

*Debreceni Orvostudományi Egyetem, Bőr- és Nemikórtani Klinika
(igazgató: Hunyadi János dr., egyetemi tanár),
Gyermecklinika (igazgató: Oláh Éva dr., egyetemi tanár) és I. sz. Belgyógyászati Klinika
(igazgató: Kakuk György dr., egyetemi tanár) közleménye*

Humán endothel sejtek és keratinocyták oxidatív károsító hatásokkal szemben mutatott érzékenységének vizsgálata és összehasonlítása

Investigation and comparison of the sensitivity of human endothelial cells and keratinocytes to oxidative stresses

SZEGEDI ANDREA DR., JENEY VIKTÓRIA, DOBOLYI ALICE, BALLA JÓZSEF DR.,
HUNYADI JÁNOS DR. ÉS BALLA GYÖRGY DR.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az ultraibolya (UV) sugarak közül mind az UVB, de különösen az UVA tartomány képes a sejtekben toxikus oxigén gyökök képzésére. A reaktív oxigén gyökök nagy mennyiségű felszaporodása a sejt pusztulását eredményezi lipidperoxidáció, strukturális és enzim fehérjék, valamint nukleinsavak károsodása révén. Jelen közleményünkben a szerzők célja egy transzformált humán keratinocytá sejt vonal (HaCaT) és humán umbilikális vénából nyert endothel sejtek különböző oxidatív károsító hatásokkal szemben mutatott érzékenységének összehasonlítása volt. Tanulmányozták a vas mediálta oxidatív károsodás mértékét is a sejtekben. Vizsgálták a sejtpusztulás fokát hidrogénperoxid (H_2O_2) kezelés, H_2O_2 és hem kezelés, valamint UVB és UVA besugárzás után. Összefoglalva megállapítható, hogy a H_2O_2 és az UVA-Protoporphyrin IX kezelés eseteiben az endothel sejtek érzékenysége fokozott a HaCaT sejtekhez viszonyítva. Ugyanakkor a két sejt típus nem mutatott jelentős különbséget az UVB által előidézett citotoxicitás tekintetében, vagyis a direkt DNS károsodás által előidézett sejthalál azonos mértékű volt.

Kulcsszavak:

**Endothel sejtek - HaCaT sejtek -
oxigén szabadgyökök - ultraibolya sugárzás -
hem**

SUMMARY

Solar UVB and particularly UVA radiations have a capacity to generate reactive chemical species, including free radicals in cells. When generated in excess, these reactive oxygen species can damage cells by peroxidizing lipids and disrupting structural proteins, enzymes and nucleic acids. In the present study the aim of the authors was to compare the sensitivity of a transformed human keratinocyte cell line, HaCaT cells and human endothelial cells derived from umbilical vein, to various oxidative stresses with special emphases on the iron driven oxidative stress. They measured the cytotoxicity after H_2O_2 and H_2O_2 -heme treatment and also investigated the effect of the UVB and UVA radiation. In conclusion their results demonstrate that compared to HaCaT cells, endothelial cells are more sensitive to H_2O_2 or UVA-Protoporphyrin IX treatment. On the other hand they did not find significant difference between the two cell types in the UVB caused lethality, which primarily injures cells by causing direct DNA damage.

Key words:

**Endothelial cells - HaCaT cells -
free oxygen radicals - ultraviolet radiation -
heme**

A nem ionizáló elektromágneses sugárzások közé tartozó ultraibolya (UV) sugarak közül mind az UVB, de különösen az UVA tartomány képes a sejtekben elhelyezkedő, a sugárzást abszorbeáló kromofór molekulákkal reakcióba lépve toxikus oxigén gyökök képzésére (14). A reaktív oxigén gyökök nagy mennyiségű felszaporodása a sejt pusztulását eredményezi lipidperoxidáció, strukturális és enzim fehérjék, valamint nukleinsavak károsodása révén (6, 16). Ezen változatos biológiai hatások következménye in vitro sejt kultúrában az adott sejt (pl. keratinocyták) ha-

lála, míg in vivo a bőrön kialakuló erythema. Nem csupán az epidermis sejtjei vannak azonban kitéve az UV sugárzásnak, hiszen az UVA sugarak közel 30%-a, és az UVB sugarak 1–10%-a áthatolva a hámon eléri a dermis rétegét és hatást gyakorol az ott elhelyezkedő struktúrákra, többek között a vaszkuláris endothel sejtekre is (5, 8). Ugyanakkor mind az endothel sejtekben, mind a keratinocytákban képződnek szabad oxigén gyökök az UV sugárzáson kívül egyéb más káros hatást követően is, mint pl. a gyulladásos folyamatok vagy ischaemia (10).

Jelen közleményünkben azon kísérleteink eredményeiről számolunk be, melyek célja egy transzformált humán keratinocita sejtvonal (HaCaT) és humán endothel sejtek különböző oxidatív károsító hatásokkal szemben mutatott érzékenységének összehasonlítása volt. Vizsgálataink során e sejtekben tanulmányoztuk a vas mediálta oxidatív károsodás mértékét is. A szervezet biztonságos vasraktáraiból felszabaduló vas igen veszélyes a sejtekre, szövetekre nézve, mivel a vas és komplexei a szabad oxigén gyökök toxicitását jelentősen fokozzák, többek között azért, hogy részt vesznek a Fenton reakcióban, melynek során a hidrogénperoxidból erősen reaktív hidroxil gyök keletkezik (1, 4). Testünk vastartalmának több mint 70%-a hem-proteinekben található, melyekből felszabadulva a hidrofób természetű hem a sejtmembrán lipid rétegébe hatolva fokozni tudja az oxidatív pusztulás mértékét (2). Ezek alapján vizsgáltuk a két sejtvonalon a hem szerepét is a különböző oxidatív stressz folyamatok által előidézett sejtpusztulásban.

Anyag és módszer

1. *Sejtek:* A HaCaT sejteket módosított DMEM (Sigma) tápfolyadékban tenyésztettük, melyet adalékkal is kiegészítettünk [10% borjúsavó (GIBCO), 4 mM L-glutamin (Sigma), 1% antibiotikum-antimikotikum (Sigma)].

Az endothel sejteket humán umbilikális vénából nyertük a már ismertetett módon (3) és médium 199-ben (Sigma) tenyésztettük 75 cm²-es flasksban (Sigma). Kísérleteinkben mindkét sejtípusból egy sejtrétegű tenyészetet használtunk fel.

2. *Citotoxicitás vizsgálata:* A sejthalál vizsgálatára az MTT-tetrazolium kolirimetriás módszert használtuk fel, mely az élő sejtek azon képességén alapul, hogy redukálják a sárga színű MTT vegyületet kék színű formazánná, s ezt 570 nm-en spektrofotométerrel mértük. A sejthalál folyamatát Zeiss inverz mikroszkóppal is követtük.

3. *H₂O₂ citotoxicitás:* Mosást (két alkalommal, HBSS puffer, pH: 7,4) követően a H₂O₂ (Sigma) különböző koncentrációival inkubáltuk a sejteket 2 órán át termosztátban, majd elvégeztük az MTT reakciót.

4. *Hem és H₂O₂ citotoxicitás:* Két mosást követően 5 µM hemmel (Sigma) 1 órán át termosztátban történt előkezelés, majd egy mosás után a sejteket a fentebb említett módon H₂O₂-vel kezeltük.

5. *Protoporphyrin IX (PPIX) és H₂O₂ citotoxicitás:* Két mosás után 5 µM PPIX-el (Sigma) termosztátban 1 órán át inkubáltuk a sejteket, majd egyszer mostuk és H₂O₂-vel kezeltük. Valamennyi lépést sötétszobában végeztük.

6. *Ultraibolya besugárzás:* Az UVB besugárzáshoz Saalman Multitestert, az UVA besugárzáshoz Waldmann PUVA 800 készüléket használtunk. Besugárzás előtt a színes tápoldatot eltávolítottuk a sejtekről és mosás után 500 µl HBSS puffert adtunk a besugárzás idejére hozzájuk. Az UVA besugárzás ideje alatt a keletkező hő hatásának kiküszöbölése érdekében a sejteket vízfürdő felszínére állítottuk.

A kísérleteket minden esetben legalább három alkalommal megismételtük, az eredményeket egy-egy reprezentatív csoport duplikátumokban mért adatainak felhasználásával mutatjuk be.

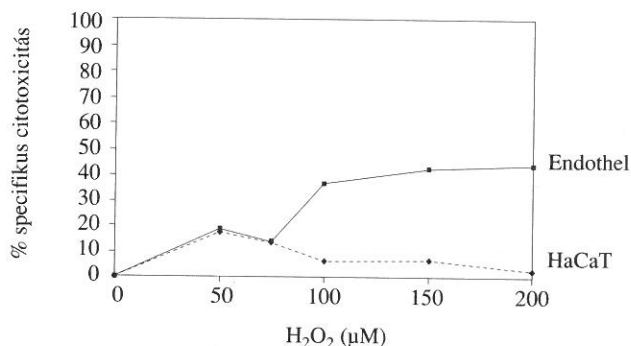
Eredmények

Az endothel és a HaCaT sejtek oxidatív károsodással szemben mutatott érzékenységét vizsgálva megállapítható, hogy a H₂O₂ okozta citotoxicitás mértéke jelentősen nagyobb volt az endothel sejtek esetében, mint a HaCaT sejtek esetében (1. ábra). 200 µM koncentráció mellett az endothel sejtek 42%-a, míg a HaCaT sejtek csupán 2%-a

pusztult el. Balla és munkatársai korábbi vizsgálataik során kimutatták, hogy sertés aorta endothel sejtek dóziszfüggő módon képesek a hemet felvenni környezetükből és az a sejtmembránban akkumulálódik (1). A hem nem mutat direkt toxicitást a sejtekre, azonban jelentősen fokozza a sejtek érzékenységét a H₂O₂ mediálta citotoxicitásra. Kísérleteinkben hasonló eredményeket kaptunk, miszerint a hem előkezelés mindkét sejtípusnál nagymértékben fokozta a H₂O₂ mediált citotoxicitást, de az endothel sejtek ezen kísérleti körülmények mellett is érzékenyebbek voltak, mint a HaCaT sejtek. 5 µM hemmel történt inkubálás után a 200 µM H₂O₂ az endothel sejteknél 85%-ban, a HaCaT sejteknél pedig 40%-ban okozott pusztulást (2. ábra).

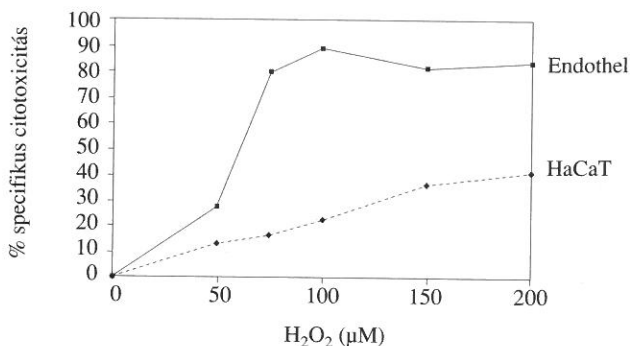
A következő kísérletben arra kerestünk választ, hogy hem előkezelés esetén a hemből található vas szerepe kritikus-e a H₂O₂ toxicitás szempontjából. A sejteket hem előkezelés helyett 5 µM PPIX-el inkubáltuk, mivel tudott, hogy a hem és a PPIX szerkezete csupán egy vas ionban különbözik. A 3. ábra mutatja, hogy a vasmentes PPIX-el végzett előkezelés a hem előkezeléssel szemben alig fokozta a H₂O₂ citotoxicitását, tehát megállapítható, hogy mindkét sejtípusnál a vas jelentős szereppel bír az oxidatív károsító hatásokkal szembeni érzékenység fokozásában.

Az UVB sugárzás által okozott sejthalál mértéke nem mutatott jelentős különbséget a két sejtípus között. Az általunk alkalmazott dózistartományokban megfigyelhető, hogy a hem előkezelés sem fokozta az UVB citotoxicitá-



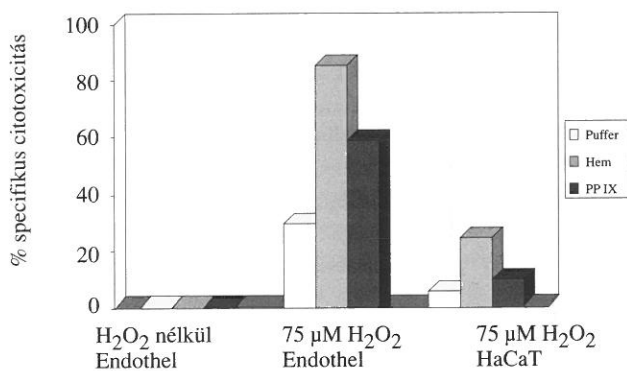
1. ábra

H₂O₂ mediált citotoxicitás endothel és HaCaT sejtekben



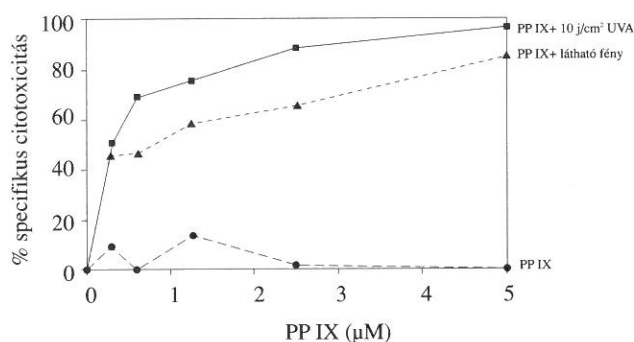
2. ábra

H₂O₂ mediált citotoxicitás hem kezelést követően



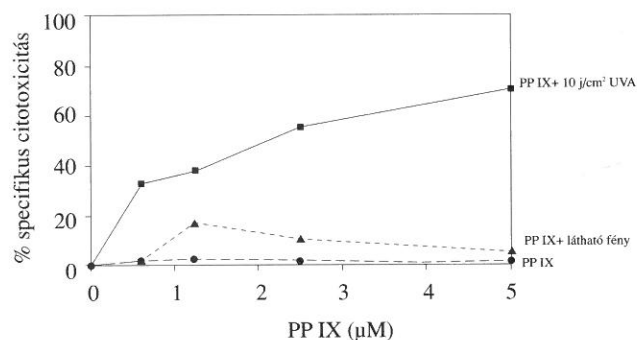
3. ábra

H₂O₂ meditált citotoxicitás hem, illetve protoporphyrin IX kezelést követően



4. ábra

Protoporphyrin IX., protoporphyrin IX+10 J/cm² UVA és protoporphyrin IX- látható fény által előidézett citotoxicitás endothel sejtekben



5. ábra

Protoporphyrin IX., protoporphyrin IX+10 J/cm² UVA és protoporphyrin IX- látható fény által előidézett citotoxicitás HaCaT sejtekben

sát. Így feltételezhető, hogy a vas mediálta oxidatív károsodás nem játszik lényeges szerepet az UVB mediálta sejthalál folyamatában.

Ugyanakkor azt tapasztaltuk, hogy az UVA tartomány önmagában nem okozott sejtpusztulást sem az endothel, sem a HaCaT sejtekben. Ennek feltehetően az alkalmazott UVA dózisok alacsony mértéke volt az oka. Emelve az UVA dózist ez olyan hő károsító hatást eredményezett a sejtekben, melyet nem tudunk kompenzálni vízfürdő

használatával sem. A PPIX az egyik legfontosabb endogén kromofór molekula, mely elsősorban az UVA tartományt abszorbeálja az ultraibolya sugarak közül és ez aktív gyökök képződését eredményezi. A 4. és 5. ábra jól demonstrálja, hogy PPIX előkezelés után az UVA sugárzás mindkét sejttípusnál jelentős pusztulást okozott, de az endothel sejtek érzékenyebbek bizonyultak ezen károsító hatásra is. Az endothel sejtek fokozott érzékenységét jól demonstrálja az is, hogy a PPIX inkubálás után a nappali fényben lévő UVA dózis is (30 perc laboratóriumi fényviszonyok mellett, míg a kísérlet többi lépését sötétszobában végeztük) citotoxicitáshoz vezetett. A HaCaT sejtek nappali fény mellett alig mutattak sejtpusztulást.

Megbeszélés

Az utóbbi évek photodermatológiai kutatásainak eredményei szerint az ultraibolya sugárzás UVB (290–320 nm) és UVA (320–380 nm) tartománya által előidézett sejthalál mechanizmusa, a számos hasonlóság ellenére, jelentős különbségeket mutat mind a sejtszintű, mind a molekuláris változásokat tekintve (11, 15). Az UVB elsősorban direkt DNS károsodást hoz létre pyrimidin dimérek indukálásával, bár magas UVB dózisok mellett oxigén szabad gyökök képződését is leírták (9). Ugyanakkor az UVA a nem DNS típusú kromofórokban abszorbeálódik nagyrészt és ez reaktív oxigén gyökök képződéséhez vezet, mint például a szinglet oxigén (¹O₂), a szuperoxid anion (O₂⁻) és a hidroxil gyök (OH) (7, 12, 13). A szabad gyökök jelenléte lipidperoxidációt idéz elő, melynek membránkárosodás és következményes fehérje, enzim és DNS károsodás lesz az eredménye, egy-szálú DNS törések és fehérje-DNS keresztkötések kialakulása révén. Wang és munkatársai legutóbbi közleményükben az UVA és UVB által előidézett apoptózis molekuláris mechanizmusában is alapvető különbséget mutattak ki (15). Humán epitheliális sejtvonalon (MCF-7) UVA hatására az apoptózis gátló *bcl-2* gén expressziójának jelentős csökkentését észlelték, míg UVB hatására a tumorsuppresszor *p53* gén expressziójának fokozódását figyelték meg.

Jelen közleményünkben ismertetett vizsgálataink szerint a két sejttípus, egy transzformált humán keratinocita sejtvonal és a humán endothel sejtek nem mutattak jelentős különbséget az UVB által előidézett citotoxicitás tekintetében, vagyis a direkt DNS károsodás által előidézett sejthalál azonos mértékű volt mindkét sejtből. Ezzel szemben a toxikus oxigén gyökök mediálta sejtpusztulás foka különbözött, hiszen az UVA + PPIX kezelés szempontjából az endothel sejtek érzékenysége szignifikánsan nagyobb volt. A mitokondriumban elhelyezkedő PPIX az egyik legfontosabb endogén kromofór molekula, mely UVA abszorpciót követően egy magasabb energiájú állapotba kerülve szinglet oxigén keletkezését idézi elő a sejtekben (13). Az endothel sejtek a HaCaT sejtekkel összehasonlítva jóval érzékenyebbek bizonyultak a szinglet oxigén által előidézett károsodásra. Ugyancsak fokozott endothel érzékenységet tapasztaltunk egy másik oxidatív

károsodást előidéző molekula, a H_2O_2 jelenlétében. A H_2O_2 in vivo számos folyamatban termelődik a sejtekben, szövetekben. Többek között UV sugárzás eredményeként is képződik vagy gyulladás esetén neutrophil granulocytákból is jelentős mennyiségben szabadul fel (12). További lépésként a H_2O_2 -ból Fe^{2+} ion jelenlétében a legtoxikusabb gyök, a hidroxil gyök jön létre a már korábban említett Fenton reakcióban. Saját kísérleteinkben az endothel sejtek mind H_2O_2 kezelésre, mind pedig hem és H_2O_2 kezelésre fokozott mértékű pusztulást mutattak a HaCaT sejtekkel összehasonlítva.

A különböző oxidatív károsító hatások következtében létrejövő sejthalál pontos mechanizmusát számos kutatócsoport vizsgálja. Godar eredményei szerint az UVA 1 besugárzás elsősorban szinglet oxigén gyökök képzése révén azonnali, előre programozott apoptózist indít el a mitokondriumok Cyclosporin A érzékeny megaportjainak megnyitása révén transzformált T és B lymphocytákon (8). Ugyanakkor nagyobb koncentrációban a szuperoxid anion, illetve a belőle képződő H_2O_2 és hidroxil gyök is képes azonnali apoptózist indukálni a mitokondriumok Cyclosporin A-ra nem érzékeny P megaportjainak megnyitásával. Saját kísérleteinkben Zeiss inverz mikroszkóppal vizsgálva a sejtpusztulás folyamatát, a sejtmembránból való vezikula képződést tudtunk megfigyelni, melynek eredményeként a sejtek zsugorodtak, elhaltak, struktúrájuk felismerhetetlenné vált. Mivel a hem és H_2O_2 mediálta citotoxicitás esetén az apoptózisra jellemző DNS fragmentációt ismételtelen sem tudtuk kimutatni endothel sejteken, illetve a sejthalál mértéke és időbeli lefolyása szoros párhuzamban futott a sejtmembrán lipid peroxidációjával (1), ezért a hem és H_2O_2 hatására létrejövő sejtpusztulást elsősorban sejt necrosisnak véljük. Az UVA + PPIX, illetve UVB toxicitás tekintetében a jövőben tervezzük a sejthalál pontos mechanizmusának vizsgálatát, miszerint apoptózis vagy necrosis vezet a sejtek pusztulásához.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a különböző oxidatív károsító hatásokkal szemben az endothel sejtek érzékenysége fokozott a HaCaT sejtekhez viszonyítva. Ennek hátterében véleményünk szerint a HaCaT sejtek oxidatív védő mechanizmusainak erőteljesebb működése áll, azonban ennek igazolása számos további kísérletet igényel.

Köszönetnyilvánítás

Munkánkat az OTKA (F16689) és Mecénatúra (DOTE4/96) támogatások tették lehetővé.

IRODALOM

1. Balla G. és mtsai: Expouse of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species. *Lab. Invest.* (1991) 64, 648–655.
2. Balla G. és mtsai: Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arterioscler. Thromb.* (1991) 11, 1700–1711.
3. Balla J. és mtsai: Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: Induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1993) 90, 9285–9289.
4. Balla J. és mtsai: Role of heme, heme oxygenase and ferritin in free radical mediated vascular endothelial cell injury. *Free radicals in the environment, medicine and toxicology*. Richelieu Press, London. (1994) 429–467.
5. Bruls W. A. G. és mtsai: Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths. *Photochem. Photobiol.* (1984) 40, 485–494.
6. Cross és mtsai: Davis conference: oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.* (1987) 107, 526–545.
7. Cunningham M. L. és mtsai: Photosensitized production of superoxide anion by monochromatic (290–405 nm) ultraviolet irradiation of NADH and NADPH coenzymes. *Photochem. Photobiol.* (1985) 42, 125–128.
8. Godar D. E.: UVA1 radiation triggers two different final apoptotic pathways. *J. Invest. Dermatol.* (1999) 11, 3–12.
9. Gorman A., McGowan A., Cotter T. G.: Role of peroxide and superoxide anion during tumour cell apoptosis. *FEBS Lett.* (1997) 404, 27–33.
10. Halliwell B., Gutteridge J. M. C.: *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, New York. (1989) 141.
11. deLeeuw S. M. és mtsai: The UV action spectra for the clone-forming ability of cultured human melanocytes and keratinocytes. *Photochem. Photobiol.* (1994) 59, 430–436.
12. McCormick J. P. és mtsai: Characterisation of a cell-lethal product from the photooxidation of tryptophan: hydrogen peroxide. *Science.* (1976) 191, 468–469.
13. Tyrrell R. M., Keyse S. M.: New trends in photobiology. The interaction of UVA radiation with cultured cells. *J. Photochem. Photobiol. B.* (1990) 4, 349–361.
14. Tyrrell R. M.: Ultraviolet radiation and free radical damage to skin. *Biochem. Soc. Symp.* (1995) 61, 47–53.
15. Wang Y. és mtsai: Differential regulation of p53 and bel-2 expression by ultraviolet A and B. *J. Invest. Dermatol.* (1998) 111, 380–384.
16. Yohn J. J. és mtsai: Disparate antioxidant enzyme activities in cultured human cutaneous fibroblasts, keratinocytes, and melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* (1991) 97, 405–409.

Érkezett: 1999. VI. 25.

Közlésre elfogadva: 1999. VIII. 26.