami. První vrstva je povrchová (*stratum papillare, pars papillaris*) a druhá vrstva se nazývá hlubší (*stratum reticulare*) (Kolarsick a kol. 2011).

Povrchová vrstva (*stratum papillare*) je dermální oblast promítající se mezi epidermální hřebeny. Obsahuje početná vlákna a vazivové buňky, které jsou propletené sítí kapilár zasahující až do vrchních papil (Čihák 2016). Majoritními buňkami zde jsou fibroblasty produkující do okolí extracelulární matrix a různá kolagenní vlákna. Fibroblasty spojují elastická vlákna s extracelulární matrixí *dermis*, která se skládá z glykosaminoglykanů.

Minoritní skupinou buněk pak v této vrstvě můžeme najít žírné buňky lokalizované podél krevních kapilár, makrofágy a leukocyty (Kolarsick a kol. 2011).

Hlubší vrstva (*stratum reticulare*) představuje největší část škůry s hustou pojivou tkání obsahující vláknité komponenty. Počet buněk je v této vrstvě značně menší než v povrchové vrstvě z důvodu hustých kolagenních svazků a v menší míře elastických fibril. Vlnitý průběh snopců kolagenního vaziva umožňuje tažnost kůže, přičemž elastické fibrily vracejí stav do původního stavu, poté co tah povolí. Elastická vlákna postupně s přibývajícím věkem ubývají a kůže tak ztrácí svoji elasticitu a pružnost (Čihák 2016).

2.1.2.1 Nervová čidla škůry

Nervové aparáty můžeme rozdělit na dvě podskupiny, prvními jsou volná nervová zakončení a druhé jsou smyslová tělíska.

Volná nervová zakončení souvisí s nervovým zakončením v *epidermis*. V nervové síti škůry se objevují gangliové buňky. Volná nervová zakončení jsou tvořena holými nervovými vlákny pokryty Schwannovou vrstvou bez myelinové pochvy. Reagují tak na chemické podněty a dávají vznik pocitům bolesti (Hajniš 1988).

Smyslová tělíska (*corpuscula sensitiva*) vznikla výrazným poklesem Markelových buněk z *epidermis* do *dermis*. Kolem těchto seskupených buněk vznikají sensitivní tělíska reagující na různé podněty. Mezi smyslová tělíska zařazujeme například Wagner-Meissnerova tělíska (*corpuscula tactus*) nacházející se těsně pod *epidermis* a jedná se o orgán dotykového cití, tlaku a tahu. Ruffiniho tělíska se nachází v hlubokých vrstvách škůry a podkožním vazivu a představuje tepelný receptor. Krausova tělíska (*corpuscula bulboidea*) jsou uložena pod hmatovými tělisky v *epidermis* a bývají pokládána za receptory tlaku, tahu a chladu. Poslední smyslová tělíska, obsažená v kůži se nazývají Vater-Paciniho tělíska (*corpuscula lamellosa*) a jedná se o receptory uložené velmi hustě v podkožním vazivu, a to zejména na dlaňové straně prstů pro vnímání tlaku, vibrací a tahu (Hajniš 1988).

2.1.2.2 Nervová zakončení pokožky a škůry

Společná nervová zakončení pro pokožku i škůru existují dvojího typu, a to volná nervová zakončení a zakončení na vlasových pochvách (Hajniš 1988).

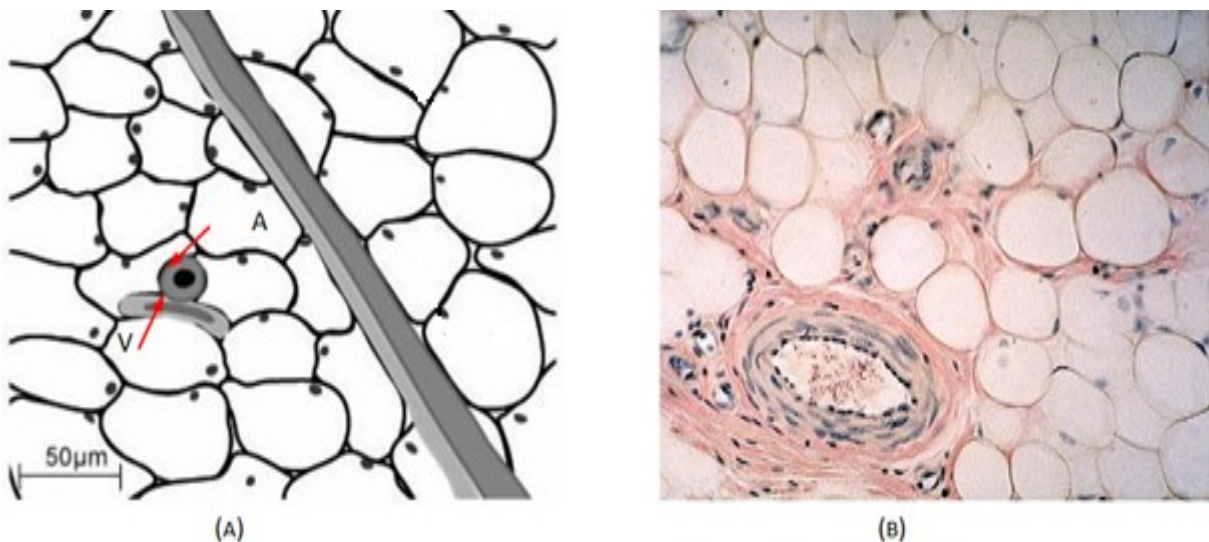
Volná nervová zakončení představují síť rozvětvených dendritů sensitivních vláken spojené do tzv. svazečků. Začínají v hlubokých vrstvách pokožky a pronikají až do

Markelových buněk. Převážná část volných nervových zakončení fungují, jako čidla bolesti zároveň je jimi také snímáno nepřesně ohraničené cití dotykové (Hajniš 1988).

Zakončení na vlasových pochvách ústí pod mazovými žlázami. Při změnách sklonu vlasu dochází k podráždění těmito nervovými zakončeními. Tímto způsobem se jak chlupy, tak i vlasy účastní na přenosu hmatových podráždění na nervová zakončení ve škáře (Hajniš 1988).

2.1.3 Podkožní vazivo (*Hypodermis*)

Podkožní vazivo je definováno jako vrstva tukové tkáně nacházející se mezi *dermis* a aponeurózou (Geerlings 2009). Jeho tloušťka se liší dle individuálních faktorů, jako je například anatomické místo, věk, pohlaví a výživa jedince. Základními buňkami podkožního vaziva jsou tzv. tukové buňky (*adipocyty*), které mohou hromadit velké množství tuku. Tukové buňky mohou posloužit nejen jako zásobárna vitamínů rozpustných v tucích, ale i zásobárna energie (Rajnochová Svobodová 2012). Podkožní vazivo spojuje kůži se svalovými povázkami, anebo s okosticí. V určitých místech se mohou nacházet tužší vazivové pruhy (*retinacula cutis*), které se připojují k mezodermní tkáni fibrózního kolagenu, (viz obr. 2). Subkutánní tuková tkáň je strukturálně a funkčně dobře integrována prostřednictvím nervových, vaskulárních sítí a kontinuity epidermálních přívěsků, jako jsou chlupy a nervová zakončení (Hajniš 1988, Geerlings 2009).



Obr. 2: Schématický nákres (a) a histologický řez (b) podkožního vaziva neboli subkutánní tukové tkáně, zobrazující bílé tukové buňky (*adipocyty*) s jádrem na periferii. Adipocyty jsou v kontaktu s krevním oběhem prostřednictvím arteriol, které se větví na větší tepny (A) a žíly (V). Převzato (Geerlings 2009).

3.1 Elektromagnetické spektrum záření

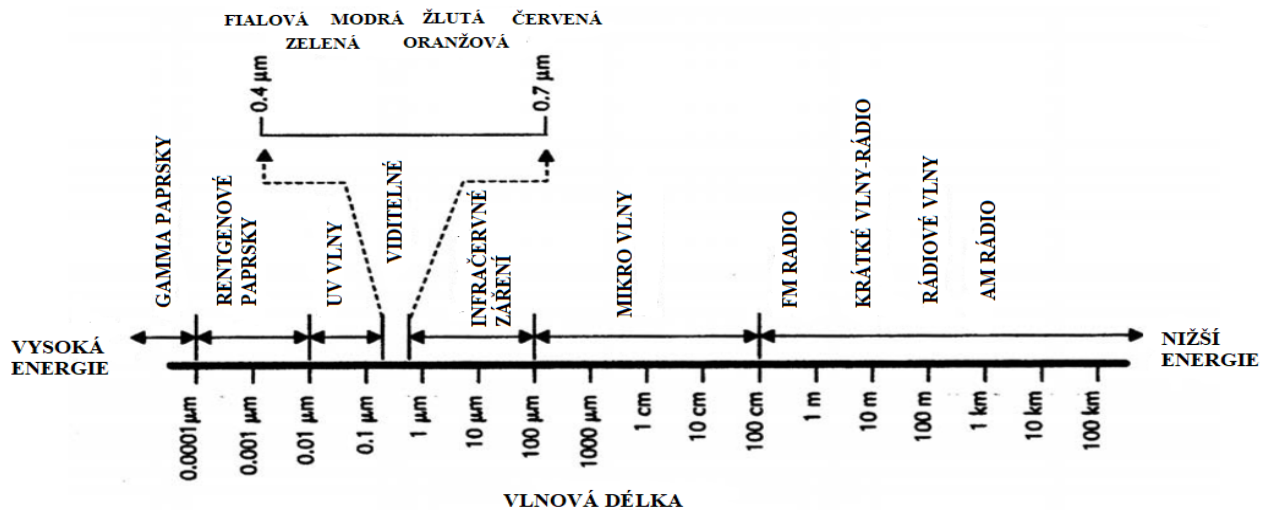
Elektromagnetické vlnění je děj, při kterém dochází k šíření příčného vlnění elektrického a magnetického pole prostorem. Elektromagnetické záření z pravidla rozdělujeme dle vlnové délky, frekvence, energie a zdrojů záření na neionizující a ionizující záření. Neionizující složka (radiofrekvenční, infračervené (IČ), viditelné (VIS), ultrafialové (UV)) je charakterizována vysokými hodnotami vlnové délky a zanedbatelnou energií. Naopak pro ionizující složku (rentgenové, gama, elektromagnetická komponenta kosmického záření) jsou typické nízké hodnoty vlnové délky záření o vysoké energii, jak vyplývá z následujícího vztahu závislosti energie záření na vlnové délce

$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda}, \quad (1)$$

kde h značí Planckovu konstantu, jejíž hodnota činí $h = 6,626 \cdot 10^{-34}$ J·s, λ značí vlnovou délku záření, c značí rychlost světla, kterou urazí světlo nebo jiné magnetické záření ve vakuu. Tato hodnota činí $c = 3 \cdot 10^8$ m·s⁻¹ (Fairbridge R. W. 2005).

Na zemský povrch však dopadá pouze infračervené záření (760-1000 nm), viditelné záření (400-760 nm) a dílčí složky ultrafialového záření, jako jsou UVA (400-315 nm) a UVB (315-280 nm) (obr. 3). Stratosférický ozón blokuje záření o vlnové délce menší, než 290 nm, účinně tak brání celé složce UVC spektra a ostatním ionizujícím složkám přijít do styku s lidskou kůží (Farage a kol. 2010).

Sluneční záření je významné nejen pro řadu pochodů probíhajících na zemi a v atmosféře, ale i pro vitální funkce živých organismů. Představuje nezbytný zdroj energie pro fotosyntézu rostlin a syntézu biologicky aktivní formy vitamínu D. Využití jednotlivých složek slunečního záření se našlo v terapeutické léčbě různých kožních onemocnění, jako je například lupénka či zánětlivé stavy. Navzdory příznivým účinkům slunečního záření zde nacházíme i řadu nepříznivých účinků, zejména působení UV světla na kůži či oči (Rajnochová Svobodová 2012).



Obr. 3: Elektromagnetické spektrum. Upraveno (Fairbridge R. W. 2005).

3.2 UV záření

Ultrafialové záření můžeme dále rozdělit podle velikosti jejich vlnových délek a energie na podsložku UVA1 (340-400 nm), UVA2 (315-340 nm), UVB (280-315 nm) a UVC (100-280 nm). Každá z těchto složek má za následek různé biologické účinky, avšak s rostoucí hodnotou energie dané složky, závažnost biologického účinku se zvyšuje (Rajnochová Svobodová 2012). Dlouhodobá či opakovaná expozice ultrafialového záření (UV) může způsobovat řadu chronologických onemocnění jednotlivců, jejichž závažnost je modifikována individuálními faktory, jako jsou například doba a intenzita ozařování, expozice dílčí složky UV záření, geneticky podmíněná odolnost jedince a jeho aktuální stav (Rostová a kol. 2006).

3.2.1 UVA záření

UVA záření tvoří majoritní část, více než 90 % z celkového UV záření, dopadající na zemský povrch. Vlnové délky se pohybují v intervalu hodnot 315-400 nm a v odborné literatuře je často označováno jako tzv. měkké záření neboli černé světlo, protože vyzařuje nejnižší energii z celého UV spektra. UVA záření je dále členěno na dvě podsložky, UVA1 záření o vlnových délkách 340-400 nm a UVA2 záření o vlnových délkách 315-340 nm. Ve srovnání s UVB záření, UVA záření není absorbováno ozonovou vrstvou a jeho intenzita nezávisí jak na nadmořské výšce, tak denní a roční době (Rajnochová Svobodová 2012).

UVA fotony mají na rozdíl od ostatních dílčích složek UV záření schopnost pronikat až 100 μm hluboko do kůže. Na rozhraní *epidermis-dermis* může proniknout až 80 % UVA fotonů a 10 % dosahují až do podkožního vaziva. Dílčí složka UVA záření byla dlouho považována za irelevantní k procesu poškození kůže díky své nízké energii, ale nyní bývá často spojována s fyziologickým procesem fotostárnutí. Studie prokázaly, že se značně podílí na chronickém poškození nejen kožních buněk, ale i způsobování nekrózy endoteliálních buněk. Energie UVA fotonů však není dostatečně velká na to, aby mohla způsobit přímé poškození molekul a narozdíl od UVB složky, je špatně absorbováno DNA a působí nepřímo prostřednictvím endogenních fotocitlivých látek excitovaných UVA zářením (Rajnochová Svobodová 2012; Puch a kol. 2010). Mechanismus poškození buněk spočívá v masivní produkci reaktivních forem kyslíkových (ROS) a dusíkových sloučenin (RNS) vznikajících za pomoci interakce UVA fotonů s endogenními nebo exogenními molekulami zvanými fotosenzitizéry či chromofory. Vzniklé ROS a RNS atakují okolní molekuly a způsobují jejich vážné poškození. UVA také stimuluje oxidaci melaninu v kůži a zajišťuje jeho přenos z melanocytů do keratinocytů. I přes negativní stránky UVA záření v rámci poškození molekul se často využívá ke speciálním dermatologickým terapiím při léčbě lupénky (Rajnochová Svobodová 2012).

3.2.2 UVB záření

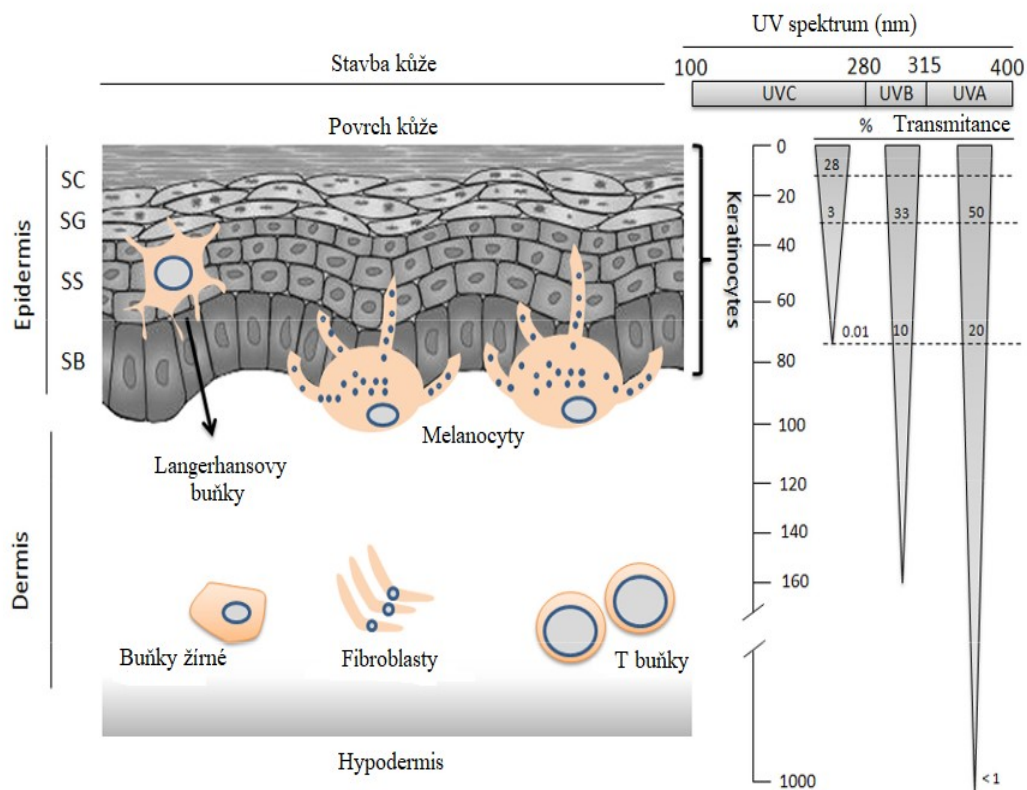
Vlnové délky UVB záření se pohybují v intervalu hodnot od 280 nm po 315 nm a tvoří přibližně 1-10 % UV záření na zemském povrchu. Velká část intervalu vlnových délek o velké energii, je absorbována ve stratosféře ozonovou vrstvou. Na rozdíl od UVA složky, UVB záření má mnohem větší energii, jeho působení na různé molekuly způsobují 1000x účinnější destrukci, a proto je v odborných studiích často označován za vysoký karcinogen. Jeho intenzita se změnou zeměpisné či nadmořské výšky se mění a závisí tak na denní a roční době (Rajnochová Svobodová 2012).

UVB záření už neprostupuje do tak hlubokých vrstev lidské kůže, jako UVA složka. Nejčastěji je absorbována v pokožce, přičemž okolo 70 % UVB fotonů je pohlceno v rohové vrstvě. Zbylé záření působí na buněčné kultury již v bazální vrstvě. Minoritní část UVB fotonů, zejména v intervalu hodnot od 1 % do 10 % může proniknout do samotné škáry (viz obr. 4). Díky své vysoké energii iniciuje vznik nádorů a potencuje účinky jiných karcinogenů. UVB záření vyvolává stejně jako UVA nepřímé poškození buněk za vzniku ROS a RNS, ale ve větší míře. Molekulární účinky se často objevují ve formě edému, erytému, zánětlivých či alergických onemocnění. Tyto účinky mohou značně přispívat k fotoimunosupresi vedoucí

ke karcinogenezi (Ettler 2007). Opakovaná expozice UVB záření značně přispívá k fyziologickému procesu předčasného stárnutí (fotostárnutí), neboť dochází k úbytku fibroblastů, kolagenu a elastinu na histologické úrovni. Rovněž tlumí odezvu imunitního systému. Vedle negativních účinků, UVB záření je nezbytné pro lidské tělo v rámci produkce aktivní formy vitamínu D, jenž je přeměněn v provitamin D₃ a způsobuje tak stimulaci syntézy melaninu a následné opálení kůže (Rajnochová Svobodová 2012).

3.2.3 UVC záření

UVC záření přetrvává na intervalu vlnových délek od 100 po 280 nm a má tak nejvyšší energii z celého UV spektra, proto je možné očekávat, že jeho biologické účinky budou nejintenzivnější. Avšak vlnové délky pohybující se okolo hodnot 100 až 294 nm jsou zcela pohlceny ozonovou vrstvou, a proto tato dílčí složka UV záření na zemský povrch zcela nedopadá a nepodílí se tak na patologických procesech v kůži. Přesto, že působí vysoce mutageně a genotoxicky na všechny formy života i při velmi krátkých expozicích, svoje využití nachází jako baktericidní prostředek k dezinfekci zdravotnických zařízení, operačních sálů či laboratoří (Rajnochová Svobodová 2012).



Obr. 4: Struktura kůže a pronikání slunečních ultrafialových paprsků (UVR) do pokožky. Upraveno (Chih-Hung 2013).

3.3 Molekulární podstata působení UV fotonů

Podmínkou k vyvolání biologického účinku po expozici slunečního záření, musí být fotony pohlceny vhodnou endogenní nebo exogenní molekulou. Molekula či látka, která má schopnost absorbovat elektromagnetické záření se nazývá chromofor. Za chromofory v lidském těle můžeme považovat např. makromolekuly typu proteinů, DNA nebo jednoduché látky jako jsou aminokyseliny či heterocyklické sloučeniny. Tyto chromofory jsou schopny pohlcovat záření jen o určité vlnové délce, jenž závisí na jejich absorpčním spektru. Absorpce UV fotonů odstartuje sérii biologických reakcí, které mohou probíhat dvěma různými způsoby. Rozlišujeme přímý a nepřímý mechanismus.

Přímý mechanismus je typický pro heterocyklické báze DNA a aromatické aminokyseliny. Princip přímého mechanismu je založen na přímé absorpci UV fotonů daným chromoforem (Rajnochová Svobodová 2012).

Naopak nepřímý mechanismus zahrnuje tzv. fotosenzitizační proces. Po absorpci energie dochází uvnitř chromoforu k změně distribuce elektronů. To má za následek vybuzení chromoforu ze základního singletního stavu S_0 do stavu excitovaného singletního S_1 , kde si stále udržuje dva elektrony s opačným spinem. V tomto stavu však chromofor nesetrvává dlouho (nanosekundy) a svoji energii může náhle ztratit emisí záření (fluorescence), vnitřní konverzí přeměnou na teplo nebo podstoupit fotochemickou reakci za vzniku fotoprojektu (Rajnochová Svobodová 2012). Postranní možností chromoforu je tzv. mezisystémový přechod, při kterém dochází k přechodu do excitovaného tripletového stavu za podmínky, že se chromoforu změní spiny na paralelní a molekula se stává velmi nestabilní. Nepřímý mechanismus může probíhat dvěma způsoby, nepřímým mechanismem typu I a typu II (Davies a Pattison 2006).

3.3.1 Nepřímý mechanismus biologického působení UV fotonů typu I a typu II

Nepřímý mechanismus typu I zahrnuje přenos elektronu z excitovaného chromoforu na jinou molekulu vedoucí k tvorbě volných radikálů. Mechanismus nevyžaduje přítomnost kyslíku pro vyvolání biologického poškození a je typický zejména pro DNA báze v závislosti na oxidačním potenciálu DNA bází či redukčním potenciálu excitovaného chromoforu (Rajnochová Svobodová 2012; Davies a Pattison 2006).

Nepřímý mechanismus typu II využívá principu přenosu energie z molekuly, která původně absorbovala UV fotony (chromofor) na molekulární kyslík s následnou tvorbou reaktivních forem kyslíku (ROS) (Davies a Pattison 2006). Mechanismus probíhá majoritě či minoritně. Majoritně přechází energie z excitovaného chromoforu na molekulární kyslík

za vzniku singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$), který podléhá reakcím s řadou molekul včetně DNA. Minoritně dochází k přenosu energie elektronu na molekulární kyslík za vzniku superoxidového aniontu $\text{O}_2^{\bullet-}$, který se následnou reakcí přemění na peroxid vodíku. Vzniklé reaktivní formy kyslíku ROS interagují s biomolekulami a způsobují jejich vážné poškození (Rajnochová Svobodová 2012).

3.4 ROS a jejich biologické působení

Ve vystavěné kůži slunečnímu záření dochází k masové produkci reaktivních forem kyslíku ROS a dusíku RNS. Nejčastěji jsou reaktivními formami tzv. volné radikály. Za volný radikál považujeme biomolekulu či atom, která má alespoň jeden nespárovaný elektron, jenž způsobuje její velkou reaktivitu a pohotově dokáže reagovat s různými biologickými strukturami. Reaktivní formy kyslíku lze rozdělit na dvě skupiny. První skupinu tvoří radikálové reaktivní formy, kam řadíme hydroxylový radikál ($\bullet\text{OH}$), peroxy ($\text{ROO}\bullet$), alkoxy ($\text{RO}\bullet$), hydroperoxy ($\bullet\text{OH}_2$) a superoxid ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Druhou skupinou neradikálových reaktivních forem tvoří peroxid vodíku (H_2O_2), kyselina chlorná (HClO), ozón (O_3) a singletový kyslík ($^1\text{O}_2$). Rozdělení je přehledně členěné v tabulce č. 1.

Tabulka č.1: Reaktivní formy kyslíku vznikající v kůži.

Radikály		Reaktivní sloučeniny	
Hydroxylový radikál	$\bullet\text{OH}$	Peroxid vodíku	H_2O_2
Peroxy	$\text{ROO}\bullet$	Kyselina chlorná	HClO
Alkoxy	$\text{RO}\bullet$	Ozón	O_3
Hydroperoxy	$\bullet\text{OH}_2$	Singletový kyslík	$^1\text{O}_2$
Superoxid	$\text{O}_2^{\bullet-}$		

Reaktivní sloučeniny atakují okolní buněčné makromolekuly, zejména DNA, lipidy a proteiny. Interakce DNA s reaktivními formami kyslíku ROS má za následek oxidaci bází nebo deoxyribózu. Tyto chemické procesy způsobují nežádoucí destrukce biologických struktur jako je například jedno – či dvouvláknové zlomy DNA nebo vznik křížkových vazeb DNA s proteiny. Nízký ionizační potenciál způsobuje nejčastější oxidaci guaninových bází. Hojný výskyt můžeme zaznamenat u 8-hydroxyguanin nebo jeho fyziologicky běžnější keto-forma 8-oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxo-G), jejíž potenciál je silně mutagenní, neboť může dojít k výměně purinového nukleotidu za pyrimidinový a naopak. Oxidované báze jsou

počátkem samotné kancerogeneze a často jsou spojovány se vznikem maligního nádoru (Rajnochová Svobodová 2012).

Tyto reaktivní formy kyslíku mají také svoji pozitivní stránku. ROS se tvoří během normálního buněčného metabolismu a jsou zapojeny do mnoha fyziologických procesů, včetně aktivace imunitního systému. Například aktivované fagocyty jsou součástí imunitního systému a uvolněný peroxid vodíku dokáže zabít patogeny. Superoxidový anion je také známý tím, že se účastní v boji proti infekcím (Ahmad a kol. 2017).

3.5 Antioxidační systémy

Nadměrná tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) může vyvolat oxidační stres, což vede k poškození a někdy i k samotné smrti buňky. Proto jsou kožní buňky vybaveny tzv. antioxidanty, které omezují aktivitu kyslíkových radikálů a chrání molekuly před oxidací z důvodu nadměrné produkce ROS/RNS. Rovnováha mezi produkcí a inaktivací ROS vede obecně k homeostáze. Rovnováha je však spíše posunuta na stranu směrem k tvorbě volných radikálů. Antioxidanty mohou zmírnit škodlivé účinky ROS *in vitro* a zpozdit mnoho událostí, které přispívají ke stárnutí buněk. Rovnováha mezi ROS a antioxidanty je velmi důležitá, protože když počet volných radikálů převyší počet dostupných antioxidantů, nastává proces, označovaný jako oxidační stres a dochází k poškození a ničení kožních buněk (Polšjak 2013).

Antioxidanty zahrnují jak enzymové, tak i neenzymové molekuly. Mezi nejznámější enzymové antioxidanty patří katalasa (KAT), glutathionreduktasa (GSR), glutathion-S-transferaza (GST), hemoxygenasa (HO), thioredoxinreduktasa (TRX-R), NAD(P)H chinonoxidoreduktasa-1 (NQO-1) a superoxidodismutasa (SOD), který je jedním z hlavních antioxidantních enzymů přispívající k udržení fyziologické hladiny ROS v pokožce (Rajnochová Svobodová 2012).

Mezi neenzymové antioxidanty nejčastěji zařazujeme nízko i vysokomolekulární sloučeniny. Nízkomolekulární antioxidanty jsou nepostradatelné v široké škále fyziologických či patologických dějů, jako jsou například stárnutí, hojení ran a modulace imunitního systému. Nejznámější nízkomolekulárním antioxidantem je zejména GSH, thioredoxin, močová kyselina a lipoová kyselina. Antioxidanty, jež získáváme z potravy, jsou vitamin E, kyselina askorbová, karotenoidy a fenolové látky. Vysokomolekulární sloučeniny vážou přechodné kovy a mění jejich redukční vlastnosti tak, aby jim nebylo umožněno katalyzovat nebezpečné radikálové

reakce. Mezi vysokomolekulární sloučeniny řadíme transferin, laktoferin, feritin a albumin (Rajnochová Svobodová 2012).

3.6 Reparační mechanismy

V této kapitole navážeme na již zmíněné mechanismy, které chrání buňku před vznikem reaktivních forem kyslíku vlivem expozice UV záření. Vedle antioxidantů má buňka další ochrannou funkci, tzv. reparační mechanismy sloužící k opravení či odstranění modifikovaných molekul.

3.6.1 Poškození lipidů a proteinů

Pokud se oxidačně poškodí lipidy, nastává tzv. ireverzibilní proces postihující především nenasycené mastné kyseliny. Tento proces probíhá nejčastěji v biomembránách buněk za vzniku různých reaktivních molekul, jako jsou lipidové alkoxylové radikály, alkeny, aldehydy, lipidové peroxidy, alkoholy a v poslední řadě hydroperoxidy, které způsobují razantnější poškození buněčných molekul. Tyto nežádoucí produkty je třeba odstranit pomocí antioxidačních systémů, např. glutathionperoxidasa (GPX), nebo již zmíněný glutathion-S-transferaza (GST) (Rajnochová Svobodová 2012).

Vedle uvedených reaktivních forem kyslíku ROS a dusíku RNS se zde nachází další produkty, které jsou schopny modifikovat molekuly proteinů. Jedním z nich si představíme tzv. malondialdehyd podílející se na oxidaci samotného proteinu. Nejnáchylnější vůči oxidaci jsou sírné a aromatické kyseliny. Na ireverzibilně pozměněné proteiny se aplikují specifické enzymové systémy, glutathion (GSH)/glutathionreduktasa (GSR) či glutathion (GSH)/ glutathion-S-transferaza (GST), přičemž jejich hlavní úkol spočívá v odstranění disulfidových můstků. Detoxicitu exogenních a endogenních látek zajišťuje izoforma cytochromu P450, zejména CYP1A1 a CYP1B1. Jejich aktivace však nepřímo způsobuje poškození DNA a následkem je proces kancerogeneze (Rajnochová Svobodová 2012).

3.6.2 Reparační mechanismus DNA

Modifikace DNA buňky je nejzávažnější ze všech poškození, které může nastat po expozici UV zářením, neboť jeho následky vedou ke vzniku mutacím a v nejhorším případě i k buněčné smrti. V nejnovějších studiích bylo dále prokázáno, že poškození DNA vyvolané UV zářením má dva odlišné účinky: mutagenizi a toxicitu (Britt 1995).

3.6.2.1 Oprava vystřížením nukleotidu

Buňky jsou vybaveny dostatečně ochranným mechanismem, který funguje na základě kontrolních bodů buněčného cyklu. Má celkovou kontrolu nad strukturou DNA a po zjištění lokálního poškození, zastavuje buněčný cyklus. Poté následuje proces odstranění poškození.

Syn-cyklobutan-pyrimidinové dimery (CPD) a pyrimidin-pyrimidinové -6-4- fotoprodukty (6-4PP) tvoří přibližně 25 % produktů poškozujících DNA způsobených UV zářením a eliminují opravný systém DNA na základě vystřížení nukleotidu (Britt 1995). Přesto, že pyrimidinové dimery nemohou účinně spárovat pár bází s jinými nukleotidy, nejsou přímo mutagenní, ale spíše nachází svoji funkčnost jako bloky replikace DNA. Vzniklé léze v aktivně přepisovaných oblastech genetické informace se následně odstraňují procesem, nazývaným transkripčně vázaná oprava. Ostatní poškození na DNA se odstraňují pomalejším procesem tzv. globální genomové opravy. Procesu se účastní přibližně 25 navzájem se lišících proteinů, ale poškození je z genomu odstraňováno obdobnými kroky. Rychlost prováděné opravy závisí na tom, kde je léze lokalizována a na jejím typu. Proces opravy vystřížením nukleotidu nebývá neomylný, a proto zbytky lézí mohou zůstat ve struktuře DNA (Rajnochová Svobodová 2012).

3.6.2.2 Oprava jednovláknových zlomů DNA

Chyba spárovaných bází má velký vliv na udržování genetické stability. Proces opravy chybného párování se snaží snižovat výskyt chybně spárovaných bází o dva řády, neboť jedna chyba žádá 10^9 zkopírovaných nukleotidů z původní chyby mající 10^7 zkopírovaných nukleotidů (Bruce 2005). Mechanismus opravy je téměř srovnatelný s předchozím mechanismem opravy pomocí vystřížení nukleotidu. Proteiny, jež jsou zahrnuty v mechanismu opravy, rozpoznávají během replikace DNA chybně zařazeného nukleotidu v dceřiném řetězci a poté je tento nuklid odstraněn a nahrazen správným (Rajnochová Svobodová 2012).

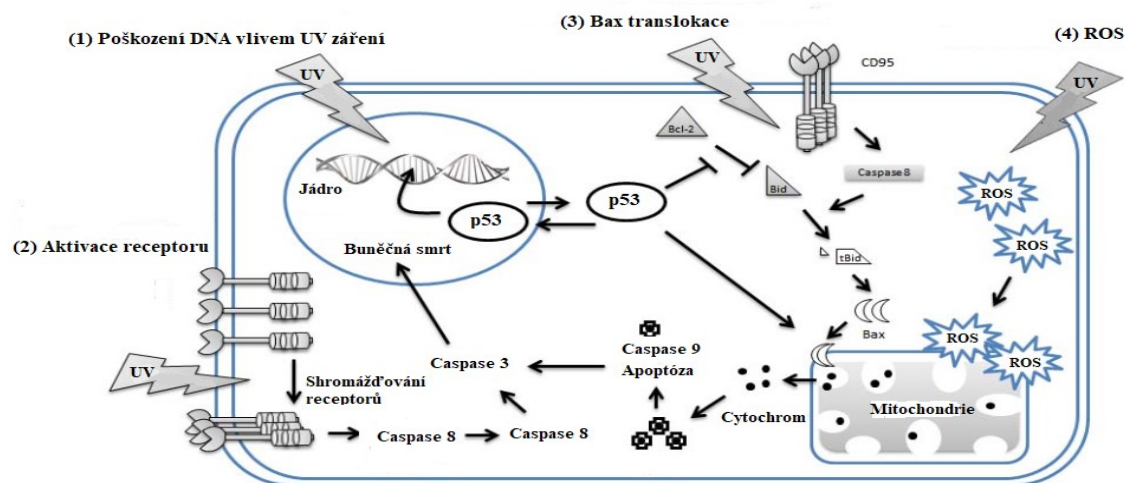
3.6.3 Buněčná smrt

Buněčná smrt je konečné stádium buňky, pokud je vzniklé poškození DNA velmi rozsáhlé a neopravitelné. Nastává proces, tzv. apoptóza neboli řízená smrt buňky, která plní funkci dalšího obranného mechanismu zabraňující hromadné množení buněk s poškozenou genetickou informací a předchází tak vzniku kancerogeneze. Pomocí eliminace buněk nesoucí genetickou mutaci, hostitel je schopen zabránit další inkorporaci poškozených anebo mutovaných genů v následné expanzi klonálních buněk. Fyziologický proces, apoptóza, bývá

zprostředkovávaná geny, které zapříčiňují mutace a přenos mutace na další generace buněk (Rajnochová Svobodová 2012).

Během apoptózy se výrazně uplatňuje protein p53. Apoptické účinky mohou záviset na dávce a typu ozářených buněk zahrnující nejen apoptickou dráhu v závislosti na proteinu p53, ale i na receptoru smrti a mitochondriální disfunkci (obr. 5). Několik studií prokázalo, že oprava DNA je narušena při absenci funkčního proteinu p53. Taktéž hraje velikou roli jako regulátor opravy DNA, ale nepodílí se na apoptóze bazálních keratinocytů. Současné studie předpokládají, že protein p53 zprostředkovává apoptózu prostřednictvím přímé interakce se samotnou mitochondrií nebo členy rodiny BCL-2 proteinů regulujících apoptózu. Změna propustnosti membrány mitochondrií má následek uvolnění mitochondriálních proteinů, jakou jsou například cytochrom c (Chih-Hung 2013).

Proces buněčné apoptózy je složen z několika jdoucích po sobě biochemických procesů. Dochází tak k degradaci cytoskeletu, která má za následek agregace chromatinu, změnu tvaru jádra a buněčné membrány. Buňka následně vypudí vodu, sraší se a na povrchu buněčné membrány se objeví puchýřky, které se po určité době oddělují na malé útvary, označované jako apoptická tělíska. Tato tělíska jsou klíčová pro rozpoznání buňky imunitního systému a následně odstraněna (Rajnochová Svobodová 2012).



Obr. 5: Mechanismy apoptózy indukované UV zářením. (1) UV záření indukuje poškození DNA a poté dochází k aktivaci proteinu p53 a úniku cytochromu c mitochondrií. (2) UV záření také může aktivovat a seskupit celulórní membránové receptory smrti, což vede k aktivaci kaspázové kaskády a apoptózy. Dále může nastat situace (3), kdy UV záření může podporovat translokaci Bax na mitochondrie, což opět vede k uvolnění cytochromu c. V poslední řadě (4) UV záření může vyvolat nadprodukcii reaktivních forem kyslíku ROS způsobující nejen

poškození několika důležitých strukturálních a funkčních proteinů či DNA, ale taky uvolňují cytochrom c z narušených mitochondrií. Upraveno (Chih-Hung 2013).

3.6.4 Buněčné přežití a proliferace

V okamžiku poškození buňky, vlivem expozicí UV zářením, se aktivují mechanismy vedoucí k apoptóze, ale i k zajištění jejich přežití a proliferaci. Tyto ochranné procesy buňky jsou založeny především na řadě specifických kinasách.

Za zcela klíčové kinasy jsou považovány mTOR a Akt (proteinkinasa B) patřící do rodiny proteinů fofatidylinositol-3-kinasy (PI3K). Jejich aktivace způsobuje buněčné procesy ke kontrole transkripce a translace genů. Kinasa mTOR plní funkci „hlavního vypínače“ buněčného katabolismu a anabolismu. Dále slouží jako regulátor buněčné apoptózy, především expresi proteinů p53, Bad či Bcl-2. K udržení energetické rovnováhy slouží protein kinasa aktivovaná 5'-adenosinmonofosfátem (AMPK). Svoji funkci plní v aktivaci katabolických drah produkující ATP a v regulaci aktivity různých proteinů, zejména p53, p38 a mTOR (Rajnochová Svobodová 2012).

3.7 Stárnutí kůže

Stárnutí kůže neboli senescence je složitý fyziologický proces, který se s časem vyvíjí a zahrnuje vnitřní stárnutí a faktory prostředí, představující vnější stárnutí. Tyto dva rozdílné procesy ovlivňují stárnutí kůže současně a navzájem se kombinují (Sachs 2009).

Lidská kůže nejen podléhá chronologickým změnám, ale i vystavení komutativním vlivům prostředí, zejména UV záření. V průběhu života může přispět k řadě onemocnění lidské kůže. Nezávisle na věku, zejména v důsledku změn životního stylu v kombinaci se zvýšením opakované expozice slunečním zářením se výskyt rakoviny razantně podílí na onemocnění kůže a za posledních 20 let se dramaticky zvyšuje. Tento důsledek UV záření na lidský organismus se označuje jako fotokancerogeneze (Gilchrest a Krutmann 2006).

3.7.1 Chronologické stárnutí kůže

Chronologické stárnutí kůže zahrnuje ty změny, ke kterým dochází v důsledku endogenního poškození kontinuální tvorbu reaktivních forem kyslíky (ROS) generovaných během oxidace buněčného metabolismu. Navzdory antioxidačním obranným systémům buňky, generované reaktivní formy kyslíku poškozují několik buněčných složek, včetně membrán,

enzymů a DNA, ale také ovlivňují interakce DNA-protein a protein-protein (Gilchrest a Krutmann 2006). Další faktor podílející se na chronologickém stárnutí kůže jsou telomery, tzv. terminální části chromozomů. S každou buněčnou divizí se délka lidského telomeru zkracuje. Kriticky krátké telomery signalizují apoptózu buňky a přispívají tak k buněčnému stárnutí. (Gilchrest a Krutmann 2006). Podobně jako stárnutí jiných systémů je chronologické stárnutí kůže ovlivněno změnami růstových faktorů a hormonů, jejichž funkčnost s přibývajícím věkem značně klesá. Největší pokles byl zaznamenán u pohlavních steroidů, jako jsou například estrogeny, testosterony, dehydroepiandrosterony (DHEA), sulfátové estery DHEAS a jiné hormony včetně melatoninu, kortizolu a tyroxinu. Také aktivní forma vitamínu D, 1,25-dihydroxyvitamin D₃ a molekuly ovlivňující tkáň včetně kůže a jejich pokles konstitučních hladin určitých signálních molekul postupem věku dochází ke zhoršení kožních funkcí. Avšak pokles hladin signálních molekul není obecné pravidlo pro změny, které jsou doprovázeny stárnutím kůže z důvodu existence signálních molekul, které se s rostoucím věkem zvyšují (Gilchrest a Krutmann 2006).

Taktéž důležitým faktorem ve fyziologickém procesu senescence jsou označovány skleroproteiny kolagen a elastin. Produkce kolagenu se s přibývajícím věkem zpomaluje a elastin se stává méně pružný. Odumřelé kožní buňky neopadávají tak rychle, ale obrát nových kožních buněk se může značně snížit (Sjerobabski-Masnec a Šitum 2010). Mezi klinické projevy chronologického stárnutí kůže se řadí xeróza neboli suchost pokožky, dále časté vrásky, nepravidelná pigmentace, laxnost kůže, úbytek kostní hmoty, neschopnost se potit, ztráta tuku, ochablost a možný výskyt různých benigních neoplazmů (Gilchrest a Krutmann 2006). Klinické a histologické projevy chronického stárnutí pokožky jsou shrnuty v tabulce č. 2.

Tabulka č.2 Přehled histologických rysů chronologického stárnutí lidské kůže. Upraveno (Gilchrest a Krutmann 2006).

Epidermis	Dermis	Ostatní
Zploštěné dermo-epidermální rozhraní	Atrofie (ztráta dermálního objemu)	Depigmentace vlasů
Variabilní tloušťka	Změny struktury pojivé tkáně	Úbytek vlasů
Variabilní velikost a tvar buňky	Úbytek fibroblastů	Úbytek žláz
Občasná atypie jádra	Úbytek žírných buněk	Abnormální nehty
Úbytek melanocytů	Méně krevních cest	-
Úbytek Langerhansových buněk	Abnormální nervová zakončení	-

3.7.2 Předčasné stárnutí kůže – fotostárnutí

Další faktory, podílející se na stárnutí lidské pokožky jsou ionizující záření, fyzický a psychický stres, nadměrné stravování, a naopak kalorické omezení. Ze všech vyjmenovaných faktorů prostředí, je sluneční UV záření rozhodující pro urychlení tohoto fyziologického procesu. Pojem fotostárnutí (photoaging) se vztahuje k účinkům dlouhodobé či opakované expozice UV záření a podle odborných studií, učiněných v posledních letech výzkumu, je nyní zřejmé, že jak složka UVB záření o vlnových délkách 280 až 315 nm, tak i složka UVA záření o vlnových délkách 315 až 400nm k němu značně přispívají (Gilchrest a Krutmann 2006).

3.7.2.1 Mechanismus předčasného stárnutí

Předčasné stárnutí kůže je následkem dlouhodobé či opakované expozice UV záření se vyznačuje určitými znaky příslušné právě tomuto fyziologickému jevu. Mezi nejčastější příznaky řadíme tvorbu vrásek, zažloutlou barvu pokožky, drsnost, časté olupování, vyschlost, snížení tónu kůže a abnormální pigmentace. Hlavní indukované změny se nachází na úrovni dermis a taktéž jsou z velké části odpovědné za fenotyp kůže (Gilchrest a Krutmann 2006, Rajnochová Svobodová 2012). Nejvíce se projevují v oblasti obličeje, krku, hřbetu rukou a také předloktí, avšak nejzávažněji postihuje jedince se světlejší pokožkou (Rabe a kol. 2006).

Molekulární podstatou fyziologického procesu fotostárnutí je přímé či nepřímé poškození DNA oxidací reaktivních forem kyslíku a dusíku. Míra urychlení procesu stárnutí nepřímo koreluje s rychlostí a spolehlivostí opravy DNA buňky. V kombinaci se skutečností, že poškození DNA doprovází chronologické stárnutí, se musí brát v úvahu, že dědičnost a vliv okolního prostředí mají za následek velký podíl na změně stavu DNA v průběhu života jedince (Gilchrest a Krutmann 2006). Molekulární změny v DNA vyvolané expozicí ultrafialového záření byly studovány na základě fotokancerogeneze. Chromofory v lidské tkáni absorbují fotony o určité energii a dosáhnou tak excitace do vyšších energetických stavů. Dochází k chemické změně a převedení energie na jiné molekuly nebo vyzáření energie ve formě tepla. UV záření o vlnových délkách 245 až 290 nm je absorbováno maximálně pomocí DNA, přičemž dochází k různým poškozením či mutacím. Mutace DNA mohou být klinicky spojeny se specifickými příznaky fotostárnutí (Rabe a kol. 2006).

Masivní produkce ROS/RNS také způsobuje aktivaci povrchových receptorů keratinocytů a fibroblastů. Dochází ke stimulaci mitogen-aktivované kinasy proteinů (MAPK) vedoucí k indukci transkripce aktivačního proteinu-1 (AP-1). Tento aktivovaný protein stimuluje expresi matrixových metaloproteináz (MMP) zodpovědné za tvorbu kolagenu.

Přítomné reaktivní formy mohou oxidovat produkty MMP, což může za normálních okolností způsobit zpomalení, jejich rychlé degradace (Rajnochová Svobodová 2012).

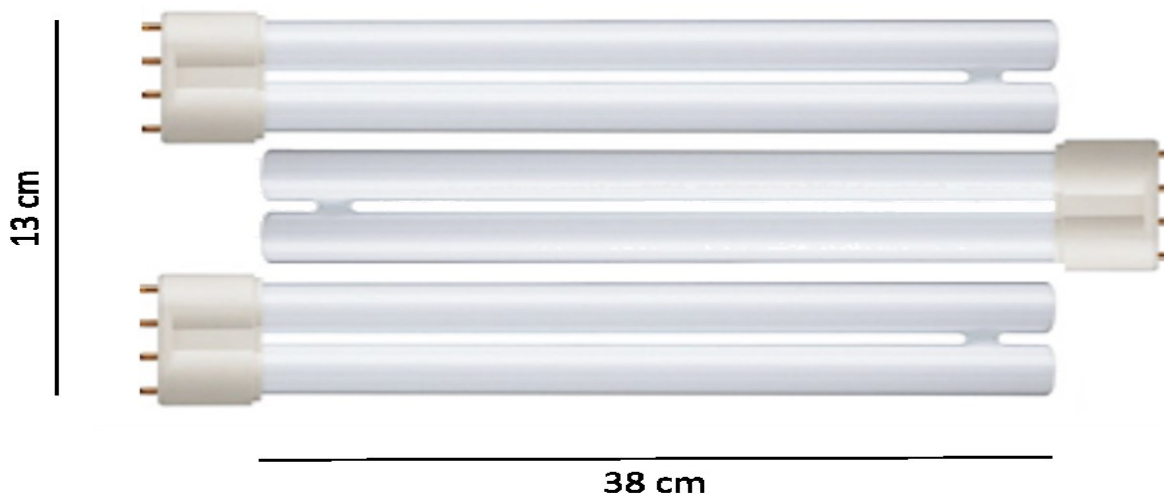
Mitochondrie jsou orgány, jejichž hlavní funkce spočívá v generování energie pro buňku. Pokud dojde k poškození mitochondriální DNA, její reparace je omezená a následky mohou vést až k narušení metabolických procesů buňky, zejména schopnosti produkovat energii ATP. Toho je dosaženo vícestupňovým procesem nazývaným oxidativní fosforylace nebo řetězec přenosu energie, při kterých dochází k tvorbě reaktivních forem kyslíku ROS a následující mitochondriální mutace. Z odborných studií vyplývá, že mutace mtDNA hrají roli u degenerativních nemocí, jako je Alzheimerova choroba, chronická progresivní oftalmoplegie (Gilchrest a Krutmann 2006; Rajnochová Svobodová 2012).

Dále po opakované či dlouhodobé expozici UV zářením může docházet k lokální imunosupresi. Langerhansovy buňky po vystavení UV záření podléhají numerickým, funkčním a morfologickým změnám, které vedou k jejich poškození (Rabe a kol. 2006). Značně tak opět přispívají k fotostárnutí.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístrojové vybavení

MS 3 basic Lab Shaker – Vortex, Heracell™ 150i CO₂ Incubators with Staniless Steel Chambers, spektrofluorimetr FLS-980 (Edinburgh Instruments, Skotsko), UVA zářivka (PL L 36W/10/4P UV A (PUVA)) Phototherapy Philips), UVB zářivka (PL L 36W/01/4P UV B NarrowbandPhototherapy), UV – metr Dr. Hönle (UV technology Německo), pH metr přenosný Milwaukee MW101, magnetická míchadla s ohřevem IKAMAG RH basic, Spektrofotometr pro měření absorpance a fluorescence Tecan Infinite®200 PRO (Tecan, Švýcarsko), univerzální centrifuga, laminární box, laboratorní váha Steinberg systém.



Obr. 6: Umístění a velikost zářivek v UV zdrojích.

4.2 Použitý biologický materiál:

K experimentům nám byly Ústavem lékařské biofyziky, Lékařské fakulty Univerzity Palackého poskytnuty buňky typu HaCaT. Jedná se o imortalizované lidské keratinocyty stavějící se jako modelový buněčný systém používající se k různým studiím. Tento typ buněk se hojně používá především pro svou vysokou kapacitu diferenciaci a proliferaci *in vitro*.

4.3 Použité materiály a pomůcky

Kultivační desky, kultivační láhve, 24-jamkové a 96-jamkové destičky (Dispolab, ČR), alobal, parafilm, váženky, kopisti, kádinky, plastové mikrozkušavky, pipety a špičky (Eppendorf, ČR), centrifugační zkumavky (Biotech, ČR) a Petriho misky.

4.4 Použité chemikálie a roztoky:

Dulbecco's Modified Eagles médium (DMEM, D5523, Sigma-Aldrich), hovězí sérum albumin (S-1810, Biowest), ethanol (EtOH; C₂H₅OH p.a., 96%), trypsin-EDTA 10x (T4174, Sigma-Aldrich), penicillin-streptomycin (P4333, Sigma-Aldrich), chlorid draselný (KCl), chlorid sodný (NaCl), dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄), kyselina chlorovodíková 37% (HCl), methanol (MeOH; CH₃OH-), dimethylsulfoxid (DMSO; (CH₃)₂SO)), hydrogenuhličitan sodný (NaHCO₃), D-glukosa (C₆H₁₂O₆, ≥ 99,5), ethanol (EtOH; C₂H₅OH p.a., 70%).

Byly zakoupeny produkty: fluorescenční značka CM-H₂DCFDA (C6827, Life Technologies) na detekci ROS, MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (M5655, Sigma-Aldrich) pro zobrazení životaschopných buněk, fluorescenční značka SOSG (S36002, Life Technologies) k detekci singletového kyslíku, fluorescenční značka MitoTracker Orange (M7510, Life Technologies) k detekci membránového potenciálu mitochondrií, fluorescenční značka Amplex Red (CAYM10010469, CaymanChemicalCompany) k detekci peroxidu vodíku a křenová peroxidasa (VWR0417, VWR Life Science).

4.5 Použité zásobní a pracovní roztoky

4.5.1 Roztoky pro kultivaci HaCaT buněk

- Médium se sérem: Práškové DMEM bylo rozpuštěno ve sterilizované destilované vodě. Do média bylo přidáno sterilně přefiltrované hovězí sérum BSA (100 ml), hydrogenuhličitan sodný NaHCO₃ (3,7 g/l), a 10 ml roztoku antibiotika (10 ml/l). Výsledné pH roztoku bylo 7,4.
- Fosfátový pufr PBS 10x: 80 g NaCl; 2,0 g KCl; 14,4g Na₂HPO₄; 2,4g KH₂PO₄ a destilovaná voda. Hodnota pH na 7,4.
- Fosfátový pufr PBS 1x: z již připraveného zásobního roztoku fosfátového pufru PBS 10x změníme koncentraci na 1x.

4.5.2 Roztoky pro fluorescenční značku DCF

- Zásobní roztok: Rozpuštěním 50 µg CM-H₂DCFDA v 87 µl DMSO byl připraven 1mM zásobní roztok.
- Měřicí roztok PBS s glukosou (PBS-G): Glukosa GC Sigma ultra 5mM, fosfátový pufr PBS 1x.

4.5.3 Roztoky pro stanovení viability pomocí testu MTT

- Pracovní roztok MTT: MTT bylo rozpuštěno v růstovém médiu o výsledné koncentraci 5mg/ml. U analýzy buněčné viability byl tento roztok přidán k buněčným kulturám tak, aby výsledná koncentrace činila 0,5 mg MTT na 1 ml růstového média.
- Roztok pro extrakci MTT: Výsledný buněčný produkt MTT, formazan, byl rozpuštěn po odstranění média z jamek v 100 µl DMSO.

4.5.4 Roztoky pro fluorescenční značku SOSG

- Zásobní roztok: 100 µg fluorescenční značky SOSG bylo rozpuštěno v 330 µl methanolu, čímž byl získán 0,5 mM zásobní roztok.
- Pracovní roztok: zásobní roztok s fluorescenční značkou byl zředěn 250x pomocí zásobního roztoku PBS-G na výslednou koncentraci 2µM.

4.5.5 Roztoky pro fluorescenční značku MitoTracker Orange

- Pracovní roztok: 50 µg fluorescenční značky MT Orange bylo rozpuštěno v 117 µl dimethylsulfátu sodném DMSO na výslednou koncentraci 1 mM.
- Zásobní roztok: Zásobní roztok PBS s glukosou (PBS-G): Glukosa GC Sigma ultra 5mM, fosfátový pufr PBS 1x.
- Měřicí roztok: Zředěním pracovního roztoku v PBS-G byl obdržen měřicí roztok s výslednou koncentrací 200nM.

4.5.6 Roztoky pro fluorescenční značku Amplex Red

- Pracovní roztok: 1,3 mg fluorescenční značky Amplex Red bylo rozpuštěno v 100 µl dimethylsulfátu sodném DMSO na koncentraci 50mM.
- Zásobní roztok: Zásobní roztok PBS s glukosou (PBS-G): Glukosa GC Sigma ultra 5mM, fosfátový pufr PBS 1x.
- Měřicí roztok: Po 1000 násobném zředěním pracovního roztoku s PBS-G byla výsledná koncentrace v měřicím roztoku 50 µM.

4.6 Použité metody a pracovní postupy:

4.6.1 Kultivace a pasážování buněk

Před každým použitím byla vyjmuta kultivační láhev z inkubátoru a splněn následující postup. Pro absolutní sterilitu byl, těsně před vložením do flow boxu, aplikován 70% ethanol rovnoměrně po otvoru kultivační nádoby. Staré růstové médium bylo vyjmuta z kultivační láhve a nádoba byla 3krát promyta fosfátovým pufrům PBS 1x. Pro uvolnění buněk ze dna nádoby byl použit Trypsin v poměru 1:10 s fosfátovým pufrům PBS. Následně byla kultivační láhev opět vložena do inkubátoru na 3 až 8 minut při 37 °C v atmosféře obsahující 5 % CO₂. V uvedeném časovém intervalu byla kultivační láhev kontrolována pod mikroskopem, zdali už nejsou buňky uvolněné. Trypsinizace byla zastavena přidáním čerstvého růstového média s 10% sérem. Nově ošetřenou kultivační láhev je možné opět vložit do inkubátoru.

Na přípravu experimentu bylo nutné určit množství buněk v médiu spočítanou metodou za pomoci Bürkerovy komůrky. Následně byly buňky s buněčným médiem vysety do 96- jamkových analytických mikroadestiček v koncentraci 10⁴/jamka. Pro naše experimenty bylo připraveno 7 analytických mikroadestiček, tedy 3 destičky po 96- jamkách pro expozici UVA zářením a 3 destičky po 96- jamkách pro expozici UVB zářením. Poslední destička byla neozářená. Připravené destičky na následující experimenty byly následně inkubovány po dobu 24 hodin při 37 °C v atmosféře obsahující 5 % CO₂.

4.6.2 Měření spekter UV zdrojů

Pro kvalitní výsledky experimentu byla ověřena spektra použitých laboratorních UVA a UVB zdrojů pomocí spektrofluorimetru FLS-980. UV trubice byly vloženy do přístroje tak, aby jejich vyzařování bylo nasměrováno na vstupní štěrbinu emisního monochromátoru. Velká opatrnost byla kladena na pečlivé uzavření poklopu přístroje, z důvodu eliminace proniknutí denního světla v laboratoři. Počet vyzařovaných fotonů byl naměřen v rozmezí vlnových délek 220 až 800 nm. Výsledná spektra byla zpracována v programu MS Excel 2016.

4.6.3 Ozařování buněk

Před samotnou expozicí UV zářením byly odebrány 96-jamkové destičky z inkubátoru. Růstové médium bylo nahrazeno 80 µl PBS-G obsahující rozdílné značky o výsledných koncentracích 6 µM CM-H₂DCFDA; 2 µM SOSG; 50 µM Amplex Red společně s křenovou peroxidasou o aktivitě 0,125 U/ml. U stanovení vlivu UV záření na viabilitu buněk a u měření

změn mitochondriálního membránového potenciálu, ozařování probíhalo pouze v 80 μ l PBS-G. Byly zvoleny časové intervaly ozařování 0, 2, 5, 10, 20, 40 a 80 minut pro většinu fluorescenčních sond, výjimkou byla sonda MitoTracker Orange, kde byly stanoveny časové intervaly 0, 5, 15 a 35 minut. V odborné literatuře se uvádí i přepočet na dávku ozáření, jež vychází ze vztahu č. 1

$$\text{dávka záření} \left(\frac{\text{J}}{\text{cm}^2} \right) \cdot 1000 = \left(\text{intenzita záření} \left(\frac{\text{W}}{\text{cm}^2} \right) \right) \cdot (\text{doba ozáření [s]}). \quad (2)$$

Ozařování buněk bylo provedeno ve flowboxu ve vzdálenosti 20 cm od zdroje s průměrnými hodnotami ozáření 6,5 mW/cm² u UVA zdroje a 2,3 mW/cm² u UVB zdroje, (viz obr. 7).



Obr. 7: Ozařování buněčných kultur UVA a UVB zdrojem.

4.6.4 Pozorování viability buněk po dobu 9 dnů

Pomocí MTT testu je možné stanovit životaschopnost buněk. Princip testu MTT spočívá v tom, že u většiny životaschopných buněk je mitochondriální aktivita konstantní, a proto zvýšení či snížení počtu životaschopných buněk souvisí lineárně s mitochondriální aktivitou. Mitochondriální aktivita buněk se odráží přeměnou barviva MTT 3- (4,5- dimethylthiazol – 2-yl) -2,5- difenyl tetrazolium bromid na jeho vodou nerozpustný formazan, jehož barva je intenzivně fialová. Množství produkovaného formazanu

živými buňkami je tedy přímo úměrné počtu životaschopných buněk (Van Meerloo a kol. 2011). Princip metody spočívá na základě Lambert-Beerova zákona, tedy se zvyšující se koncentrací formazanových krystalů, které jsou produkovány živými buňkami, se zvyšují také hodnoty absorbance.

Po extrakci buněk byly analytické mikroděstičky inkubovány v růstovém médiu po dobu 24 hodin při konstantní teplotě 37 °C a atmosféře obsahující 5 % CO₂. Po výměně růstového média za 80 µl roztoku PBS-G, adherované buňky na destičkách, prošly expozicí UVA a UVB zdrojem v pravidelném časovém rozmezí, následně bylo přidáno 220 µl růstového média a opět byly vloženy do inkubátoru. Po 24 hodinové inkubaci bylo růstové médium zředěno v poměru 1:10 s pracovním roztokem (5 mg MTT na 1 ml, růstového média), tak že výsledná koncentrace MTT v růstovém médiu byla 0,5 mg/ml. Poté byly opět destičky vloženy do inkubátoru na 3 hodiny. Po inkubaci bylo růstové médium odsáto a do jamek přidáno 100 µl rozpouštědla dimethylsulfoxidu DMSO. Pro stanovení absorbance odpovídající koncentraci formazanových krystalů byly destičky přeneseny do spektrofotometru Tecan – Infinite M200 PRO. Nastavení přístroje probíhalo obdobně, jako v měření produkce ROS v kožních buňkách HaCaT, avšak tentokrát byla měřena absorbance při 570 nm. Výsledná data byla zpracována v programu MS Excel 2016.



Obr. 8: Spektrofotometr Tecan – Infinite M200 PRO.

4.6.5 Stanovení produkce peroxidu vodíku

Princip detekce produkovaného peroxidu vodíku H_2O_2 , je založen na fluorescenční značce Amplex Red. Amplex Red (N-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin) je bezbarvý derivát dihydroresorufinu, jež vchází do reakce s peroxidem vodíku v přítomnosti peroxidázy ve stechiometrii 1:1 a hodnotí extracelulární přítomnost peroxidu vodíku. Vlivem UV záření dochází k produkci peroxidu vodíku běžně, obzvláště pokud jsou ve vodných roztocích přítomny organické látky. Peroxid vodíku je však látka, která proniká snadno přes buněčné membrány, a proto i část intracelulární produkce se může dostat do extracelulárního prostředí a reagovat s fluorescenční značkou Amplex Red v přítomnosti peroxidázy na vysoce fluorescenční produkt tzv. resorufin. Maximum emise probíhá na hodnotách vlnové délky 590 nm a excitace na 535 nm (Zhou a kol. 1997).

Po 24 hodinové inkubaci bylo z analytických mikrodestiček odebráno růstové médium. Za předpokladu přilnutých buněk na dně jamek destiček bylo aplikováno opět 80 μ l zásobního a pracovního roztoku s fluorescenční sondou Amplex Red (PBS + Glukóza 5mM, Amplex Red 50 μ M, HRP 0,125 U/ml). Poté byly buňky ozařovány UVA a UVB zdrojem ve stanovených časových intervalech. Následně byly 96-jamkové destičky přeneseny do spektrofotometru pro luminiscenci – Infinite M200 PRO. Měření emise probíhá na vlnové délce 590 nm při excitaci 535 nm. Výsledná data byly zpracována v programu MS Excel 2016.

4.6.6 Stanovení produkce ROS v buňkách

Tato technika spočívá v pasivní difúzi nefluorescenční látky 2', 7' – dichlordihydrofluoresceinu diacetátu (H_2DCFDA), případně jejich derivátů (např. chlormetylový CM- H_2DCFDA) do buněk a uvnitř cytosolu došlo k odstraňování acetátových skupin esterázami, za vzniku nefluorescenčního produktu 2, 7-dichlorodihydrofluoresceinu (H_2DCF). Tato látka v blízkosti ROS, zejména peroxidu vodíku H_2O_2 oxiduje, což má za následek intracelulární produkci vysoce fluorescenční látky DCF. V menší míře může být látka H_2DCF nepřímo citlivá na singletový kyslík, který může nepřímo přispívat tvorbě DCF prostřednictvím jeho reakce s buněčnými substráty produkující peroxidové produkty či peroxylové radikály. DCF se detekuje pomocí fluorescenční spektrometrií při excitaci 480 nm a emisi 530 nm (Reineirs a kol., 2011).

Před expozicí HaCaT buněk UV zářením, bylo nahrazeno růstové médium roztokem PBS-G se 6 μ M CM- H_2DCFDA a poté byly buňky ozařovány UVA a UVB zdrojem po stanovených časových intervalech. Po ozáření byly analytické mikrodestičky přeneseny do

spektrofotometru Tecan – Infinite M200 PRO. Výsledné hodnoty byly zpracovány v programu MS Excel 2016.

4.6.7 Stanovení produkce singletového kyslíku v buňkách

Fluorescenční značka Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) je vysoce selektivní pro detekci singletového kyslíku $^1\text{O}_2$ a zároveň nevykazuje žádnou výraznou odpověď hydroxylového radikálu ($\text{OH}\cdot$) nebo superoxidu ($\text{O}_2\cdot^-$). V přítomnosti singletového kyslíku, tato fluorescenční sonda vykazuje zelenou fluorescenci.

HaCaT buňky v 96-jamkových destičkách byly inkubovány v růstovém médiu po dobu 24 hodin při konstantní teplotě 37 °C a atmosféře obsahující 5 % CO_2 . Po 24 hodinové inkubaci bylo odsáto růstové médium a do jamek 96- jamkové destičky bylo přidáno 80 μl zásobního a pracovního roztoku (PBS + Glukóza 5mM, SOSG 2 μM). Poté byly buňky ozařovány UVA a UVB zdrojem v pravidelných časových intervalech. Následně byly analytické mikrodestičky přeneseny do spektrofotometru pro luminiscenci – Infinite M200 PRO. Měření excitace probíhá na vlnové délce 488 nm a emise na 525 nm. Výsledná data náhle byla zpracována v programu MS Excel 2016.

4.6.8 Stanovení změn mitochondriálního membránového potenciálu

Za pomoci kationtové fluorescenční sondy MitoTracker Orange je možné měřit potenciál mitochondriální membrány v buňkách. MitoTracker orange je kationt a může volně difundovat přes plazmatickou membránu buňky a na základě jejího redoxního potenciálu se dokáže akumulovat v aktivních a životaschopných mitochondriích buněk v závislosti na velikosti náboje na membráně, tzv. velikosti membránového potenciálu. Intenzita fluorescence je závislá na gradientu membránového redoxního potenciálu mitochondrií (Scorrano a kol. 1999).

Do 96-jamkových destiček bylo laboratorní pipetou aplikováno místo růstového média, 80 μl PBS-G, poté se byly buňky ozařovány UVA a UVB zdrojem po stanovených časových intervalech. Po ozáření bylo do jamek přidáno stejné množství roztoku PBS-G, avšak nyní s 400 nM MT Orange (výsledná koncentrace byla 200 nM). Použitá sonda byla inkubována s buňkami po dobu 20 minut. Následně byly analytické mikrodestičky přeneseny do spektrofotometru Tecan – Infinite M200 PRO. Měření fluorescence probíhá na vlnové délce 544 nm a emise na 576 nm. Výsledná data náhle byla zpracována v programu MS Excel 2016.

5. VÝSLEDKY:

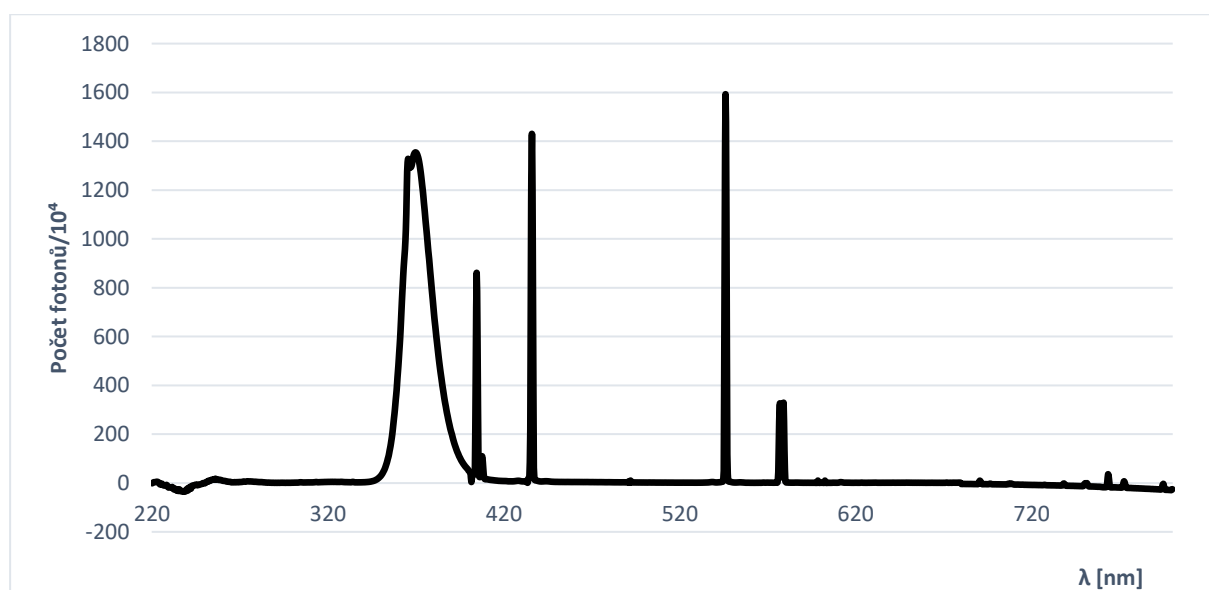
5.1 Měření spektra UV zdrojů

Nejprve bylo nutné proměřit spektra UVA a UVB zářičů, které byly použity v laboratoři k ozařování HaCaT buněk. Zářiče byly proměřeny spektrofluorimetrem FLS-980, jehož největší výhodou je použití dvojitých monochromátorů. V porovnání s jednoduchým monochromátorem dokážou poskytnout větší disperzi a u luminiscenčních spektrometrů se projeví lepším poměrem signál/šum. Naměřená spektra vykazují závislost četnosti fotonů použitého UV zdroje na vlnové délce.

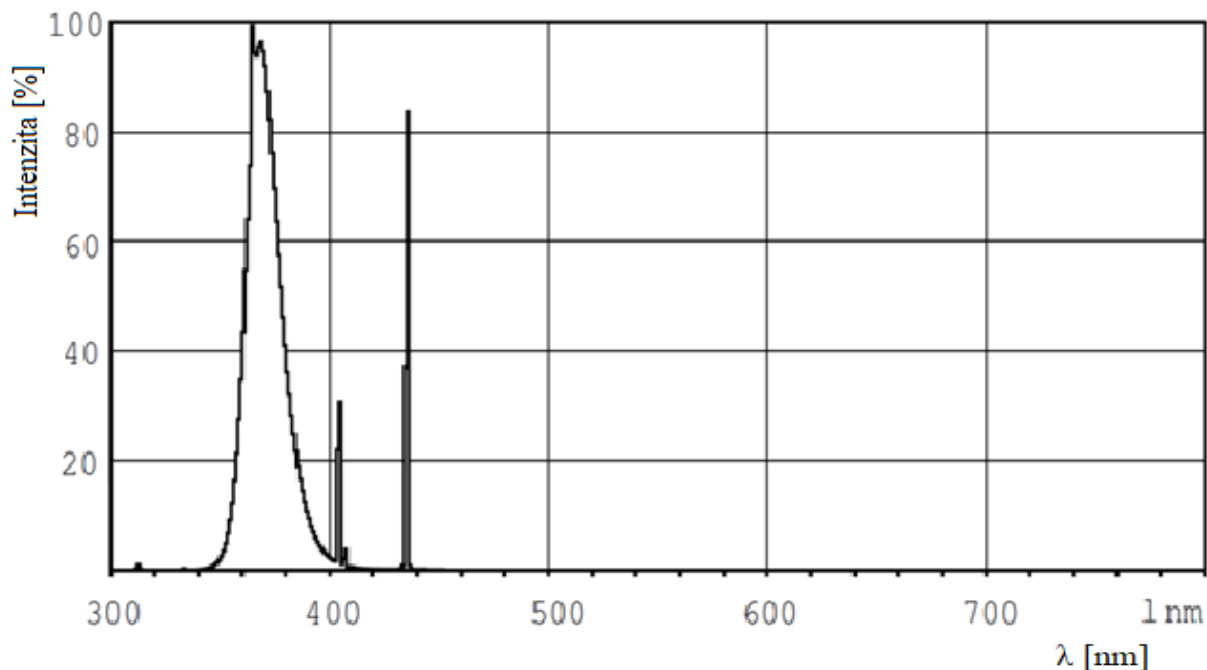
5.1.1 Spektrum UVA zdroje

UVA záření je členěno na dvě podsložky, UVA1 záření o vlnových délkách 340-400 nm a UVA2 záření o vlnových délkách 315-340 nm. Graf č. 1 představuje závislost četnosti fotonů UVA zdroje na vlnové délce. Při tvorbě grafu byl kladen důraz na odečtení pozadí neboli šumu, které je způsobeno vniknutím okolního světla v laboratoři do štěrbiny spektrometru z důvodu velkého rozměru zářiče, kdy poklop přístroje nemohl být dostatečně utěsněn.

Změřené spektrum pozadí však ukázalo zanedbatelný vliv na vyzařovacích charakteristikách UV zdrojů. Maximálních hodnot v počtech registrovaných fotonů bylo zaznamenáno ve viditelné oblasti, a to s hodnotou kolem $5 \cdot 10^3$ při takto nastavených parametrech.



Graf č. 1: Emisní spektrum UVA zdroje.



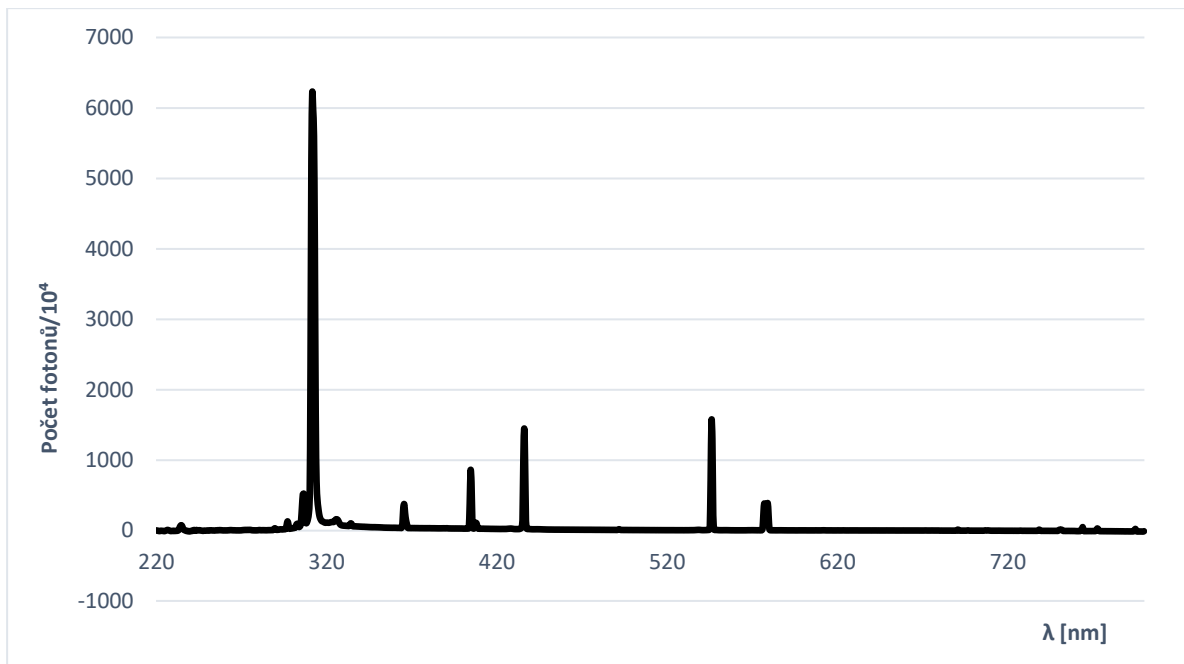
Obr. 9: Vyzařovací charakteristika UVA trubice daná výrobcem. Převzato

(<https://www.assets.signify.com/is/content/PhilipsLighting/fp927903421007-pss-global>)

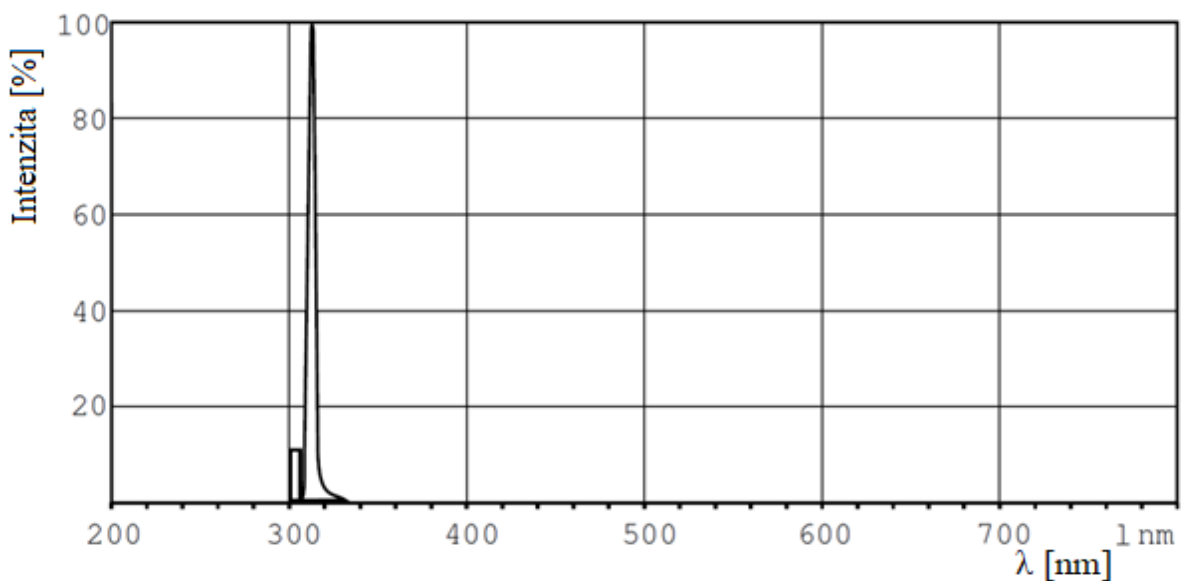
Z grafu č. 1 můžeme vyčíst vyzařování UVA zdroje na rozmezí hodnot 352-395 nm vlnové délky. Tyto hodnoty vlnových délek odpovídají UVA1 zdroji záření. Naměřením spektra jsme ověřili vyzařovací charakteristikou UVA trubice danou výrobcem, viz obrázek č.7. Nalezený peak v rozmezí hodnot vlnových délek 352 až 395 nm se zcela shoduje se spektrem od výrobce. Avšak rozdíl obou spekter můžeme najít ve viditelné oblasti, kde u naměřené vyzařovací charakteristiky se objevují spektrální čáry, naopak ve spektru daným výrobcem tyto spektrální čáry chybí. Úspěšně byl ověřen charakter použitého UVA zdroje a výsledky v následujících metodách tak představují větší kvalitu.

5.1.2 Spektrum UVB zdroje

Vlnové délky UVB záření se pohybují v intervalu hodnot vlnových délek od 280 nm po 315 nm. Graf č. 2 představuje závislost četnosti fotonů UVB zdroje na vlnové délce. Při tvorbě grafu byl opět kladen důraz na odečtení pozadí neboli šumu, které jsou způsobeny vniknutím okolního světla v laboratoři z důvodu velkého rozměru zářiče, kdy poklop přístroje nemohl být dostatečně utěsněn.



Graf č. 2: Emisní spektrum UVB zdroje.



Obr. 10: Vyzařovací charakteristika UVB trubice daná výrobcem. Převzato (<https://www.assets.signify.com/is/content/PhilipsLighting/fp927903400121-pss-global>)

Z grafu č. 2 můžeme nalézt vyzařování UVB zdroje na rozmezí hodnot vlnových délek 308 až 315 nm, které zcela odpovídají UVB zdroji záření. Naměřené spektrum potvrdilo vyzařovací charakteristiku UVB trubice danou výrobcem, viz obrázek č. 8. Nalezený peak v rozmezí hodnot vlnových déle 308 až 320 nm zcela odpovídá peaku ve spektru

daném výrobcem zářiče. Avšak opět můžeme pozorovat spektrální čáry objevující se ve viditelné oblasti, jež ve spektru daném výrobcem zcela chybí. Charakter použitého UVB zdroje byl ověřen a výsledky v následujících metodách jsou tak reprodukovatelné.

5.2 Pozorování viability buněk po dobu 9 dnů

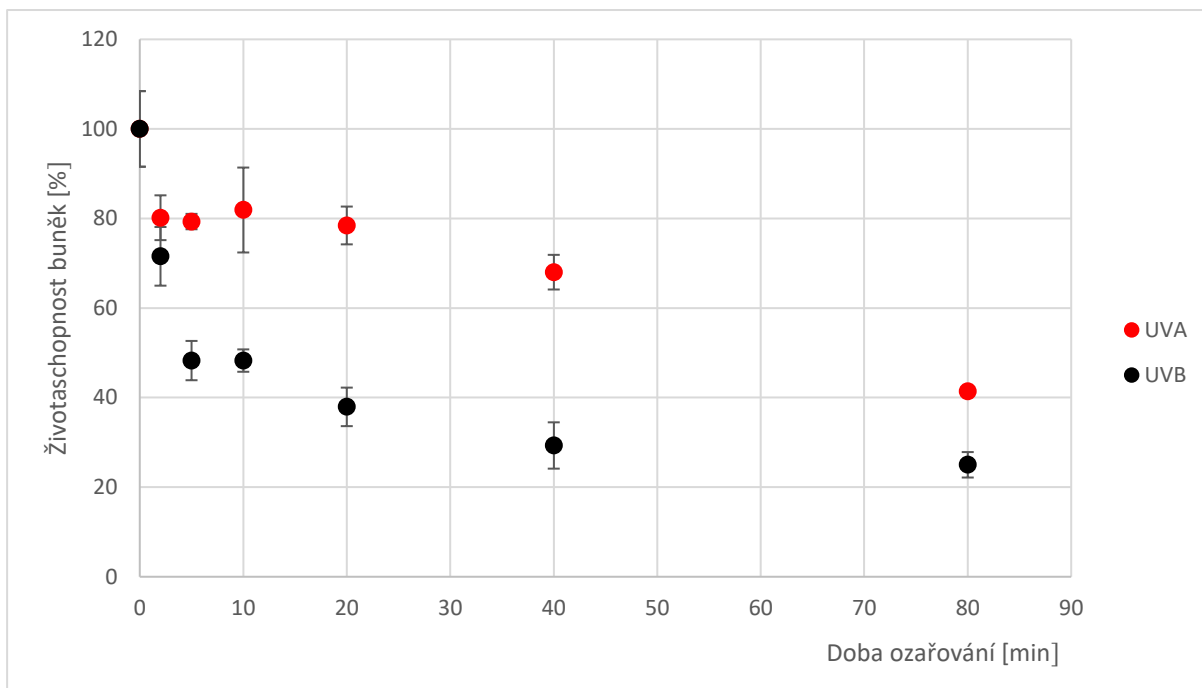
Cílem zvolené metody je sledování životaschopnosti HaCaT buněk ozářené UVA a UVB zdrojem, 0, 2, 5, 10, 20, 40 a 80 minut po dobu devíti dnů. Konkrétně bylo prováděno pozorování životaschopnosti buněk první druhý, čtvrtý, šestý a devátý den. Tato studie nám pomůže více nahlédnout do procesů spojených se schopností buněk vypořádat se se škodlivými účinky UVA a UVB záření. Životaschopnost buněk byla detekována pomocí značky MTT pracující na základě přeměny tetrazoliového barviva na formazanové krystaly fialové barvy. Koncentrace formazanových krystalů je přímo úměrná počtu životaschopných buněk. Spektrofotometr pro luminiscenci nám vydal hodnoty absorbance, jež vychází z Lambert-Beerova zákona, tedy se zvyšující se absorbancí se bude zvyšovat i koncentrace formazanových krystalů, jež jsou produkovány živými buňkami.

Buněčné médium bylo aplikováno do prostředních řad 96-jamkové destičky z důvodu eliminace vzniku možných artefaktů. Na každý pozorovací den byly k dispozici 4 jamky z 96- jamkové destičky a v ranních hodinách byl k buněčnému médiu aplikován pracovní roztok se značkou MTT. Hodnoty absorbance byly zprůměrovány a byla určena nejistota typu A dle vztahu

$$u_{(A)} = k_A \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{i \cdot (i-1)}}, \quad (3)$$

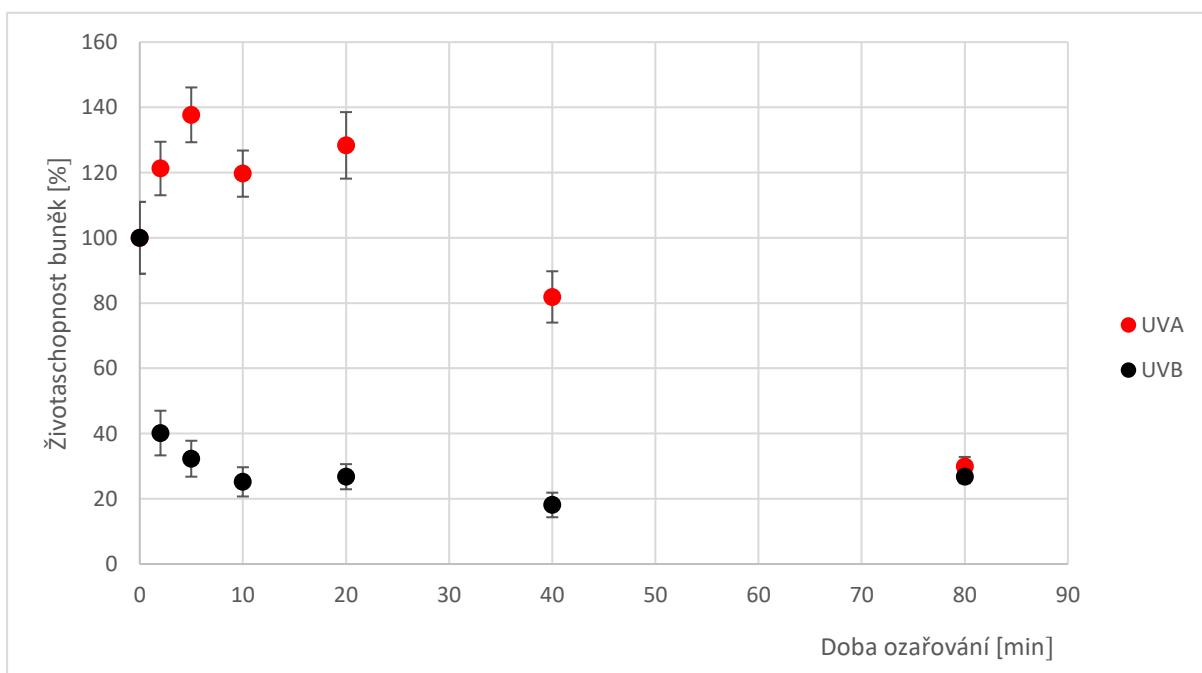
kde $u_{(A)}$ je hodnota směrodatné odchylky, x značí námi naměřenou hodnotu veličiny, i je počet měření a k_A značí koeficient počtu malých dat. Pro 4 hodnoty, koeficient k_A činí 1,7.

Následně byly sestrojeny grafy č. 3 až č. 7 znázorňující průběh mechanismů v buňkách po ozáření UVA a UVB zdrojem.

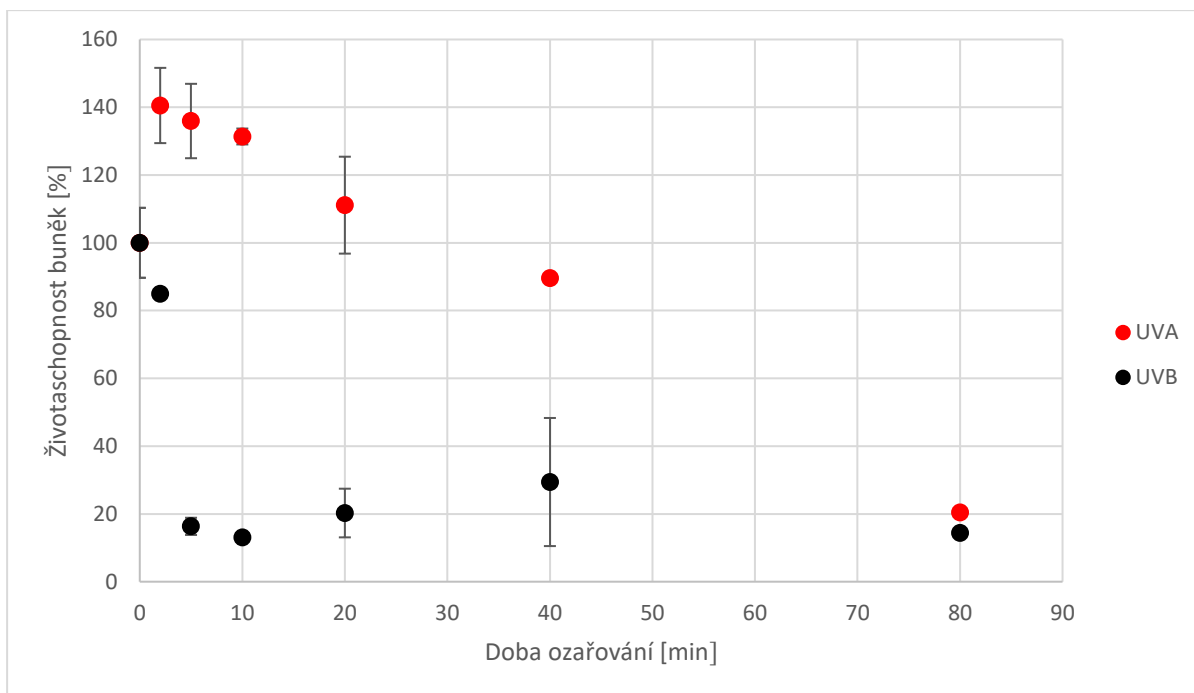


Graf č. 3: Graf zobrazující první den pozorování životaschopnosti buněk ozářených UVA a UVB zdrojem. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD ($n =$).

První den pozorování vykazuje značný pokles koncentrace životaschopných buněk, schopné produkovat krystaly formazanu, ozářené jak UVA, tak i UVB zdrojem. Markantní pokles je však značný po expozici UVB zářením, kde množství buněk po 80 minutách ozařování, klesl téměř na 25 % s relativní odchylkou měření 2,84 %, zatímco po UVA expozici, výsledná koncentrace buněk po 80 minutové expozici klesla na 41 %.

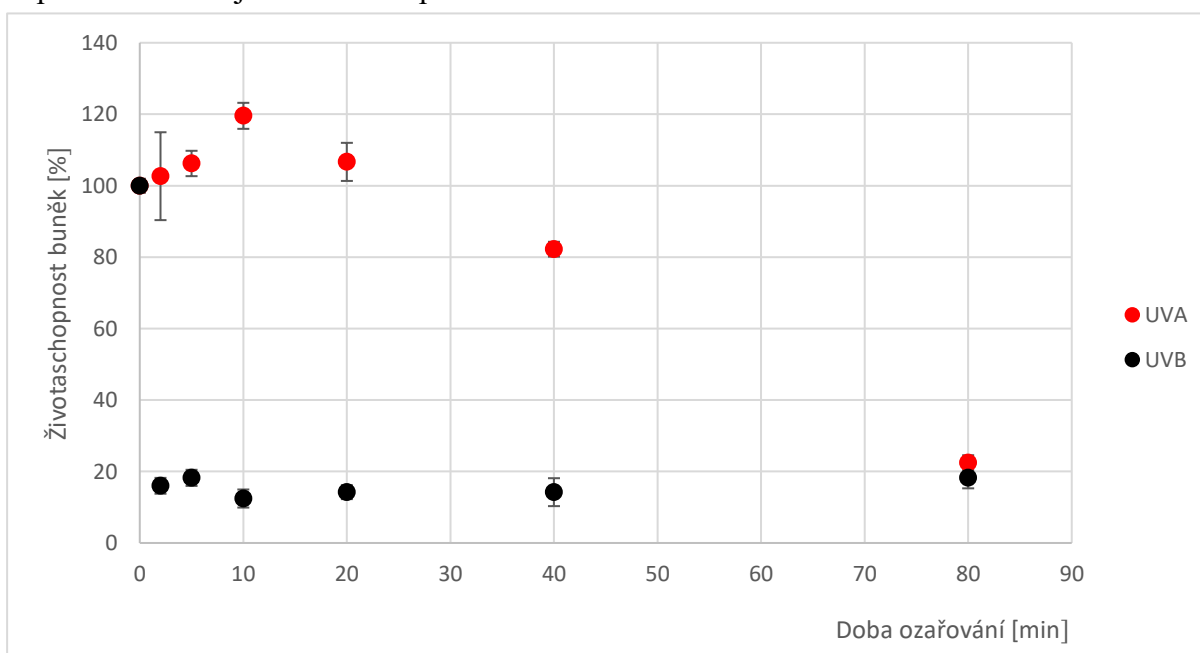


Graf č. 4: Graf zobrazující druhý den pozorování životaschopnosti buněk ozářených UVA a UVB zdrojem. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD ($n = 4$).



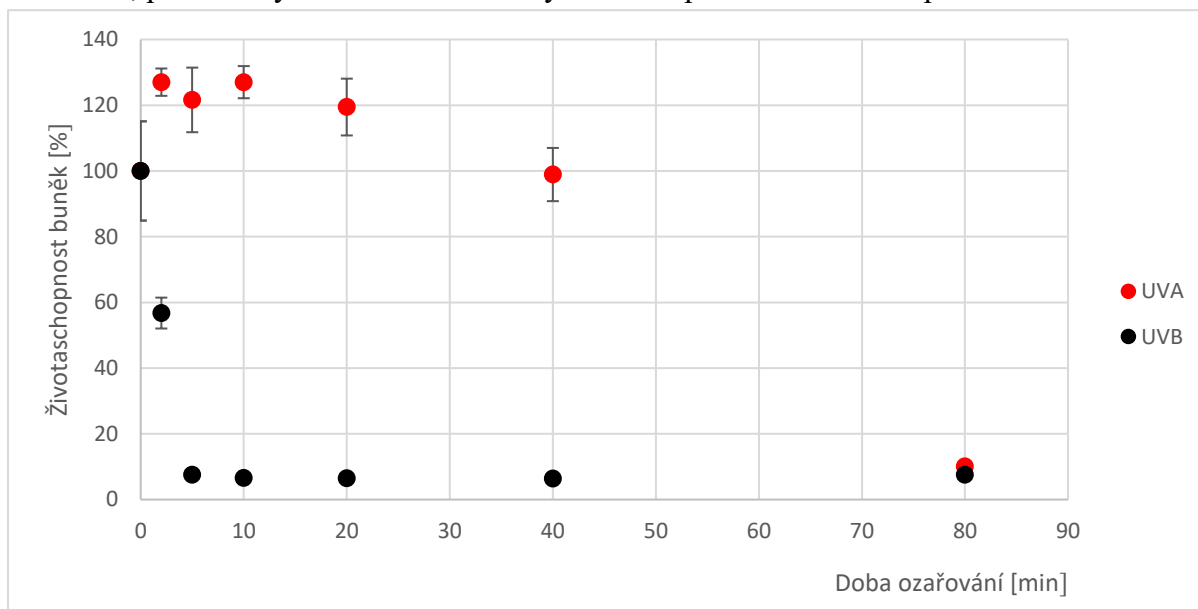
Graf č. 5: Graf zobrazující čtvrtý den pozorování životaschopnosti buněk ozářených UVA a UVB zdrojem. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD ($n = 4$).

Druhý a čtvrtý den pozorování, vykreslené v grafech č. 4 a č. 5, vykazují téměř srovnatelný průběh. Po expozici UVA záření, se množství buněk v prvních minutách se zvětšilo téměř o 40 % a následným rapidním úbytkem až k 20 % po 80 minutové expozici. Buňky ozářené UVB světlem zcela ztrácí životaschopnost již po 2 minutách ozáření a po 80 minutové expozici sníží svoji koncentraci pod 20 %.



Graf č. 6: Graf zobrazující šestý den pozorování životaschopnosti buněk ozářených UVA a UVB zdrojem. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD ($n = 4$).

Šestý den pozorování, znázorněný v grafu č. 6, vykazuje pouze 20 % navýšení koncentrace životaschopných buněk, schopné produkovat krystaly formazanu po 10 minutové expozici UVA zdrojem a po 80 minutové expozici, výsledné množství živých buněk kleslo na pouhých 22 %. UVB expozice opět znázorňuje markantní pokles již po 2 minutách ozařování, přičemž výsledné množství živých buněk po 80 minutové expozici činí 18 %.



Graf č. 7: Graf zobrazující devátý den pozorování životaschopnosti buněk ozářených UVA a UVB zdrojem. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD ($n = 4$).

V grafu č. 7 je vykreslen průběh životaschopnosti buněk v devátém dnu pozorování. UVA expozice způsobuje hned po 2 minutách ozáření nárůst životaschopných buněk schopných produkovat krystaly formazanu o 27 %, poté následuje téměř lineární pokles množství živých buněk na pouhých 10 %. Expozice UVB zářením, značí opět pokles již po 2 minutém ozařování a výsledná koncentrace po 80 minutách činí pouhých 8 % životaschopných buněk.

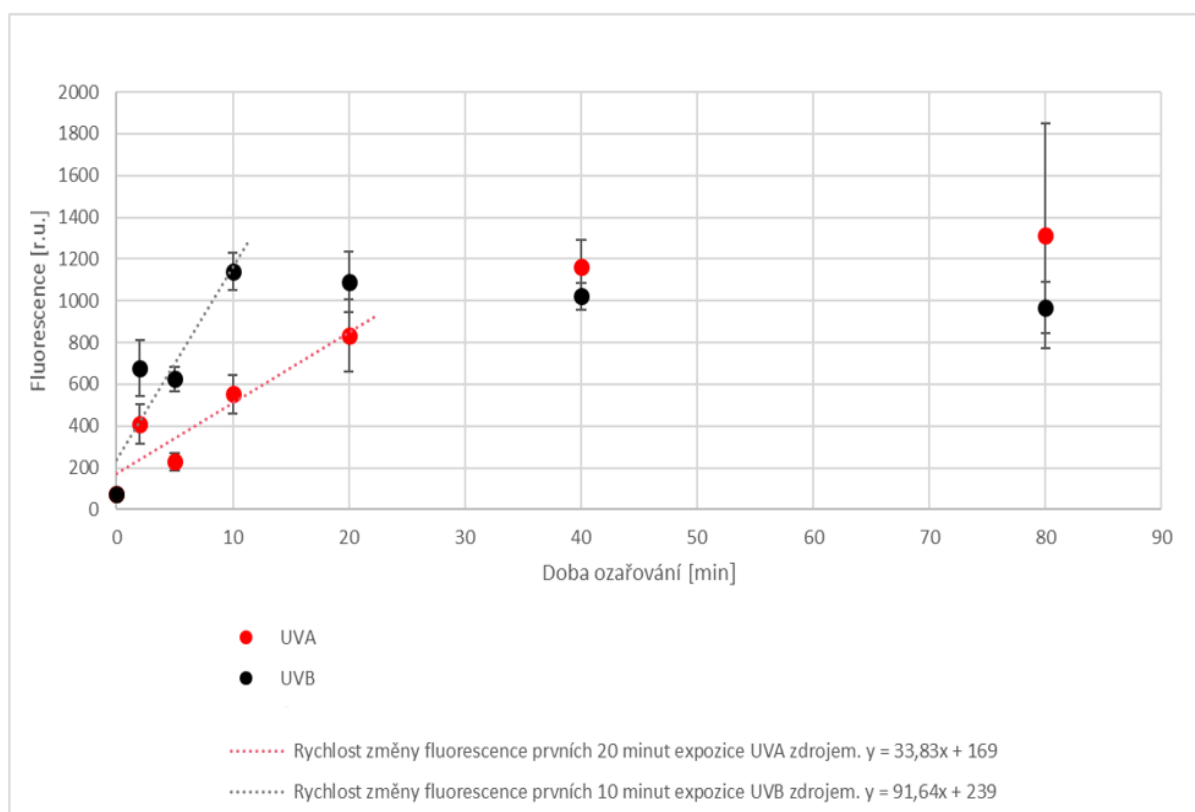
5.3 Detekce produkce peroxidu vodíku

Expozice 96-jamkových destiček s buněčným médiem a pracovním roztokem fluorescenční sondy Amplex Red byla provedena obdobným způsobem jako předchozí měření v časových intervalech 0, 2, 5, 10, 20, 40, 80 minut ozařování. Buňky s pracovním roztokem byly opět záměrně aplikovány do prostředních pěti jamek 96-jamkové destičky z důvodu eliminace působení okolních rušivých vlivů.

Ozařování UVA a UVB zdrojem probíhalo zároveň v uzavřeném flow boxu. Pomocí laboratorního přístroje spektrofotometru– Infinite M200 PRO byly detekovány hodnoty

intenzity fluorescence, která je vyvolaná vysoce fluorescenčním produktem roserufinem v reakci fluorescenční značky Amplex Red s peroxidem vodíku v přítomnosti peroxidázy. Z výsledných hodnot intenzity fluorescence byla naleznuta průměrná hodnota a dále byly určeny nejistoty typu A. Následně byl sestrojen graf č. 8 závislosti intenzity fluorescence na dávce ozáření HaCaT buněk UVA a UVB zářením.

Předpokládaný vliv použité fluorescenční značky je takový, že s rostoucím časem expozice by hodnoty intenzity fluorescence značící produkci peroxidu vodíku, měly mít v ideálním případě lineární průběh. Tomuto předpokladu také téměř naše naměřené výsledky odpovídají, viz graf č. 8.



Graf č. 8: Detekce produkce peroxidu vodíku způsobené fluorescenční značkou Amplex Red po expozici UVA a UVB zářičem. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD ($n = 5$).

HaCaT buňky ozářené UVA zdrojem dle grafu č. 8 vykazují téměř lineární závislost produkce reaktivní formy, zejména peroxidu vodíku, na času expozice, avšak po 80 minutách ozáření bylo dopuštěno markantní relativní odchylky činící 41,14 %. Naopak po expozici UVB zdrojem, HaCaT buňky dosahují maximum své produkce peroxidu vodíku již na 10 minutě, přičemž bylo dopuštěno chyby měření 7,7 % a poté produkce reaktivních forem vykazuje mírný pokles. Největší relativní odchylky bylo dopuštěno na 20 minutě, jejíž hodnota

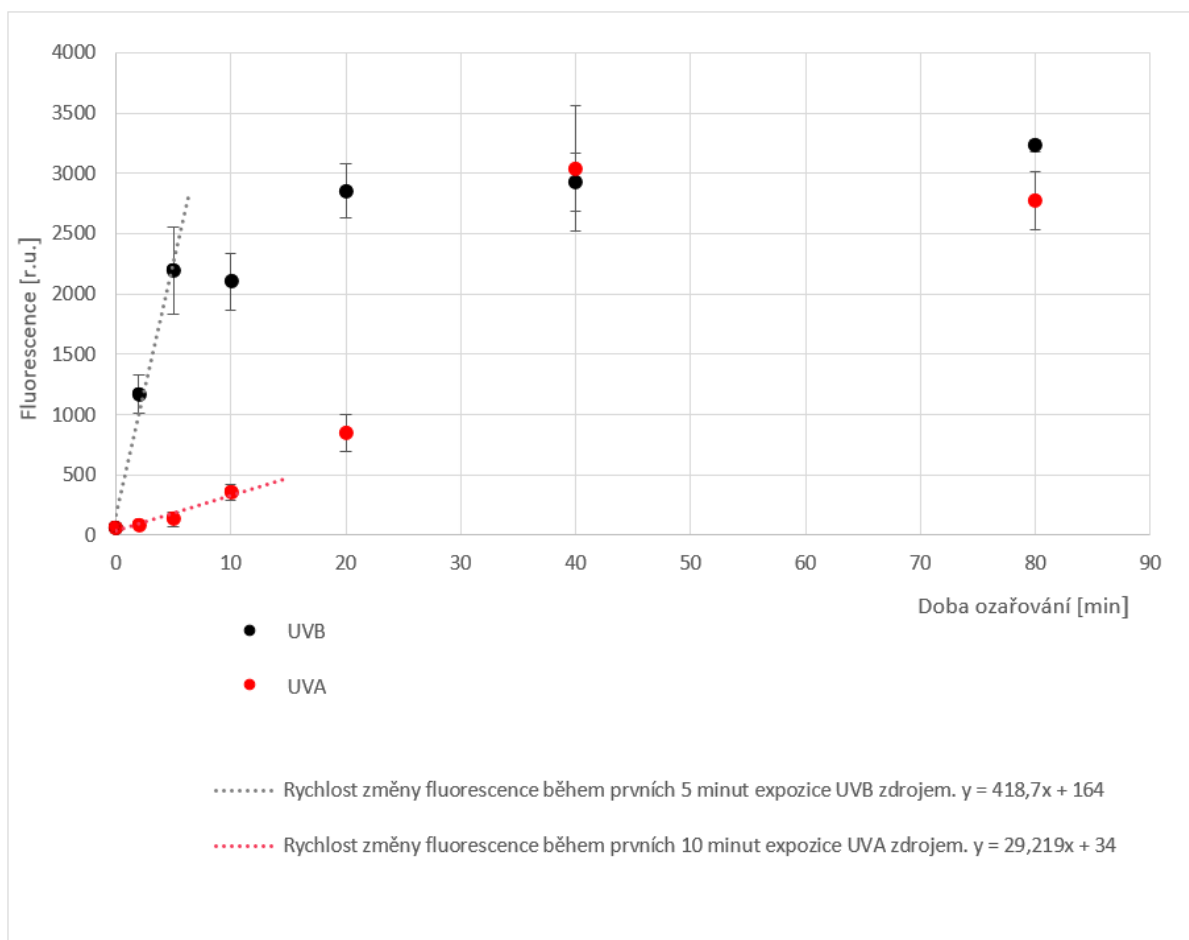
činí 12,78 %. Rychlost změny fluorescence jsme charakterizovali regresní křivkou prvních 20 minut expozice UVA zdrojem a pro UVB zdroj prvních 10 minut expozice. Směrnice regresní křivky značí nárůst změny fluorescence, viz graf č. 8.

Tento značný rozdíl průběhů hodnot fluorescence můžeme opět připsat vyšší energii a kratším vlnovým délkám UVB záření oproti UVA záření.

5.4 Stanovení produkce ROS v buňkách

Buňky s pracovním roztokem byly opět aplikovány záměrně do prostředních jamek, z důvodu eliminace okolních rušivých elementů. Pro každou dávku ozáření bylo k dispozici 5 jamek z 96-jamkové destičky pro fluorescenční značku DCF.

Hodnoty produkce reaktivních forem kyslíku nám spektrofotometr–Infinite M200 PRO vydal ve formě hodnot intenzity fluorescence, které by se v ideálním případě měly zvyšovat spolu s rostoucím časem expozice buněk. U zdravých neozářených buněk jsou kyslíkové radikály eliminovány různými buněčnými enzymy či přírodními antioxidanty, a tudíž hodnoty fluorescence by měly být minimální na rozdíl od buněk postižených expozicí UVA a UVB zdrojem. Hodnoty intenzity fluorescence byly zprůměrovány a byla určena nejistoty typu A dle vztahu č. 3. Tentokrát koeficient k_A pro 5 hodnot činí 1,4. Následně byl sestrojen graf č. 9 závislosti velikost intenzity fluorescence na dávce ozáření pro UVA a UVB zářič.



Graf č. 9: Detekce produkce H_2O_2 pomocí fluorescenční sondy DCF po expozici UVA a UVB zářičem. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD ($n = 5$).

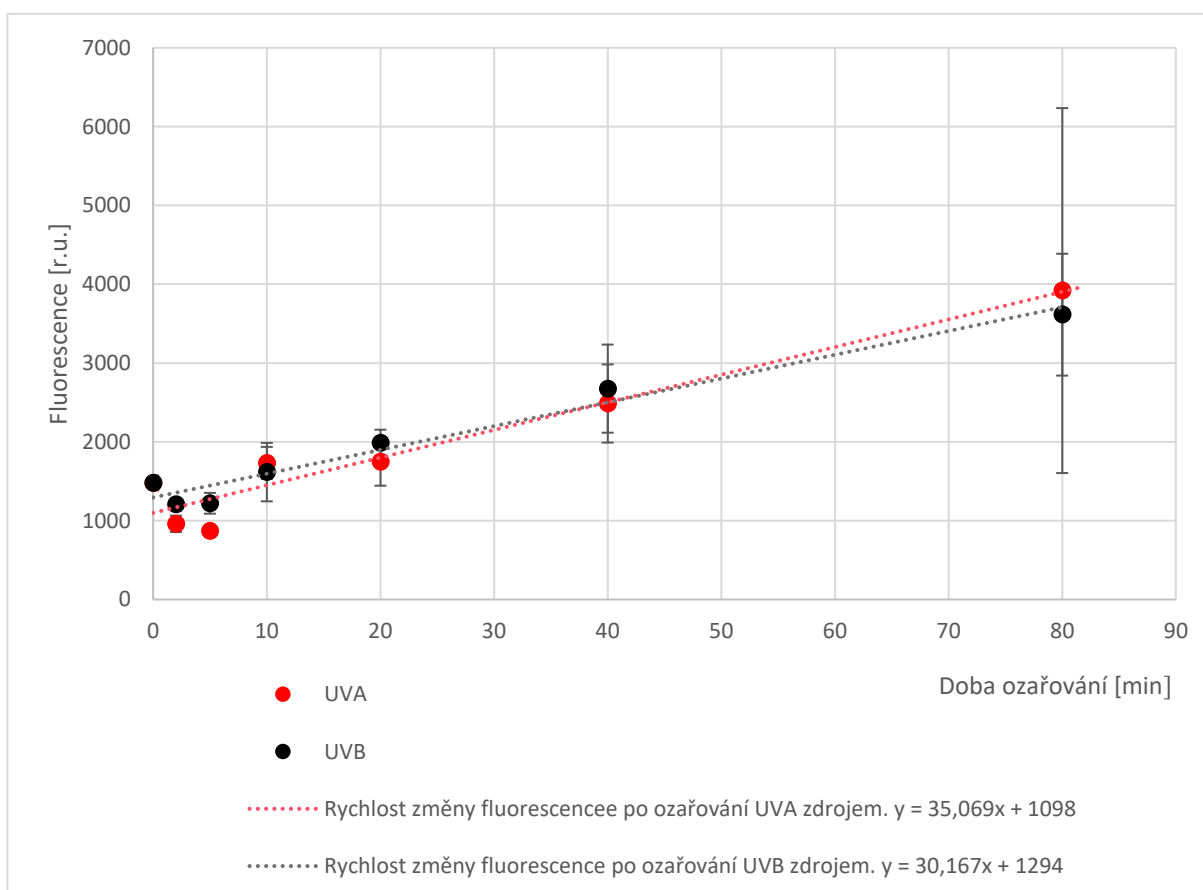
Z grafu č. 9 je možné zpozorovat srovnání průběhů produkce reaktivních forem kyslíku, zejména peroxidu vodíku, po expozici jak UVA zářením, tak i UVB zářením. Při takto nastavených podmínkách měření došlo k nasycení fluorescenční sondy H_2O_2 u UVB záření již po 20 minutách, oproti UVA záření, které dosáhlo maximum svého nasycení až po 40 minutách a kde se zároveň dopouštíme velké relativní odchylky činící 18,8 %.

V porovnání obou průběhů můžeme zpozorovat velké rozdíly v rychlosti změny fluorescence, znázorňující produkci ROS, zejména peroxidu vodíku H_2O_2 . U expozice UVA zářením dochází v prvních 10 minutách k poklidnému přírůstku ROS. Rozdíl změny nárůstu fluorescence jsme charakterizovali regresní křivkou prvních 10 minut expozice UVA zdrojem záření a pro UVB záření byla sestrojena regresní křivka prvních 5 minut expozice. Směrnice regresních křivek značí nárůst změny fluorescence, viz graf č. 9.

5.5 Stanovení produkce singletového kyslíku v buňkách

Buňky s pracovním roztokem byly opět záměrně aplikovány do prostředních jamek, z důvodu eliminace okolních rušivých elementů. Pro každou dávku ozáření bylo tedy k dispozici 5 jamek z 96-jamkové destičky pro fluorescenční značku SOSG.

Ozařování UVA a UVB zdrojem probíhalo zároveň v uzavřeném flow boxu v obdobných časových intervalech jako u předešlých fluorescenčních sond, tedy 0, 2, 5, 10, 20, 40 a 80 minut expozice UVA a UVB zdrojem záření. Hodnoty produkce singletového kyslíku nám spektrofotometru pro luminiscenci – Infinite M200 PRO opět vydal ve formě hodnot intenzity fluorescence, které by se v ideálním případě měly zvyšovat spolu s rostoucím časem expozice HaCaT buněk. Tato hypotéza byla ověřena viz graf č. 10 až na malé kolísání hodnot u druhé a páté minuty po expozici obou UV zdrojů. Hodnoty intenzity fluorescence byly zprůměrovány a dále byly určeny nejistoty typu A. Následně byl sestaven graf č. 10 závislosti velikosti intenzity fluorescence na době ozáření HaCaT buněk UVA a UVB zářením.



Graf č. 10: Detekce produkce singletového kyslíku 1O_2 pomocí fluorescenční sondy SOSG po expozici UVA a UVB zářičem. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD ($n = 5$).

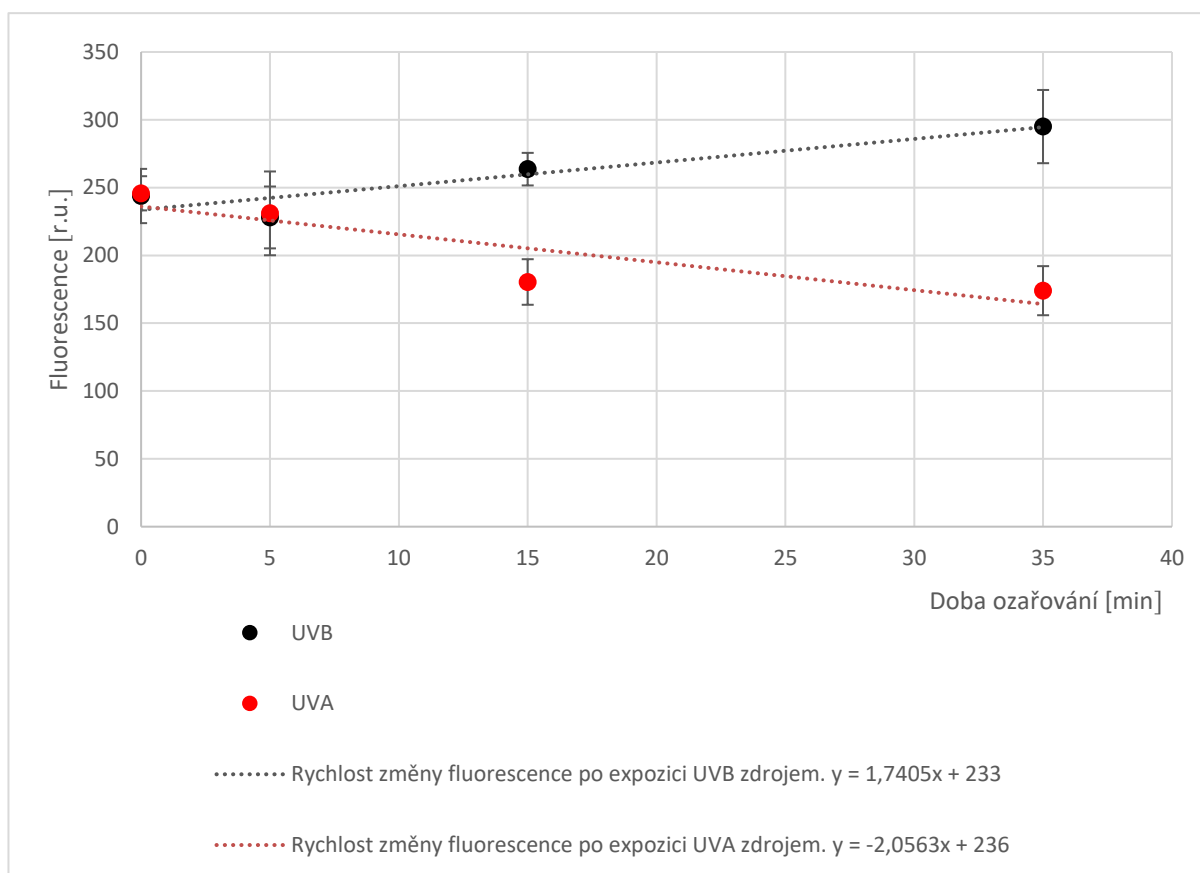
V grafu č. 10 je možné zpozorovat srovnání průběhů produkce singletového kyslíku po expozici jak UVA zářením, tak i UVB zářením. Můžeme zde zpozorovat téměř lineární nárůst produkce singletového kyslíku v závislosti na čase expozici UVA a UVB zdrojem. Mírný pokles se nachází mezi druhou a pátou minutou, přičemž tento zajímavý fenomén je zrcadlen v obou případech. Při ozařování UVA zdrojem se dopouštíme značné relativní odchylky při 80 minutové expozici až 59,06 %. Identicky v grafu nacházíme značnou relativní odchylku 80 minutové expozici 21,31 % pro UVB záření.

Rychlost změny fluorescence jsme charakterizovali regresními křivkami 80 minutové expozice UVA a UVB zdroj, znázorněné v grafu č. 10. Směrnice regresních křivek pro jednotlivé UV zdroje značí rychlost změny nárůstu fluorescence.

5.6 Stanovení změn mitochondriálního membránového potenciálu

Buňky s pracovním roztokem byly opět záměrně aplikovány do prostředních jamek, z důvodu eliminace okolních rušivých elementů. Pro každou dávkou ozáření bylo k dispozici 5 jamek z 96- jamkové destičky pro fluorescenční značku MitoTracker Orange. Ozařování UVA a UVB zdrojem probíhalo zároveň v uzavřeném flow boxu. Hodnoty intenzity fluorescence byly zprůměrovány a dále byly určeny nejistota typu A. Následně byl sestrojen graf č. 11 závislosti velikost intenzity fluorescence na dávce ozáření HaCaT buněk UVA a UVB zářením.

Ozařování HaCaT buněk probíhalo obdobným způsobem jako v předchozích případech, avšak jiných časových intervalech. Časové intervaly byly zvoleny na 0, 5, 15, 35 minut expozice. Byly změřeny hodnoty intenzity fluorescence, která značí množství buněk s aktivními mitochondriemi. Předpoklady by tedy měly být takové, že s přibývajícím dobou ozáření by se hodnoty intenzity fluorescence měly značně snižovat, v případě, že dochází k poškození mitochondrií, jež je spojeno s poklesem mitochondriálního membránového potenciálu. Naše naměřená data tomuto předpokladu však odpovídají pouze u ozařování UVA zdrojem, viz graf č. 11.



Graf č. 11: Detekce intenzity fluorescence způsobené fluorescenční značkou MitoTracker Orange po expozici UVA a UVB zářičem. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD ($n = 5$).

Graf č. 11 vykresluje porovnání průběhů vzniklé fluorescence v různých časových intervalech po expozici jak UVA, tak i UVB zářením. Můžeme zpozorovat mírný pokles po pěti minutách ozařování UVB zářičem, který odpovídá námi stanovenému předpokladu. Avšak v delších časech expozice, tedy na patnácté a třicáté minutě, buňky vykazují vyšší fluorescence než před samotným ozářením. Naopak vzniklá fluorescence po expozici UVA zdrojem má očekávaný průběh a ověřil tak naše stanovené předpoklady.

Rychlost změny fluorescence jsme charakterizovali regresní křivkou prvních 80 minut expozice UVA a UVB zdrojem. Směrnice regresní křivky značí nárůst změny fluorescence, viz graf č. 11.

6. DISKUZE:

Sluneční záření je tvořeno kontinuálním spektrem skládající se z řady oblastí. Na zemský povrch však nedopadají všechny, pouze část ultrafialového (UV), viditelného (VIS) a infračerveného záření (IR). Tato práce se zabývá zejména UV složkou, protože právě ona je schopná vyvolat řadu chronologických změn či akutních onemocnění v lidském organismu. Závažnost je dána individuálními faktory, jako jsou například, věk, pohlaví, ale také aktuální zdravotní stav jedince. Kvůli vnějšímu vystavení na povrchu těla, získává lidská kůže největší zátěž negativních účinků, jež plní funkci ochranné bariéry před vnějším okolím. Ta se však může dostat do kontaktu pouze s UVA a UVB složkou z celého UV spektra. Agresivní UVC paprsky záření jsou téměř pohlceny ozonovou vrstvou a svoji vysokou mutagenost a genotoxicitu neuplatní v patologických procesech kůže. Naopak složky UVA a UVB se zcela podílí na mechanismech vedoucí k poškození DNA, apoptóze buněk, inhibici růstu buněk a následným karcinogenním účinkům. Dlouhodobá či periodická opakovanost expozice má za následek nejzávažnější změny přispívající k tzv. předčasnému stárnutí kůže neboli fotostárnutí (Rajnochová Svobodová, 2012).

Fotostárnutí popisuje změny v klinických, histologických a funkčních vlastnostech kůže při obvyklém vystavení na slunci. Skládá se jak z chronologického slunečního poškození,

tak i z tzv. vnitřního nebo programovaného stárnutí. Obě však mají za následek nežádoucí změny vzhledu kůže, jako jsou například abnormální pigmentace, větší počet vrásek, vyschlost kůže a zažloutlá barva. Tyto rysy se vyskytují v oblastech těla, jež jsou často vystaveny slunečnímu záření, tedy krk, dekolt, obličej, předloktí a ruce. Nejvýznamnější epidermálními změnami jsou pigmentové změny, jako jsou lentiginy a difúzní hyperpigmentace. Podle nejnovějších studií je prokázáno, že proces fotostárnutí je obecně výraznější u jedinců se světlou pokožkou (Gilchrest a Krutmann 2006, Berneburg a kol. 2000).

Předčasné stárnutí postihuje všechny kožní vrstvy, nejvíce však pokožku (*epidermis*) a pojivou tkáň *dermis*. Typickým histologickým projevem je ztráta uspořádaného charakteru kolagenu a úbytek vláken. Tloušťka bazální membrány se zvětšuje, což pravděpodobně odráží poškození keratinocytů a distribuce melanocytů v bazální membráně je nepravidelná (Rajnochová Svobodová 2012; Berneburg a kol. 2000).

Proces předčasné stárnutí je především způsobeno masivní produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) po expozici UV zářením. Podmínkou vzniku těchto reaktivních forem kyslíku je pohlcení fotonů vhodnou endogenní či exogenní molekulou, jež odstartuje sérii biologických reakcí probíhající dvěma způsoby. První způsob, přímý mechanismus, je založen na přímé

absorpci UV fotonů danou molekulou. Druhý způsob, nepřímý mechanismus, může opět probíhat dvěma způsoby. Nepřímý mechanismus typu I zahrnuje přenos elektronu z excitovaného chromoforu na jinou molekulu, což má za následek tvorbu volných radikálů. Důležitým rozdílem od nepřímého mechanismu typu II je, že nevyžaduje přítomnost kyslíku pro vyvolání biologického poškození. Oproti tomu, nepřímý mechanismus typu II, využívá princip přenosu energie chromoforu na molekulární kyslík za tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS), jež mají schopnost atakovat ostatní makromolekuly a způsobovat jejich vážné poškození, zejména DNA, lipidů a proteinů. Mezi nejznámější reaktivní formy kyslíku řadíme hydroxylový radikál ($\text{OH}\cdot$), peroxy ($\text{ROO}\cdot$), alkoxy ($\text{RO}\cdot$), hydroperoxy ($\text{OH}_2\cdot$) a superoxid ($\text{O}_2\cdot^-$), představující tzv. radikálové reaktivní formy a mezi neradikálové reaktivní formy zařazujeme peroxid vodíku (H_2O_2), kyselinu chlornou (HClO), ozón (O_3) a singletový kyslík ($^1\text{O}_2$). Nadměrná produkce reaktivních forem kyslíku vede ke vzniku maligního nádoru a k samotné kancerogenezi. Na ochranu před ROS, jsou buňky vybaveny tzv. antioxidačním systémem, který má schopnost omezit aktivitu kyslíkových radikálů a chrání tak buňku před samotnou oxidací.

K detekci zmíněných reaktivních forem kyslíků (ROS), se často využívají tzv. fluorescenční barviva neboli fluorescenční značky. Fluorescence biologických objektů obvykle rozdělujeme na primární a sekundární. Primární fluorescence se vyskytuje přirozeně a říká se jim také autofluorescence. Sekundární fluorescence vyžaduje umělé vložení fluorescenčních sond či značek do objektu. Fluorescenční značka se nejčastěji používají k fluorescenčnímu značení různých makromolekul, například proteinů, lysozomů nebo lipidů, ke kterým se vážou kovalentní vazbou. V naší experimentální práci byly použity k detekci reaktivních forem kyslíku, zejména peroxidu vodíku H_2O_2 fluorescenční značka CM- H_2DCFDA a Amplex Red, k detekci singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$) fluorescenční značka Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) a k detekci membránového potenciálu mitochondrií, fluorescenční značka MitoTracker Orange (MT Orange). Tyto fluorescenční značky, zejména CM- H_2DCFDA byla použita nedávno v práci H. Kolářové a kol. (2007) zabývající se detekcí reaktivních forem kyslíku při fotodynamické reakci *in vitro*.

6.1 Pozorování viability buněk po dobu 9 dnů

Pomocí uvedené metody v kapitole 6.2 byla sledována životaschopnost HaCaT buněk, ozařované UVA a UVB zdrojem, v časových intervalech 0, 2, 5, 10, 20, 40 a 80 minut po dobu devíti dnů. Pozorovací dny byly stanoveny na první, druhý, čtvrtý, šestý a devátý den. Životaschopnost buněk byla detekována pomocí značky MTT, jež pracuje na principu přeměny

tetrazoliového barviva na formazanové krystaly. Koncentrace formazanových krystalů fialové barvy slouží jako odhad počtu mitochondrií, a proto počet životaschopných buněk ve vzorku. MTT značka je široce používána jako rychlá a citlivá metoda pro zobrazování protinádorových léčiv a hodnocení cytotoxicity materiálů (Wan a kol. 1994). Na rozdíl od ostatních tetrazoliových sloučenin (MTS, XTT a WST-1), MTT značka, díky jejímu kladnému náboji snadno proniká životaschopnými eukaryotickými buňkami a formazanový produkt MTT tetrazolia se hromadí jako nerozpustná sraženina v blízkosti buněčného povrchu (Riss a kol. 2013).

Porovnáním expozice UVA a UVB záření jsou na první pohled vidět markantní rozdíly v procentuálním vyjádření životaschopných buněk. UVB záření se od UVA liší vyšší energií fotonů, jež způsobují razantnější poškození buněk, v našem případě keratinocytů typu HaCaT. Této tezi odpovídají výsledky vykreslené v grafech č. 3 až č. 7. Buňky ozářené UVB zdrojem vykazují v celém průběhu procesu ozařování po pravidelných intervalech nižší životaschopnost buněk než po expozici UVA zdrojem. Přesto, že UVA záření má dost vysokou energii na poškození buněk, grafy pozorování v jednotlivých dnech značí v prvních 10 až 20 minutách ozařování nárůst koncentrace životaschopných buněk a pokles nastává obvykle na 40 minutě ozařování. I přesto, že buňky byly ozářené UVA zdrojem, dokázaly proliferovat a navyšovat své množství. Po překročení určitého časového intervalu expozice, se produkce ROS přerostla na masivní produkci a negativní účinky vedoucí k buněčné smrti se objevují většinou na 40 minutě ozařování. Oproti tomu UVB záření, díky své vysoké energii, dokáže vyvolat přímé poškození buněk hned po prvních minutách ozařování. Buňky už tedy nejsou schopné proliferovat a poškození UVB fotony vede okamžitě k buněčné smrti. Rozdíl průběhů mechanismů, jimiž prochází buňky pozorované po dobu devíti dnů, hraje svoji roli. První a poslední den pozorování v konečném stádiu, tedy po 80 minutové expozici, se procentuální životaschopnost buněk liší o téměř 31 % pro UVA záření a téměř o 17 % pro UVB záření.

6.2 Detekce reaktivních forem kyslíku pomocí fluorescenčních značek

První použitou fluorescenční značkou byla Amplex Red, která hodnotí extracelulární přítomnost reaktivních forem kyslíku, zejména peroxidu vodíku (H_2O_2). Vlivem ultrafialového záření dochází k produkci peroxidu vodíku ve vodných roztocích běžně, obzvláště pokud jsou přítomny organické látky. Peroxid vodíku je však látka, která proniká docela snadno přes buněčné membrány, a proto i část intracelulární produkce se může dostat do extracelulárního prostředí a reagovat tak s fluorescenční značkou Amplex Red v přítomnosti křenuvé peroxidázy

na fluorescenční resorufin. Při vysokých koncentracích může být resorufin dále oxidován za vzniku již nefluorescenčního produktu.

Byly sestaveny závislosti intenzity fluorescence na době ozařování jak UVA, tak i UVB zdrojem. Výsledné závislosti značí rozdílný průběh jak pro expozici UVA zářením, tak i UVB zářením. Směrnice přímkou charakterizující rychlost změny fluorescence během prvních 10 minut expozice UVB zářením vykazuje cca třikrát vyšší hodnotu než pro UVA, což vypovídá o větší produkci H_2O_2 při UVB záření.

Existují studie, založené na detekci peroxidu vodíku fluorescenční značkou Amplex Red, pomocí níž dokázali, že peroxid vodíku je důležitým mediátorem fosforylace EGF-receptoru indukovaný právě UVB složkou záření v kultivovaných keratinocytech. Peroxid vodíku má pak potenciál iniciovat nebo modulovat včasné signální události zprostředkované epidermálním růstovým faktorem EGFR, které by mohly hrát důležitou roli v buněčné reakci na oxidační stres (Peus a kol. 1998). Tato pozorování dokazují akutní a chronické kožní odezvy ultrafialového světla včetně solárního erytému, stárnutí kůže a karcinogeneze, které mohou být zprostředkovávány alespoň částečně H_2O_2 a dalšími ROS produkovanými epidermálními keratinocyty.

Druhá použitá fluorescenční značka, často používaná k detekci peroxidu vodíku se nazývá CM- H_2DCFDA , která je založená v pasivní difúzi nefluorescenční látky 2', 7' – dichlordihydrofluoresceinu diacetátu (H_2DCFDA) do buněk. Esterázy uvnitř cytosolu odstraňují acetátové skupiny za vzniku nefluorescenčního derivátu H_2DCF . Při vystavení reaktivních forem kyslíku, zejména peroxidu vodíku, UV světlu, dochází k oxidaci dvou elektronů látky H_2DCF , což vede k tvorbě vysoce fluorescenční DCF. Na rozdíl od fluorescenční značky Amplex Red, zde dochází hlavně k měření intracelulární produkce peroxidu vodíku. V souladu s tím je velikost fluorescence DCF považována jako měřítko stupně oxidačního stresu, tj. stav, ve kterém generování ROS převažuje nad antioxidační schopností buňky (Reineirs a kol. 2011).

Naše výsledné hodnoty intenzity fluorescence závislé na době ozařování vykazují rozdílné průběhy pro UVA a UVB expozici. Směrnice přímkou charakterizující rychlost změny fluorescence během prvních 5 minut expozice UVB zářením vykazuje přibližně čtrnáctkrát vyšší hodnotu než pro UVA, což vypovídá o značně vyšší energii UVB záření. Tuto rychlost změny fluorescence opět můžeme připisat rychlosti nárůstu produkce reaktivních forem kyslíku, zejména H_2O_2 . Ve srovnání extracelulárního a intracelulárního měření, je možné zpozorovat nárůst intenzity fluorescence u UVB vůči UVA záření pouze přibližně třikrát větší, tak při intracelulárním měření dosahoval až čtrnáctinásobku.

Je bezprostředně známo, že peroxid vodíku se iniciuje v negativním působení na buněčné molekuly a je zejména spojen s poškozením DNA, mutacemi a genetickou nestabilitou. Také se často uvažuje, že poškození DNA vyvolané H_2O_2 je zprostředkováno hydroxylovým radikálem OH generovaným z Fentonovy reakce. Hromadné důkazy naznačují, že peroxid vodíku může hrát důležitou roli ve vývoji karcinogeneze, jak již toto tvrzení T. Nakayama a kol. (1983) popsal ve své studii „*Generation of hydrogen peroxide and superoxide anion from active metabolites of naphthylamines and aminoazo dyes: its possible role in carcinogenesis*“. Experimentální data dalších odborných studií ukázala, že rakovinné buňky produkují vysoké množství H_2O_2 , a že za vyvolání rakoviny může být zodpovědná především UVB složka záření (Lopez – Lázaro 2006, de Gruijland Van der Leun 1994 v Shorrocks a kol. 2008). Následně pak Agaret a kol. (2004) ve své studii ukázal, že UVA a UVB přispívají rovnoměrně k mutačnímu spektru pozorovanému u lidského spinocelulárního karcinomu (Acaret a kol. 2004 v Shorrocks a kol. 2008).

K detekci singletového kyslíku 1O_2 byla použita fluorescenční značka Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG). V přítomnosti singletového kyslíku v buněčném médiu, fluorescenční značka SOSG vykazuje zelenou fluorescenci. Avšak z upozornění experimentálních studií je nutné brát v úvahu, že tato zelená fluorescence mizí pod UV světlem v důsledku fotobělení fluorescenční značky SOSG zprostředkovaného radikálovými druhy (Ragàs a kol. 2009). Námi naměřené výsledky ověřily hypotézu, že s rostoucí délkou expozice, se hodnoty fluorescence plynule zvyšují. Směrnice přímky charakterizující rychlost změny fluorescence během 80 minut expozice UVB zářením vykazuje minimální rozdíl od hodnoty směrnice udávající UVA expozici. Tato rychlost změny fluorescence odpovídá rychlosti nárůstu produkce singletového kyslíku. Značná produkce singletového kyslíku má však nejvíce negativní účinky ze všech reaktivních forem kyslíku. Značí se jako vysoce reaktivní kyslíkový druh, který může poškodit biologické buněčné složky, jako jsou lipidy proteiny nebo nukleové kyseliny. Svými negativními účinky přispívá ke kancerogenezi či fotostárnutí. Své využití však nachází ve fotodynamické terapii k odstranění nádorů (Ragàs a kol. 2009).

K detekci změn mitochondriálního membránového potenciálu v buňkách byla použita kationtová fluorescenční sonda MitoTracker Orange. Tato fluorescenční sonda volně difunduje přes plazmatickou membránu buňky a na základě redoxního potenciálu se dokáže akumulovat v aktivních a životaschopných mitochondriích buněk. Oxidovaná forma reaguje s SH skupinou proteinů a značka se stává fixována v mitochondriích (Scorrano a kol. 1999). S přibývajícím dávkou ozáření by se hodnoty intenzity fluorescence měly značně snižovat, v důsledku depolarizace mitochondriální membrány navozené jejím poškozením ROS při expozici k UVA

nebo UVB záření. Námi naměřený graf bohužel tomuto předpokladu neodpovídá pro expozici UVB světlem, jehož hodnoty neklesají, naopak je zaznamenán mírný nárůst hodnot.

Přestože řada studií poukazuje, že UV záření vyvolává jak morfologické, tak i funkční změny mitochondrií, které jsou obecně spojené se ztrátou mitochondriálního membránového potenciálu (Paz, M.L., Gonzalez Maglio, D.H., Weill, F.S., Bustamante, J., Leoni, J. (2008) Mitochondrial dysfunction and cellular stress progression after ultraviolet b irradiation in human keratinocytes. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 24, 115–122; Denning M.F., Wang Y., Tibudan S., Alkan S., Nickolo B.J., Qin J.Z.(2002) Caspase activation and disruption of mitochondrial membrane potential during UV radiation-induced apoptosis of human keratinocytes requires activation of protein kinase c. *Cell Death Di er.* 9, 40–52), tak nedávno byla zveřejněna práce, jež naopak ukázala, že UVB ozáření u lidských keratinocytů může vést k hyperpolarizaci mitochondriální membrány a ke zvýšení produkce ATP (Hegedüs C., Boros G., Fidrus E., Kis G.N., Antal M., Juhász T., Janka E.A., Jankó L., Paragh G., Emri G., Bai P., Remenyik É. (2020) PARP1 Inhibition Augments UVB-Mediated Mitochondrial Changes-Implications for UV-Induced DNA Repair and Photocarcinogenesis. *Cancers*, 12, 5.). Domníváme se proto, že odlišné výsledky mohou s největší pravděpodobností být způsobeny rozdílnostmi v aplikovaném UV spektru, dávce, v době měření od aplikace, případně i v druhu buněk.

6.3 Srovnání expozice UVA a UVB záření a jejich následky

V měření byly použity dva typy osvětlení buněčného média, UVA a UVB záření. Vzájemně se liší jak hodnotou vlnové délky, dopadající na lidskou pokožku. Přestože UVA paprsky jsou méně zapojeny do akutního poškození kůže, pronikají hlouběji do dermální matrice kožních tkání a z tohoto důvodu se považují za zdroje škodlivých chronických kožních účinků. UVB složka není schopna proniknout do hlubokých vrstev kůže a nejvíce se iniciuje ve způsobování erytému pokožky. UVA složka uplatňuje svůj karcinogenní účinek vytvářením reaktivních forem kyslíku (ROS), včetně superoxidového radikálu, peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu se singletovým kyslíkem, což způsobuje oxidační poškození makromolekul, včetně DNA a buněčných struktur (Bowden 2004). Přímé poškození molekul způsobuje UVB složka, jejíž následky vedou k tvorbě cyklopirimidinových dimerů a dalších fotoproduktů, o nichž se předpokládá, že jsou zapojeny do iniciace rakoviny kůže (Syed a kol. 2012).

Naše naměřená porovnání UVA a UVB záření na keratinocyty typu HaCaT značí jasné rozdíly, jež jsou vykresleny v grafu č. 3 až č.11. U měření viability buněk pomocí MTT testu

v pozorovacích devíti dňoch, bola vykreslená závislosť pro UVB a UVA žiarení, jež činila opačný průběh. Expozice UVA žiarením způsobila v prvních minutách ozařování nárůst životaschopných buněk, zatím co UVB expozice zapříčinila okamžitý pokles životaschopných buněk na minimální hodnoty. Můžeme tedy usoudit, že UVB složka byla zodpovědná za přímé usmrcení buněk při krátkodobých expozicích na rozdíl od UVA složky. Měření pomocí fluorescenčních složek detekující reaktivní formy kyslíku, zejména peroxid vodíku a singletní kyslík, taktéž prokázaly vyšší kinetiku jejich produkce pro UVB zdroj. Ačkoliv naše měření značně dokazují větší produkci ROS způsobené UVB složkou, obě složky se považují za úplné karcinogeny a následky expozice přispívají jak ke karcinogenezi, tak i fyziologickému procesu fotostárnutí.

7. ZÁVĚR

V rámci této bakalářské práce bylo zkoumáno působení UV záření na lidský organismus, především se zaměřením na oblast modelového stresového faktoru UVA a UVB záření v působnosti na buněčné kultury typu HaCaT. Byla měřena zejména produkce reaktivních forem kyslíku, jejichž vznik je následkem opakované či dlouhodobé expozice UV světlem na lidskou kůži. Detekce reaktivních forem kyslíku byla realizována pomocí fluorescenčních značek: Amplex Red, CM-H₂DCFDA, Singlet Oxygen Sensor Green, MitoTracker Orange a MTT test pro stanovení viability buněk. V neposlední řadě byly shrnuty vybrané morfologické a funkční změny buněčných kultur vystavených UV záření a bylo provedeno srovnání negativních účinků obou podsložek UV záření.

Pomocí MTT testu byla měřena životaschopnost buněk v pozorování po dobu 9 dnů. Byly nalezeny rozdílné průběhy pro UVA a UVB složku ozařování. Po UVA expozici byl zjištěn mírný nárůst životaschopných buněk v prvních minutách ozařování a poté následný pokles životaschopných buněk. Po UVB expozici byl naopak zaznamenán značný pokles životaschopných buněk již po prvních minutách ozařování.

Pomocí fluorescenční značky Amplex Red a CM-H₂DCFDA byl pozorován nárůst produkce peroxidu vodíku v závislosti na čase expozice UVA a UVB ozařováním. Byl zaznamenán nárůst produkce reaktivních forem kyslíku pro obě podsložky UV záření, avšak markantní rozdíl byl zjištěn u UVB expozice, jehož směrnice regresní křivky byla mnohonásobně vyšší oproti UVA expozici.

Za pomoci fluorescenční značky Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) byla detekována produkce singletového kyslíku, jež byla přibližně srovnatelná pro oba typy UV expozice. Byl zaznamenán téměř lineární nárůst produkce singletového kyslíku jak pro UVA, tak i UVB záření.

Poslední námi použitá fluorescenční značka byla MitoTracker Orange k detekci změn membránového potenciálu mitochondrií. Byly nalezeny opačné průběhy regresních křivek pro UVA a UVB expozici. U UVB expozice byl nalezen mírný nárůst hodnot, zatímco u UVA došlo k poklesu.

Ze získaných výsledků je možné usoudit, že vliv UV záření způsobuje negativní účinky na lidskou kůži, v podobě nadměrné produkce reaktivních forem kyslíku, jež jsou schopny atakovat buněčné makromolekuly, zejména DNA, lipidy a proteiny. Tyto destrukce buněčných

makromolekul mohou vést k počátku kancerogeneze a také přispívají k fyziologickému ději, zvanému fotostárnutí.

8. POUŽITÁ LITERATURA

- Ahmad G., Abuayyash M., Almasry M., Kothandaraman N. (2017) Overview and source of reactive oxygen species (ROS) in the reproductive system. *Oxidative Stress in Human Reproduction Shedding Light on a Complicated Phenomenon*, 1-16.
- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2005) In: *Základy buněčné biologie-Úvod do molekulární biologie buňky*. 2nd ed., Espero, Ústí nad Labem, 630 stran.
- Berneburg M., Plettenberg H., Krutmann J. (2000) Photoaging of human skin. *Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine* **16**, 239-244.
- Britt A. (1995) Repair of DNA damage induced by ultraviolet radiation. *Plant Physiology* **108**, 891-896.
- Boulais N., Misery L. (2007) Merkel cells. *Journal of the American Academy of Dermatology* **57**, 147-65.
- Bowden G. T. Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B-light signalling. *Nature Reviews Cancer* **4**, 23-35.
- Čihák R., Grim M. (2016) Kůže a kožní orgány. In: *ANATOMIE 3*. Vol. 3, 3rd ed., (Čihák R., Grim M.), Univerzita Karlova lékařská fakulta, Praha, 627-651.
- Eckert R. L., Rorke E. A. (1989) Molecular biology of keratinocyte differentiation. *Environmental Health Perspectives* **80**, 109-116.
- Ettler K. (2007) Účinky UV záření na kůži a fotoprotekce. *Medicina pro praxi* **6**, 273-275.
- Fairbridge R. W. (2005) Electromagnetic radiation. In: *Encyclopedia of world climatology*. (Oliver J. E.) Springer, Dordrecht, Netherlands, 348-351.
- Farage M. A., Miller K. W., Maibach H. I. (2010) DNA Biomarkers in Aging Skin. *Textbook of Aging Skin*. (Farage M. A., Miller K. W., Maibach H. I.), Springer, Berlin Heidelberg 453-457.
- Geerlings M. (2009) Hypodermis. In: *Skin layer mechanics*. Eindhoven, Netherlands, 9-8.
- Gilchrest B. A., Krutmann J. (2006) Photoaging of skin. *Skin Aging*. (Philipp M.) Heidelberg, Germany 33-45.
- Hajniš K. (1988) Kůže a její deriváty. In: *Anatomie člověka pro biology*. Vol. 2, Univerzita Karlova přírodovědecká fakulta, Praha, 58-77.
- Hong Y., Song B., Chen H., Gao X. (2015) Melanocytes and skin immunity. *The Journal of Investigative Dermatology Symposium* **17**, 37-39.
- Kolarsick P. A. J., Goodwin C., Kolarsick M. A. (2011) Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association* **3**, 2013-213.
- Lee Ch., Wu S., Hong Ch., Yu H., Wei Y. (2013) Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis and its effects on skin residential cells: The implications in UV-based phototherapy. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 6414-6435.
- López-Lázaro M. (2007) Dual role of hydrogen peroxide in cancer: Possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Letters* **252**, 1-8.
- Masneć I. S., Situm M. (2010) Skin aging. *Acta clinica Croatica* **49**, 515-518.
- Nakayama T., Kimura T., Kodama M., Nagata Ch. (1983) Generation of hydrogen peroxide and superoxide anion from active metabolites of naphthylamines and aminoazo dyes: its possible role in carcinogenesis. *Carcinogenesis* **4**, 765-769.
- Pattison D. I., Davies M. (2006) Actions of ultraviolet light on cellular structures. *Cancer: Cell Structures, Carcinogens and Genomic Instability* **96**, 131-157.

- Peus D., Vasa R. A., Meves A, Pott M., Beyerle A., Squillace K., Pittelkow R. (1998) H₂O₂ Is an Important Mediator of UVB-Induced EGF-Receptor Phosphorylation in Cultured Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* **110**, 966-971.
- Poljšak B., Milisav I., Suput D. (2013) Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **1**, 1-11.
- Puch F., Schnebert S., Bonnet M., Kurfurst R. (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**, 308-320.
- 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**, 1-19.
- Ragàs X., Jiménez-Banzo A., Sánchez-García D., Batllori X., Nonell S. (2009) Singlet oxygen photosensitisation by the fluorescent probe Singlet Oxygen Sensor Green. *Chemical Communications*, 2920-2922.
- Rajnochová Svobodová A. (2012) Lidská kůže a její poškození působením slunečního záření. In: *Poškození kůže působením slunečního záření, možnosti ochrany a prevence*. 1st ed., Univerzita Palackého, Olomouc, 11-38.
- Reid Y., Storts D., Riss T., Minor L. (2013) Authentication of Human Cell Lines by STR DNA Profiling Analysis. *Assay Guidance Manual*. 1-10.
- Reiniers M. J., van Golen R. F., van Gulik T. M., Heger M. (2012) 2', 7'-Dichlorofluorescein is not a probe for the detection of reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of hepatology* **56**, 1214-1216.
- Rostová J., Borská L., Fiala Z., Krejsek J. (2006) Chronologický účinek ultrafialového záření na organismus. *Vojenské zdravotnické listy* **75**, 111-119.
- Sachs D. (2008) Overview of skin aging and photoaging. *Journal of the Dermatology Nurses' Association* **20**, 177-183.
- Scorrano L., Petronilli V., Colonna R., Di Lisa F., Bernardi P. (1999) Chloromethyltetramethylrosamine (Mitotracker OrangeTM) induces the mitochondrial permeability transition and inhibits respiratory complex I. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 24657-24663.
- Shorrocks J., Paul N. D., McMillan T. J. (2008) The Dose Rate of UVA Treatment Influences the Cellular Response of HaCaT Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* **128**, 685-693.
- Schovánek P., Havránek V. Chyby a nejistoty měření (doplňující text k laboratornímu cvičení). Univerzita Palackého, Olomouc, 18 stran.
- Syed D. N., Afag F., Mukhtar H. (2012) Differential Activation of Signaling Pathways by UVA and UVB Radiation in Normal Human Epidermal Keratinocytes. *Photochemistry and Photobiology* **88**, 1184-1190.
- ThermoFisher scientific: Singlet Oxygen Sensor Green Reagent: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2Fmp36002.pdf&title=U2luZ2xldCBPeHlnZW4gU2Vuc29yIEdyZWVuIFJlYWdlbnQ=> (29. 3. 2020).
- Van Meerloo J., Cloos J. (2011) Cell sensitivity assays: The MTT assay. *Department of Haematology* **731**, 237-245.
- Wan H., Williams R., Doherty P., Williams D. F. (1994) A study of the reproducibility of the MTT test. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **5**, 154-159.

Zhao B., Summers A. F., Mason R. P., (2012) Photooxidation of Amplex Red to resorufin: implications of exposing the Amplex Red assay to light. *Free Radical Biology and Medicine* **53**, 1080-1087.