

Apoptoza i ochronne działanie kwasu foliowego

dr n. biol. Renata Dębowska, dr n. biol. Karolina Bazela, dr n. farm. Irena Eris
Centrum Naukowo-Badawcze Dr Irena Eris, Warszawa
kierownik działu: dr n. farm. Katarzyna Rogiewicz

Wstęp

W ostatnich latach wiedza o budowie i czynnościach poszczególnych warstw skóry uległa znacznemu poszerzeniu. Skóra, jako układ wielu warstw komórek o wyspecjalizowanych funkcjach, jest pierwszą barierą chroniącą organizm przed urazami mechanicznymi i utratą wody. Jako zewnętrzna powłoka – umożliwia wydalanie i wchłanianie różnych substancji oraz przekazuje do układu nerwowego informacje o otaczającym świecie. To również organ – największy i najcięższy w ciele człowieka – w którym zachodzi szereg reakcji immunologicznych, prowadzących do powstania alergii kontaktowej bądź podrażnień.

Jednym ze zjawisk zachodzących w komórkach skóry jest apoptoza, nazywana też programowaną lub aktywną śmiercią komórki. Umożliwia ona eliminację komórek bez pobudzania procesu zapalnego i uszkodzenia tkanek otaczających. Na drodze apoptozy z ustroju usuwane są komórki zakażone, uszkodzone, zmutowane lub zbędne, np. takie, które występują tylko na pewnych etapach rozwoju organizmu.

Apoptoza stymulowana jest m.in. przez niedobór hormonów, niedobór czynników wzrostu, produkcję cytokin lub na skutek przekazywania błędnych informacji o podziałach komórkowych. Sygnalami do rozpoczęcia tego procesu

są: połączenie odpowiednich receptorów powierzchniowych z rodziny TNFR (tzw. receptory śmierci – Tumor Necrosis Factor Receptors) z ligandami (szlak receptorowy) lub zmiany zachodzące w mitochondriach (szlak mitochondrialny) [1,3]. Uruchomione w ten sposób procesy proteolityczne i nukleolityczne prowadzą do charakterystycznych zmian w morfologii komórek. Ciągłość błony komórkowej zostaje zachowana: otacza ona za-

wartość obumierającej komórki, tworząc tzw. ciała apoptotyczne. We wczesnym stadium apoptozy dochodzi do odwodnienia komórki, co prowadzi do zagęszczenia cytoplazmy, która staje się silnie kwasochłonna [2]. Zmiany zachodzące w jądrze komórkowym mają charakter zorganizowany: chromatyna ulega kondensacji, przybiera kształt półksiężyca lub koła, a DNA zostaje strawione przez endonukleazy, zależne od jonów wapnia i magne-

Tabela 1

Przeżywalność komórek naskórka hodowanych przez 16 godz. w obecności kwasu foliowego (0,01%), a następnie naświetlanych promieniowaniem UVB przez 90 min i 180 min, oceniana metodą FDA/Pi (n=2)
Viability of keratinocytes incubated (16 h) in presence of folic acid (0,01%) and next UVB-irradiated (90 min and 180 min), died by FDA/Pi (n=2)

Średnia przeżywalność komórek naskórka (kontrola)	74,8%
Średnia przeżywalność komórek naskórka hodowanych przez 16 godz. w obecności 0,01% FA	77,2%
Średnia przeżywalność komórek naskórka poddanych działaniu UVB (90 min)	52,2%
Średnia przeżywalność komórek naskórka poddanych 16-godzinnej preinkubacji z 0,01% FA, a następnie naświetlonych UVB (90 min)	75,9%
Średnia przeżywalność komórek naskórka poddanych działaniu UVB (180 min)	29,6%
Średnia przeżywalność komórek naskórka poddanych 16-godzinnej preinkubacji z 0,01% FA, a następnie naświetlonych UVB (180 min)	68,8%

zu [4]. Ciałka apoptotyczne ostatecznie ulegają sfagocytowaniu przez sąsiadujące komórki o właściwościach żernych oraz przez wędrujące makrofagi. Komórki te w przebiegu apoptozy wydzielają substancje hamujące proces zapalny [3]. Oprócz zmian morfologicznych w komórkach apoptycznych dochodzi do szeregu przemian biochemicznych, np. mobilizacji wapnia wewnątrzkomórkowego, destrukcji mikrotubul i aktywacji transglutaminaz katalizujących powstawanie wiązań między niektórymi białkami.

Keratynocyty, tworzące żywą warstwę naskórka, ulegają apoptozie w trakcie ich migracji w kierunku powierzchni skóry. Nie ulegają jednak fagocytozie, ale są usuwane z powierzchni skóry w procesie złuszczenia. Podobna sytuacja ma miejsce w czasie tworzenia się kosmków jelitowych lub komórek soczewki oka (w rozwoju zarodkowym).

Przekształcanie się keratynocytów (keratynizacja) obejmuje kilka zachodzących jednocześnie procesów, dotyczących desmosomów, białek śródkomórkowych (keratyny) i tworzenia otoczki rogowej. Apoptoza rozpoczyna się już w warstwie kolczystej zmianami struktury jądra komórkowego i rozpadem DNA oraz niektórych organeli komórkowych (np. retikulum endoplazmatycznego – ER i aparatu Golgiego). Jądra komórek warstwy kolczystej są owalne, a w cytoplazmie stwierdza się dość dużą liczbę wolnych rybosomów i ziarnistości o owalnym kształcie, otoczonych błoną [5]. Ziarnistości te są charakterystyczne dla komórek, w których rozpoczyna się proces rogowacenia.

Apoptoza, w przeciwieństwie do martwicy, jest procesem czynnym, związanym z aktywacją genów i syntezą białek [1]. Natomiast nekroza (martwica) jest procesem za-

Apoptoza i ochronne działanie kwasu foliowego

STRESZCZENIE

Słowa kluczowe: kwas foliowy, apoptoza, promieniowanie ultrafioletowe

Wstęp: Jednym ze zjawisk zachodzących w komórkach skóry jest apoptoza, nazywana też programowaną lub aktywną śmiercią komórki. Proces ten umożliwia eliminację komórek bez pobudzania procesu zapalnego i uszkodzenia tkanek otaczających. Keratynocyty tworzące żywą warstwę naskórka ulegają apoptozie w trakcie ich migracji w kierunku powierzchni skóry. Nie ulegają jednak fagocytozie, ale są usuwane z powierzchni skóry w procesie złuszczenia. Do czynników stymulujących apoptozę należy m.in. promieniowanie ultrafioletowe. Istnieje wiele substancji chroniących przed szkodliwym działaniem UVB, jednak tylko niektóre z nich wywierają wpływ na poziom indukowanej UV apoptozy. Substancją kosmetyczną o działaniu ochronnym, która jednocześnie wpływa na apoptozę komórek naskórka i odgrywa istotną rolę w naprawie materiału genetycznego, jest kwas foliowy.

Celem pracy było sprawdzenie, jaki jest wpływ kwasu foliowego na poziom apoptozy indukowanej UVB w komórkach naskórka stymulowanych lub niestymulowanych badaną witaminą.

Materiał i metody: Oceny poziomu apoptozy dokonano przy użyciu cytometru przepływowego.

Wyniki: Przeprowadzone badania wykazały ochronne działanie kwasu foliowego na uszkodzenia wywołane promieniowaniem ultrafioletowym. Zmniejszenie poziomu apoptozy zaobserwowano tylko w komórkach, które hodowano w obecności kwasu foliowego, zanim zostały uszkodzone przez działanie promieniowania ultrafioletowego. Nie stwierdzono zmniejszenia poziomu apoptozy w komórkach, które przed naświetlaniem nie były stymulowane witaminą.

Wnioski: Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazują, że kwas foliowy jest niezbędny do przetrwania szkodliwych warunków środowiska, ale musi być dostarczony odpowiednio wcześnie – zanim powstaną uszkodzenia w komórkach. Wydaje się, że kwas foliowy nie tyle redukuje wywołaną UV apoptozę (co w konsekwencji mogłoby doprowadzić do rozwoju nowotworów na skutek nagromadzenia uszkodzeń w komórkach), co zapobiega powstawaniu uszkodzeń, które uruchomiłyby proces samobójczej śmierci komórki.

Apoptosis and protective effect of folic acid

SUMMARY

Key words: folic acid, apoptosis, ultraviolet radiation

Introduction: Apoptosis, called also programmed or active cell death, is one of the phenomena occurring in skin cells. It makes possible elimination of cells without stimulating inflammatory process and damage of surrounding tissues. The keratinocytes forming the viable epidermal layer are subject to apoptosis during their migration towards skin surface. However, they undergo no phagocytosis but are eliminated from skin surface in the process of desquamation. The factors that stimulate apoptosis include, among other, ultraviolet radiation. There are numerous cosmetic substances protecting against harmful effects of UVB, but only some of them exert influence on the level of UV-induced apoptosis. Folic acid is a cosmetic substance with protective activity, that, at the same time, affects apoptosis of epidermal cells and plays a significant role in genetic material repair.

The aim of the study was an assessment of the effect of folic acid on the level of UVB-induced apoptosis in epidermal cells stimulated or not stimulated with the studied vitamin.

Material and methods: The assessment of apoptosis level was carried out by

means of a flow cytometer.

Results: The tests performed demonstrated a protective effect of folic acid against the damages induced by ultraviolet radiation. Apoptosis level reduction was observed only in those cells which had been cultured in the presence of folic acid before they were damaged by ultraviolet radiation. No reduction of apoptosis level was found in the cells, which were not stimulated with the vitamin.

Conclusions: The results of the experiments performed demonstrate that folic acid is indispensable for survival under harmful environmental conditions, but it must be supplied early enough – before cell damages occur. It seems that folic acid not so much reduces the UV-induced apoptosis (which, in consequence, could lead to development of tumours due to accumulation of damages in cells), as prevents the development of damages, which could start the process of suicidal cell death.

leżnym od rodzaju uwolnionych enzymów, a powstałe produkty rozpadu komórki wywołują reakcję zapalną. Śmierć nekrotyczna następuje wówczas, gdy komórki zostają poważnie uszkodzone przez czynniki fizyczne lub niedotlenienie i, w przeciwieństwie do komórek apoptotycznych, ulegają pęcznieniu. Komórka w procesie martwicy traci zdolność zachowania równowagi wodno-elektrolitowej, czego efektem jest zwiększanie objętości organelli komórkowych (głównie mitochondriów) oraz ich pękanie.

Apoptoza odgrywa bardzo ważną rolę w procesach fizjologicznych (w rozwoju i modelowaniu tkanek i narządów, kształtowaniu układu nerwowego, rozrodczego i odpornościowego, erytropoezie) oraz w procesach patologicznych (zakażenia pasożytnicze, bakteryjne, wirusowe i grzybicze, choroby z autoagresji oraz nowotworowe). Zaburzenia tego procesu towarzyszą chorobom nowotworowym i degeneracyjnym, alergiom bądź przewlekłym zapaleniom.

Na drodze apoptozy, jak wspomniano wcześniej, usuwane są komórki uszkodzone. Do uszkodzeń takich dochodzi m.in. na skutek ekspozycji skóry na promieniowanie ultrafioletowe. Największa dawka promieniowania dociera do naskórka, powodując rumień, oparzenia i rozwój nowotworów. Oparzenia słoneczne prowadzą do apoptozy

keratynocytów znajdujących się jeszcze w dosyć głębokich warstwach skóry: warstwie podstawnej i kolczystej [6]. Apoptoza w tych warunkach wywołana jest znacznymi uszkodzeniami materiału genetycznego tych komórek i poprzedza ich migrację w kierunku powierzchni skóry [4].

Normalna, zdrowa skóra chroni się w pewnym stopniu przed uszkodzeniami wywołanymi przez światło. Martwe komórki naskórka oraz lipidy cementu międzykomórkowego odbijają część światła i absorbują go bez szkody dla skóry. Melanina produkowana pod wpływem promieni UV staje się naturalnym

filtrem o działaniu ochronnym, przeciwrodnikowym oraz zwiększającym odporność skóry na poparzenia słoneczne i zmiany nowotworowe. Innym sposobem zapobiegania zmianom wywoływanym przez promieniowanie świetlne jest odpowiednia pielęgnacja skóry. Najlepszą metodą ochrony skóry jest unikanie bezpośredniego działania promieni słonecznych oraz stosowanie filtrów słonecznych, które na skórze absorbują lub odbijają promieniowanie UV.

Składniki zawarte w kosmetykach można podzielić na trzy grupy. Należą do nich: składniki nawilżające, których działanie ogranicza się głównie do warstwy rogowej (wzmacniają lipidy cementu międzykomórkowego i działają na zasadzie higroskopijności); składniki ochronne (np. przeciwrodnikowe, przeciwutleniające, wiążące jony metali ciężkich), które swoją aktywność przejawiają w reakcjach chemicznych, oraz substancje, które ingerują w procesy biochemiczne skóry – ekspresję genów, regulację aktywności enzymów, syntezę hormonów czy wyzwalanie sygnałów w układzie nerwowym [7]. Podsta-

Tabela 2
Poziom apoptozy komórek naskórka hodowanych przez 16 godz. w obecności kwasu foliowego (0,01%) i naświetlanych promieniowaniem UVB, oceniany metodą Annexyna V/Pi.
Apoptosis level in keratinocytes incubated (16 h) in presence of folic acid (0,01%) and next UVB-irradiated, died by Annexin V (n=2)

Średnia wczesna apoptoza komórek naskórka (kontrola)	84,90%
Średnia wczesna apoptoza komórek naskórka hodowanych przez 16 godz. w obecności 0,01% FA	9,76%
Średnia wczesna apoptoza komórek naskórka poddanych działaniu UVB (90 min)	30,72%
Średnia wczesna apoptoza komórek naskórka poddanych 16-godzinnej preinkubacji z 0,01% FA, a następnie naświetlonych UVB (90 min)	9,59%

Tabela 3
Przeżywalność komórek naskórka niepoddanych przed naświetlaniem działaniu kwasu foliowego, oceniana metodą FDA/Pi (n=2)
Viability of keratinocytes after UVB radiation (70 min), without pre-incubation with folic acid

Średnia wczesna apoptoza komórek naskórka (kontrola)	79,8%
Średnia przeżywalność komórek naskórka hodowanych przez 4 godz. w obecności 0,01% FA	84,4%
Średnia przeżywalność komórek naskórka poddanych działaniu UVB (70 min)	43,2%
Średnia przeżywalność komórek naskórka naświetlonych UVB (70 min) i następnie poddanych 4-godzinnej inkubacji z 0,01% FA	43,1%

wowym warunkiem ich skuteczności jest powinowactwo do określonych cząsteczek chemicznych (receptorów komórkowych) oraz zdolność dotarcia do określonego miejsca w tkance skóry.

Substancją kosmetyczną o działaniu ochronnym, która jednocześnie wpływa na apoptozę komórek naskórka oraz przejawia istotną rolę w naprawie materiału genetycznego jest kwas foliowy. Jest to witamina z grupy B, określana mianem witaminy Bc, B₉ lub witaminy M, która została wyodrębniona wiele lat temu z liści szpinaku i nazwę swoją wywodzi od powszechnego występowania w zielonych liściach (folium – liść). Kwas foliowy przejawia właściwości regenerujące komórki skóry [8], bierze udział w regulacji proliferacji komórek (stymuluje proces ich odnowy) oraz skutecznie chroni przed fotostarzeniem [9]. W badaniach *in vitro* wykazano przyspieszenie naprawy DNA uszkodzonego w wyniku ekspozycji na promieniowanie UVB w komórkach hodowanych w obecności kwasu foliowego [10]. Wykorzystując technikę Elisa stwierdzono, że kwas foliowy zapobiega także apoptozie komórek naskórka wywołanej tym

promieniowaniem [11]. W przeprowadzonych doświadczeniach komórki naskórka były hodowane w obecności kwasu foliowego zanim poddano je działaniu UV. Nie sprawdzono jednak jaki jest wpływ witaminy na poziom apoptozy komórek bez ich wcześniejszej stymulacji testowaną substancją. Wysłunięto jedynie przypuszczenie, że kwas foliowy może redukować apoptozę. Aby zweryfikować tę sugestię przeprowadzono badania poziomu apoptozy w komórkach traktowanych i niehodowanych w obecności kwasu foliowego, a następnie poddanych działaniu promieniowania ultrafioletowego.

Cel pracy

Celem pracy było sprawdzenie, jaki jest wpływ kwasu foliowego na poziom apoptozy indukowanej UVB w komórkach naskórka, stymulowanych lub niestymulowanych badaną witaminą.

Dla zobrazowania opisywanych zjawisk zastosowano technikę cytometrii przepływowej, monitorującej charakterystyczne zmiany morfologiczne w komórkach apoptotycznych. Przeprowadzono barwienie

komórek diocetanem fluoresceiny i jodkiem propidyny (kompleks FDA/Pi) oraz aneksyną V (kompleks aneksyna V/Pi).

Materiał i metody

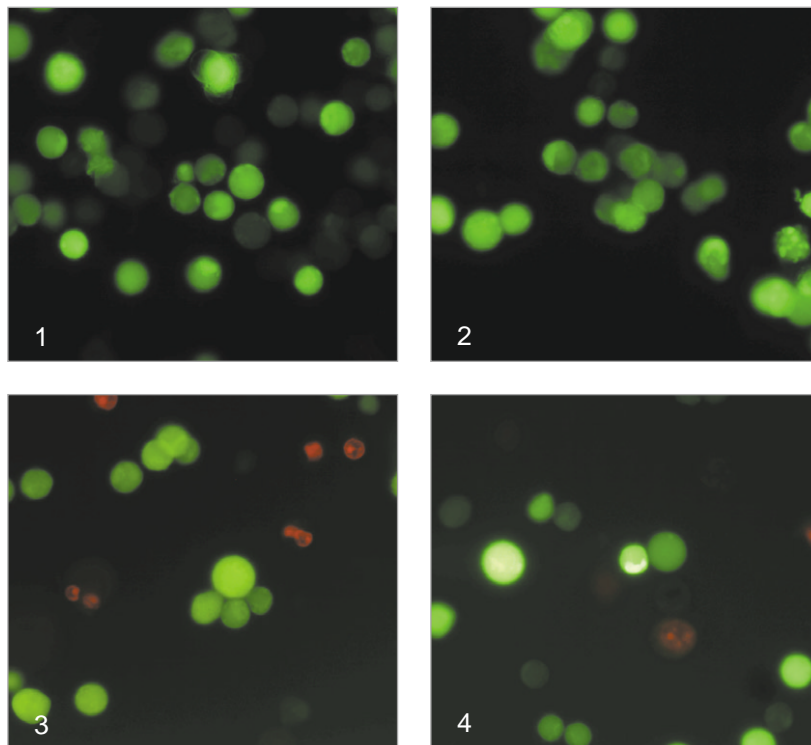
Materiałem do badań była linia komórek naskórka (epidermoid carcinoma cell line KB, American Type Culture Collection) hodowana w podłożu RPMI zawierającym 2 mM L-glutaminę, antybiotyki (100 jed./ml penicyliny, 0,25 mg/ml siarczanu streptomycyny) i 10% FCS [11]. Doświadczenia przeprowadzono na komórkach hodowanych na płytach 6-dołkowych (NUNC).

■ Metody

Komórki naświetlano promieniowaniem UVB (1000 mW/m²) z wysokości 20 cm lampą Vilber Lourmat VL-6M 12W (długość fali: 312 nm). Natężenie promieniowania w miejscu umieszczenia płytek przed każdym doświadczeniem kontrolowano za pomocą miernika napromieniowania UVB-20 firmy Sonopan. Naświetlanie materiału badawczego odbywało się w inkubatorze, w warunkach 37°C i 5% CO₂. Naświetlaniu poddawano komórki niestymulowane kwasem foliowym (czas naświetlania 70 min) oraz te, które hodowano przed naświetlaniem w obecności kwasu foliowego (0,01%) przez 16 godzin (czas naświetlania: 90 i 180 min). Po naświetlaniu komórki inkubowano przez 4 godz (w podłożu zawierającym lub nie kwas foliowy), a następnie barwiono kompleksem FDA/Pi według metody opisanej przez Stachnik i wsp. [12]. Diocetan fluorescyny (FDA) jest niepolarną i niefluoryzującą pochodną fluoresceiny, która ma zdolność przenikania przez błonę komórkową. Po wnikięciu jest hydrolizowana w cytoplazmie przez wewnątrzkomórkowe esterazy, co prowadzi do powstania

fluoresceiny – związku wykazującego silne właściwości fluoryzujące. Komórki żywe, przejawiające dużą aktywność esteraz, kumulują znaczne ilości fluoresceiny, co w konsekwencji prowadzi do otrzymania dużej wartości fluorescencji zielonej. Komórki apoptyczne i martwe, mające mniejszą aktywność esteraz oraz słabiej zachowaną integralność błony komórkowej, słabiej akumulują produkt hydrolizy FDA. W konsekwencji oznacza to mniejsze wartości fluorescencji zielonej tych komórek. W celu odróżnienia komórek apoptycznych od nekrotycznych stosuje się dodatkowy barwnik – jodek propidyny (Pi), który ze względu na posiadany ładunek elektryczny nie przenika przez nieuszkodzoną błonę żywych komórek. Komórki martwe i apoptyczne wykazujące zakłóconą integralność błony przepuszczają jodek propidyny, który – wiążąc się z kwasami nukleinowymi – daje sygnał czerwonej fluorescencji. Właściwości ww. związków zostały wykorzystane do oceny przeżywalności komórek naskórka poddanych działaniu promieniowania UV.

Komórki, poddawane barwieniu kompleksem Aneksyna V/Pi (ApoAlert Annexin V & Apo 2.7-PE, Becton Dickinson), inkubowano przez 16 godz. w obecności 0,01% kwasu foliowego, następnie naświetlano przez 90 min promieniowaniem UVB i ponownie inkubowano przez 4 godziny w podłożu zawierającym kwas foliowy. Jedną z cech biochemicznych wczesnego etapu procesu apoptozy jest przemieszczenie (eksternalizacja) na zewnątrz błony fosfolipidu – fosfatydyloseryny (FS) [2]. Aneksyna V: białko zależne od jonów wapnia, wiąże się z dużym powinowactwem do FS, co daje możliwość ilościowego określenia poziomu apoptozy obserwowanego w badanej populacji komórek. Połączenie Aneksyny V z fluorochromem, przeważnie izotiocyjani-



Ryc. 1-4

1) Komórki naskórka barwione FDA/Pi (kontrola).

Morphological examination of keratinocytes stained with FDA/Pi.

2) Komórki naskórka hodowane przez 16 godz. w obecności 0,01% kwasu foliowego, barwione FDA/Pi.

Morphological examination of keratinocytes incubated (16 h) in medium containing 0.01% folic acid, stained with FDA/Pi.

3) Komórki naskórka poddane działaniu promieniowania UVB (90 min), barwione FDA/Pi.

Morphological examination of UVB-irradiated keratinocytes (90 min), stained with FDA/Pi.

4) Komórki naskórka hodowane przez 16 godz. w obecności 0,01% kwasu foliowego, a następnie poddane działaniu promieniowania UVB (90 min), barwione FDA/Pi.

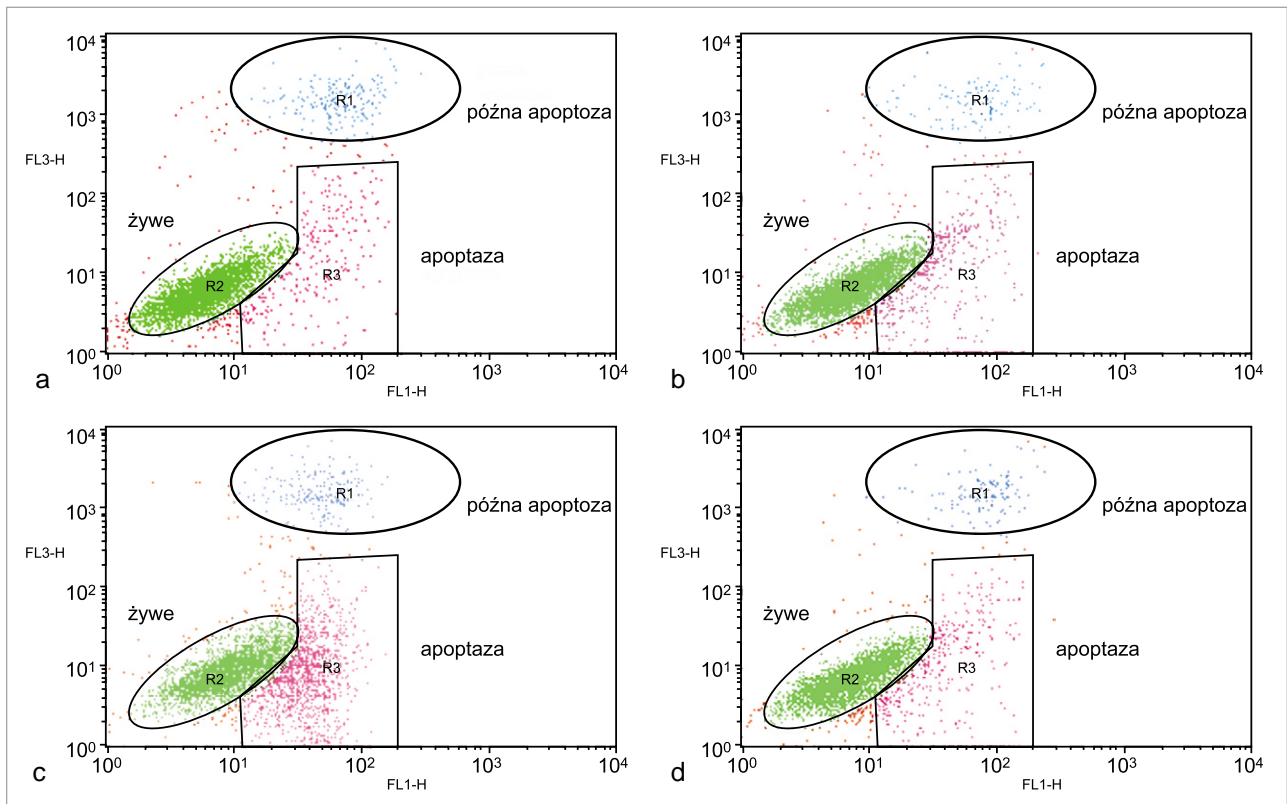
Morphological examination of keratinocytes incubated (16 h) in medium containing 0.01% folic acid, next UVB-irradiated (90 min.), stained with FDA/Pi.

Komentarz: Komórki barwy czerwonej to komórki martwe (nekrotyczne), barwa jasnozielona wskazuje na komórki żywe.

ny fluoresceiny, umożliwiło przeprowadzenie badań z zastosowaniem cytometrii przepływowej. W celu rozróżnienia komórek nekrotycznych, mających zmienioną integralność błony komórkowej, i apoptycznych – wyznakowanych Aneksyną V, zastosowano dodatkowo barwienie jodkiem propidyny (Pi). Poziom

apoptozy mierzono przy użyciu cytometru przepływowego (FACSV, BD Bioscience, USA) w Samodzielnej Pracowni Cytometrii Przepływowej (w Narodowym Instytucie Zdrowia Publicznego).

Komórki po barwieniu FDA/Pi lub kompleksem Aneksyna V/Pi oglądano w mikroskopie fluorescency-



Ryc. 5

Komórki barwione Aneksyną V/Pi analizowane w cytometrze przepływowym:
 a) komórki kontrolne, b) komórki hodowane w obecności 0,01% kwasu foliowego przez 16 godz.,
 c) komórki kontrolne naświetlane UVB,
 d) komórki hodowane w obecności 0,01% kwasu foliowego przez 16 godz. i naświetlane UVB.

Apoptosis level in keratinocytes analysed in flow cytometry, died by Annexin V/Pi:
 a) control cells, b) keratinocytes incubated 16 h in presence of 0.01% FA,
 c) UVB-irradiated keratinocytes,
 d) keratinocytes incubated 16 h in presence of 0.01% FA and next UVB-irradiated.

jnym BX60, wyposażonym w kamerę DP50 (Olympus, Japonia).

Wyniki

Średnia przeżywalność komórek kontrolnych, niepoddanych działaniu kwasu foliowego, wynosiła 74,8% i była podobna do przeżywalności komórek hodowanych przez 16 godz. w obecności witaminy B₉ (77,2%) – tabela 1 i ryc. 1, 2. Naświetlanie keratynocytów promieniowaniem UVB przez 90 min. (ryc. 3) i przez 180 min. spowodowało spadek żywotności komórek odpowiednio o blisko 30% i 60%

(tab. 1). Natomiast przeżywalność komórek naskórka hodowanych przed naświetlaniem w obecności kwasu foliowego, a następnie poddanych działaniu UVB przez 90 min. (ryc. 4) i 180 min. wynosiła odpowiednio 75,9% i 68,8%.

W celu potwierdzenia ochronnego działania kwasu foliowego na komórki naskórka uszkodzone promieniowaniem ultrafioletowym zastosowano barwienie kompleksem Aneksyna V/Pi (ryc. 2). Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wykazały, że poziom wczesnej apoptozy wywołanej UVB w komórkach kontrolnych wynosił ponad

30%, podczas gdy w komórkach hodowanych uprzednio w obecności kwasu foliowego – niespełna 10% (tab. 2). Poziom apoptozy w komórkach inkubowanych z witaminą B₉ i następnie naświetlanych UVB był podobny do poziomu apoptozy w komórkach kontrolnych i traktowanych kwasem foliowym, a niepoddanych działaniu UV (tab. 2).

Przeprowadzone badania potwierdziły, że kwas foliowy chroni komórki naskórka przed szkodliwym działaniem promieniowania ultrafioletowego. Zaobserwowano wyraźne zmniejszenie apoptozy indukowanej działaniem UV w ko-

mórkach hodowanych w obecności witaminy B₉ przed naświetlaniem w stosunku do komórek, które nie były traktowane kwasem foliowym.

W opisywanych wyżej doświadczeniach komórki naskórka były hodowane w obecności kwasu foliowego, zanim poddano je działaniu UV. Ciekawe wydawało się sprawdzenie, jaki jest wpływ witaminy na poziom apoptozy komórek, bez ich wcześniejszej stymulacji testowaną substancją. Przeprowadzono doświadczenia określające przeżywalność komórek naskórka niehodowanych w obecności witaminy i poddanych działaniu UVB, a następnie inkubowanych przez 4 godz. z kwasem foliowym. W takim wariantcie doświadczenia komórki naskórka miały dostęp do testowanej substancji dopiero po wywołaniu uszkodzeń przez UVB.

Okazało się, że średnia przeżywalność komórek niepoddanych pre-inkubacji z kwasem foliowym, a następnie naświetlonych UV i inkubowanych w obecności witaminy przez 4 godz. po naświetlaniu jest taka sama, jak komórek kontrolnych uszkodzonych promieniowaniem ultrafioletowym (tab. 3) i wynosi 43,2%. Średnia przeżywalność komórek niepoddanych działaniu UVB wahała się od blisko 80% (kontrola) do 84,4% (komórki inkubowane przez 4 godz. w obecności kwasu foliowego) (tab. 3). Wyniki przeprowadzonego doświadczenia wskazują, że kwas foliowy jest niezbędny do przeżycia w szkodliwych warunkach środowiska, ale musi być dostarczony odpowiednio wcześniej – zanim powstaną uszkodzenia w komórkach.

Dyskusja

Choć Słońce jest podstawą życia na Ziemi, a działanie jego promieniowania, pożyteczne dla ludzi i środowiska, jest szeroko doceniane, to stale trzeba pamiętać o nieko-

rzystnym działaniu tych promieni na skórę. W przypadku skóry narażonej na ekspozycję na promieniowanie UV obserwuje się nadmierny rozrost warstwy rogowej, zaburzenia keratynizacji, przesuszenie skóry i osłabienie funkcji ochronnych. W przypadku trądziku młodzieńczego pobudzenie komórek do podziałów utrudnia usuwanie obfitej w tym okresie wydzieliny gruczołów łojowych. Promieniowanie UVB jest przyczyną powstawania rumienia i oparzeń słonecznych, ma także działanie rakotwórcze. Szczególnie wrażliwe na promieniowanie ultrafioletowe są komórki układu immunologicznego skóry: upośledzeniu ulegają czynności komórek Langerhansa, indukowane są antygeny, które w warunkach prawidłowych nie wykazują ekspresji [13].

Komórki uszkodzone usuwane są z organizmu dzięki mechanizmowi indukowanej apoptozy. Wykryto szereg białek umożliwiających samounicestwienie komórek. Związki te wykorzystuje się obecnie jako markery apoptozy w technikach wykrywania komórek apoptotycznych. Należą do nich m.in.: Bcl-2, kaspazy, białko Apaf1, mitochondrialny czynnik AIF, czynnik transkrypcyjny NFκB [3].

W prezentowanej pracy zastosowano technikę cytometrii przepływowej do oceny żywotności komórek naskórka, poddanych działaniu promieniowania ultrafioletowego. Przeprowadzono barwienie komórek diocetanem fluoresceiny, substratem dla komórkowych esteraz, oraz Ankesyną V, wykazującą powinowactwo do fosfatydyloseryny. Badano ochronne właściwości kwasu foliowego – witaminy przejawiającej silne działanie regeneracyjne na komórki skóry. Wykazano, że kwas foliowy zapobiega indukowanej UVB apoptozie, ale tylko wtedy, gdy komórki hodowano w obecności witaminy, zanim zostały poddane działaniu promieniowania. Tworzenie

tzw. sun burn cells, czyli komórek podlegających apoptozie wywołanej UVB w naskórku, jest mechanizmem ochronnym komórek skóry przed uszkodzeniami. Tylko w przypadku upośledzenia mechanizmów naprawczych organizm uruchamia proces samounicestwienia nieprawidłowych komórek. Wydaje się, że kwas foliowy nie tyle redukuje wywołaną UV apoptozę (co w konsekwencji mogłoby doprowadzić do rozwoju nowotworów na skutek nagromadzenia uszkodzeń w komórkach), co zapobiega powstawaniu uszkodzeń, które uruchomiłyby proces samobójczej śmierci komórki. Wyniki badań wskazują, że miejscowa obecność kwasu foliowego przyspiesza naprawę uszkodzonego DNA, nie dopuszczając tym samym do uruchomienia procesu apoptozy – zmniejszenie apoptozy zaobserwowano tylko w komórkach, które były hodowane w obecności kwasu foliowego, zanim zostały uszkodzone działaniem promieniowania UV. Podobny efekt stwierdzono w przypadku działania interleukiny [12].

W badaniach Schwarz i wsp. [14] wykazano wyraźnie mniejszy poziom indukowanej UVB apoptozy w komórkach inkubowanych w obecności IL-12. Wykazano, że zmniejszenie poziomu apoptozy było związane z włączeniem mechanizmów naprawczych, szczególnie naprawy poprzez wycinanie pojedynczego nukleotydu (nucleotide excision repair – NER) [14].

Kwas foliowy bierze udział w syntezie DNA – jest donorem grup metylowych w tworzeniu monofosforanu tymidyny. Zaburzenie puli deoksyrybonukleotydów, wynikające z niedoboru kwasu foliowego może niekorzystnie wpływać na syntezę DNA, prowadząc do jej spowolnienia lub występowania błędów. Ponadto może prowadzić do nieprawidłowości w procesach naprawy uszkodzonego materiału genetycznego. Dlatego niezmiernie

ważne jest stałe dostarczanie komórkom kwasu foliowego – zarówno w suplementacji doustnej, jak i w postaci zewnętrznie stosowanych preparatów kosmetycznych. Kwas foliowy wspomaga system immunologiczny, wpływa na metabolizm cukrów i aminokwasów, a także odpowiada za wzrost komórek oraz przeciwdziała uszkodzeniom chromosomów. Jest witaminą, której najczęściej przypisuje się działanie przeciwnowotworowe. Wzbogacenie preparatów w tę cenną substancję to sposób na doskonałą pie-

legnącję skóry i zabezpieczenie jej przed uszkodzeniami pojawiającymi się na poziomie komórkowym.

Wnioski

Wykazano, że kwas foliowy chroni komórki naskórka przed szkodliwym działaniem promieniowania ultrafioletowego. Zaobserwowano wyraźnie mniejszy poziom apoptozy indukowanej działaniem UVB w komórkach stymulowanych przed naświetlaniem witaminą B₉ w porównaniu do komórek kontrolnych,

które nie były traktowane kwasem foliowym. Natomiast poziom przeżywalności komórek niestymulowanych witaminą B₉ przed naświetlaniem był taki sam, jak komórek kontrolnych uszkodzonych promieniowaniem ultrafioletowym.

Uzyskane wyniki badań wskazują, że kwas foliowy przejawia właściwości ochronne – zapobiegając uszkodzeniom, które uruchomiłyby proces samobójczej śmierci komórki, nie dopuszcza do powstania apoptozy wywołanej promieniowaniem ultrafioletowym.

PIŚMIENNICTWO

1. Cywińska A., Baś M., Krzyżanowska M., Sokołowska J.: Apoptoza – programowana śmierć komórki. Część I. Mechanizmy apoptozy. *Życie weterynaryjne*, 2004, 79(10): 553-557.
2. Sokołowska J., Krzyżanowska M., Cywińska A., Baś M.: Apoptoza – programowana śmierć komórki. Część II. Metody wykrywania apoptozy. *Życie weterynaryjne*, 2004, 79(11): 617-622.
3. Baś M., Cywińska A., Sokołowska J., Krzyżanowska M.: Apoptoza – programowana śmierć komórki. Część III. Rola apoptozy w procesach fizjologicznych i patologicznych. *Życie weterynaryjne*, 2004, 79(12): 671-675.
4. Sulejczak D.: Apoptoza i metody jej identyfikacji. *Postępy Biologii Komórki*, 2000, 27(4): 527-568.
5. Ostrowski K. (red.): *Histologia. Skóra*. PZWL, Warszawa, 1988: 635-654.
6. Duke R.C., Ojcius D.M., Young J.D.: Śmierć komórki w zdrowiu i chorobie. *Świat Nauki*, 1997, 2: 24-32.
7. Arct J., Majewski S., Pytkowska K.: Kosmetyczne zastosowanie witamin A i E. *Pielęgnacja i suplementacja*. Wyższa szkoła Zawodowa Kosmetyki i Pielęgnacji Zdrowia, Warszawa, 71-96.
8. Eris I., Dębowska R.: Kwas foliowy (Folacyna) w preparatach do pielęgnacji twarzy – ocena działania witaminy na komórki skóry w badaniach in vitro. *Dermatologica*, 2003, 6: 13-18.
9. Dębowska R., Rogiewicz K., Iwaneńko T., Kruszewski M., Eris I.: Folic acid (folacin) – new application of cosmetic ingredient. *Cosmetic Medicine*, 2005, 3: 123-129.
10. Dębowska R., Eris I., Iwaneńko T., Kruszewski M., Wojewódzka M.: Repair of UV- and X-radiation induced DNA damage in folacin-treated primary human fibroblasts. 4-th DNA Repair Workshop, 2004, Smolenice, Słowacja.
11. Dębowska R., Schwarz A., Eris I.: Ochronne działanie wybranych surowców kosmetycznych na komórki naskórka poddane działaniu promieniowania ultrafioletowego. *Dermatologia Estet.*, 2005, 2(37): 87-94.
12. Stachnik K., Grieb P., Skierski J.S.: Cytotoxic effects of cladribine and tezacitabine toward HL-60. *Acta Biochimica Polonica*, 2005, 2: 561-565.
13. Rubaj-Dudek E.: Kosmetologiczne aspekty ochrony skóry przed promieniowaniem ultrafioletowym. *Lek w Polsce*, 2001, 11(7): 69-83.
14. Schwarz A., Stander S., Berneuburg M., Bohn M., Kulms D., van Steeg H. i in.: Interleukin-12 suppresses ultraviolet radiation-induced apoptosis by inducing DNA repair. *Nature Cell Biology*, 2002, 4: 26-31.

Adres do korespondencji:

Renata Dębowska
Centrum Naukowo-Badawcze Dr Irena Eris, ul. Puławska 107A, 02-595 Warszawa
tel.: 022 540 17 104