

CHRONICKÝ ÚČINEK ULTRAFIALOVÉHO ZÁŘENÍ NA ORGANISMUS

¹MUDr. Jana ROSTOVÁ, ²MUDr. Lenka BORSKÁ, Ph.D., ¹doc. Ing. Zdeněk FIALA, CSc., ³prof. RNDr. Jan KREJSEK, CSc.

¹Univerzita Karlova v Praze, Ústav hygieny a preventivního lékařství Lékařské fakulty v Hradci Králové

²Univerzita Karlova v Praze, Ústav patologické fyziologie Lékařské fakulty v Hradci Králové

³Ústav klinické imunologie a alergologie Fakultní nemocnice Hradec Králové

Souhrn

Dlouhodobá expozice ultrafialovému záření (UV) vyvolává v organismu řadu chronických změn, jejichž rozsah a intenzita jsou modifikovány individuálními faktory. Cílem předkládané práce je přehled aktuálních poznatků o mechanismech chronického působení UV záření na organismus. Stárnutí kůže způsobené chronickou expozicí UV záření je spojeno s elastózou koria, zmnožením glykosaminoglykanů, úbytkem kolagenních vláken a s dalšími změnami vyvolanými chronickým zánětem (heliodermatitis). Nejčastějšími formami kožních malignit vyvolaných chronickou expozicí UV záření je bazaliom, spinaliom a maligní melanom. Poškození buněk vedoucí k maligní transformaci vzniká přímým (převážně expozice UV-B záření) i nepřímým (převážně expozice UV-A záření) mechanismem. Přímý mechanismus je založen na poškození DNA, které se projeví vznikem cyklobutanových pyrimidinových dimerů a (6,4)-fotoproduktů. Nepřímý mechanismus spočívá ve vzniku volných radikálů s následujícím poškozením proteinů a membránových struktur. Na etiologii kožních malignit se významnou měrou podílí i změny v imunitním systému projevující se vznikem lokální i systémové imunosuprese, s následným poškozením imunitního dohledu. Chronická expozice UV záření vyvolává kontaktní hypersenzitivitu (CHS) i reakce oddálené přecitlivělosti (DTH, tuberkulinová, granulomatozní) a „hapten specifickou toleranci“. Častým průvodním jevem fotokarcinogeneze jsou též mutace některých protoonkogenů (ras, raf) a antionkogenů (p53, Rb1, BRCA1, Ptch, ESS1, bcl-2), v jejichž důsledku dochází k poruchám procesu apoptózy. Velký význam pro studium závažných biologických účinků UV záření mají fotodermatózy (xeroderma pigmentosum, Cockayneho syndrom a trichothiodystrofie) spojené s poruchami reparačních mechanismů DNA (zejména nukleotidových excisních oprav).

Klíčová slova: Ultrafialové záření; Photoaging; Karcinogeneze; Imunosuprese.

Chronic Effects of Ultraviolet Radiation on Organism

Summary

Long term exposure to Ultraviolet-radiation (UV) causes many chronic changes in organism which extent and intensity is being modified by individual factors. The aim of this paper is to give an overview of current information on mechanisms of chronic effect of UV radiation on organism. Skin aging caused by chronic exposure to UV radiation is connected with corial elastosis, glykosaminoglykan multiplication, and collagen fibres diminution and with many other changes, caused by chronic inflammation (heliodermatitis). The most frequent forms of skin malignancies, caused by chronic exposures to UV radiation, are bazalioma, spinalioma and malignant melanoma. Cellular damage, leading towards malignant transformation, is caused by both direct (mostly exposure to UV-B radiation) and indirect (mostly exposure to UV-A radiation) mechanism. Direct mechanism is based on DNA damage that is manifested in cyclobutane pyrimidine dimers rise and (6,4)-photoproducts. Indirect mechanism is based on free radicals rise, with following protein and membrane structures damage. Changes in immune system, manifested in both local and system suppression rise (with consecutive immune charge damage), partake significantly in etiology of dermal malignancies. Chronic exposure to UV radiation causes both contact hypersensitivity (CHS) and estranged hypersensitivity reactions (DTH, tuberculine, granulomatosis) and also "hapten specific allowance". Common accompaniments of photo carcinogenesis are also mutation of some of protooncogene (ras, raf) and antioncogenes (p53, Rb1, BRCA1, Ptch, ESS1, bc1-2) in consequence of which apoptosis process damage occurs. Photodermatosis (Xeroderma pigmentosum, Cockayne's syndrom and Trichothiodystrophy) connected with reparation mechanism disorders (especially nucleic excise repairs) are of great significance for serious biologic effects of UV radiation study.

Key words: Ultraviolet-radiation; Photo-aging; Carcinogenesis; Immunosuppression.

Úvod

Ultrafialové (UV) záření patří mezi významné vlivy prostředí, které mohou determinovat stav lidského zdraví. Expozice UV záření vyvolává v organismu řadu akutních a chronických změn, jejichž rozsah a intenzita jsou modifikovány individuálními faktory, jako je doba a intenzita expozice, geneticky podmíněná odolnost a aktuální stav organismu.

V současné době dochází k celosvětovému nárůstu výskytu kožních malignit. Tento nárůst je přičítán zvýšené expozici UV záření v důsledku změn chování populace a v důsledku poškození ozónové vrstvy (12). Mezi zhoubné novotvary kůže indukované UV zářením patří bazocelulární karcinom, spinocelulární karcinom a maligní melanom. Zhoubné novotvary kůže, zejména zhoubný melanom, se v České republice řadí mezi velmi sledovaná onemocnění. V roce 2001 bylo u mužů hlášeno 741 nových onemocnění, což reprezentuje zvýšení o 162 % proti roku 1980. Počet zemřelých na dané onemocnění se ve stejném roce zvýšil proti roku 1980 o 21 %. Výskyt zhoubného melanomu kůže narůstá také u žen. V roce 2001 bylo hlášeno 716 nových onemocnění, což reprezentuje zvýšení o 155 % proti roku 1980. Počet zemřelých ve stejném roce se proti roku 1980 zvýšil o 33 % (21).

Poškození buněk vedoucí k maligní transformaci vzniká přímým (převážně UV-B záření) a nepřímým (převážně UV-A záření) mechanismem (33). Významnou roli při vzniku kožních malignit hraje poškození funkce APC buněk (antigen prezentující buňky), NK („natural killers“) a přesměrování Th odpovědi s následnou poruchou imunitního dohledu (8). Z hlediska ochrany organismu mají velký význam hladiny antioxidantů v keratinocytech a úroveň reparačních mechanismů DNA (28). Dalším důležitým obranným mechanismem je apoptóza poškozených buněk. Bohužel však geny, které apoptózu řídí, jsou častým cílem mutací v kožních karcinomech. Důsledkem toho dochází k přenosu mutací na další generace buněk (23).

Cílem předkládané práce je přehled aktuálních poznatků o mechanismech chronického působení UV záření na organismus. Přiblížení mechanismů vybraných chronických účinků expozice UV záření může přispět k efektivnější prevenci a účinnější terapii onemocnění indukovaných UV zářením.

Stárnutí kůže způsobené UV světlem

Stárnutí kůže způsobené UV světlem (photoaging) zahrnuje změny kůže vzniklé v souvislosti s expozicí kůže UV záření, není prostým urychlením na věku závislých, ke stárnutí vedoucích poruch. U velmi starých lidí, kteří se celý život vyhýbali oslunění je kůže hladká, neposkvrněná, pouze ztenčená, méně elastická s prohloubením ohybových rýh. Photoaging se po vzhledové stránce projevuje vznikem vrásek, zdrsňením, snížením tonu kůže, skvrnitými hyperpigmentacemi, lentigy, aktinickými keratózami, olupováním, zažloutnutím, atrofií a teleangiektaziemi.

Photoaging jako důsledek chronické expozice UV záření má úzký vztah ke vzniku pigmentových i nepigmentových kožních malignit (7, 24, 35). Mezi nepigmentové změny řadíme aktinické keratózy, keratoakantomy, basaliomy, spinaliomy a lentiginózní melanom, ale i benigní útvary (solární lentigo, seborrhoická keratóza) (8). Těmito dlouhodobými změnami jsou více postiženy osoby prvního fototypu žijící v geografických oblastech s větší intenzitou slunečního záření a pracující pod otevřeným nebem (zemědělci, námořníci). V mírných oblastech Evropy se uvedené změny objevují nejčastěji po 50. roce věku.

UV záření aktivuje receptory pro EGF (epithelial growth factor), TNF α (tumor necrosis factor alpha) na povrchu keratinocytů a fibroblastů. Tyto receptory vedou k aktivaci transkripčního faktoru AP-1 (aktivační protein 1). Ten stimuluje tvorbu tkáňových (matrixových) metaloproteáz (MMP), u fibroblastů navíc brání expresi genu pro kolagen. Keratinocyty a fibroblasty secernují MMP a rozkládají kolagen a další proteiny tvořící extracelulární matrix v kůži. Opakované expozice záření způsobí díky akumulaci poškození koria vrásky. K aktinickému stárnutí také přispívá UV zářením vyvolané poškození DNA molekuly, a to nejen té uložené v buněčném jádře, ale především té mitochondriální, která nemá možnost reparace. Tento typ poškození vede časem k narušení metabolických procesů (8).

Základním histologickým podkladem photoagingu je elastóza, kdy je v kůži amorfní změť mnoha elastických vláken. Dochází k zmnožení glykosaminoglykanů. Kolagenní vlákna naproti tomu mizí a tím uvolňují prostor pro předchozí změny. Vzniká hyperplazie a zmnožení fibroblastů, zmnožení žírných buněk, mononukleárů. Tyto změny odpovídají chronickému zánětu, tzv. heliodermatitidě. Epider-

mis je v odpovědi na zánětlivé změny ztlustělá, objevuje se akantóza, buněčné atypie, ztráta polarity a variabilita velikosti buněk. UV záření také navozuje poruchy mikrocirkulace, od dilatace a změny průběhu cév až k jejich úplné obliteraci (8). Normální horizontální cévní pleteně se vytrácejí. Poškození vzniklé chronickým ozařováním není ireverzibilní, ze subepidermální hraniční zóny je obnovován kolagen.

U staré kůže chráněné před UV zářením se nikdy neobjevuje elastóza. Fibroblasty ubývají a mastocyty jsou vzácné. Epidermis se ztenčuje a je vyhlazeno dermo-epidermální spojení. I zde je sníženo zastoupení drobných cév, ale cévy nejsou dilatované a vinuté.

Podle současných názorů je za změny v epidermis odpovědnou především UVB pásmo, v dermis se uplatňuje jak UVB, tak i oblast UVA.

Fotokarcinogeneze

Vznik nádoru je komplexní, vícestupňový děj. Jednotlivé děje, které ke vzniku karcinomu vedou se nazývají iniciace, promoce a progres. Prvním krokem je iniciace, kdy mutací vzniká změna genetické informace. Promoce je nezbytným pochodem, při kterém se díky poruše kontrolních mechanismů pomnoží buňky s poškozenou DNA. Progrese zahrnuje přechod v potenciálně metastazující, invazivní tumor. Všechny tyto procesy ultrafialové záření ovlivňuje a to tím, že poškozuje genetickou informaci, vyvolává tvorbu volných kyslíkových radikálů, lokálního zánětu, zvyšuje tvorbu některých cytokinů a působí lokální i celkovou imunosupresi. Tyto vlivy mohou vyústit ve vznik malignit, nejčastěji kožních nádorů – spinaliom, bazaliom, maligní melanom. Existuje ale také vztah chronické UVB expozice a vzniku některých leukémií (lymfoidní leukémie) (39).

Kožní nádory patří mezi nejčastější nádory v populaci, jejich incidence celosvětově stoupá, např. výskyt melanomu se každých deset let zdvojnásobí (12). Souvislost mezi expozicí slunečnímu záření a vznikem nádorů kůže vyplývá již ze skutečnosti, že tyto malignity jsou vesměs lokalizovány na místech nekryté kůže (24). Častěji také vznikají u osob pracujících venku. Prevalence je značně ovlivněna zeměpisnou šířkou. Mezi oblastmi s největším výskytem patří Austrálie. Velmi významný je také fototyp jedince, ohrožení je větší u prvního a druhého foto-

typu (27). Modelovou situací může být albinismus, kdy postižení jedinci nejsou schopni tvořit melanin, jejich kůže je díky tomu daleko citlivější na sluneční záření a incidence zhoubných novotvarů je u nich vyšší. Výskyt kožních malignit je vyšší u bílé populace, 90 % nádorů vzniká v kůži exponované slunci (9).

Mezi nejvýznamnější kožní malignity vznikající v souvislosti s UV expozicí patří:

- **Aktinická keratóza.** Tato změna je považována za prekancerózu, někdy se užívá pojem spinalioma in situ, protože přechází ve spinaliom. Aktinická keratóza vzniká v kůži chronicky exponované UV záření obvykle u osob starších 45 let. Klinicky se jeví jako zarudlá, zhrubělá ložiska často s teleangiektaziemi. Snadno po poranění krvácí (2, 40).
- **Bazaliom.** Tento typ rakoviny vzniká opět v chronicky ozařované kůži. Častěji se objevuje u mužů, na obličeji. Bazocelulární karcinom vypadá jako čoučovitá indurace až uzlík, může vředovatět. Jeho nebezpečí spočívá v lokální invazivitě (ulcus rodens), metastázy jsou velmi vzácné. Naopak recidivy se objevují často (40).
- **Spinaliom.** Je daleko vzácnější než předchozí typ rakoviny. Opět vzniká u starších osob jako následek chronické expozice UV záření. Makroskopicky se jeví jako tuhá keratotická papule, která může zvředovatět. Spino-celulární karcinom má na rozdíl od bazaliomu tendenci tvořit metastázy.
- **Maligní melanom.** Vzniká maligní přeměnou melanocytů nebo vychází z névocytů, proto jsou dysplastické névy považovány za prekancerózu. Na rozdíl od dříve uvedených lézí vede ke vzniku melanomu akutní popálení až do puchýřků, především v dětském věku (10). Rozlišuje se několik klinických forem: nodulární, povrchově se šířící, akrolentiginózní, amelanotický a lentigo maligna melanom. Brzy po vzniku léze dochází k metastazování (7, 40).

UV expozice poškozuje buňku na několika úrovních a tím podporuje vznik rakovinného bujení. Pří-
mým následkem expozice záření UVB jsou struktu-
rální změny DNA, UVA poškození je nepřímé, zpro-
středkované kyslíkovými radikály.

Volné radikály

Volné radikály jsou látky, které mají ve vnějším orbitalu nepárový elektron, proto mají velkou snahu získat do páru jiný.

Nejčastěji se z radikálů uplatňují volné **kyslíkové radikály** (VKR). Místo tohoto termínu by bylo vhodnější označení ROS – Reactive Oxygen Species (aktivní formy kyslíku), protože např. singletový kyslík není radikálem, ač je nebezpečnější. Mezi kyslíkové radikály patří superoxid O_2^- , hydroxylový radikál $\cdot OH$, singletový kyslík 1O_2 , peroxyhydroxylový radikál $\cdot O_2H$, nitroxidový radikál ($\cdot OH$), event. HOCl, chloraminy. Na tvorbě kyslíkových radikálů v kůži má větší podíl UVA pásmo, jejich vlivy na buňku zahrnují poškození DNA, bílkovin, lipidů, depleci NAD⁺ a tím i ztrátu energie.

UV záření zvyšuje aktivitu xantin oxidázy v lidských keratinocytech a tím zvyšuje tvorbu superoxidových radikálů. V lidské kůži je celá řada chromoforů, jako jsou porfyriny a hem, které mohou produkovat ROS po expozici UV záření. Mezi nejvýznamnější z nich patří superoxid a hydroxylový radikál.

Obranou organismu proti ROS jsou antioxidanty. Enzymové (cytochromy, superoxiddismutáza, kataláza, glutathionperoxidáza), neenzymové (vitaminy A, D, C, β -karoten, transferin, albumin, ceruloplazmin, Cu, Zn, Mg), scavengery vzniklých VKR, některé stopové prvky aj. (34). Zvýšená produkce ROS po UV expozici může vyčerpat tyto ochranné mechanismy, což má za následek větší náchylnost kůže k poškození radikály (22).

UVB i UVA záření stimuluje aktivitu NO syntáz v kůži. Tyto enzymy (inducibilní – iNOS, neurální – nNOS, endoteliální – eNOS) tvoří z L-argininu **oxid dusnatý** (NO). NO může reagovat se superoxidovými radikály za vzniku peroxynitritu, jenž je v rovnováze s kyselinou peroxynitritovou. Tyto látky jsou vysoce reaktivní a vedou k poškození DNA, nitrosylaci tyrosinových zbytků v proteinech a působí lipoperoxidaci (16).

V odpovědi na poškození DNA vyvolané peroxynitritu je aktivovaná Poly (ADP-ribóza) polymeráza (PARP), která spotřebovává NAD⁺ s následným vyčerpáním intracelulárních energetických zdrojů. Tímto mechanismem jsou poškozeny buněčné funkce, v extrémních případech může dojít až k zániku buňky.

Zánětlivé buňky jako jsou makrofágy, neutrofily také tvoří NO a ROS, s následným vznikem per-

oxynitritu, poškozením DNA a energetickými ztrátami. Lokální zánět po expozici ultrafialovému záření je podporován především vyššími hladinami IL-1 α , TNF, PG (prostaglandinů), jím vyvolaná oxidační poškození mají mj. vztah ke vzniku malignit. Tento vztah můžeme dokumentovat změnami solární keratózy (SK) při přechodu ve spinaliom. Podrobněji-li bližšímu zkoumání SK, které se klinicky jeví jako zánětlivé a bolestivé, zjistíme že polovina z nich je již časným stadiem spinaliomu, zbylé jsou SK s vyšším počtem dysplazií oproti nezaníceným solárním keratózám. Přechod nezanícené SK v zanícenou SK, následně pak v histologicky i klinicky diagnostikovatelný spinaliom je provázen několika imunohistochemicky zjištěnými změnami. Je to ztráta „heat shock proteinu“ (HSP27), vzestup aktivního p53 a bcl-2, pokles exprese Fas. Zajímavé je, že zánět mizí po přechodu SK v karcinom. Tento jev je pravděpodobně spojen s větší expresí Fas ligandu na buňkách spinaliomu oproti solární keratóze. Fas L umožňuje navodit apoptózu v zánětlivých buňkách a tím lokální zánět zaniká. Stejně tak může Fas L pomáhat nádorovým buňkám bránit se proti T-Ly a tím i proti vznikající buněčné imunitní reakci (16).

Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) podléhají *lipoperoxidaci*. VKR odtrhne elektron z PUFA a tím vznikne lipidový radikál. Ihned následuje navázání dvou atomů kyslíku a vzniká lipidový peroxidradikál. Po redukci vodíkem vzniká lipidový hydroperoxid, který buď zůstává v takto poškozené buněčné membráně, nebo se mění na lipidový cykloperoxid. Ten podléhá dalším změnám, jejichž konečným produktem jsou LLP (lipofuscin-like pigments). Díky lipoperoxidaci se také zvyšuje produkce prostaglandinů (PG), např. PGE₂, které vyvolávají zánět a tím opět zvyšují oxidační stres. PGE₂ vzniká z kyseliny arachidonové působením inducibilní cyklooxygenázy (COX-2). Její vyšší aktivita se přispisuje UV zářením navozenému zvýšení aktivity fosfolipázy, která tak zvyšuje nabídku volné kyseliny arachidonové pro tvorbu PG (16).

Obecně působí ROS **poškození bílkovin** jejich oxidací, nesporný je také jejich vliv na **nádorové bujení**. Poškozují **membrány** přímo při peroxidaci či nepřímo uvolněním kyseliny arachidonové, která je zdrojem leukotrienů a PG a tím i dalších VKR. Dochází k degradaci kyseliny hyaluronové a **poškození mezibuněčných prostor**. Vzniká zánětlivá reakce a tím se opět zvýší produkce VKR (17).

Strukturní změny DNA

Z UVB navozených strukturálních změn DNA se nejčastěji objevují cyklobutanové pyrimidinové dimery (CPDs), (6-4)-fotoprodukty ((6,4)-PPs), méně často vznikají purinové dimery, cytosin fotohydrát, 8-oxo-7,8-dihydroguanin a jiné změny (6). Hlavní nebezpečí spočívá v UVB pásmu, ale podíl expozice UVA na mutagenních vlivech je odhadován na 10–20 % (účinkuje nepřímě, prostřednictvím ROS) (29). Proto se také liší zastoupení nejčastějších změn vyvolaných UVA zářením. Protože je guanin z DNA bází nejcitlivější k oxidaci, velmi často se objevují mutace G na T, A nebo C (16).

CPDs jsou tranzitní mutace vznikající u dvou sousedících pyrimidinových bází, z nichž jedna je cytosin. Výsledkem jsou dimerické pyrimidinové produkty, kde je cytosin nahrazen thyminem. CPDs jsou považovány za hlavní mutagenní poškození, je to dáno četností jejich tvorby (tvorí více než 80 % vzniklých mutací), pomalou opravou a častým obejitím opravných mechanismů (6, 33).

(6,4)-PPs jsou charakterizované silnou vazbou mezi pozicemi 6 a 4 dvou sousedících pyrimidinů, častěji jsou nalézány na 5'-TC a 5'-CC sekvencích. Nejsou tak časté jako pyrimidinové dimery. Jejich význam v UV mutagenezi není zcela jasný.

Delší dobu je známo, že dipyrimidiny obsahující cytosin jsou častým cílem UV záření navozených mutací. Ale v nedávné době bylo zjištěno, že **5-metylcytosin** hraje snad ještě významnější roli mezi UVB zářením navozenými mutacemi. Možným vysvětlením může být jeho oproti cytosinu větší citlivost k delším vlnovým délkám. 5-metylcytosinové báze jsou téměř výhradně zastoupeny v CpG dinukleotidech. Tyto sekvence jsou častým místem mutací v genech spojených s lidskými geneticky podmíněnými chorobami. Jejich náchylnost podléhat mutacím je podmíněna dvěma mechanismy: spontánní deaminací 5-metylcytosinu vzniká thymin, časté působení karcinogenů v této pozici. U lidských keratinocytů je 5-metylcytosin zastoupen např. v trinukleotidové sekvenci 5'-PyCG genu p53. Tato sekvence je častým místem tranzice C za T v karcinomech kůže navozených slunečním zářením. U genu p53 je známo 8 velmi často mutovaných oblastí, 5 z nich (kodony 196, 213, 245, 248, 282) obvykle obsahuje mutovaný dipyrimidin v sekvencích 5'CCG či 5'TTG (33).

Proti poškození DNA zasahují **reparační mechanismy** jako je excizní oprava, postreplikační oprava

a fotoreaktivace. Přetížením způsobeným UV zářením těchto buněčných reparačních systémů je umožněna karcinogeneze. Modelem může být geneticky podmíněné onemocnění xeroderma pigmentosum, jehož podkladem je porucha reparačních mechanismů. Nemelanotická rakovina se u těchto jedinců objevuje již okolo 8. roku života.

- **Excize** se účastní enzymy endonukleáza, exonukleáza a ligáza. Následkem je vytěti poškozeného úseku nukleové kyseliny a znovuzrekonstruování DNA. Tento reparační systém je ve své aktivitě ohraničen erytémovou dávkou radiace o ½ až 1 MED a vyčerpá se opakováním několika menších radiačních dávek (25).
- **Postreplikační oprava** se objevuje až v průběhu dělení poškozené DNA, pro opravu je využita sekvence bází sousedního řetězce. Je známa jako „error prone“ oprava (k chybám náchylná) a je spojena se zvýšenou mutagenitou.
- **Fotoreaktivace** je neenzymatický proces, při kterém světlo určitých vlnových délek přímo štěpí thyminové dimery (8).

Cyklické pyrimidinové dimery jsou primárně opravovány nukleotidovou excizní opravou (NER), složitým procesem, na kterém se účastní minimálně 25 proteinů. Lze rozeznat tyto základní kroky:

- rozpoznání poškození DNA,
- rozpojení DNA vlákna na obou stranách poškození,
- excize DNA fragmentu,
- opravná syntéza DNA k zaplnění vystřiženého úseku,
- spojení vláken.

Proteinový komplex XPC-hHR23B je primárním, poškození rozpoznávajícím faktorem, který označí konce mutovaného úseku DNA. Následně se vytváří incizní komplex z transkripčního faktoru TFIIH, XPA-RPA proteinového komplexu a dvou endonukleáz (XPG a XPF-ERCC1) (28).

Nukleotidová excizní oprava zahrnuje dvě cesty odstranění poškozené DNA. Mutace, které vznikly v aktivně přepisovaných oblastech genetické informace jsou odstraněny rychle fungujícím mechanismem tzv. s transkripcí vázané opravy (TCR). Poškození jiných částí genomu je odstraněno pomalejší cestou globální genomové opravy (GGR). TCR je vázána k aktivní transkripci genomu, předpokládá

se, že signálem pro tento opravný mechanismus je zastavení transkripce. Na rozdíl od GGR zde není nutný proteinový komplex XPC-hHR23B k rozpoznání léze (26). Defekty těchto pochodů mohou ústit ve tři různá onemocnění – xeroderma pigmentosum, Cockayneho syndrom, trichothiodystrofie. Každá z uvedených nemocí je spojena s poškozením jiné složky NER, proto jsou vhodným modelem pro studium mechanismů DNA opravy. XPA má poškozeny TCR i GGR, XPC pouze GGR a CS jen TCR (5). U skupiny myši s vyřazeným XPA i C mechanismem opravy se ukázala vyšší citlivost k působení karcinogenů, včetně UV. XPC (GGR porucha) myši mají podobné MED jako zdravá zvířata. Ale po expozici ultrafialovému záření u XPA, CS (porucha TCR) myši se ukázaly změny v postiradiačních reakcích, jako je déle přetrvávající a více vyjádřený edém, větší vznik sunburn cells, delší poškození LC a výraznější lokální i systémová imunosuprese. Toto pozorování je potvrzením úlohy DNA reparačních mechanismů při vzniku UVB imunosuprese a také naznačuje rozdílnou úlohu TCR a GGR ve vzniku postiradiačních reakcí a v karcinogenezi (5, 36). TCR i GGR jsou nutné k prevenci imunomodulace po UV expozici, ale fungující TCR postačuje k ochraně proti UVB indukovanému erytému (28).

U lidí postižených xeroderma pigmentosum je nalézáno normální množství NK, T-Ly i produkce TNF α je nezměněna. Nicméně je porušena funkce NK-buněk i jejich produkce interferonu γ . Při srovnání XP a TTD je sice u obou skupin snižena aktivita NK, ale u XP je navíc méně cirkulujících T-Ly. U Cockayneho syndromu nebyly změny imunity prokázány. Uvedené změny u XP opět spojují poškození imunity a fotokarcinogenezi.

Mutace na XPD genu může být spojena jak s XPD, tak i s TTD, ale jen XP s sebou nese zvýšené riziko vzniku rakoviny. Intercelulární adhezivní molekula 1 (ICAM-1) je vystavena na povrchu Langerhansových buněk, keratinocytů, fibroblastů a je zapojena do mnoha významných dějů v imunitě (především do buněkami zprostředkovaných imunitních reakcí). Expres ICAM-1 molekul na fibroblastech se zvyšuje díky IFN γ , toto zvýšení je ale po UVB expozici v závislosti na dávce oslabeno. Právě zde se liší XPD a TTD, u trichothiodystrofie po UVB expozici nastane obvyklé IFN γ indukované zvýšení exprese ICAM-1, ale u xeroderma pigmentosum je tato reakce poškozena. Podle těchto výsledků u jedinců s poškozenou opravou DNA, ICAM-1 od-

pověď koreluje s rizikem vzniku rakoviny a s poruchou opravy CPDs (37). Neopravené pyrimidinové dimery mohou zastavit transkripci RNA polymerázou II a tím zabránit transkripci genů nutných k odpovědi na UVB expozici (5).

Buňky s poškozeným genomem mohou být zastaveny v různých fázích buněčného cyklu a pak podlehnout apoptóze – tím je zabráněno šíření poškozené DNA. Přechodné zastavení buněčného cyklu zajistí čas pro opravu mutací. TCR je postačující k pokročení buňky do S fáze, brání také vzniku hyperplazie i apoptózy. Ochranný efekt je pravděpodobně podmíněn odstraněním apoptotického signálu, který asi vzniká jako následek zastavení transkripce (blokádu RNA polymerázy II v oblasti mutovaného úseku). TCR tedy chrání proti vzniku akutních efektů UV (edém, erytém), vzniku apoptózy, hyperplazie, ale ne proti vzniku rakoviny (31).

DNA polymeráza η (POLH), kódovaná genem XPV u lidí, je pravděpodobně odpovědná za nízkou frekvenci výskytu mutací v 5'-TT sekvencích kůže exponované UV. POLH správně přechází tyto léze. Existují dva modely vysvětlující převahu transpozicí C za T v dipyrimidinech. První z nich předpokládá působení k chybám náchylné DNA polymerázy, jež naproti C či mC cyklobutanového dipyrimidinového dimeru vkládá adenin. Druhým mechanismem by mohla být nejprve deaminace C či mC v CPDs, následovaná „správným“ vřazením adenosinové báze DNA polymerázou. Podle tohoto názoru je deaminace plně zodpovědná za vznik mutace. Význam této cesty pro UVB mutagenезi byl již prokázán (33). Neopravené změny DNA vedou k aktivaci několika poškození signalizujících kaskád, např. ATR/Chk1, jun N-terminální kináza, p38 kináza. Touto cestou dojde k aktivaci NER a jiných opravných mechanismů prostřednictvím transkripčních faktorů, jako jsou NF- κ B, p53, AP-1. Výsledkem je komplexní změna buněčné transkripce regulující v opravu DNA, buněčný cyklus a apoptózu (13).

Oprava poškození DNA vzniklého po expozici UVB záření je možnou terapeutickou a preventivní cestou. U lidí trpících vrozenou poruchou opravných mechanismů se dá s úspěchem použít aplikace bakteriálního enzymu **T4 endonukleáza V** (T4N5) (lokální aplikace v liposomech), který se zapojuje do NER. Širší použití by mohl mít xenogenní enzym **fotolyáza**, který rozpoznává CPDs, váže se na ně a po expozici fotoreaktivacímu světlu (300–500 nm) mění dimery zpět na monomerní formu (tzv. světél-

ná oprava, oproti temné opravě NER). Přirozený výskyt tohoto enzymu u člověka není zatím potvrzen, proto terapeutická aplikace vlastně zajistí k vrozeným opravným mechanismům ještě jeden zcela nový a účinnost reparace CPDs je vysoká (38).

Genové změny

Na genetické úrovni se na onkogenezi podílejí protoonkogeny a proti nim působící tumor supresorové geny. Např. **ras-onkogeny** vznikající v UV ozářených epidermálních buňkách jsou aktivní v 20 % lidských melanomů, jejich nástupci v transdukční kaskádě raf-onkogeny u 70 % melanomů (18).

Antionkogen **p53** za normálních okolností zastavuje buněčný cyklus poškozených buněk ve stadiu přechodu z G1 do S fáze, tím má buňka možnost opravit všechna genetická poškození. Jiným efektem genu p53 je navození apoptózy poškozených buněk, tím se eliminují buňky, které by se mohly stát zdrojem trvalých somatických mutací. Díky znemožnění apoptózy je umožněno další dělení buněk s poškozenou genetickou informací a tedy i vznik malignit (15). Obecně však musí onkogen zůstat dlouhodobě latentní, než je vlivem vyřazení různých supresorů umožněna nádorová proliferace. O významu genu p53 pro vznik malignit kůže svědčí již to, že jeho mutace jsou nalézány u 90 % spinaliomů a v 50 % bazaliomů. Jedná se obvykle o záměnu C za T, včetně CC změn na TT, podobné mutace se v genu p53 dají nalézt měsíce před vznikem karcinomu (4, 19). Lokalizace UV zářením vyvolaných mutací v genu p53 není náhodná, liší se např. od mutací, které v tomto genu vznikají působením aflatoxinu v hepatocelulárním karcinomu (20).

Poškození antionkogenu **Rb1** se zřejmě podílí na vzniku maligního melanomu. Produktem tohoto genu je jaderný fosfoprotein p105^{Rb}, který je aktivní v nefosforylované formě, kdy interakcí s transkripčními faktory skupiny E2F udržuje buňku v G₀ fázi a brání transkripci protoonkogenů c-myc, c-fos (14). Fosforylace Rb proteinu se děje aktivovaným komplexem proteinkinázy cdk. Cdk jsou v buňce stále přítomny, ale jejich enzymatická aktivita je podmíněna interakcí s bílkovinou ze skupiny cyklinů (jejichž hladina se mění v průběhu buněčného cyklu). U 50 % lidských melanomů je přítomna ztráta lokusu INK4a/ARF (CDKN2A), který kóduje dva

proteiny p16^{INK4a} a p14^{ARF}. Oba vykazují tumor supresorovou aktivitu ve dvou geneticky oddělených protitumorových cestách: p16^{INK4a} přes Rb cestu a p14^{ARF} přes p53. Inhibitor cyklin-dependentních kináz (CKI) p16^{INK4a} brání CDK4/CDK6 fosforylaci Rb proteinu. Nedostatek p16^{INK4a} vede k Rb hyperfosforylaci a následné aktivaci Rb-regulovaných genů, p14^{ARF} je regulátorem MDM2, E3 ubiquitinové ligázy významné v degradaci p53. Ztráta p14^{ARF} může poškodit odpověď p53 na onkogenní vlivy. Oba proteiny by mohly hrát roli v supresi melanomu. Zatím je prokázáno, že je UV expozice spojena se zvýšením hladiny cdk6 (u 40 % melanomů) a ztrátou proteinu p16^{INK4a} (18).

Jiným antionkogenem, na který má UVB záření vliv, je gen **BRCA1**. Jeho fosforylace se zvyšuje po dobu 6 h expozice, s maximem za 2 h. BRCA1 se účastní na mnoha buněčných funkcích, včetně oprav DNA. Regulace funkcí tohoto genu se děje fosforylací, která umožní jeho interakci s jinými DNA reparačními molekulami, jako jsou Rad 50, Rad51, BRCA2. Zdá se, že UVB zářením podpořená fosforylace vede ke zvýšeným opravám DNA. V tomto ději hraje důležitou roli FRAP, stejně jako je tomu u p53 fosforylace (41).

Antionkogen **Patched** (Ptch) (9q22.3) je poškozen u autosomálně dominantně dědičného onemocnění – syndromu névoidního bazaliomu (Gorlinův syndrom). Takto postižení jedinci mají velké riziko vzniku bazaliomu i jiných abnormalit. Bazocelulární karcinom je nejčastějším typem rakoviny kůže, asi u jedné třetiny těchto malignit se nalézají mutace genu Ptch (u jinak zdravých jedinců). Mutace, které v něm vznikají, jsou charakteristické pro UVB záření (CPDs) (3, 4).

Mnohočetná keratoakantomatóza (Ferguson-Smith syndrom) je onemocnění, při kterém se ve větším množství vyskytují spinaliomy, nikoli bazaliomy. Této chorobě dominuje postižení genu **ESS1** na 9. chromozomu. Vztah tohoto genu ke vzniku onemocnění se zdá být analogií vztahu genu Patched a bazocelulárního karcinomu (32).

Dalším ochranným mechanismem je apoptóza. Zde ale existují antiapoptotické faktory, geny – **bcl-2**. Rovnováha mezi expresí genu bcl-2 a p53 je ústředním bodem rozhodujícím o dalším osudu somatických buněk. Zvýšená exprese tohoto genu je spojena se zvýšenou buněčnou proliferací a je nalézána v řadě lidských tumorů (melanom, bazaliom) (23). Při studiu transgenních myší se zvýšenou expresí bcl-2 se ale překvapivě ukázalo, že mají menší ná-

chylnost ke vzniku malignit vyvolaných UV. Toto lze vysvětlit dvěma mechanismy. Zaprvé Bcl-2 se také účastní na regulaci buněčného cyklu. TNF α vyvolává u buněk se zvýšenou bcl-2 expresí zástavu buněčného cyklu v G₀ fázi, a protože je TNF α uvolňován po UV expozici, může tímto mechanismem dojít k pozastavení růstu buněk a tím se zabrání zdědění UV zářením vyvolaných mutací i následnému vzniku nádoru. Dalším možným pozitivním vlivem bcl-2 jsou jeho antioxidační vlastnosti. Díky nim by mohl bránit vzniku ROS a DNA poškození po UV expozici (4).

UVA navozuje apoptózu časnou, lézí buněčné membrány, naproti tomu smrt buněk po vystavení záření UVB nastává po více než 20 hodinách poškozením DNA.

Radiační poškození také zabraňuje apoptóze poruchou integrinů.

Další změny

Jiným negativním vlivem UV expozice je **imunosuprese**. UVB zářením vyvolané nádory jsou vysoce antigenní a normálně jsou po transplantaci zdravým jedincům odvrženy, ale po implantaci UV ozářeným jedincům k odhojení nedojde. Tyto jevy vysvětluje UV zářením vyvolaná indukce supresorových T-Ly, které blokují normální rejekční odpověď. Většina informací se získává pokusy na myších, tento model ale nemusí plně odpovídat imunitním pochodům probíhajícím u člověka. Přímo u lidí byly pozorovány změny počtu cirkulujících imunokompetentních buněk po UV ozařování. Známo je také ovlivnění antigen prezentujících Langerhansových buněk v kůži (29). Pro toto studium je přínosné sledování kontaktní přecitlivělosti. U lidí s kožní rakovinou v anamnéze se až ve 100 % daří díky UV expozici tlumit kontaktní reakci na DNCB. Pro význam imunity ve vztahu ke vzniku malignit svědčí již zvýšený výskyt kožních karcinomů u pacientů na dlouhodobé imunosupresivní terapii (po transplantaci) (3, 26).

Proti UVB karcinogenezi by mohlo působit jím vyvolané **zvýšení tvorby prostaglandinů** (PGE₂ a PGF₂) v kůži, jejichž následkem je vzestup cAMP a tím pokles buněčné proliferace. To může vést ke snížení počtu buněk rizikových ze zasažení UV zářením (11).

Ornitindekarboxyláza (ODC) je prvním a nejvýznamnějším enzymem účastnícím se tvorby po-

lyaminů (putrescin, spermidin, spermin), hraje významnou roli v regulaci buněčného růstu a ve vzniku malignit. Ačkoli přesný význam polyaminů v buňce není zcela jasný, je známo, že akumulace polyaminů je nezbytná pro růst, dělení a diferenciaci normálních i neoplastických buněk. Všechny eukariotické buňky obsahují jeden či více polyaminů a jejich koncentrace se mění v závislosti na buněčném cyklu. Zvýšená aktivita ODC byla nalezena v transformovaných buněčných liniích. Je také známo, že začátek růstu normální buňky je spojen s náhlým a přechodným zvýšením aktivity ornitindekarboxylázy. Naproti tomu onkogeny navozená buněčná transformace je spojena s trvale zvětšenou aktivitou ODC. Zvýšená aktivita ODC je potřebná pro nádorový růst, ale je také možné, že zvýšená aktivita ODC sama o sobě (vyvolaná silným stimulem) může vést ke vzniku malignity (1).

Literatura

1. AFAQ, F. – ADAMI, VM. – MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutat. Res.*, 2005, vol. 571, no. 1/2, p. 153–173.
2. AHSAN, H. – MOAMMIR, HA. – AHMAD, N. Ultraviolet B exposure activates Stat3 signaling via phosphorylation at tyrosine⁷⁰⁵ in skin of SKH1 hairless mouse: A target for the management of skin cancer? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, vol. 333, no. 1, p. 241–246.
3. BEISSERT, S. Use of mutant mice in photoimmunological and photocarcinogenic investigations. *Methods*, 2002, vol. 28, no. 1, p. 130–137.
4. BEISSERT, S., et al. IL-12 Prevents the Inhibitory Effects of cis-Urocanic Acid on Tumor Antigen Presentation by Langerhans Cells: Implications for Photocarcinogenesis. *J. Immunol.*, 2001, vol. 167, no. 11, p. 6232–6238.
5. BERNBURG, M. – KRUTMANN, J. Photoimmunology, DNA repair and photocarcinogenesis. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2000, vol. 54, no. 2/3, p. 87–93.
6. CADET, J. – SAGE, E. – DOUKI, T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat. Res.*, 2005, vol. 571, no. 1/2, p. 3–17.
7. EDITORIAL. Protecting man from UV exposure. *Lancet*, 1991, vol. 337, no. 5, p. 1258–1259.
8. ETTLER, K. *Fotoprotekce kůže. Ochrana kůže před účinky ultrafialového záření*. 1. vyd., Praha, Triton, 2004. 133 s.
9. ETTLER, K. – LÁZNIČKOVÁ, P. – NOŽIČKOVÁ, M. Minimální erytémové dávky UV-B záření. *Čs. Dermatol.*, 1997, roč. 72, č. 2, s. 60–62.
10. ETTLER, K. Příspěvek k otázce opalování u dětí. *Čs. Pediatrie*, 1991, roč. 46, č. 3, s. 181–182.
11. ETTLER, K. Stanovení minimálních erytémových dávek a přirozené fotoprotekce kůže u naší populace. *Acta Med. (Hradec Králové), Suppl.*, 1998, roč. 41, č. 1, s. 81–104.

12. FIKRLE, T. – RESL, V. Etiologie a prevence maligního melanomu a karcinomu kůže. *Prakt. Lék.*, 2001, roč. 81, č. 2, s. 62–65.
13. GENTILE, M. – LATONEN, L. – LAIHO, M. Cell cycle arrest and apoptosis provoked by UV radiation-induced DNA damage are transcriptionally highly divergent responses. *Nucleic. Acids. Res.*, 2003, vol. 31, no. 16, p. 4779–4790.
14. GHOSH, R. – AMSTAD, P. – CERUTTI, P. UVB-Induced DNA Breaks Interfere with Transcriptional Induction of c-fos. *Mol. Cel. Biol.*, 1993, vol. 13, no. 11, p. 6992–6999.
15. GROSSMAN, D., et al. Transgenic expression of survivin in keratinocytes counteracts UVB-induced apoptosis and cooperates with loss of p53. *J. Clin. Invest.*, 2001, vol. 108, no. 7, p. 991–999.
16. HALLIDAY, GM. Inflammation, gene mutation and photo-immunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. *Mutat. Res.*, 2005, vol. 571, no. 1/2, p. 107–120.
17. KAMMEYER, A., et al. Oxidative breakdown and conversion of urocanic acid isomers by hydroxyl radical generating systems. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, vol. 1526, no. 3, p. 277–285.
18. KANNAN, K., et al. Components of the Rb pathway are critical targets of UV mutagenesis in murine melanoma model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, vol. 100, no. 3, p. 1221–1225.
19. KLENER, P. *Klinická onkologie*. 1. vydání. Praha, Galén, 2002. 686 s.
20. KRAEMER, HK. Commentary. Sunlight and skin cancer: Another link revealed. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, no. 1, p. 11–14.
21. KRÍŽ, J. *Zdravotní stav populace*. Praha, Státní zdravotní ústav, 2004. 136 s.
22. KUCHIDE, M., et al. Cancer chemopreventive effects of oral feeding α -tocopherol on ultraviolet light B induced photocarcinogenesis of hairless mouse. *Cancer. Lett.*, 2003, vol. 196, no. 2, p. 169–177.
23. LAETHEM, AV., et al. The sunburn cell: Regulation of death and survival of the keratinocyte. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 2005, vol. 37, no. 8, p. 1547–1553.
24. LEGAT, FJ. – WOLF, P. Photo damage the cutaneous sensory nerves: role in photoaging and carcinogenesis of the skin? *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2006, vol. 5, no. 2, p. 170–176.
25. MALINA, L. *Fotodermatózy*. 1. vyd., Praha, Maxdorf, 1999. 205 s.
26. MALINA, L. Vliv ultrafialového záření na imunitní systém a působení zevních fotochemoprotektivních prostředků na UVR vyvolanou imunosupresi. *Čas. Lék. čes.*, 2002, roč. 141, č. 11, s. 338–342.
27. MARESCA, V., et al. UV-induced modification of catalase charge properties in the epidermis in correlated with the skin phototype. *J. Invest. Dermatol.*, 2006, vol. 126, no. 1, p. 128–90.
28. MULLENDERS, LH. – BERNEBURG, M. Photoimmunology and nucleotide excision repair: impact of transcription coupled and global genome excision repair. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2001, vol. 56, no. 2/3, p. 97–100.
29. NAKAGAWA, S., et al. Differential Modulation of Human Epidermal Langerhans Cell Maturation by Ultraviolet B Radiation. *J. Immunol.*, 1999, vol. 163, no. 10, p. 5192–5200.
30. NISHIGORI, C. Cellular aspects of photocarcinogenesis. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2006, vol. 5, no. 2, p. 208–214.
31. OOSTEN, M. – REBEL, H. – FRIEDBERG, EC., et al. Differential role of transcription-coupled repair in UVB-induced G₂ arrest and apoptosis in mouse epidermis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, vol. 97, no. 21, p. 11268–11273.
32. OUHTIT, A. – ANANTHASWAMY, HN. A model for UV-induction of skin cancer. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2001, vol. 1, no.1, p. 5–6.
33. PFEIFER, GP. – YOU, YH. – BESARATINIA, A. Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat. Res.*, 2005, vol. 571, no. 1/2, p. 19–31.
34. RESL, V. – HOLEČEK, V. – RACEK, J. Význam volných kyslíkových radikálů v dermatovenerologii. *Čs. Dermatol.*, 1995, vol. 70, no. 3, s. 157–159.
35. RIJKEN, F., et al. Pathophysiology of photoaging of human skin: focus on neutrophils. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2006, vol 5, no. 2, p.184–189.
36. SCHWARZ, T. Mechanisms of UV-induced immunosuppression. *Keio. J. Med.*, 2005, vol. 54, no. 4, p. 165–171.
37. STEGE, H. Effect of xenogenic repair enzymes on photo-immunology and photocarcinogenesis. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2001, vol. 65, no. 2/3, p. 105–108.
38. STEGE, H., et al. Enzyme plus light therapy to repair DNA damage in ultraviolet-B-irradiated human skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, vol. 97, no. 4, p. 1790–1795.
39. UEHARA, M., et al. Geographical correlation between ambient UVB level and mortality risk of leukemia in Japan. *Environ. Res.*, 2003, vol. 92, no. 2, p. 78–84.
40. VOSMÍK, F., et al. *Dermatovenerologie*. 1. vyd., Praha, Karolinum, 2001. 396 s.
41. YAROSH, DB., et al. Measurement of UVB-Induced DNA damage and its consequences in models of immunosuppression. *Methods*, 2002, vol. 28, no. 1, p. 55–62.

Práce vznikla za podpory grantu IGA MZ, ČR NR 8154-3/2004 a Výzkumného záměru MZO 00179906.

Korespondence: MUDr. Jana Rostová

Lékařská fakulta UK v Hradci Králové
Ústav hygieny a preventivního lékařství
Šimkova 870
500 38 Hradec Králové
e-mail:rostova@volny.cz

Do redakce došlo 17. 2. 2006