

616.591-001.29-084

KERATINOCYT – ZÁKLADNÍ BUŇKA EPIDERMIS: JEHO POŠKOZENÍ NEIONIZUJÍCÍM A IONIZUJÍCÍM ZÁŘENÍM A MOŽNOSTI PROTEKCE

Pavel PETÝREK

Ústav zdravotnické nukleární a biologické ochrany Vojenské lékařské akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové

Souhrn

Interakce organismu se zevním prostředím jsou zprostředkovány přes epidermis a přes několik rozdílných keratinizovaných a nekeratinizovaných epitelů. Epidermis není přímo vaskularizována, ale je vyživována z krevních cév dermis. Lidský keratinocyt izolovaný z kůže vytváří *in vitro* kolonie a každá kolonie pochází z jednoho keratinocyty, který je kmenovou buňkou epidermis.

Absorpce UV záření v kůži se projevuje primárně v keratinocytech epidermis a vyvolává poškození DNA a proteinů. Poškození DNA je obecně chápáno jako základní efekt záření vedoucí k buněčné smrti, chromozomální aberacím a onkogenní transformaci. Senzitivita k záření není závislá jen na rozsahu iniciačního poškození, ale také na kapacitě buněk reparovat toto poškození. Na rozdíl od UV záření, které poškozuje především epidermis, je ionizující záření schopné poškodit nejen epidermis, ale celou kůži, včetně adnex a tkání ležících pod ní.

Klíčová slova: Kůže; Epidermis; Keratinocyt; *in vivo*; *in vitro*; Radiační poškození; DNA; CD44; p53; Neionizující záření; Ionizující záření; Radioprotekce; Apoptóza; Cytokiny; Růstové faktory; L-askorbová kyselina.

Keratinocyte – a Basic Cell of the Epidermis: Its Damage by Non-ionizing and Ionizing Radiation and Possibilities for Its Protection

Summary

An organism's interactions with the external environment are mediated through the epidermis and through a few different keratinized and non-keratinized epithelia. The epidermis is not directly vascularized but it is nourished from the blood vessels of the dermis. A human keratinocyte isolated from the skin creates *in vitro* colonies and each colony comes from one keratinocyte which is a stem cell of the epidermis.

The absorption of UV radiation in the skin is primarily manifested in the epidermis keratinocytes and causes DNA and protein damage. This DNA damage is generally understood as a basic effect of irradiation leading to cellular death, chromosomal aberrations and oncogenic transformation. Sensitivity to irradiation is not dependent only on the extent of initial damage, but also on the capacity of cells to repair this damage. In contrast to UV irradiation which damages above all the epidermis, ionizing radiation is able to damage not only the epidermis but the whole skin, including the adnexa and the tissues lying beneath it.

Key words: Skin; Epidermis; Keratinocyte; *in vitro*; *in vivo*; Radiation damage; DNA; CD44; p 53; Non-ionizing radiation; Ionizing radiation; Radioprotection; Apoptosis; Cytokines; Growth factors; L-ascorbic acid.

Úvod

Interakce savčího organismu jsou zprostředkovány kůží a několika rozdílnými keratinizovanými a nekeratinizovanými epitelů zažívacího a dýchacího traktu. Jejich základní úlohou je udržení stability vnitřního prostředí organismu a jeho ochrana před vlivy zevního prostředí. Trvalé vystavení epitelů vlivu zevního prostředí si vyžaduje jejich trvalou obnovu, a proto mají jejich kmenové buňky relativně vyso-

kou proliferační a diferenciační aktivitu, která se odráží v relativně vysoké senzitivitě k vlivu ionizujícího korpuskulárního i nekorpuskulárního záření a neionizujícího, především ultrafialového záření. Vlivům uvedených typů záření mohou být příslušníci AČR vystaveni při zevním ozáření ionizujícím i neionizujícím zářením, zevní a vnitřní kontaminací radioaktivními látkami. K situacím, při nichž mohou být příslušníci AČR vystaveni vlivům uvedených typů záření, může docházet při haváriích, ev.

při teroristickém útoku na jaderná energetická zařízení, při méně pravděpodobném použití jaderných zbraní a při vystavení se vlivu ultrafialovému záření během humanitárních a jiných misí.

Interakce organismu se zevním prostředím jsou zprostředkovány přes epidermis a přes několik rozdílných keratinizovaných a nekeratinizovaných epitelů. Jejich základní role spočívá v udržení stability vnitřního prostředí ve vodě, ve vzduchu, na zemi a v ochraně těla proti rizikům prostředí. Přes ohromný počet změn ve specializaci a diferenciaci epidermálních buněk za posledních 450 milionů let vrstevnatý epitel reprezentuje jeden z nejjednodušších orgánů lidského těla. Ve skutečnosti je epidermis velmi komplexní vrstevnatý epitel, který je hlavně tvořen jedním buněčným typem – keratinocytem. Jiné buňky, jako melanocyty, Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky, které mají velmi důležité funkce, jsou přítomné v epidermis, ale přímo se nepodílejí na organizaci tkáně. Epidermis není přímo vaskularizována, ale je vyživována z krevních cév dermis.

Chování keratinocyty v kultuře

Lidský keratinocyt izolovaný z kůže vytváří kolonie a každá kolonie pochází z jednoho keratinocyty. Malé, ne terminálně diferencované bazální buňky mají největší klonogenní potenciál, přičemž velké, více diferencované buňky tvoří kolonie méně často. Velké klony tvořící buňky mohou však vytvářet kolonie obsahující malé bazální buňky, což svědčí o možnosti zachránit buňky před terminální diferenciací. Tyto kolonie rostou stejně jako kolonie založené malými buňkami, což svědčí o tom, že růstový potenciál kolonie není specifický podle velikosti zakládajících buněk. Pokud je klonogenní potenciál keratinocyty ve vztahu k velikosti buňky, pak růstový potenciál jednoho keratinocyty je určen podle typu vytvořeného klonu. Po subkultivaci z jedné keratinocytové kolonie může vyrůst různý počet terminálních kolonií, ve kterých mohou být identifikovány tři typy keratinocytů, tj. holoklony, meroklony a paraklony. Holoklony mají největší růstový potenciál a jsou považovány za kmenové buňky, paraklony mají nejnižší růstový potenciál a jejich doba života není delší než 15 buněčných generací. Buňka pasážovaná *in vitro* a přirozeně stárnoucí *in vivo* určuje progresivní snižování holoklonů a progresivní zvyšování meroklonů a paraklonů (1).

Pro diferenciaci buněk specifický protein, nazývaný involukrin, je selektivně syntetizován v buňkách určených k diferenciaci. Involukrin je jednou z hlavních součástí obalu, který je formován pod plazmatickou membránou terminálně diferencovaných keratinocytů. Během terminální diferenciaci se objevují dramatické změny architektury cytoskeletu se změnou exprese keratinového genu z nízké na vysokou molekulární hmotnost keratinů a následné změny v kompozici 8nm intermediálních filament epidermis. Modifikovaná keratinová filamenta interagují s bazickým proteinem z keratolalínových granúl, filagrinem tvořícím korneocytovou keratinovou matrix (2).

Vliv neionizujícího a ionizujícího záření

V současné době se obnovil zájem o účinky záření, které nemohou být způsobeny přímým poškozením DNA. Klastogenní účinky se mohou projevit v buňkách ozářených α -částicemi, které nemohou způsobit „přímý účinek“ ionizujícího záření. Genomová nestabilita a opožděná exprese letálních a neletálních mutací jsou také zahrnuty do nepřímých účinků, protože jejich exprese ve vývoji po ozáření je neklonální, a nemůže tak být výsledkem jednoduchých, přímo vyvolaných mutací DNA.

Zatím nedoručeno je, zda tyto účinky odrážejí reakci na buněčný stres po aktuálním poškození DNA – reakce spuštěná tím, že došlo k interakci DNA s poškozující látkou, nebo jsou následkem chyb navozených v DNA mnoha špatně reparovatelnými zlomy, které jsou výsledkem sekundárního poškození radikály. Tyto špatně reparovatelné zlomy nemohou nakódovat důležité mutace, ale mohou měnit strukturální stabilitu DNA, vytvářet chromozomální aberace projevující se během mitózy. Hypotéza buněčné reakce byla podpořena výsledky, které spojují genomovou nestabilitu s programovanou buněčnou smrtí a s oxidačním stresem.

Jedním předpokladem aktivní buněčné reakce je, že ozářené buňky mohou sekretovat signální substance, které pak iniciují proliferaci nebo smrt těchto či sousedních buněk. Některé příklady buněčných sekretů ovlivňujících jiné buňky jsou známy a zahrnují zánětlivé reakce, endokrinní, autokrinní a parakrinní vlivy na samotné či vzdálené buňky (3). Epiteliální buňky mohou sekretovat postradiační faktor, který je toxický pro jiné neozářené buňky.

Normální epiteliální buňky mají vyvinuté systémy buněčné komunikace zahrnující spojovací proteiny (connexiny) nebo povrchové receptory, které zprostředkovávají kontrolu odpovědi na změny v jejich prostředí nebo na chemicky či fyzikálně vyvolaný stres. Po gama ozáření byly prokázány změny funkce spojovacích komplexů v epiteliálních buňkách. Smrt epiteliálních buněčných typů se obvykle projevuje apoptózou. Spektrum poškození a profil exprese proteinu v situacích spojených s genomickou instabilitou nebo letálními mutacemi jsou shodné s průběhem programované smrti buňky a zastavením dělení spíše než s nekrotózou. Apoptóza a buněčné dělení epiteliálních buněk v těchto tkáních jsou pod kontrolou jiných buněk.

Normální lidský keratinocyt také projevuje závislost přežití po ozáření, pokud je v kontaktu s jinými buňkami (4). Tento efekt může být zrušen blokováním komunikace mezibuněčného spojení.

Časná apoptóza je velmi dramatická změna, protože buňky mohou sekretovat faktory, které mění přežití jiných buněk. To potvrdilo obecnou hypotézu, že faktory přežití sekretované sousedními buňkami mohou zabránit iniciaci apoptózy. Exprese konexinových proteinů je inhibována oxidativním stresem a tento účinek může být zrušen látkami, které zachycují radikály. Pozdní účinky záření (pozdní apoptóza a indukce letálních mutací) byly významné jen u buněk, které v době ozáření nebyly v kontaktu. Oxidativní stres spojený se zářením vyvolanou genomickou nestabilitou (jednak jako příčina, jednak jako součást), vede k porušení normální komunikace mezi epiteliálními buňkami.

Schopnost buněk odpovědět na extracelulární stres je základní pro jejich přežití. Tato odpověď zahrnuje změny vlastností a rychlosti exprese genů. Ionizující záření navozuje takové změny během několika hodin. Ty pak mohou vést jednak k zastavení buněčného cyklu a reparaci, jednak k buněčné smrti. Obě tyto možnosti jsou závislé na rozsahu radiačního poškození (5). Dále tyto změny spouští dlouhodobou kaskádu buněčných změn, které mohou vést k pozdním účinkům ionizujícího záření, hlavně tvorbě nádorů a vývoji pozdních následků vznikajících po ozáření v normálních tkáních.

Geny vzniklé po ozáření ionizujícím zářením při absenci syntézy nových proteinů jsou nazývány geny bezprostřední časně reakce. Příklady takových

genů jsou *jun/fos*, *egr-1* a *NFκB* rodiny, které zahrnují jaderné transkripční faktory. Aktivační protein (activator protein – AP-1) je společné označení pro třídu transkripčních faktorů a AP-1 je proteinový komplex. Aktivace transkripčních faktorů je kritickým bodem v buněčné odpovědi na ozáření. Geny kódující růstové faktory a cytokiny mohou být důležitými cíli a efekty této aktivity, i když hlavní bezprostřední efekt záření je změna buněčného cyklu poškozených buněk. UVB u lidských keratinocytů *in vitro* může zvýšit uvolňování cytokinů, interleukinu 1 α (IL-1 α) a interleukinu 6 (IL-6) v buňkách. Příkladem zářením indukovaných růstových faktorů jsou TNF- α (tumor necrosis factor α – faktor nekrotizující nádory α), FGF (fibroblast growth factor – fibroblastový růstový faktor), PDGF (platelet – derived growth factor – destičkový růstový faktor) a TGF- β (transforming growth factor β – transformující růstový faktor β).

Poškození epidermis UV zářením

Ultrafialové záření (UV) se dělí na 3 části podle vlnové délky: UVA (320–400 nm), UVB (280–320 nm) a UVC (200–280 nm). UVC záření je účinně absorbováno atmosférou a nedosáhne povrchu Země. Absorpce UVB v kůži se projevuje přimárně v keratinocytech epidermis a vyvolává poškození DNA a proteinů.

Poškození DNA je obecně chápáno jako základní efekt ionizujícího záření vedoucí k buněčné smrti, chromozomálnímu aberacím a onkogenní transformaci. Široké spektrum DNA lézí produkovaných ionizujícím zářením (alterace bází, abazická místa, DNA-protein křížové vazby) představují především ssb (DNA single-strand breaks = DNA jednovláknové zlomy) a dsb (DNA double-strand breaks = DNA dvouvláknové zlomy), dsb jsou velmi úzce spojeny s buněčnou smrtí. Když se dsb nereparují, může tento stav vést k nezvratné ztrátě genetické informace (6). Existují tři úrovně procesů objevujících se mezi iniciálním ozářením a event. ztrátou buněčné reprodukční integrity, při kterých může být určena hodnota radiosenzitivity buněk: iniciální poškození DNA; rychlost, účinnost a přesnost reparace DNA a reziduální poškození DNA.

1) Iniciální poškození, tj. rozsah poškození vyvolaného v chromozomální DNA, může být velmi rozdílné u různých buněk v závislosti na intracelulární koncentraci kyslíkových radikálů, radio-

protektivní účinnosti intracelulárních zachycovačů radikálů, vazbě proteinů na DNA a hustotě vysoce organizovaného chromatinu.

- 2) Při spojení dsb, které má bifázický charakter – rychlou ($t = 20\text{--}40$ min) a pomalou ($t =$ několik h) fází –, je rychlejší fáze mnohem účinnější u radiorezistentních než radiosenzitivních buněk. Přesnost DNA-reparace, tj. frekvence, při níž jsou mutace navozené během procesu dsb-spojení, viditelné jako chromozomální aberace, může být závislá na částečném reparačním mechanismu při spojení dsb (tj. homologní versus nelegitimní rekombinace), intracelulární koncentraci specifických reparačních enzymů a vystavení dsb spojovacímu reparačnímu procesu a/nebo destrukčním exonukleázám.

Reziduální poškození DNA je rozsah poškození, které zůstává po reparaci a pozitivně koreluje s radiosenzitivitou.

Poškození epidermis ionizujícím zářením

Senzitivita k ionizujícímu záření není závislá jen na rozsahu iniciálního poškození, ale také na kapacitě buněk reparovat toto poškození, tj. speciálně DNA dsb, což je poškození, které je v těsném vztahu k buněčné smrti. To např. může svědčit o tom, že fyzikální a chemické procesy produkující ssb mohou být v určitém rozsahu odlišné od těch, které vedou k dsb.

Na rozdíl od UV záření, které poškozuje především epidermis, je ionizující záření schopné poškodit nejen epidermis, ale celou kůži včetně tkání ležících pod ní. Kůže je složený orgán, jehož součástí jsou epidermis, vrstva kožních a podkožních pojivových tkání a různé akcesorní orgány, jako jsou vlasy, chlupy, exokrinní žlázy a senzorické receptory. Všechny tyto struktury se podílejí na různých stupních reakce kůže na ozáření ionizujícím zářením. Epidermis je samoobnovovací systém obdobný jako střevní epitel, ale náhrada buněk a doba jejich tranzitu je pomalejší. Jen asi 2 % všech buněk epidermis jsou denně obnoveny, což kontrastuje s 50 % buněk epitelu střeva. Buňky epidermis se dělí ve stratum germinativum, diferencují se keratinizací a konečně se odlučují s povrchu kůže. Tranzitní čas v lidské kůži se pohybuje od 14 do 17 dnů. Z hlediska radiačního poškození je nejvýznamnějším

faktorem velikost dávky ozáření. Pokud je svým dosahem ionizující záření schopno zasáhnout cílové, mitoticky aktivní buňky, pak není zásadně významný jeho druh. $D_0 = 1,25$ Gy, což značí, že kmenové buňky epidermis jsou stejně radiosenzitivní jako kmenové buňky krvetvorných orgánů a epitelu střeva (7).

Nepřímé účinky záření na cíle jiné, než je DNA, mohou vést k opožděné expresi neklonálních, přenosných chromozomálních aberací; letálních a neletálních mutací; opožděné apoptózy a opožděné tvorby mikronukleolů. Všechny tyto změny se projevují de novo při vývoji dalších populací buněk, než je populace původně ozářených buněk (8). Mechanismus, kterým jsou tyto efekty vyvolány – je indukovaný (ale ne projevený) a přenesený jako potenciální poškození z generace na generaci –, je neznámý, ale zahrnuje některé části mechanismu zlomu DNA a je spojen se zvýšenou tvorbou kyslíkových radikálů a radikály ovlivněných buněk (9). Procesy, které ve vývoji obvykle vedou ke zvýšenému mutagennímu potenciálu, jsou pravděpodobně příčinou časně zjistitelných iniciačních událostí radiační karcinogeneze. Usmrcení buněk „diváků“ je relativně nově dokumentovaný nepřímý efekt (3). Jde o jasný důkaz toho, že existuje zářením vyvolaný faktor, který je sekretován některými buněčnými liniemi a usmrcuje nepoškozené buňky v sousedství.

Možným mechanismem může být existence maximálně přípustné mutační zátěže nebo prahové mutační hodnoty. Tato koncepce může svědčit o tom, že každá buňka má kapacitu pro to, aby nesla nějaké chyby, které jsou tolerovány, protože nemění základní vlastnosti buňky. Když je buňka „unavená“, pak nemá 100% replikační schopnost. Pokud tento faktor poškozující DNA změní buněčnou populaci, pak se tolerance k DNA poškození nebo přípustné mutační zátěži přenesla na nižší úroveň. To může vést k tomu, že buňky s první přípustnou mutační zátěží jsou eliminovány z populace ještě před repopulací. Tento mechanismus může vysvětlit „divácký“ efekt, který způsobí, že signál secernovaný poškozenými buňkami je přenesen na celou populaci.

Změny mezibuněčných informací po ozáření

Adheze buňka–buňka u keratinocytů vyžaduje řadu molekul, které jsou rozděleny ve spojovacích plochách desmosomů (desmoglein, desmocollin), v

adherenčních spojení (vinculin) a vazbách (connexiny), nebo glykoproteiny, které reprezentují univerzální buněčný povrch (transmembránu), jako jsou členové rodiny polymorfních CD44 proteinů. CD44 byl původně považován za receptor lymfocytů, který se podílí na jejich interakci s endoteliálními buňkami lymfatických uzlin, Peyerových plaků a místy zánětu. Později byl zjištěn na různých typech buněk, včetně epidermálních keratinocytů. Společná forma – 90-kDa protein zvaný standardně CD44 (CD44s) – je receptor pro kyselinu hyaluroniovou. Variabilita epiteliálních izoform (CD44v) je generována alternativním spojením jaderné RNA. Variantní izoformy (CD44v) jsou vlastní epitelovým buňkám. Syndekan, buněčný povrchový proteoglykan CD44, váže extracelulární molekuly matrix a růstové faktory.

Ozáření tkání ionizujícím zářením mění expresi adhezních molekul včetně CD44. Expres epitelálních CD44 koreluje s proliferací buněk. Syndekan byl spojován s proliferací epidermálních buněk v hojících se ránách a UVB navozenou hyperplasticou epidermis.

Expres obou adhezních molekul se zvyšovala velmi časně v ozářené epidermis, a to dlouho před objevením se hyperplazie a hypertrofie. Expres syndekanu v ozářené kůži je odlišná od normální kůže. Dochází k přesunu jeho lokalizace z granulární vrstvy do bazální vrstvy a dolní části suprabazální vrstvy. Reakce kůže na ozáření ionizujícím zářením zahrnuje zánět, fibrózu a změnu tkáňové homeostázy. Buněčné a molekulární mechanismy pro zvýšenou imunoreaktivitu pro CD44 izoformy po ozáření začínají aktivací transkripčních faktorů reaktivním kyslíkem bezprostředně produkovaným zářením. Potenciální vazebná místa pro transkripční faktor AP-1 byla identifikována v promotorní oblasti genů kódujících CD44 a odpovídající proteiny. To dovoluje předpokládat, že na ozáření závislá aktivace AP-1 může ovlivnit expresi CD44.

Expres syndekanu v kůži je také zvýšena v migrujících a proliferujících epidermálních buňkách během hojení rány. I zde byl popsán přesun distribuce syndekanu do bazální vrstvy. Modulační exprese syndekanu během ozáření je stejná jako během hojení rány. Velmi významné pro expresi syndekanu a CD44 během frakcionovaného ozáření je jejich časně objevení se po 1 týdnu, což je dlouho před významnými morfologickými změnami

mi projevujícími se jako hyperplazie a hypertrofie. Je to v protikladu k imunohistochemickým studiím keratinů nebo jiných strukturálních proteinů, které vykazují významné změny, jen když se manifestuje hyperplazie (10). To svědčí o tom, že tyto proteiny jsou zahrnuty do procesů zrychlení repopulace, která vede ke zvýšené proliferaci a změnám vlastností diferenciací nezralých keratinocytů.

Apoptóza buněk epidermis po ozáření

Obecně je apoptóza proces buněčné smrti charakterizovaný typickými morfologickými změnami zahrnujícími kondenzaci chromatinu a zpuchřování plazmatické membrány. Apoptóza je aktivní způsob buněčné smrti, který potřebuje expresi nového genu a aktivaci endogenní DNázy. Objevuje se během embryogeneze, remodelování tkání, při homeostáze, ale i za patologických podmínek.

Apoptóza se objevuje i v normální kůži. Stejně jako byla apoptóza jádra pozorována ve vyvíjející se a dospělé lidské epidermis, je apoptóza klíčový způsob homeostázy epidermis: zabráňuje přebytku buněk, a tak ustanovuje architekturu kůže a udržení náležitého počtu buněk. Je ovšem málo známo o faktorech a látkách zahrnutých do mechanismů apoptózy v kůži. Ve skutečnosti u keratinocytů je proces apoptózy pomalý, což je možno prokázat konfokální laserovou mikroskopií. V keratinocytech dochází k srážení cytoplazmy a kondenzaci chromatinu na periférii jádra.

UV záření je významný zdroj buněčného poškození kůže a indukuje formování tzv. sluncem spálených buněk, což jsou keratinocyty v apoptóze. Regulační faktory, které kontrolují buněčný cyklus patří také do mechanismů buněčné smrti. Vedle UV sem patří např. i kalcium a keratinocyty jednak rychle apoptózou, jednak pomalu procházejí terminální diferenciací, což svědčí o tom, že terminální diferenciací může být specializovaná forma apoptózy (11).

p53 a jeho význam v reparaci keratinocytů

Po ozáření neionizujícím nebo ionizujícím zářením byla pozorována expres proteinu p53. Po UV ozáření byly pozorovány specifické buněčné mutace. p53 hraje důležitou roli v protekci genomu

keratinocytů před poškozením UV zářením a je považován za protektivní látku genomu. V epidermis existují dva mechanismy pro udržení buněčné genetické stability: reparující se DNA poškození či poškození navozující apoptózu. Je možno prokázat, že p53 je působí v obou – v DNA reparaci i v apoptóze. Po poškození DNA vyvolaném UV nebo ionizujícím zářením dochází ke zvýšení p53 proteinu, což navozuje G₁ blok, reguluje nukleotidovou reparační excizi nebo vyvolává apoptózu. G₁ blok je možná způsoben transkripční regulací p21^{Cip1}, který je potentním inhibitorem cyclin-dependentní kinázy (Cdk). Je známo, že p53 indukuje G₁ blok k získání zvláštního času pro buňku k reparaci DNA poškození předtím, než se poškození projeví během S fáze. p53 může přímo regulovat DNA reparaci.

Proliferující bazální keratinocyty, ale ne diferencované keratinocyty efektivně reparují UV poškozenou DNA, která je regulována p53 nebo p53 regulovanými proteiny.

Reparace poškozené DNA je základní podmínkou pro udržení genetické stability po genotoxickém stresu a p53 v tomto procesu hraje významnou roli. I když přesný molekulární mechanismus regulace reparace DNA vlivem p53 musí být teprve objasněn, je skutečností, že při působení takového faktoru poškozujícího DNA, jako je UV, se hodnota p53 zvyšuje. Zvýšená hodnota p53 pak reguluje potlačující cílové geny k vyvolání zástavy buněčného cyklu, participuje na reparaci DNA nebo indukuje apoptózu. p53 reguluje DNA reparaci v proliferujících, ale ne v diferencujících se keratinocytech, což svědčí o tom, že proliferující bazální keratinocyty a diferencované suprabazální buňky mají různý mechanismus protekce genomu. To může být rozhodující pro proliferující bazální keratinocyty při reparaci UV poškození, přičemž pro ne-proliferující diferencované suprabazální keratinocyty může být důležitá schopnost spuštění apoptózy (12, 13).

Význam cytokinů v radičním poškození epidermis a možnost využití antioxidantního účinku L-askorbové kyseliny jako jedné z možností jeho protekce

Volné radikály jsou konstantně generovány v epidermálních keratinocytech a rychle odstraněny neenzymovými a enzymovými antioxidantními substancemi, které chrání před škodlivými efekty vol-

ných radikálů a udržují prooxidační/antioxidační rovnováhu, která vede k buněčné nebo tkáňové stabilizaci. Přebytek volných radikálů indukovaný UV poruší integritu buněčné membrány a vyžaduje komplementární antioxidační aktivitu. UVA generuje reaktivní kyslíková species více než UVB, což může vést k zánětu, fotopodráždění a fotocarcinogenezi. L-askorbová kyselina může hrát významnou v prevenci poškození vyvolaného UVA. Antioxidativní efekt L-askorbové kyseliny u ozářených keratinocytů byl zjištěn *in vivo* u vepřové kůže.

1) UVA může přímo a nepřímo poškozovat DNA a část poškození je způsobeno volnými radikály, které působí tzv. oxidační stres. Vyvolání oxidačního stresu vede k vzniku kaskády volných radikálů zprostředkujících progresivní zhoršení buněčné struktury a funkce. Může vést ke ztrátě buněčné integrity modifikací DNA nebo proteinů a také abnormální expresi buněčných genů. Známí vychytávací volných radikálů neenzymového typu v lidské kůži jdou betakarotény, vitamíny C a E. Vychytávací enzymového typu jsou GSH peroxidáza, superoxid dismutáza a kataláza. Oba typy vychytávačů se podílejí na protekci kůže před UVA indukovanému poškození a bylo zjištěno, že jsou významně sníženy po UVA ozáření keratinocytů. Některé intracelulární mechanismy v kůži regenerují antioxidanty, tj. L-askorbová kyselina může regenerovat vitamín E a zbavit ho tokoferoxylových radikálů. Výsledný askorbový radikál může sám být konvertován na askorbat redukovanou GSH.

Zvýšení tvorby volných oxygenových radikálů, speciálně volných radikálů generovaných z peroxidu vodíku (H₂O₂), bude toxicky působit na buňky a výsledkem bude poškození tkáně. L-askorbová kyselina, ačkoli může účinně vychytávat volné radikály, však také může generovat volné kyslíkové radikály při prevenci volnými radikály zprostředkovaného poškození DNA a proteinů. Když jsou vyčerpány antioxidační mechanismy epidermis, může docházet ke vzniku „sluncem popálených buněk“ a poškození Langerhansových buněk. Poškození DNA se může projevit dvěma mechanismy. Jeden předpokládá, že *OH v DNA je vytvářen vazbou H₂O₂ na metalické ionty, které jsou obvykle vázány na DNA. Při druhém lipidová peroxidace membrán zprostředkovaná volnými radikály působí zvýšení intracelulárního Ca²⁺, které vede k aktivaci endonukleáz. Následkem těchto mechanismů jsou modifikace DNA komplexů a zlomy vláken.

Aplikace L-askorbové kyseliny může chránit kůži před UV indukovanými volnými radikály. Lokální aplikace L-askorbové kyseliny chrání normální kůži před vznikem „sluncem popálených buněk“ a jiných UV indukovaných poškození. L-askorbová kyselina může být chápána jako vychytávač UVA indukovaných volných radikálů v keratinocytech a může chránit proti UVA poškození *in vivo* (14).

Význam keratinocytů a cytokinů v hojení rány

Migrace keratinocytů a fibroblastů hraje důležitou roli v hojení rány. Tyto buňky mohou interagovat s pod nimi ležící a je obklopující tkání přes buněčné povrchové receptory zvané integriny. Tyto růstové faktory (cytokiny) mají různé efekty na různé typy buněk působících v procesu hojení rány a zahrnujících, ale ne limitovaných chemotaxí monocytů, neutrofilů a fibroblastů (PDGF), proliferaci keratinocytů (EGF a FGF), fibroblastů (EGF, FGF a PDGF), endoteliálních buněk (FGF a EGF) a zvýšenou depozici komponent matrix (TGF- β). Tyto růstové faktory působí ve shodě a udržují v rovnováze kontrolní systém. Tyto peptidy mají schopnost navodit migraci a upevnění těchto buněk adhezními peptidy by mohlo podporovat mnohem rychlejší přísun buněk odpovědných za depozici matrix a epitelizaci spodiny rány, což je klíčový stupeň hojení rány (15).

Epidermis již dále nemůže být chápána jen jako mechanická bariéra, ale hraje aktivní roli v imunitních a zánětlivých reakcích a částí své kapacity se podílí na produkci velké řady cytokinů.

Keratinocyty produkují široké spektrum cytokinů, které hrají významnou roli v kožních zánětlivých a imunitních reakcích. IL-1 α , IL-6 a TNF- α se zvyšovaly po ozáření UVB. Z keratinocytů uvolněné cytokiny jsou schopné interakce pod bazální membránou a prezentují skutečnost, že produkce těchto cytokinů z keratinocytů se podílí na zvýšení cirkulace po UVB ozáření.

Cytokiny jsou malé proteiny nebo glykoproteiny, které jsou syntetizovány a sekretovány buňkami různých typů. Keratinocyty jsou hlavní zdroj cytokinů v epidermis. Syntéza cytokinů se zvyšuje při reakci na různé poškozující stimuly, včetně UV záření. Ačkoli mnoho cytokinových interakcí projevuje autokrinní nebo parakrinní způsob vazby na specifické receptory cílových buněk epidermis, lo-

kálně uvolněné cytokiny mohou mít velmi vzdálené účinky. I když jen minimální množství cytokinů je schopno pénétrovat přes epidermis, je jasné, že UVB uvolňuje cytokiny v epidermis, které pak mají možnost vstupovat do systémové cirkulace.

Ozáření slunečním světlem může způsobit významné zvýšení uvolňování cytokinů z keratinocytů, které pak penetrují do dermis, kde mohou pronikat do dermálních krevních kapilár a pak také do systémové cirkulace (16).

Endoteliny (ETs) jsou vazoaktivní peptidy, které jsou syntetizovány a uvolňovány needoteliálními buňkami. Nyní bylo prokázáno, že endothel není jediným místem syntézy, stejně jako hladké svalstvo není jediným terčem. Bylo zjištěno, že lidské keratinocyty, makrofágy a monocyty produkují endoteliny. ET-1 je jeden ze známých velmi silných vazokonstriktorů (17).

GM-SCF může mít vliv na některé reparační pochody spojené s proliferací endotelií při neovaskularizaci (např. hojení ran) (18).

Závěr

Interakce organismu se zevním prostředím jsou zprostředkovány přes epidermis a přes několik rozdílných keratinizovaných a nekeratinizovaných epitelů. V současné době se obnovil zájem o účinky záření na epidermis. Jedním z předpokladů aktivní buněčné reakce je, že ozáření buňky mohou sekretovat signální substance, které pak iniciují proliferaci či smrt těchto nebo sousedních buněk. Smrt epiteliálních buněčných typů se obvykle projevuje apoptózou. Schopnost buněk odpovědět na extracelulární stres je základní pro jejich přežití. Tato odpověď zahrnuje změny vlastností a rychlosti exprese genů. Ionizující záření navozuje takové změny během několika hodin. Ty pak mohou vést jednak k zastavení buněčného cyklu a reparaci, jednak k buněčné smrti. Obě tyto možnosti jsou závislé na rozsahu radiačního poškození. Na rozdíl od UV záření, které poškozuje především epidermis, je ionizující záření schopné poškodit nejen epidermis, ale celou kůži, včetně tkání ležících pod ní. Homeostáza epidermis zabraňuje vzniku přebytku buněk a ustanovuje architekturu kůže s udržením náležitého počtu buněk. Migrace keratinocytů a fibroblastů hraje důležitou roli v hojení rány a růstové faktory udržují v rovnováze kontrolní systém. Epidermis již dále nemůže být chápána jen jako mechanická ba-

riéra, ale hraje aktivní roli v imunních a zánětlivých reakcích a částí své kapacity se podílí na produkci velké řady cytokinů. Ozáření může způsobit významné zvýšení uvolňování cytokinů z keratinocytů, které pak penetrují do dermis, kde mohou pronikat do dermálních krevních kapilár a pak i do systémové cirkulace.

Literatura

1. De LUCA, M. – CANCEDDA, R. Culture of human epithelium. *Burns*, 1992, vol. 18, Suppl. 1, p. S5–S10.
2. TENCHINI, ML. – RANZATI, C. – MALCOVATI, M. Culture techniques for human keratinocytes. *Burns*, 1992, vol. 18, Suppl. 1, p. S11–S15.
3. MOTHERSILL, C. – SEYMOUR, C. Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblast reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1997, vol. 71, no. 4, p. 421–427.
4. MOTHERSILL, C. – SEYMOUR, C. Survival of human epithelial cells irradiated with cobalt 60 as microcolonies or single cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1997, vol. 72, no. 5, p. 597–606.
5. MARTIN, M., et al. Coactivation of AP-1 activity and TGF- β gene expression in the stress response of normal skin cells to ionizing radiation. *Oncogene*, 1997, vol. 15, p. 981–989.
6. DAZA, P., et al. Radiosensitivity and double-strand break rejoining in tumorigenic and non-tumorigenic epithelial cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1997, vol. 72, no. 1, p. 91–100.
7. SEYMOUR, CB. – MOTHERSILL, C. Delayed expression of lethal mutations and genomic instability in the progeny of human epithelial cells that survived in a bystander-killing environment. *Radiat. Oncol. Invest.*, 1997, vol. 5, p. 106–110.
8. MORGAN, WF., et al. Genomic instability induced by ionizing radiation. *Radiat. Res.*, 1996, vol. 146, no. 3, p. 247–258.
9. CLUTTON, SM., et al. Radiation induced genomic instability and persisting oxidative stress in primary bone marrow cultures. *Carcinogenesis*, 1996, vol. 17, p. 1633–1639.
10. LIU, K., et al. Differential expression of CD44s and CDv10 proteins and syndecan in normal and irradiated mouse epidermis. *Histochem. Cell. Biol.*, 1997, vol. 107, p. 159–167.
11. BENASSI, L., et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3, Transforming Growth Factor β 1, Calcium, and Ultraviolet B Radiation Induce Apoptosis in Cultured Human Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 1997, vol. 109, p. 276–282.
12. LI, G., et al. Differentiation-Dependent p53 Regulation of Nucleotide Excision Repair in Keratinocytes. *Am. J. Pathol.*, 1997, vol. 150, p. 1457–1464.
13. NIGRO, JM., et al. Cellular adhesion regulates p53 protein levels in primary human keratinocytes. *Cancer Res.*, 1997, vol. 57, p. 3635–3639.
14. TEBBE, B., et al. L-Ascorbic Acid Inhibits UVA-Induced Lipid Peroxidation and Secretion of IL-1 α and IL-6 in Cultured Human Keratinocytes in vitro. *J. Invest. Dermatol.*, 1997, vol. 108, p. 302–306.
15. MERTZ, PM., et al. Effects of an Arginine-Glycine-Aspartic Acid Peptide-Containing Artificial Matrix on Epithelial Migration In Vitro and Experimental Second-Degree Burn Wound Healing In Vivo. *J. Burn Care Rehabil.*, 1996, vol. 17, p. 199–206.
16. KONDO, S., et al. Penetration of keratinocyte-derived cytokines into basement membrane. *J. Cell. Physiol.*, 1997, vol. 171, p. 190–195.
17. ZACHARIAE, H., et al. Plasma Endothelin in Psoriasis: Possible Relations to Therapy and Toxicity. *Acta Derm. Venereol.* (Stockh), 1996, vol. 76, p. 442–443.
18. KLENER, P., aj. *Cytokiny ve vnitřním lékařství*. Praha, Grada Publishing, 1997, 260 s.

Korespondence: Doc. MUDr. Pavel Petýrek, CSc.
Ústav zdravotnické nukleární a
biologické ochrany
Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: petyrek@pmfhk.cz

Do redakce došlo 12. 4. 2001