

Ochronne działanie wybranych surowców kosmetycznych na komórki naskórka poddane działaniu promieniowania ultrafioletowego

dr n. biol. Renata M. Dębowska*, dr n. med. Agatha Schwarz**,
dr n. farm. Irena Eris*

*Centrum Naukowo-Badawcze Dr Irena Eris, Warszawa

Kierownik Działu Badań i Rozwoju – dr n. farm. Katarzyna Rogiewicz

**Department of Dermatology and Allergology, University Hospital
Schleswig-Holstein, Kiel (Niemcy)

Wprowadzenie

Materiał genetyczny wszystkich organizmów narażony jest na działanie czynników mających zdolność modyfikacji chemicznej struktury DNA. Należą do nich przede wszystkim:

- promieniowanie (ultrafioletowe, jonizujące oraz elektromagnetyczne),
- substancje chemiczne (głównie związki alkilujące i aryłujące),
- czynniki endogenne (np. reaktywne formy tlenu będące produktami metabolizmu komórkowego) [1].

Promieniowanie jonizujące indukuje oksydacyjne modyfikacje zasad oraz pęknięcia nici DNA. Alkilujące i aryłujące związki chemiczne (w tym policykliczne węglowodory aromatyczne) mogą kowalencyjnie wiązać się z nukleotydami tworząc addukty DNA. Efektem działania wolnych rodników tlenowych są natomiast oksydacyjne przemiany zasad azotowych (8-okso-deoksyguanina). Głównymi uszkodzeniami DNA pojawiającymi się w wyniku działania promieniowania ultrafio-

letowego są uszkodzenia oksydacyjne oraz tzw. fotouszkodzenia, czyli powstawanie dimerów pirymidynowych (dimery tymidynowe i dimery tyminy z cytozyną) oraz fotoproduktów 6-4 (wiązanie między węglem 6 pierścienia pirymidyny w 5' nici DNA a węglem 4 pirymidyny w 3' nici DNA) [2]. Pary sąsiadujących w łańcuchu DNA pirymidyn, połączone wiązaniami kowalencyjnymi, zatrzymują w procesie replikacji włączanie nukleotydów przez polimerazę DNA III do nowo tworzonej nici kwasu nukleinowego, co z kolei powoduje fragmentację DNA i efekt letalny [3]. Niezależnie od źródła, wszystkie uszkodzenia DNA w mniejszym lub większym stopniu zmieniają strukturę chromosomów i zaburzają procesy ich replikacji [1].

Komórki skóry jako pierwsze narażone są na szkodliwe działanie promieniowania świetlnego. Choć jednak skóra chroni wewnętrzne tkanki i narządy przed wpływami środowiska zewnętrznego i jest naturalną zaporą dla szkodliwych czynników chemicznych, toksyn i bakterii, to nie chroni skutecznie

przed promieniowaniem świetlnym.

Promieniowanie słoneczne jest promieniowaniem elektromagnetycznym, które obejmuje promieniowanie podczerwone, światło widzialne i promieniowanie UV. To ostatnie ma najsilniejsze działanie na skórę: lecznicze, stymulujące, ale również uszkadzające tkanki. Promieniowanie ultrafioletowe dzieli się na trzy zakresy [4-5]:

- UVC (100-280 nm) – absorbowane przez warstwę ozonową atmosfery, stosowane (ze względu na silne działanie bakteriobójcze) głównie jako środek do odkażania pomieszczeń,

- UVB (280-315 nm) – powodujące zaczerwienienie skóry i pigmentację pośrednią, jest też przyczyną oparzeń i ma działanie karcynogenne,

- UVA (315-400 nm) – stosowane w solariach ze względu na stymulację pigmentacji bez efektu zaczerwienienia lub poparzenia skóry; wnika głęboko w skórę (aż do tkanki podskórnej), powodując destrukcję kolagenu, różnego rodzaju dermatozy, plamy pigmentacyjne oraz zmiany nowotworowe.

Promieniowanie UVB, absorbowane przez skórę w 90%, powoduje powstawanie cyklobutanowych dimerów pirymidynowych (ponad 50% wszystkich uszkodzeń powodowanych przez UV), fotoproduktów 6-4 (pirymidyno-pirymidynowych – 20-30% uszkodzeń), monoadduktów pirymidynowych (1% uszkodzeń), fotoproduktów purynowych (1% uszkodzeń), a także powoduje powstanie uszkodzeń oksydacyjnych [2]. Uszkodzenia oksydacyjne wywołane UVB polegają na reakcji aktywnych form tlenu z resztami cukrowymi lub zasadami nukleinowymi. W wyniku tego procesu powstają 5-hydroksymetyloracyl (addukt) oraz utlenione formy pirymidyn i puryn (glikol tyminy, 8-oksoguanina jako uszkodzenie o charakterze mutagennym) [7]. Oddziaływania aktywnych form tlenu z resztami cukrowymi mogą powodować powstawanie wiązań między niemi DNA i w efekcie końcowym doprowadzać do ich pęknięcia. Dla komórki jest to letalne.

Znane są dwa podstawowe procesy reparacji uszkodzeń wywołanych przez promieniowanie UV: fotoreaktywacja katalizowana przez fotoliazę oraz naprawa przez wyciąnianie. Fotoliza pod wpływem światła widzialnego z udziałem flawoproteinowych chromoforów ($FADH_2$) przeprowadza rozłączanie fotodimerów na monomery i usuwa pierwotne uszkodzenie DNA. Drugi proces niewymagający światła widzialnego katalizują cztery enzymy tworzące układ reperyjny zwany endonukleazą UV lub endonukleazą UVRABCD [3,6]. Uszkodzenie w postaci dimeru zostaje wycięte wraz z sąsiadującymi nukleotydami, a powstała luka w jednym z łańcuchów DNA jest wypełniana w procesie syntezy odcinka DNA, z udziałem polimerazy. Wolne końce nowo zsyntetyzowanego fragmentu DNA łączone są przy udziale ligazy. Układ reperyjny jest

Ochronne działanie wybranych surowców kosmetycznych na komórki naskórka poddane działaniu promieniowania ultrafioletowego

STRESZCZENIE

Słowa kluczowe: promieniowanie ultrafioletowe, komórki naskórka, apoptoza, folacyna, kinetyna, fitoDHEA

Wprowadzenie: Komórki skóry jako pierwsze narażone są na działanie promieniowania świetlnego, którego dobroczynne działanie polega na pobudzeniu układu odpornościowego, natomiast jego nadmiar prowadzi do stanu zapalnego w skórze i zwiększa apoptozę. Najbardziej szkodliwe działanie przejawia wysoka dawka promieniowania ultrafioletowego, które powoduje destrukcję kolagenu, różnego rodzaju dermatozy, plamy pigmentacyjne i zmiany nowotworowe. Celem pracy było wykazanie, który z testowanych surowców kosmetycznych: folacyna, kinetyna czy fitoDHEA, wykazuje działanie zapobiegające powstawaniu i redukujące apoptozę wywołaną promieniowaniem ultrafioletowym w komórkach naskórka linii KB.

Materiał i metody: Badania prowadzono na izolowanych ludzkich komórkach naskórka linii KB. Ocenę żywotności komórek wykonano testem MTT oraz przy użyciu fioleto krystalicznego. Apoptozę określono techniką ELISA.

Wyniki: Wykazano, że żaden z badanych surowców kosmetycznych nie przejawiał działania cytotoksycznego. Folacyna w stężeniu 0,1% całkowicie chroniła przed indukowaną UVB apoptozą komórek naskórka. FitoDHEA, choć nie wpływał na zmniejszenie poziomu apoptozy w komórkach napromienionych, to umożliwiał tworzenie kolonii komórkowych w stopniu wyższym niż kinetyna. Nie wykazano ochronnego działania kinetyny na komórki naskórka uszkodzone działaniem UVB.

Wnioski: Miejscowe stosowanie folacyny jest bardzo dobrą formą ochrony przed skutkami działania promieniowania ultrafioletowego. W połączeniu z filtrami słonecznymi jest skutecznym środkiem w walce z fotostarzeniem.

Protective effect of selected cosmetic raw materials on UVB irradiated epidermal cells

SUMMARY

Key words: ultraviolet radiation, epidermal cells, apoptosis, folacin, kinetin, fitoDHEA

Introduction: Cells of the epidermis are in the front line for exposure to the actions of visible light radiation, the beneficial effects of which rely on stimulation of the immune system, yet its excess leads to skin inflammation and increases apoptosis. A high dose of ultraviolet radiation exhibits the greatest damaging effects, causing destruction of collagen, various types of dermatosis, pigmentation and skin discoloration as well as neoplastic lesions. The aim of this work was to demonstrate, which of the tested cosmetic raw materials: folacin, kinetin or fitoDHEA reduce and/or protect against the apoptosis of the epidermal cells, line KB, caused by ultraviolet radiation.

Materials and methods: The studies were conducted on isolated human epidermal cells of the KB line. The MTT test as well as crystal violet were applied to assess cell viability. Apoptosis was measured by ELISA assay.

Results: It has been shown herein, that none of the tested cosmetic materials demonstrate cytotoxic activity. Folacin, at a concentration of 0.1%, completely protected against UVB-induced apoptosis of epidermal cells. FitoDHEA, even though it had no influence on the level of apoptosis in the irradiated cells, it's successfully enabled the formation of cell colonies to a greater extent than kinetin. The protective effect of Kinetin upon epidermal cells damaged by the

action of UVB radiation has not been demonstrated.

Conclusions: The local action of folacin constitutes a very good form of protection from the effects of ultraviolet radiation. Combined with sun screens, it is an effective tool in the fight against photoaging.

specyficzny tylko w stosunku do dimerów pirymidynowych i prowadzi do bezbłędnej reparacji, o ile drugi łańcuch DNA, leżący naprzeciw powstającej luki, nie jest uszkodzony i może funkcjonować jako matryca dla polimerazy DNA. W mechanizmie naprawy przez wycięcie zasady (ang. base excision repair, BER) naprawiane są głównie zasady (utlenione lub alkilowane) [7-9], natomiast w mechanizmie naprawy z wycięciem nukleotydu (ang. nucleotide excision repair, NER) usuwane są uszkodzenia w postaci dimerów lub adduktów [8].

Od dawna naukowcy światowych koncernów kosmetycznych poszukują substancji zabezpieczających przed działaniem promieniowania ultrafioletowego oraz substancji wspomagających systemy naprawcze DNA. Znane i stosowane są z powodzeniem w kosmetykach związki pochłaniające lub odbijające promienie UV (filtry chemiczne i fizyczne) oraz substancje neutralizujące aktywne formy tlenu. Te ostatnie to przede wszystkim związki wiążące (wyłapujące) toksyczne rodniki tlenowe (takie antyoksydanty, jak tokoferole, tokotrienole, polifenole) oraz inne surowce kosmetyczne, modulujące aktywność enzymów zaangażowanych w neutralizację wolnych rodników (dysmutazy nadadtlenkowej, katalazy, peroksydazy). Składniki te można nazwać ogólnie związkami o charakterze ochronnym, zabezpieczającym przed powstawaniem uszkodzeń w komórkach.

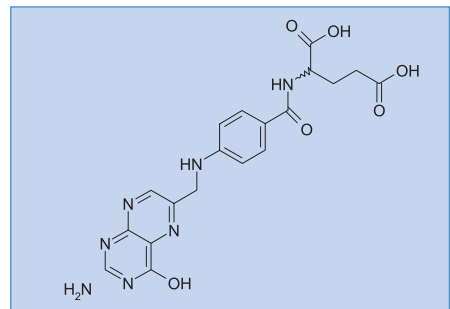
Inną grupę surowców kosmetycznych stanowią substancje, które przyspieszają naprawę już uszkodzonego DNA. Wspomagają tym samym naturalne procesy napraw-

cze lub je wręcz zastępują, gdyż przy dużej ilości uszkodzeń komórki nie nadążają z naprawą materiału genetycznego [10-12]. Część uszkodzeń zostaje naprawiona dopiero w trakcie procesów replikacyjnych.

W prezentowanej pracy oceniono działanie ochronne trzech surowców kosmetycznych: folacyny, kinetyny i fitoDHEA na izolowane ludzkie komórki naskórka linii KB, poddane działaniu promieniowania UVB. Folacyna, odkryta w latach 50. ubiegłego wieku, jest witaminą z grupy B – pochodną pterydyny, kwasu glutaminowego i p-aminobenzoowego (ryc. 1). Jej najbardziej rozpowszechniona nazwa to „kwas foliowy”, którego czynną formę stanowi kwas folinowy, niezbędny do włączania jednowęglowych fragmentów do puryn, pirymidyn i niektórych aminokwasów. Kwas foliowy, podobnie jak większość witamin rozpuszczalnych w wodzie, bierze udział we wszystkich typach odwracalnych reakcji utleniania-redukcji. Uważa się go za koenzym wielu enzymów wymagających do ich uczynienia obecności składników niebiałkowych. Odgrywa istotną rolę w tkankach, w których zachodzą liczne podziały komórkowe. W badaniach *in vitro* stwierdzono stymulację podziałów izolowanych fibroblastów hodowanych w obecności folacyny. Ich kształt był typowo wrzecionowaty, w porównaniu z gwiazdzistym kształtem komórek kontrolnych [13]. Komórki o gwiazdzistym kształcie cechują się ograniczoną zdolnością podziałową, określane są mianem stacjonarnych i przejawiają niską aktywność metaboliczną. Komórki wrzecionowatego kształtu posiadają wysoki indeks

proliferacyjny i są aktywne metabolicznie.

Kinetyna (ryc. 2), znana równie długo jak kwas foliowy, jest roślinnym hormonem wzrostu odpowiedzialnym za regulację podziałów komórkowych (cytokineza), wzrost i różnicowanie komórek, transport asymilatów oraz starzenie się [14].

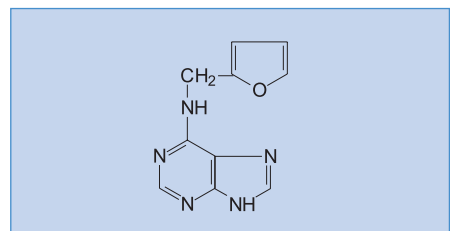


Ryc. 1

$C_{19}H_{19}N_7O_6$

Struktura chemiczna folacyny (kwas foliowy).

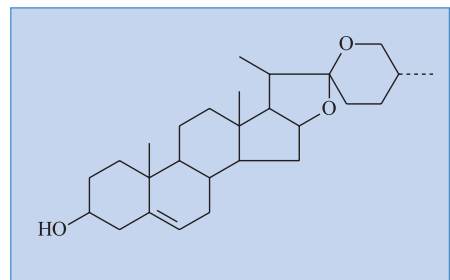
Chemical structure of folacin (folic acid).



Ryc. 2

Struktura chemiczna kinetyny.

Chemical structure of kinetin.



Ryc. 3

Struktura chemiczna diosgeniny (fitoDHEA).

Chemical structure of fitoDHEA.

Jest to izopentenyłowa pochodna adeniny (N⁶-furfuryloadenia), która działa jako wymiatacz wolnych rodników, a u roślin bezpośrednio wpływa na aktywność dysmutazy nadcielenkowej oraz lipooksygenazy [15]. Wykazano, że kinetyna przejawia właściwości chroniące przed oksydacyjnymi uszkodzeniami DNA (8-oksoguanina), poprzez wiązanie żelaza i modyfikację reakcji Fentona [16]. Badania na izolowanych komórkach skóry oraz na owadach wykazały, iż kinetyna ma właściwości przeciwstarzeniowe [17,18].

FitoDHEA to ekstrakt z korzeni Wild Yam (*Discorea villosa*), bogaty w diosgeninę (ryc. 3), steroidowy hormon roślinny wykazujący strukturalne podobieństwo do DHEA [26]. *Discorea villosa* występuje głównie w Meksyku, a stosowanie wyciągu z jej korzenia jako środka zwiększającego zasoby energii i regenerującego ma swoją długą tradycję

w Ameryce Południowej. Diosgenina przejawia właściwości regulacyjne w komórkach, hamując procesy związane ze starzeniem się. Stymuluje podziały komórek skóry właściwej oraz sprzyja zachowaniu przez nie kształtu typowego dla komórek młodych, aktywnych metabolicznie. Działanie diosgeniny warunkuje utrzymanie właściwego nawilżenia, elastyczności i napięcia skóry [19].

Celem pracy było wykazanie, który z testowanych surowców stosowanych w kosmetykach wykazuje właściwości ochronne w komórkach naskórka linii KB, poddanych działaniu promieniowania ultrafioletowego.

Materiał

Materiałem do badań oceniających właściwości surowców kosmetycznych chroniące przed UVB była

szybko proliferująca 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 µg/ml siarczanu streptomycyny) oraz 10% FCS. Komórki linii KB reagują na promieniowanie UVB i czynniki chroniące przed uszkodzeniami przez nie wywołanymi podobnie jak komórki nienowotworowe (HNC, human normal keratinocytes) [21].

Metody

■ Ocena żywotności komórek

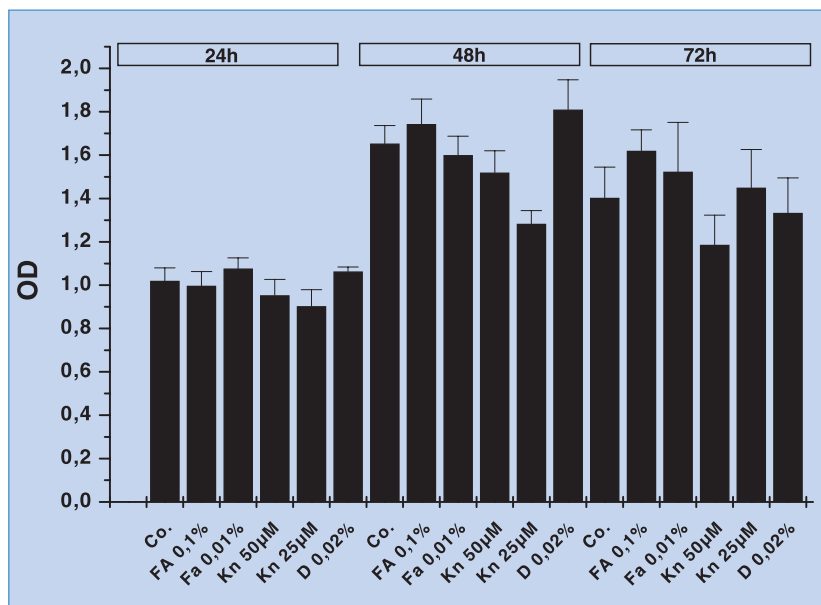
Żywotność komórek poddanych działaniu testowanych surowców określano przy zastosowaniu standardowego testu proliferacyjnego MTT (Sigma) [20].

■ Warunki naświetlania

Komórki naświetlano lampą emitującą światło UVB (TL12, Philips) o długości fali 290-320 nm, ze szczytem emisji przy 313 nm. Przed naświetlaniem komórki inkubowano przez 2 godz. w podłożu RPMI (pozbawionym FCS), po czym dodawano surowce kosmetyczne w stężeniach:

- 1) folacyna (Coletica) – 0,01% oraz 0,1%,
- 2) kinetyna (Pharma Waldhof GmbH) – 12,5 µM, 25 µM, 50 µM,
- 3) fitoDHEA – ekstrakt z Wild Yam bogaty w diosgeninę (Croda) – 0,002% i 0,02%.

Po pięciu godzinach preinkubacji z ww. składnikami komórki naświetlano w PBS promieniowaniem UVB (25 mJ/cm²), a następnie hodowlę kontynuowano przez 16 godzin w podłożu RPMI zawierającym 5% FCS oraz testowane substancje. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niepoddane działaniu promieniowania (bez surowców kosmetycznych), natomiast kontrolę pozy-



Ryc. 4

Ocena żywotności ludzkich keratynocytów linii KB (test MTT) poddanych działaniu folacyny, kinetyny i fitoDHEA przez 24, 48 i 72 godziny. (Co – kontola, Kn – kinetyna, FA – folacyna, D – fitoDHEA)

The evaluation of human keratinocytes' viability (line KB – MTT test) exposed to the action of folacin, kinetin and fitoDHEA during 24, 48 and 72 hours.

(Co – control, Kn – kinetin, FA – folacin, D – fitoDHEA)

tywną – komórki naświetlone UVB (bez surowców kosmetycznych).

■ **Oznaczanie apoptozy**

Apoptozę komórek oznaczano po 16 godzinach od naświetlenia, stosując zestaw ELISA (Cell Death Detection ELISA^{PLUS}, Boehringer Mannheim). Oznaczeniu podlegał stopień fragmentacji DNA, tzn. ilość uwalnianych do cytoplazmy monoi oligonukleosomów, oznaczanych przeciwciałami specyficznymi do białek histonowych [21].

■ **Barwienie komórek fioletem krystalicznym**

Komórki naświetlone UVB poddawano działaniu trypsyny (200 mM, GIBCO), a następnie wysiewano w różnych stężeniach na szalki hodowlane. Każdego dnia prowadzono obserwację makroskopową założonych hodowli. W momencie zaobserwowania powstania kolonii komórki barwiono fioletem krystalicznym [21].

Wyniki

■ **Ocena cytotoksyczności surowców kosmetycznych**

Pomiary żywotności komórek naskórka przeprowadzono po dobie, dwóch i trzech (ryc. 4) oraz po pięciu, siedmiu i czternastu dniach hodowli w obecności folacyny, kinetyny i fitoDHEA.

Stwierdzono, że testowane surowce kosmetyczne (w stężeniach podanych na ryc. 4) nie wykazywały właściwości cytotoksycznych. Liczba żywych, aktywnych metabolicznie komórek była podobna w kontroli (nietraktowanej żadnym surowcem) oraz w próbkach poddanych działaniu czynników kosmetycznych. Nieznacznie stymulujący wpływ na komórki naskórka wywierała folacyna (po dobie w stężeniu 0,01%, po dwóch dobach w stężeniu 0,1%, po trzech dobach – w obu testowanych

stężeniach) i fitoDHEA (efekt po dwóch dobach). Czternastodniowa hodowla w obecności wysokiego stężenia kinetyny (50 μM) oraz fitoDHEA (0,02%) spowodowała nieznaczny spadek żywotności komórek (dane nieprezentowane).

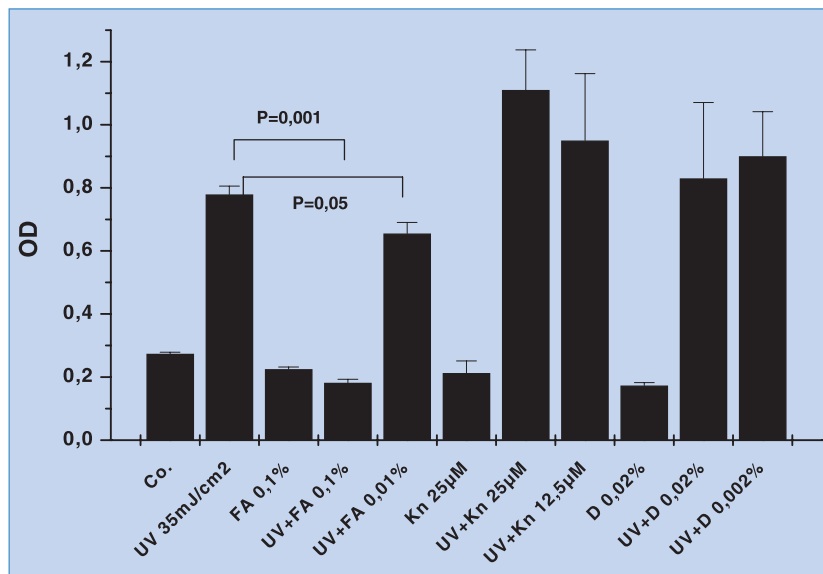
■ **Efekt działania folacyny, kinetyny i fitoDHEA na komórki uszkodzone w wyniku promieniowania UVB**

Napromieniowanie komórek naskórka UVB dawką 25 mJ/cm² spowodowało wzrost ilości białek histonowych na terenie cytoplazmy. Wynik ten wskazuje na zaindukowaną UV apoptozę. Poziom badanych uszkodzeń w komórkach nienaświetlanych oraz w komórkach niepoddanych działaniu UVB i hodowanych w obecności testowanych surowców był znikomy, wynikający prawdopodobnie z naturalnych procesów metabolicznych zachodzących w każdej żywej komórce (ryc.

5). Tym samym wykazano, że folacyna, kinetyna oraz fitoDHEA nie wpływały na indukcję apoptozy w nienaświetlonych komórkach naskórka.

Zbadano, która z ocenianych substancji kosmetycznych wykazuje właściwości chroniące przed uszkodzeniami wywołanymi działaniem promieniowania ultrafioletowego. Stwierdzono, że destrukcyjne działanie UVB zostało wyraźnie zmniejszone w komórkach hodowanych w obecności 0,01% folacyny (ryc. 5), a związek ten w stężeniu 0,1% całkowicie chronił przed indukowaną UVB apoptozą. Uzyskane wyniki były istotne statystycznie.

Ani kinetyna, ani fitoDHEA nie zapobiegały powstawaniu apoptozy w komórkach poddanych działaniu UVB. Ilość uszkodzeń wywołanych promieniowaniem była podobna w komórkach kontrolnych i traktowanych fitoDHEA (ryc. 5). Po naświetleniu komórek promieniowa-



Ryc. 5

Ocena apoptozy ludzkich keratynocytów linii KB poddanych działaniu promieniowania UVB (25 mJ/cm²) oraz folacyny, kinetyny i fitoDHEA.

(Co – kontrola, Kn – kinetyna, FA – folacyna, D – fitoDHEA)

Death assay of KB cells after UVB radiation (25 mJ/cm²) and incubation with folacin, kinetin and fitoDHEA.

(Co – control, Kn – kinetin, FA – folacin, D – fitoDHEA)

niem ultrafioletowym obecność kinetyny w podłożu hodowlanym przyczyniła się do dalszego zwiększenia poziomu apoptozy (wartość absorbancji dla 25 μ M stężenia kinetyny statystycznie większa w stosunku do kontroli po UV).

■ **Zdolność komórek do tworzenia kolonii**

W celu zbadania zdolności uszkodzonych przez UVB komórek naskórka do tworzenia kolonii przeprowadzono test ich barwienia przy użyciu fioletu krystalicznego. Komórki niepoddane działaniu promieniowania, zarówno kontrolne, jak i te traktowane folacyną, kinetyną

lub fitoDHEA, tworzyły wyraźnie widoczne kolonie (obserwacje makroskopowe). Fiolet krystaliczny barwi wyłącznie żywe, aktywne metabolicznie komórki, a intensywność zabarwienia jest proporcjonalna do liczby komórek. Po naświetleniu UVB intensywność zabarwienia i – co za tym idzie – liczba komórek uległy wyraźnemu zmniejszeniu (ryc. 6). Po 16 dniach od zadziałania promieniami UV komórki zachowały zdolność do tworzenia kolonii jedynie w obecności folacyny i, w mniejszym stopniu, w obecności fitoDHEA. Nie wykazano pozytywnego wpływu kinetyny na efektywność tworzenia skupisk komórek uszkodzonych przez UVB.

Dyskusja

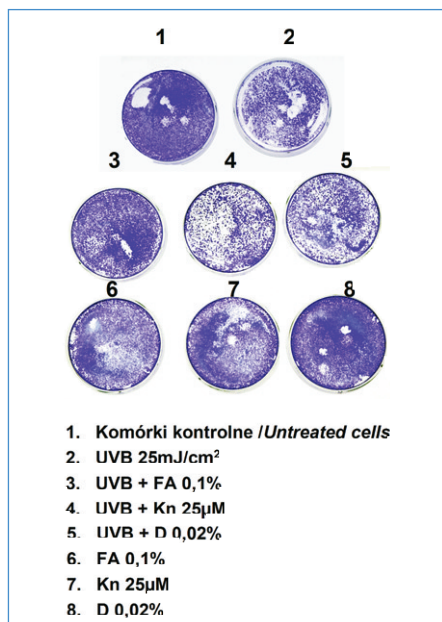
Światło słoneczne oddziałuje w wieloraki sposób na organizm ludzki. Jest niezbędne w regulacji zegara biologicznego, pobudza odporność w trakcie opalania się, leczy na zasadzie fototerapii. Zagrożenia wynikają z podwyższonego natężenia promieniowania prowadząc do katarakty, nowotworów skóry, przebarwień, oparzeń słonecznych, fotouczuleń. Promieniowanie słoneczne działa korzystnie, gdy mutacje indukowane promieniowaniem ultrafioletowym prowadzą do adaptacji, a szkodliwie, gdy mutacje te powodują choroby i różnego rodzaju formy raka [22].

Zażywanie kąpiele słonecznych jest dobroczynne i wskazane ze względu na pobudzenie układu odpornościowego, natomiast ich nadmiar prowadzi do stanu zapalnego w skórze oraz zwiększa apoptozę. W jej mechanizmie uszkodzone komórki są usuwane z ustroju na drodze fagocytozy, czemu nie towarzyszy stan zapalny. Jest to proces czynny, często związany z aktywacją genów i określany mianem aktywnej śmierci komórki [23]. Apoptoza jest zjawiskiem powszechnym w świecie roślin i zwierząt (np. pełni szczególną rolę w kształtowaniu układu nerwowego ssaków), jest obecna w rozwoju generatywnym roślin. Ponieważ taka śmierć komórki nie powoduje stanu zapalnego u zwierząt i ludzi (w procesie nie są zaangażowane makrofagi), istnieje możliwość usuwania poprzez apoptozę komórek zainfekowanych wirusem i komórek nowotworowych. Dlatego też przedmiotem badań nad apoptozą stały się przede wszystkim choroby nowotworowe, w przebiegu których często dochodzi do zaprogramowanej śmierci komórek. Prawie wszystkie komórki organizmu wykazują zdolność do wejścia w proces programowanej śmierci, różnica polega na podatności i szybkości uruchomienia tego procesu [23].

W trakcie wspomnianych kąpiele słonecznych, przy silnym napromienianiu, w komórkach skóry powstaje tak wiele uszkodzeń, że szybki i sprawny dotąd mechanizm naprawy zaczyna popełniać błędy. W takiej sytuacji nieprawidłowo funkcjonująca komórka musi ulec zniszczeniu. Po otrzymaniu sygnału dąży do samozagłady. Wczesne etapy apoptozy komórek można jednak zatrzymać; komórki produkują szereg białek umożliwiających samounicestwienie – ich analiza pozwala na ocenę zaawansowania apoptozy i możliwości jej redukcji.

W prezentowanej pracy wykazano, że folacyna zapobiega apoptozie komórek naskórka linii KB, indukowanej promieniowaniem UVB (ryc. 5). Zdolna jest więc do zminimalizowania destrukcyjnych zmian wywołanych przez promieniowanie UVB w komórkach, do których fizjologicznie dociera największa dawka UV. Można przypuszczać, że folacyna zarówno chroni przed apoptozą wywołaną UVB, jak i potrafi ją redukować.

Poziom apoptozy komórek okre-



Ryc. 6
Ocena tworzenia kolonii ludzkich keratynocytów linii KB poddanych działaniu promieniowania UVB (25 mJ/cm²) oraz folacyny, kinetyny i fitoDHEA przez 16 dni. Barwienie fioletem krystalicznym. (Kn – kinetyna, FA – folacyna, D – fitoDHEA)
Colony assay of KB cells after UVB radiation and exposure to folacin, kinetin and fitoDHEA for 16 days. Stained with crystal violet. (Kn – kinetin, FA – folacin, D – fitoDHEA)

ślano po 16 godzinach od naświetlenia. W tym czasie komórki hodowano w podłożu zawierającym kwas foliowy, co sugeruje możliwość przyspieszonej reparacji uszkodzeń [27,28].

FitoDHEA, chociaż nie ochraniał przed apoptozą w komórkach napromienionych (ryc. 5), to umożliwiał tworzenie kolonii komórkowych w stopniu wyższym niż kinetyna (ryc. 6). Zaskoczenie budzi fakt, że kinetyna, powszechnie uznawana za związek o właściwościach antyoksydacyjnych (a więc również anti-UV), nie wykazywała właściwości ochronnych w komórkach poddanych działaniu UVB i nie wpływała na wzrost zdolności do tworzenia kolonii.

Nie znamy dotąd w pełni mechanizmu działania kwasu foliowego na komórki uszkodzone promieniowaniem UV. Uważa się, że jest to związane z wpływem kwasu foliowego na syntezę i metylację DNA. Przemiana monofosforanu deoksyurydyny (dUMP) do monofosforanu tymidyny (TMP) przebiega przy udziale kwasu foliowego (5,10-metylenotetrahydrofolanu) jako donora grup metylowych. Zaburzenie puli dezoksyrybonukleotydów, wynikające z niedoboru kwasu foliowe-

go, może niekorzystnie wpływać na syntezę DNA, prowadząc do jej spowolnienia lub występowania błędów. W warunkach niedoboru kwasu foliowego zahamowanie metylacji dUMP do TMP prowadzi do wzrostu komórkowego poziomu trójfosforanu deoksyurydyny i błędnego włączania uracylu w cząsteczkę DNA (zamiast tyminy). Enzymy naprawcze DNA usuwają taki błędnie wstawiony uracyl, jednak w warunkach niedoboru kwasu foliowego, kiedy konwersja dUMP do tymidyny jest zablokowana, na miejsce usuniętej cząsteczki uracylu stawiana jest następną cząsteczką tego związku. To pociąga za sobą nadmierne zużycie energii na kolejną naprawę DNA oraz może prowadzić do powstawania bardziej istotnych uszkodzeń, a mianowicie uszkodzeń podwójnoniciowych, które mogą z kolei prowadzić do pęknięć chromosomów, niestabilności genetycznej i nowotworów [24,25].

Kwas foliowy uczestniczy w syntezie S-adenozylometioniny – podstawowego „dawcy” grup metylowych w procesie metylacji nici DNA. Zmniejszenie poziomu tego związku prowadzi do hypometylacji kwasu dezoksyrybonukleinowego i niepożądanego aktywacji proto-on-

kogenów [24]. Zatem obecność kwasu foliowego w komórkach zabezpiecza je przed występowaniem błędów w trakcie syntezy DNA i najprawdopodobniej przyspiesza naprawę istniejących uszkodzeń.

U osób dorosłych niedobór kwasu foliowego w diecie związany jest z podwyższeniem ryzyka wystąpienia niektórych nowotworów, w tym raka piersi i raka jelita grubego oraz raka płuc u osób, które rzuciły palenie [25,29]. Suplementacja diety kwasem foliowym jest zatem uznawana za jeden ze sposobów zmniejszenia ryzyka wystąpienia nowotworów.

Wnioski

Wyniki przedstawionych badań wskazują, że folacyna jest doskonałą formą zewnętrznej suplementacji skóry, zapobiegającej szkodliwemu działaniu promieniowania świetlnego. Należy stale pamiętać o tym, że stosowanie zabezpieczeń w postaci filtrów słonecznych i związków w pośredni lub bezpośredni sposób niwelujących negatywne działanie promieniowania UV na skórę ludzką jest kluczowym elementem walki z fotostarzeniem.

PIŚMIENNICTWO

1. Widlak P.: Struktura chromatyny a powstawanie i naprawa uszkodzeń DNA. *Kosmos*, 2002, 1(254): 5-12.
2. Wójtowski D., Podhajska A.J., Łukasiak J.: Efekty oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego – rola kosmetyków. Część I. *Polish Journal of Cosmetology*, 1999, 1: 10-33.
3. Węgleński P. (red.): *Genetyka molekularna*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1996: 248-278.
4. Rubaj-Dudek E.: Kosmetologiczne aspekty promieniowania ultrafioletowego. *Biuletyn Kosmetologiczny*, 1998, 1: 12-17.
5. Rubaj-Dudek E.: Kosmetologiczne aspekty ochrony skóry przed promieniowaniem ultrafioletowym. *Lek w Polsce*, 2001, 11(7): 69-83.
6. Watson J.D., Hopkins N.H., Roberts J.W., Steitz J.A., Weiner A.M.: *Molecular biology of the gene*. Wyd. IV. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., 1987: 339-357.
7. Gros L., Saparbaev M.K., laval J.: Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage. *Oncogene*, 2002, 21: 8905-8925.
8. Boer J., Hoeijmakers J.H.J.: Nucleotide excision and human syndromes. *Carcinogenesis*. 2000. 21(3): 453-460.
9. Krokan H.E., Nilsen H., Skorpen F., Otterlei M., Slupphaug

- G.: Base excision repair of DNA in mammalian cells. FEBS Letters, 2000, 476: 73-77.
10. Offredo H.: Four Enzymes to repair DNA after UV, oxidation or pollution damage. Cosmetic Ingredients and Biotechnology Conference 2004, Saint-Malo, France: 67-77.
 11. Dębowska R., Rogiewicz K.: Kosmetyczna naprawa DNA. TAN*Biz Słońce i Uroda, 2004, 4: 40-42.
 12. Wolf P., Cox P., Yarosh D.B., Kripke M.L.: Sunscreens and T4N5 liposomes differ in their ability to protect against ultraviolet-induced sunburn cell formation, alterations of dendritic epidermal cells and local suppression of contact hypersensitivity. J Invest Dermatol, 1995, 104(2): 287-292.
 13. 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.
 14. Kopcewicz J.S., Lewak S. (red.): Podstawy Fizjologii Roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1998: 478-486.
 15. Barciszewski J., Rattan I.S., Siboska G., Clark B.F.C.: Kinetin – 45 years on. Plant Science, 1999, 148: 37-45.
 16. Wyszko E., Barciszewska M.Z., Markiewicz M., Szymański M., Markiewicz W.T., Clark B.F.C., Marciszewski J.: Action-at-a-distance of a new DNA oxidative damage product 6-furfuryl-adenine (kinetin) on template properties of modified DNA. Biochem Biophys Acta, 2003, 1625: 239-245.
 17. Rattan S.I.S., Clark B.F.C.: Kinetin delays the onset of ageing characteristics in human fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 201(2): 665-672.
 18. Sharma S.P., Kaur P., Rattan S.I.S.: Plant growth hormone kinetin delays ageing, prolongs the lifespan and slows down development of the fruitfly *Zaprionus parvittiger*. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 216(3): 1067-1071.
 19. Szubert M., Dębowska R., Vincent C., Rogiewicz K.: Fito-DHEA eliksir młodości. Les Nouvelles Esthetiques, 2004, 3: 26-27.
 20. Denizot F., Lang R.: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods, 1986, 89(2): 271-277.
 21. Schwarz A., Stander S., Berneburg M., Bohm 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.
 22. Zarębska Z.: Promieniowanie słoneczne – dobroczynne działanie i zagrożenia. Kosmos, 2000, 49(1-2): 27-39.
 23. Sulejczyk D.: Apoptoza i metody jej identyfikacji. Postępy Biologii Komórki, 2000, 27(4): 527-568.
 24. Kim Y.I., Pogribny I.P., Basnakian A.G.: Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation within the p53 tumor suppressor gene. Am J Clin Nutr, 1997, 65(1): 46-52.
 25. Blount B.C., Mack M.M., Wehr C.M.: Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. Proc Natl Acad Sci, 1997, 94: 3290-3295.
 26. Kohlmunzer S.: Farmakognozja. Podręcznik dla studentów farmacji. Wyd. IV. 1993, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa: 261.
 27. Dębowska R., Eris I., Iwanańko 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.
 28. Dębowska R., Rogiewicz K., Vincent C., Iwanańko T., Kruszewski M., Eris I.: Folic acid (folacin) – new application of cosmetic ingredient. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2004, sup. 2: 228.
 29. Butterorth C.E., Bendich A.: Micronutrients in Health and Disease. Dekker, New York, 1993: 165-185.

Adres do korespondencji:

Renata Dębowska
 Centrum Badawcze Dr Irena Eris
 ul. Puławska 107 a, 02-595 Warszawa
 tel.: (22) 844 38 86