

Fotodermatologie

**Kůže, interakce světla s kůží, molekulární
mechanismy efektu záření na buňky**

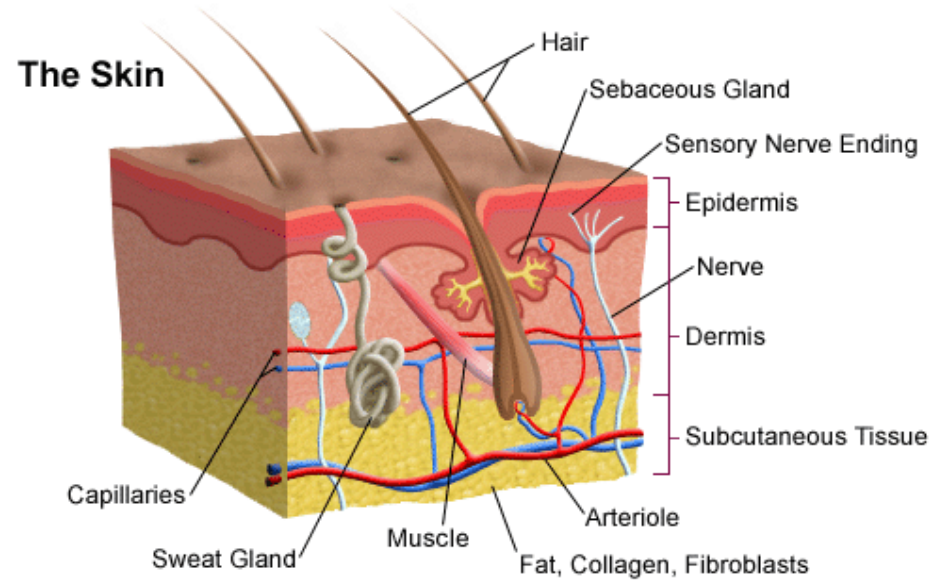
Lukáš Kubala

Kůže

- Největší orgán lidského těla
- Vrstvy kůže
 - Pokožka (epidermis)
 - Škára (dermis)
 - Podkožní vazivo

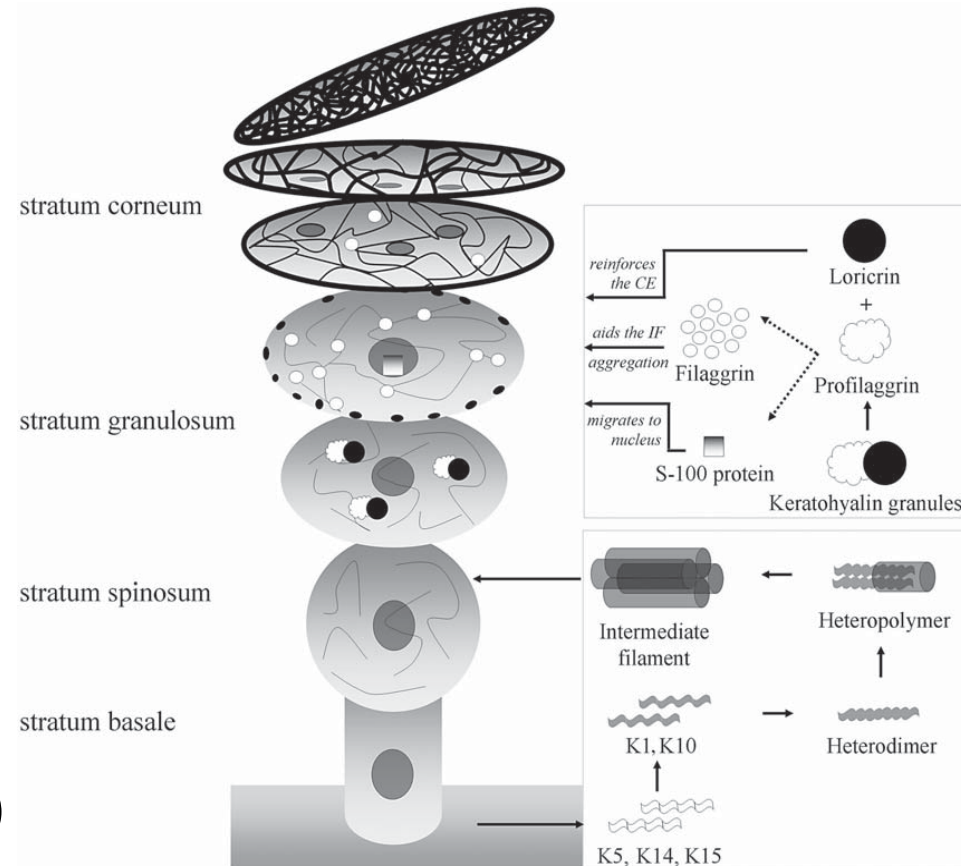
Funkce kůže

- Ochrana organismu před poškozením
 - Mechanickým
 - Chemickým
- Příjem informací z vnějšího prostředí
 - Receptory pro vnímání
- Resorpce látek
- Vylučování odpadních látek
- Udržení tělesné teploty
- Skladování tuků a vody
- Syntéza vitamínu D



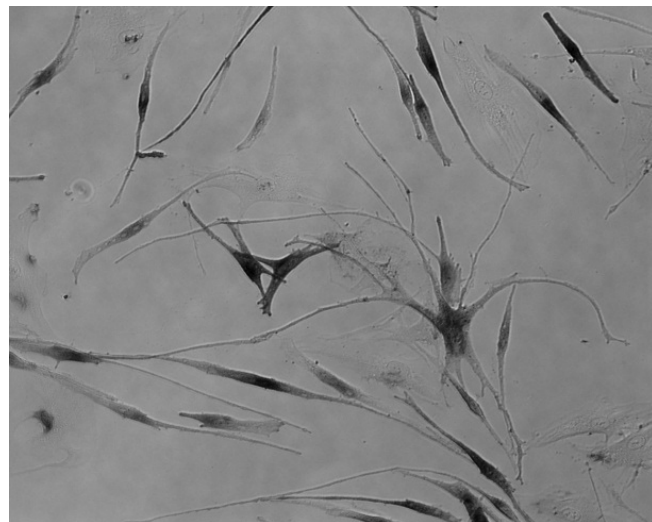
Epidermis

- Typy buněk
 - Keratinocyty, melanocyty, Langerhansovy buňky, Merkelovy buňky,
- Epidermis je neustále se obnovující vícevrstevný orgán, jehož buňky jsou v konstantní diferenciaci
- Proces rohovatění, odumírání a odlupování buněk - kornifikace
- Vrstvy keratinocytů
 - vrstva bazální (keratin 5, 14)
 - Vrstva spinózní (keratin 1, 10, involucrin)
 - Vrstva granulární (filaggrin, loricrin)
 - Stratum corneum (zrohovatělé mrtvé buňky – korneocyty na povrchu ceramidy)



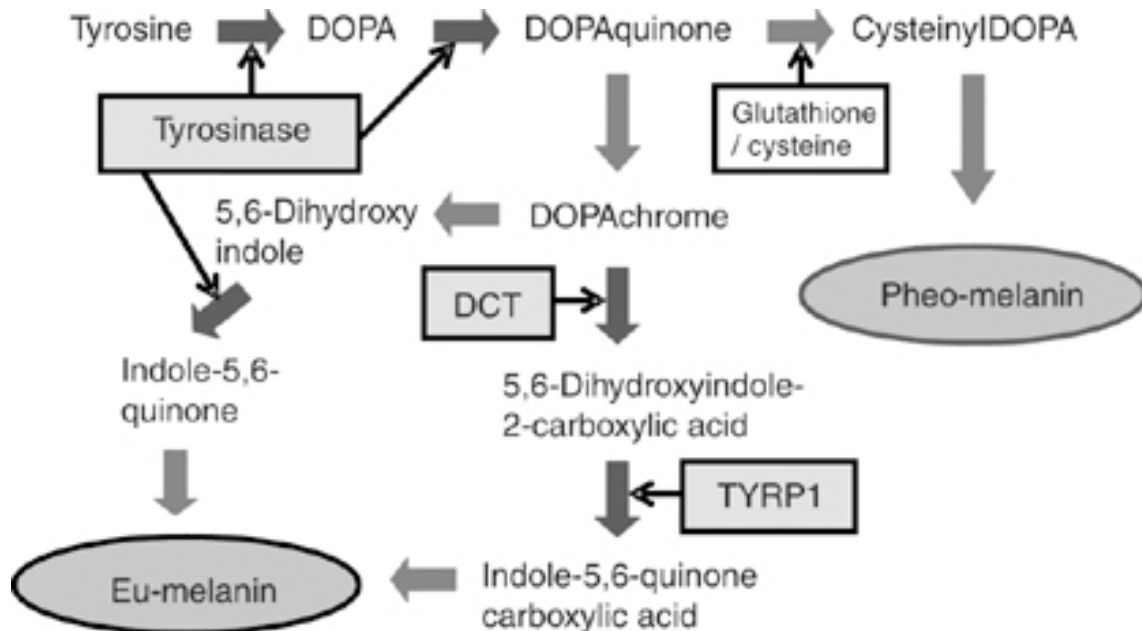
Melanocyty

- Ve spodních vrstvách melanocyty produkují pigment melanin, který udává barvu kůže
- Funkce melaninu
 - Ochrana před poškozením UV
- Syntéza melaninu
 - Hydroxylace tyrosinu tyrosinásou na 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) probíhající v specializovaných organelách melanosomech
 - přenos melanosomů z melanocytů do bazálních keratinocytů



- Stimulace tvorby melaninu
 - UV záření

Následek zhnědnutí kůže

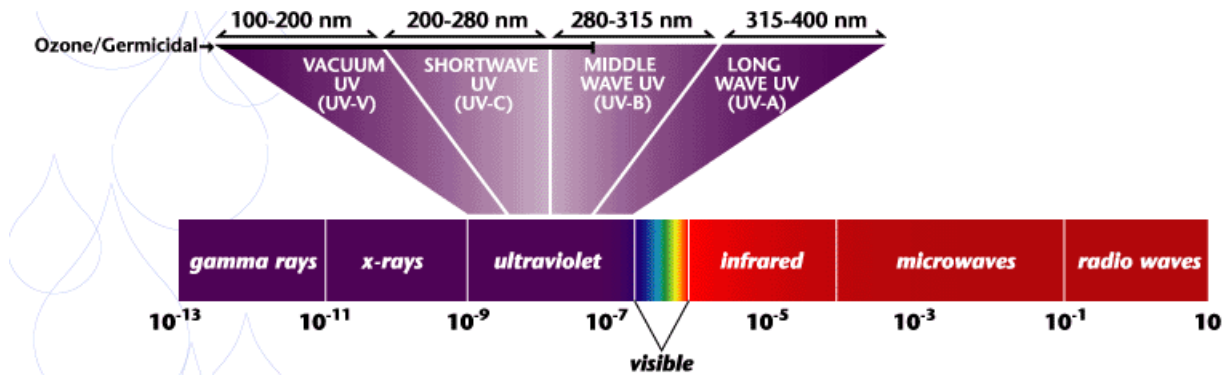


Barevný vzhled kůže - Pigmentace

- **geneticky** (geneticky určená konstituční melaninová pigmentace) a **vnějším prostředím** (intenzitou a četností expozice k sluneční záření).
- Důležitá je **aktivita melanocytů** (syntéza a distribuce melaninu).
- **Další faktory** ovlivňující barvu kůže
 - **Tok krve** blízko povrchu kůže
 - závislá např. na okolních podmínkách

UV záření

- neionizující záření
- typy: UV A ($\lambda = 315 - 400 \text{ nm}$)
 UV B ($\lambda = 280 - 315 \text{ nm}$)
 UV C ($\lambda = 100 - 280 \text{ nm}$)

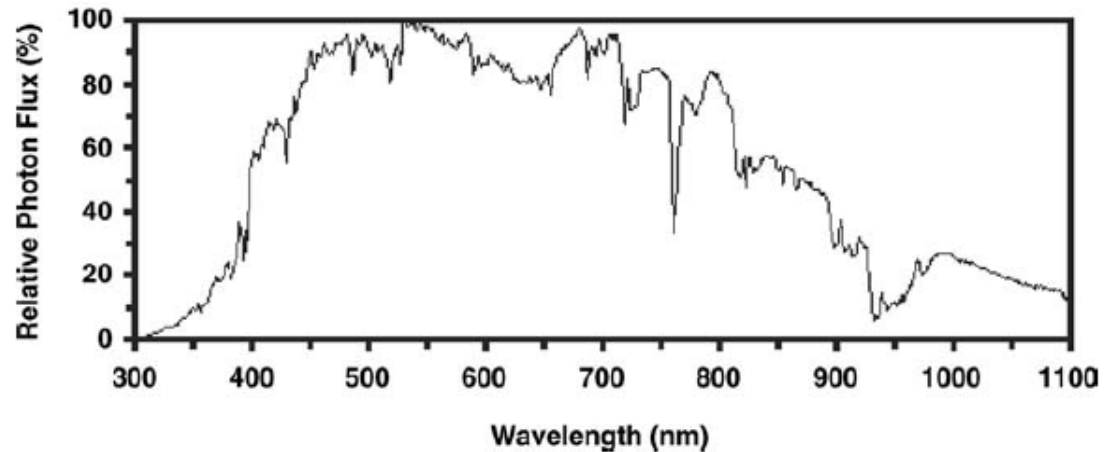


- ve slunečním světle: UV A – až 5,1 %, UV B – až 0,5 %
UV C zcela pohlceno ve stratosféře
- UVC se ale používá při velké části *in vitro* pokusů (i nízké dávky působí mutagenně)

Zdroje UV

- Sluneční záření
- Úmělé zdroje-Lampy
 - Fluorescenční
 - Germicidní
 - Rtuťové (xenonové) arc
 - Laserové

Příklad vlnové charakteristiky Arc rtuťové lampy



Iradiace - intenzita radiace mW/cm^2

Dávka – integrál iradiace za čas J/cm^2 .

Spektrum a Intenzita UV v přírodě

- **Spektrum a intenzita závisí na**
 - Čase během dne
 - Dnu v roce
 - Geografické umístění

- **Zvýšená intenzita UV**
 - V poledne
 - V létě
 - Blízko rovníku
 - Ve vyšších nadmořských výškách
 - Odrazem ze země, písku, sněhu, vody

Interakce záření a kůže

Optická fáze

Rozptyl

- Rozptyl světla v kůži a jeho zpětný odraz k povrchu

Absopce

- Chromofory - konjugované systémy (mimo melanin také nukleové kyseliny, aromatické aminokyseliny, kyselina urokánová, hemoglobin, beta karoten, bilirubin)

Fotochemické a fototermické reakce

Absorbované fotony dodávají aktivační energii pro reakce

- Fotochemické (fotoionizace, fotoexitace)
- Fototermické (vznik tepla)

Při hodnocení interakce záření a kůže je nutno zvažovat jednak parametry záření (spektrum záření, intenzitu záření, dávku záření, výkon zdroje), dále velikost ozářené plochy, dobu expozice a optické vlastnosti ozařované tkáně.

Hlavní buněčné chromofory

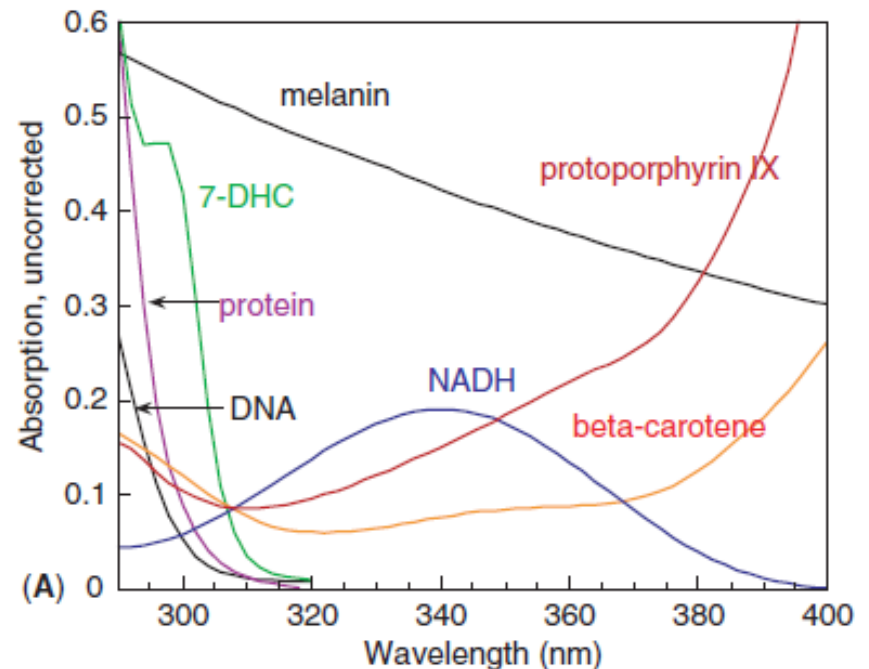
- chromofory = látky nebo části molekul schopné absorbovat energii z fotonů a přeměnit ji na biochemický signál
- buněčné chromofory:
 - otevřené a uzavřené pyroly: porfyrin (hem), bilirubin
 - molekuly s π orbitaly (aromatické látky či látky se systémem nenasycených vazeb): DNA, aromatické aminokyseliny, kyselina uronová

Epidermis:

Melanin, nukleové kyseliny,
aromatické aminokyseliny

Dermis:

hemoglobin, β -karoten, bilirubin



Efekty UV záření na buňky

- Tvorba reaktivních metabolitů kyslíku
- Poškození DNA a dalších biomolekul spojených s indukcí mutací a případnou změnou fenotypu
- Poškození struktury proteinů a lipidů spojených s narušením funkce mitochondrií, aktivaci signálních drah
- Indukce apoptózy

Poškození DNA UV zářením

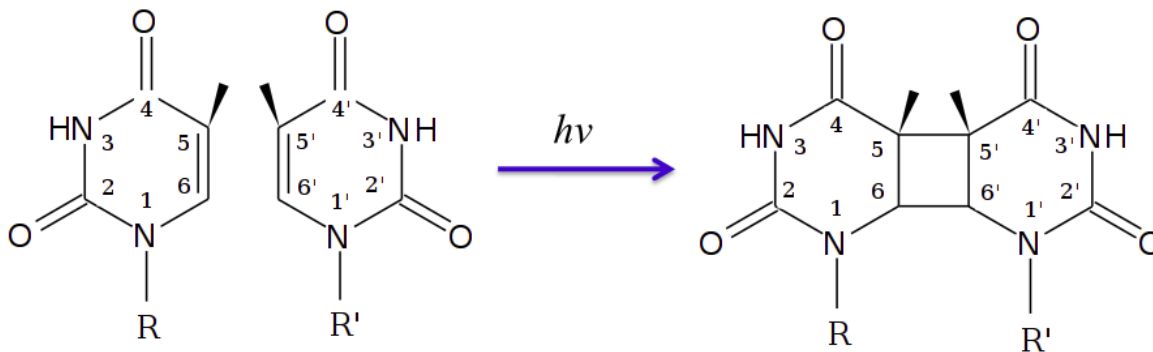
- Dochází ke vzniku tzv. fotoléze
- Hlavní mechanismy poškození DNA UV zářením:
 1. Absorpce UV záření přímo nukleotidy
 2. Poškození zprostředkované fotosenzitizátory
 3. Působení reaktivních kyslíkových radikálů

Typy fotolézí

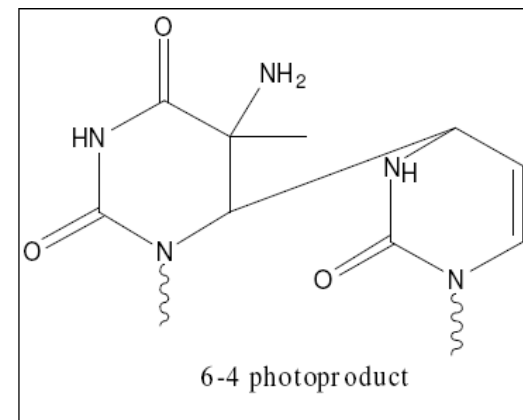
Dimerizace mezi sousedními pyrimidiny v důsledku absorpce UV záření

Vznik vazeb mezi 5' - 6' uhlíky

Vznik cyklobutanových pyrimidinových dimerů (CPD)
nejčastěji typu TT (méně TC a CC)

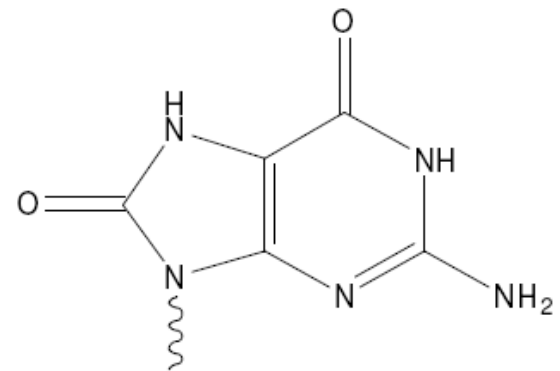


Další nečastější jsou 6' - 4' fotoprodukty
nejčastěji mezi TC (méně CC a TT)



Typy fotolézí

- monomerní poškození pyrimidinovýchází
 - vznik cytosin hydrátu, 8-hydroxydeoxyguanidinu či thyminového glykolu
 - indukují zlomy v DNA, křížové vazby



8-oxo-guanine

Typy fotolézí

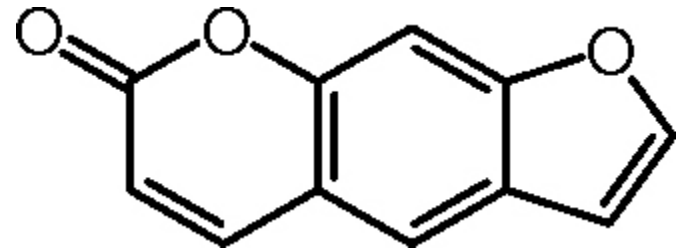
Na relativní podíl vzniku různých typů DNA fotoproduktů se podílí

- UV spektru, sekvenci bází, sekundární struktury DNA a interakce DNA s proteiny

Např. cytosin absorbuje delší vlnové délky UV záření efektivněji než thymin, a proto CPDs obsahující cytosin jsou po UVB ozáření tvořeny častěji.

Fotoléze indukované fotosenzitizací

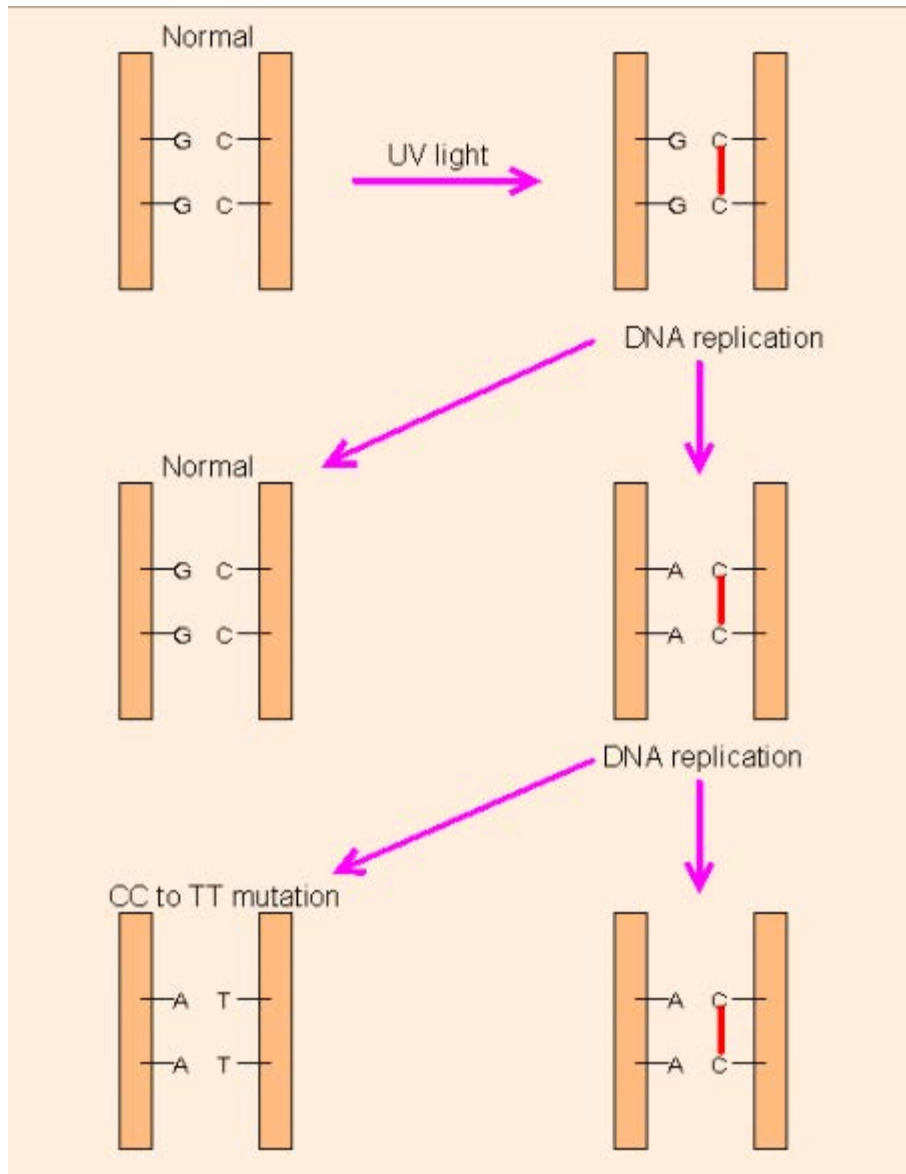
- fotosenzitizátor – látka (chromofor), která je schopná absorbovat foton UV záření a stává se reaktivní
- DNA je poškozená tzv. fotocykloadicí
- např. furokumaríny – vytváří mono- či biadukty s DNA (poruchy replikace)



Mutagenní účinky UV záření

- UV indukované mutace vznikají při nesprávné reparaci fotolézí
- nejčastěji skryté mutace, ale s rizikem patologického projevu na úrovni buňky či celého organismu

Mutagenní účinky UV záření

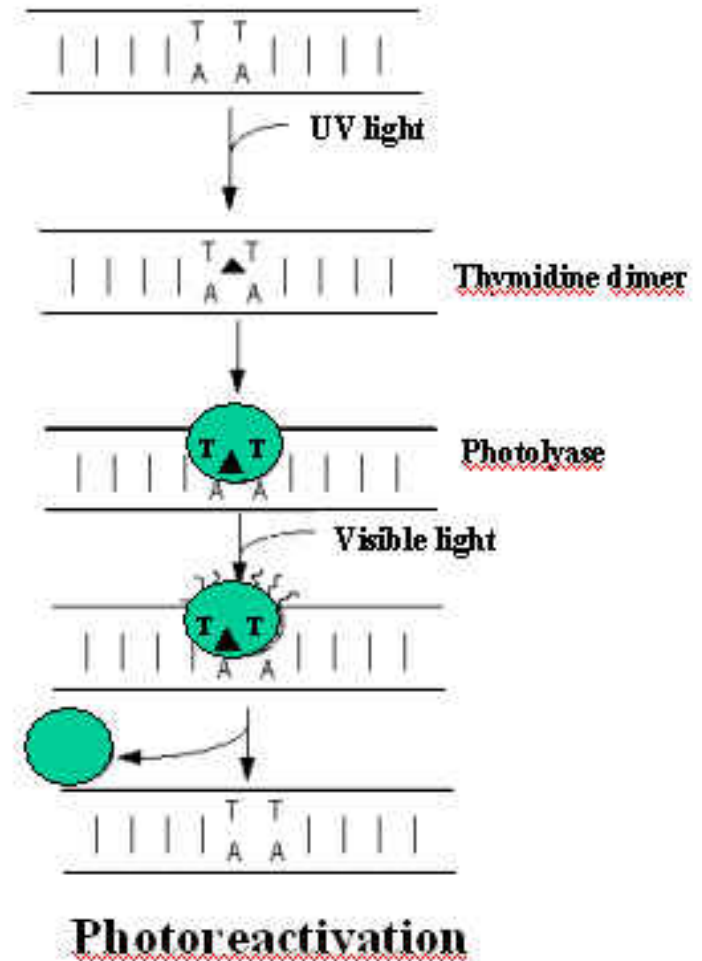


- Vznik mutace při replikaci DNA s CPD:

- při replikaci může dojít kvůli CPD ke změně páru GC na AC
- při další replikaci pak vznikne jedno dceřinné vlákno nesoucí pár AT
- ve výsledku: mutace GC → AT

Reparace fotolézí

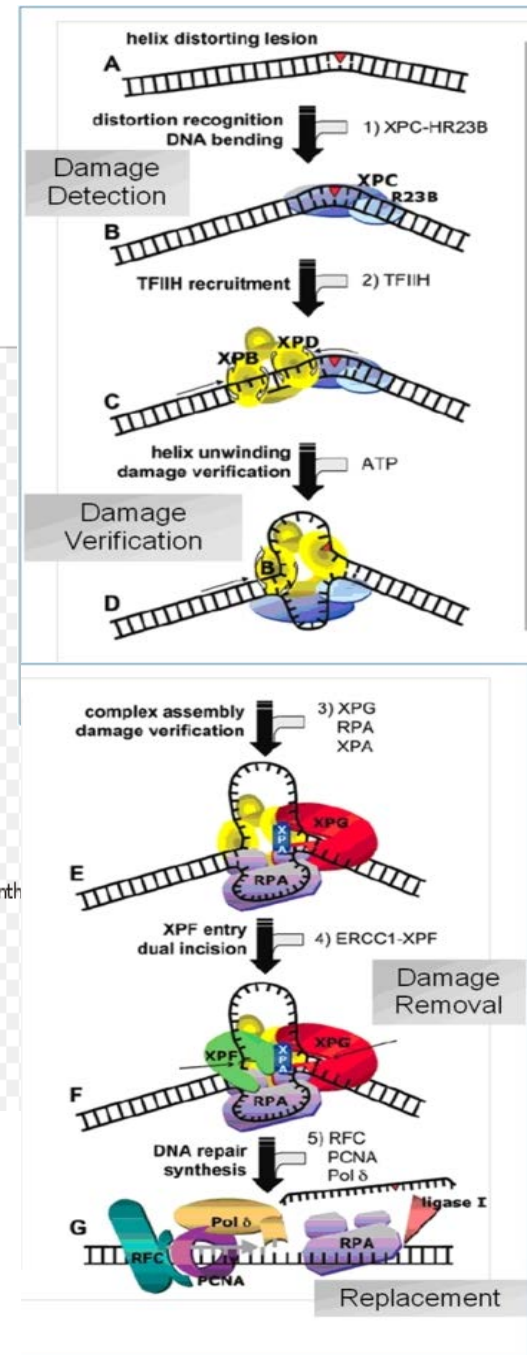
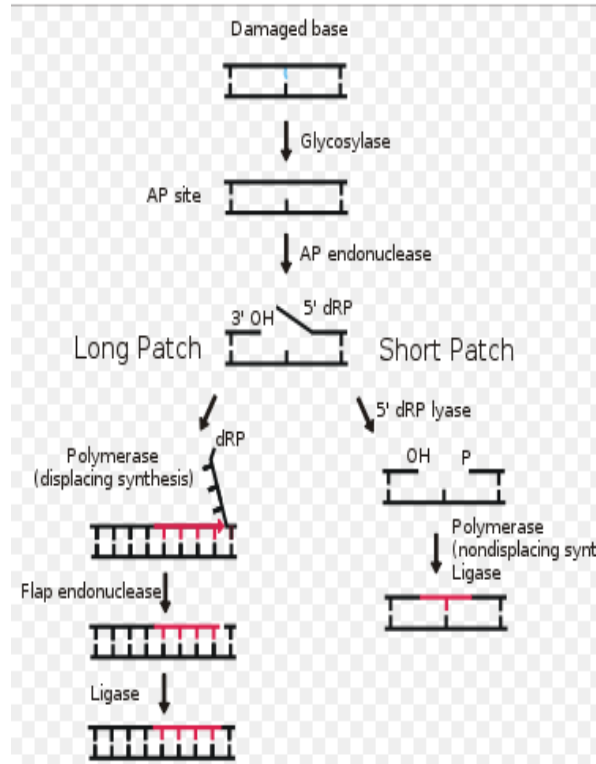
- fotoreaktivace u nižších živočichů, hub a bakterií
 - enzym fotolyáza s vysokou afinitou k CPD
 - po absorpci fotonu z viditelné části spektra dochází k rozrušení kovalentních vazeb mezi CPD a reparaci fotoléze



Reparace fotolézí

- U vyšších živočichů: EXCIZNÍ REPARACE

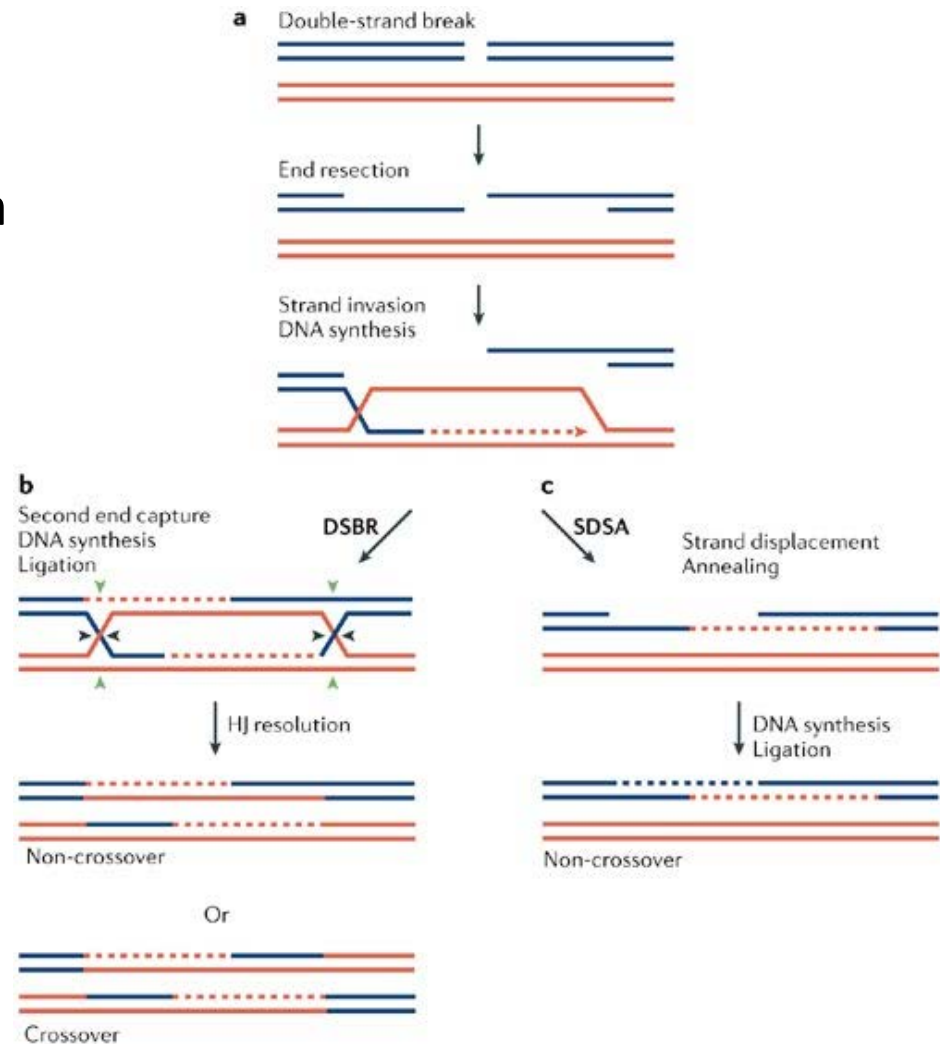
- 1- je rozpoznáno poškozené místo
- 2- chybná báze (bázová excizní reparace) nebo poškozená část řetězce DNA (nukleotidová excizní reparace –NER) se odstraní
- 3- opravené místo se dosyntetizuje polymerázou
- 4- opravené místo je spojeno ligázou



Reparace fotolézí

Homologní rekombinace

- oprava dvojřetězcových zlomů, které nevznikají přímo následkem UV záření, ale po NER fotoproduktů na obou řetězcích
- sdílí většinu enzymatického aparátu s meiotickým crossing-overem
- homologní rekombinace využívá k obnově genetické informace ztracené v místě zlomu jako homologní templát sesterskou chromatidu
- probíhá v S-fázi, kdy se DNA replikuje



Poruchy reparace fotolézí

Celá řada závažných onemocnění

Xeroderma pigmentosum

Autosomálně recesivní
onemocnění

Mutace genů podílejících se na
NER

Velká citlivost na poškození DNA
UV zářením - vysoká incidence
rakoviny kůže (melanomu i
bazocelulárního karcinomu)



Reparace fotolézí

U pacientů s XP byly identifikovány mutace v 8 genech
 7 je zapojeno do excizní opravy nukleotidů (XPA - XPG)
 1 (varianta XP) se podílí na replikaci poškozené DNA

Mutace v některém z genů XPA až XPG snižují schopnosti buněk opravit
 CPD, [6-4] fotoproduktů a jiných objemných aduktů.

Gene	Disease	Chromosome site	Protein (aa)	Function
<i>XPA</i>	XP	9q34	273	Photoproduct binding
<i>XPB</i>	XP, CS	2q21	782	3'-5' helicase, TFIIH member
<i>XPC</i>	XP	3p25	940	Photoproduct binding
<i>XPD</i>	XP, CS, TTD	19q13	760	5'-3' helicase, TFIIH member
<i>XPE</i>	XP	11p12-p11	1140	Photoproduct binding
<i>XPF</i>	XP	16p13	905	5' incision
<i>XPG</i>	XP, CS	13q32	1186	3' incision
<i>ERCC1</i>	COFS	19q13.2-q13.3	297	5' incision
<i>XPV</i>	XP	6p21	713	Bypass polymerase (Pol η)
<i>CSA</i>	CS, UV ^S	5q21	396	RNA Pol II cofactor
<i>CSB</i>	CS, COFS, UV ^S	10q11	1493	RNA Pol II cofactor
<i>UVSSA</i>	UV ^S	4p16.3	709	RNA Pol II cofactor
<i>GTF2H5</i>	TTD	6q25.3	71	TFIIH member
<i>TTDN1</i>	TTD	7p14.1	179	TTD but not UVB sensitive

Vliv UV na další biomolekuly

- proteiny – absorpce UV aromatickými aminokyselinami, narušení sulfidických můstků (narušení terciární struktury proteinů)
- lipidy - UV poškozuje dvojné vazby v lipidech – narušení biologických membrán

Mitochondrie a UV

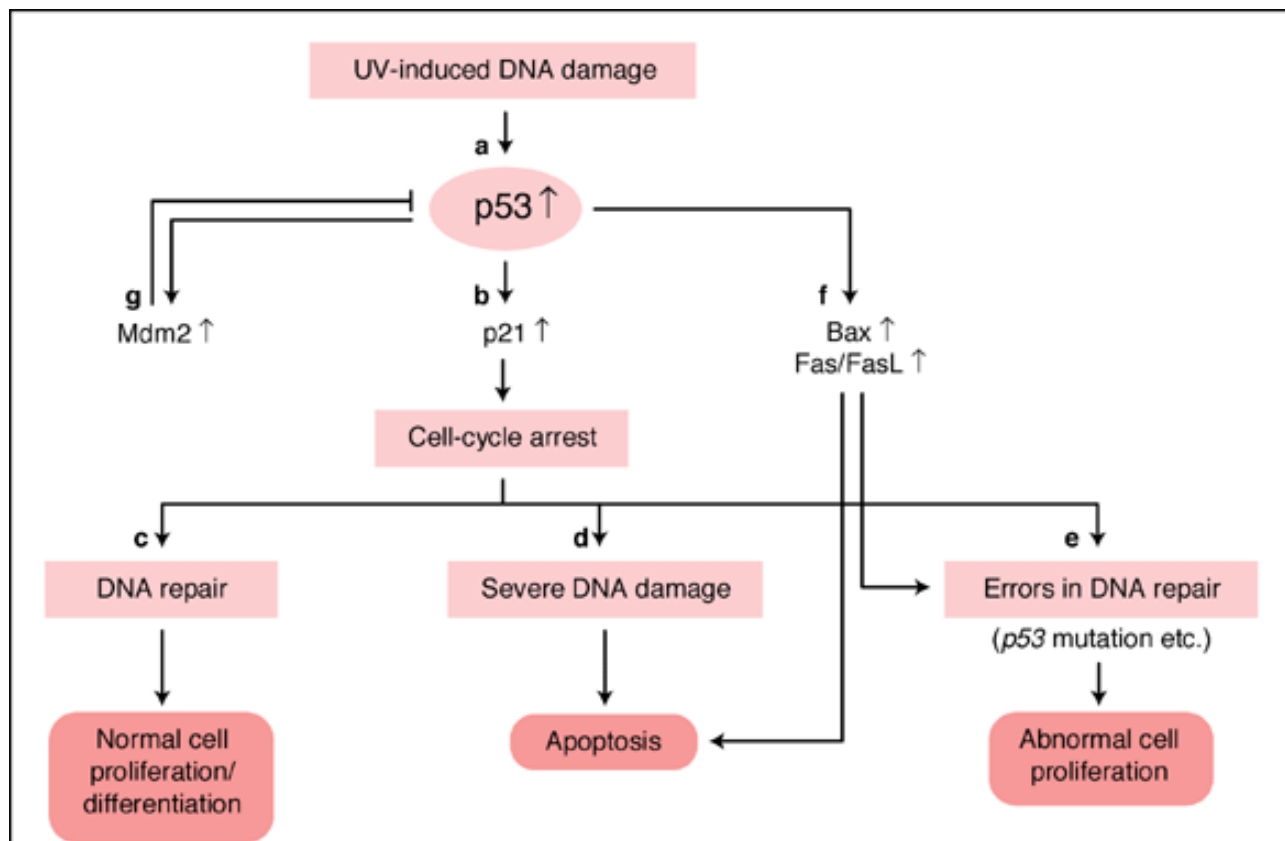
- mitochondrie jsou hlavními producenty energie v eukaryotické buňce, které mají vysoké nároky na spotřebu kyslíku – vznik velkého množství ROS
- UV záření generuje další ROS a následné poškození mtDNA, vznik mutací, peroxidaci membránových lipidů a oxidaci proteinů
- nejčastější fotolézí v mtDNA je 8-oxo-7,8-dihydro-20-deoxyguanosine (8-oxodGuo), který je vysoce mutagenní, protože dochází k transverzi GC→AT
- velmi časté jsou v mitochondriích vystavených UV záření i delece
- poškození mitochondrií spouští produkci ROS a mitochondriálního NO
- velké poškození spouští apoptotickou kaskádu vylitím cytochromu c

- Další účinky UV na buňky kůže
 - UV vyvolává klastrování a internalizaci řady receptorů, např. EGFR, receptorů pro TNF- α a IL-1
 - UV spouští apoptózu klastrováním a následnou aktivací CD95
 - spouští produkci IL-6 aktivací receptoru pro TNF- α
 - UVC přímo aktivuje cytoplazmatické transkripční faktory NF κ B a AP-1 (nezávislé na poškození DNA)
 - UVC snižuje defosforylaci EGF receptoru, tím dochází k jeho aktivaci a spuštění signální kaskády zahrnující c-fos, c-jun a Ras, Raf a MAP kinázy (ve výsledku vliv na produkci prostaglandinů)

Apoptóza indukovaná UV

- Apoptóza vyvolaná poškozením DNA:
 - hlavní úlohu hraje tumor supresor p53

Buňky s fotolézí zůstávají v G1 fázi buněčného cyklu a p53 spouští reparaci DNA před vstupem do S fáze, je-li poškození DNA příliš rozsáhlé je spuštěn proces apoptózy



The central role of p53 in cell-cycle arrest, DNA repair and apoptosis following UV irradiation

Apoptóza vyvolaná poškozením

- hlavní úlohu hrají tzv. death receptory z rodiny receptorů pro TNF (TNF-receptor-1, TRAIL-receptor-1, TRAIL-receptor-2 and deathreceptor-3 (DR-3) a CD95 (Fas or Apo-1))
- UV C i UV B upreguluje expresi CD95 i jeho ligandu u keratinocytů
- UV A upreguluje CD95L i u pomocných T buněk
- tato upregulace není pravděpodobně přímá, ale skrze singletový kyslík generovaný UV zářením
- vazba ligandu na CD95 způsobuje trimerizaci receptoru a spuštění apoptotické dráhy

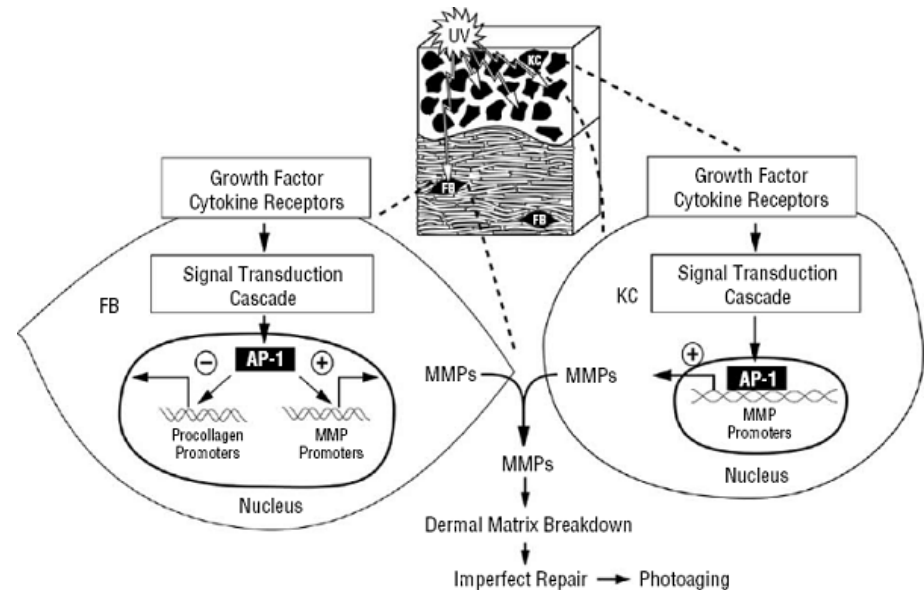
Účinek UV záření na intracelulární procesy - shrnutí

Signalizace a regulace genů

- Aktivace receptorů pro epidermální růstový faktor, IL-1 a TNF na povrchu keratinocytů
- Aktivace transkripčního faktoru AP-1
- Aktivace genů pro matrixové metaloproteázy, inhibice genu pro prokolagen
- Rozklad kolagenu a dalších proteinů

Reakce buněk

- Zastavení růstu
- Reparace poškození DNA, mutací
- Nedokonalá reparace
- Apoptosa buněk (sunburn cell)



Akutní a chronické efekty UV záření na kůži

Akutní účinek UV na kůži

Produkce vitamínu D

Pigmentace – opálení

Erytrém a spálení

Fotosensitivita

Fotoimunosuprese

Fotosyntéza vitaminu D

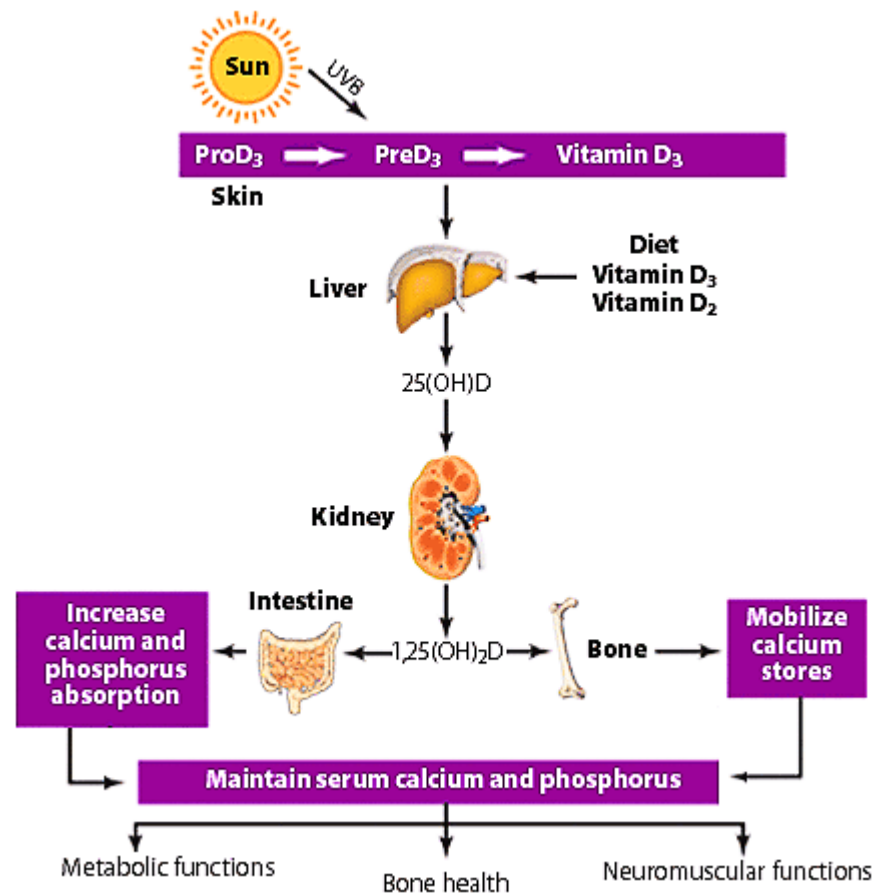
Přeměna 7-dehydrocholesterolu ve 2 krocích:

- 7-dehydrocholesterol absorbuje UVB záření (<320 nm) a přemění se na provitamin D₃
- dochází k termální izomerizaci na formu vitaminu D₃, který je přednostně vázán na protein vázající vitamin D₃ v kapilárách

Provitamin D₃ může po absorpci UV záření dát vzniknout 2 fotoproduktům:

- humisterolu a tachysterolu

Potenciální význam: úloha v prevenci toxicity vitaminu D, která by mohla teoreticky nastat po nadměrné expozici UVB



Pigmentace melaninem - opálení

Časné pigmentační ztmavnutí

- Výsledek oxidace melaninu již v kůži přítomného, nebo redistribucí melanosomů v epidermálních melanocytech
- Probíhá okamžitě během ozáření a vytrvává minuty až dny

Pozdní pigmentace

- Výsledek zvýšené novotvorby melaninu v epidermis
- Zvýšená aktivita melanocytů i vzestup jejich počtu
- Patrná cca za 72 hodin
- U tmavých jedinců (lepší genetická dispozice) může být pozdní pigmentace indukována již suberytémovými dávkami

Konstitucionální (rasová) pigmentace

Fakultativní (získaná) pigmentace

Erytém – spálení

Erytémová reakce

- Zánětlivý erytém je nejnápadnější akutní kožní odpověď na UV ozáření
- Klasické známky zánětu: zvýšená teplota, bolest, otok
- Infiltrace imunitními buňkami – akutní zánětlivá reakce
- Objem krve v povrchových a hlubokých pleteních škáry se zvýší cca o 38% nad normální úroveň.



Mechanismus vzniku erytému

- Chromofory, které zahajují chemické procesy vedoucí k vyvolání erytému, nejsou doposud jasně rozpoznány, avšak tvar křivky erytémového akčního spektra je podobný tvaru křivky UV absorpce DNA – poškození DNA může být důležité
- V procesech vedoucích k UV erytému může zaujímat místo i poškození jiných buněčných složek
- Vznik erytému je silně závislý na množství melaninu přítomného v kůži
- Tloušťka kůže hraje důležitou úlohu v rozvoji erytému, erytémová odpověď kolísá s věkem

Mediátory erytému

- *Reaktivní metabolity kyslíku*
- *Transkripční faktory*
zejména AP-1 a NF-κB
- *Vasodilatační mediátory*
histamin a oxid dusnatý
(zvýšení cévní permeability, vasodilatace)
- *Serotonin a prostaglandiny*
(vasodilatace, modulace ostatních mediátorů)
- *lysosomální enzymy*
(poškození extracelulární hmoty)
- *Prozánětlivé cytokiny*
IL-1, IL-6, IL-8, TNF-alfa

Histologické změny

- vznik tzv. „sunburn cells“ v epidermis - perinukleární vakuolizace, poškození jader lymfocytů
- mezibuněčný otok
- redukce počtu Langerhansových buněk
- pokles počtu žírných buněk ve škáře
- otok endoteliálních buněk povrchových krevních cév
- perivaskulární infiltrát v podkožním tuku (T-lymfocyty, neutrofily, monocyty/makrofágy)

Dlouhodobé vystavení UV záření může indukovat popáleniny druhého stupně tj .puchýře na kůži, silné bolesti doprovázené pocitem na zvracení.

Mediátory reakce jsou primárně prostaglandiny, takže nesteroidní protizánětlivé látky mohou zlepšit stav.

Vícenásobné expozice vede k předčasnému stárnutí a může vést k rakovině kůže.



Minimální erytémová dávka

Minimální erytémová dávka (MED)

- minimální jednotlivá dávka UV záření, která vyvolá jasně ohraničený erytém
- udává se v mJ/cm^2 nebo J/m^2
- reciprocita – záleží pouze na dávce absorbované v kůži, ať už byla absorbována po dlouhou ozařovací dobu ze zdroje o nízké intenzitě, nebo krátce ze zdroje o vysoké intenzitě (avšak neplatí v mezních situacích - např. lasery)
- MED závisí na:
 - Typu kůže a tloušťce
 - Množství melaninu a schopnosti tvořit melanin po ozáření
 - Intenzita ozáření

Fototypy

- Šest fototypů kůže na základě MED
 - Rozdělení kožních fototypů je založeno na reakci vůči slunečnímu záření v květnu-červnu v poledne po 45-60 minutách slunění (zeměpisná šířka 20 – 30 st.).
 - I. Vždy zrudne, nepigmentuje
 - II. Zrudne, pigmentuje mírně
 - III. Zrudne zřídka, pigmentuje
 - IV. Nerudne, pigmentuje dobře
 - V. Trvale hnědá kůže (arabové)
 - VI. Trvale černohnědá kůže (černoši)