

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NATAŠA SIMONIČ

IMUNOLOŠKA KARAKTERIZACIJA NEKATERIH  
PREDSTAVNIKOV UV FILTROV

Ljubljana, 2013

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta za farmacijo



NATAŠA SIMONIČ

IMUNOLOŠKA KARAKTERIZACIJA NEKATERIH  
PREDSTAVNIKOV UV FILTROV

IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION OF SOME  
UV FILTERS

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za klinično biokemijo, pod mentorstvom doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Martine Gobec, mag. farm.

## **ZAHVALA**

*Iskreno se zahvaljujem mentorju, doc. dr. Žigu Jakopinu, mag. farm. za pomoč pri izbiri teme, ki me je resnično pritegnila, za zanesljivost in čas, ki mi ga je posvetil ter za vse strokovne nasvete pri pisanju diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi somentorici, asist. dr. Martini Gobec, mag. farm. za pomoč pri eksperimentalnemu delu, za prijaznost in potrpežljivost ter odgovore na številna vprašanja, ki so se mi porajala tekom eksperimentalnega dela.*

*Zahvala gre tudi moji srednješolski profesorici kozmetologije, Ireni Svoljšak Mežnaršič, mag. farm., ki me je še posebej navdušila nad kozmetologijo ter me spodbujala tekom študija.*

*Rada bi se zahvalila tudi direktorici Oddelka za razvoj in kakovost Ilirija d.d., mag. Zdenki Koren za priložnost in omogočanje dela. Hvala tudi Klavdiji Lukman za nesebično deljenje znanja ter prisluh mojim idejam.*

*Posebna zahvala gre vsem domačim, posebno pa mami Marjetki za približanje pomembnosti izobrazbe in delovni vzgled ter bratu Klemenu za navdih. Izjemno sem hvaležna fantu Gregorju za brezpogojno podporo, ki je neprecenljiva.*

## **IZJAVA**

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Martine Gobec, mag. farm.

Ljubljana, september 2013

Nataša Simonič

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Samo Kreft, mag. farm.

Članica diplomske komisije: asist. dr. Jasna Omersel, mag. farm.

# VSEBINA

POVZETEK.....	6
SEZNAM OKRAJŠAV .....	7
1 UVOD .....	9
1.1 ULTRAVIJOLIČNO SEVANJE .....	9
1.2 NEGATIVNE POSLEDICE UV SEVANJA.....	10
1.2.1 SPREMEMBE NA NIVOJU TKIVA IN CELIC .....	10
1.2.2 SPREMEMBE NA MOLEKULSKEM NIVOJU.....	11
1.3 KOZMETIČNI IZDELKI ZA ZAŠČITO PRED SONCEM .....	11
1.4 UV FILTRI.....	11
1.4.1 ANORGANSKI UV FILTRI .....	12
1.4.2 ORGANSKI UV FILTRI .....	12
1.5 TOKSIKOLOGIJA UV FILTOV .....	16
1.5.1 VPLIV NA OKOLJE IN VODNE ORGANIZME .....	17
1.5.2 VPLIV NA ENDOGENO SINTEZO VITAMINA D .....	17
1.5.3 CITOTOKSIČNOST IN GENOTOKSIČNOST .....	18
1.5.4 SISTEMSKA IN DERMALNA ABSORPCIJA .....	18
1.5.5 ENDOKRINA AKTIVNOST .....	19
1.5.6 IMUNOTOKSIČNOST .....	20
2 NAMEN DELA.....	21
3 MATERIALI IN METODE .....	22
3.1 MATERIALI .....	22
3.1.1 KEMIKALIJE .....	22
3.1.2 LABORATORIJSKA OPREMA.....	22
3.1.3 MEDIJI IN PUFRI .....	23
3.2 METODE.....	24
3.2.1 CELIČNE KULTURE .....	24
3.2.2 MTS TEST.....	25

3.2.3 DIFERENCIACIJA CELIC S PMA IN AKTIVACIJA LE-TEH Z LPS .....	26
3.2.4 DOLOČANJE CITOKINOV .....	28
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>30</b>
4.1 IMUNOCITOTOKSIČNOST UV FILTROV .....	30
4.2 IMUNOMODULATORNI UČINEK UV FILTROV .....	35
<b>5 SKLEP .....</b>	<b>39</b>
<b>6 LITERATURA.....</b>	<b>40</b>

## **POVZETEK**

Zmotno je prepričanje, da zdrava porjavelost obstaja, saj gre pravzaprav za naravni obrambni mehanizem kože kot odgovor na izpostavljenost UV sevanju. Prekomerno izpostavljanje UV sevanju lahko privede do razvoja sončnih opeklin, fotostaranja ter različnih bolezni kože. Vedno večja osveščenost ljudi o škodljivih učinkih UV žarkov ter o pomenu uporabe izdelkov za zaščito pred soncem je botrovala k enormnemu razvoju UV filtrov. Pomisleki o njihovi varnosti so vodili v številne toksikološke raziskave, ki so poleg ekološkega vprašanja postavile tudi polemike o endokrini aktivnosti in citotoksičnosti teh spojin. Učinki UV filtrov so sprožili tudi našo raziskavo, pri kateri smo imunotoksikološko okarakterizirali benzofenon-1, benzofenon-3, padimat O, oktil metoksicinamat in oktil salicilat na humanih imunskeih celicah THP-1. Z metodo MTS smo preverili njihov vpliv na metabolno aktivnost celic, pri čemer se je kot najbolj citotoksični izkazal benzofenon-1, ki je pri koncentraciji 500 µM po 72-urnem tretiranju zmanjšal delež metabolno aktivnih celic kar do 95 %. Monocyte THP-1 smo s 50 nM forbol miristat acetatom diferencirali do vnetnih makrofagov, ki zaradi izraženih estrogenskih receptorjev molekulam UV filtrov nudijo potencialno vezavno mesto. Makrofage smo aktivirali z dodatkom lipopolisaharida ter po 24 urah določili spremembe v izločanju citokinov v prisotnosti in odsotnosti necitotoksičnih 100 µM UV filtrov. Analiza citokinov, sproščenih v celični supernatant tretiranih in netretiranih celic, je razkrila imunomodulatorno delovanje UV filtrov, ti so namreč znatno povišali raven IL-6 in TNF-α ter s tem porušili esencialno ravnotežje med vnetnimi in protivnetnimi citokini.

**Ključne besede** UV filtri, celice THP-1, citotoksičnost, imunomodulacija, imunostimulacija

## **SEZNAM OKRAJŠAV**

3-BC – 3-benziliden kafra (angl. 3-benzylidene camphor)

4-MBC – 4-metilbenziliden kafra (angl. 4-methylbenzylidene camphor)

BP – benzofenon (angl. benzophenone)

DMSO – dimetil sulfoksid

FBS – fetalni goveji serum (angl. fetal bovine serum)

HMS – homosalat

IFN – interferon

IL – interlevkin

IMC – izoamil metoksicinamat

LPS – lipopolisaharid

MCF-7 – celična linija izolirana leta 1970 iz raka dojk 69-letne ženske

MTS – [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol]

NF- κB – jedrni faktor κ-lahko-verižni ojačevalec aktiviranih B-celic  
(angl. Nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells)

OD-PABA – oktildimetil *para*-aminobenzojska kislina  
(angl. octyldimethyl *para*-aminobenzoic acid)

OMC – oktil metoksicinamat

OS – oktil salicilat

PABA – *para*-aminobenzojska kislina (angl. *para*-aminobenzoic acid)

PBS – raztopina fosfatnega pufra (angl. phosphate buffered saline)

PE – fikoeritrin (angl. phycoerythrin)

PMA – forbol 12-miristat 13-acetat (angl. phorbol 12-myristate 13-acetate)

PMS – fenazin metosulfat (angl. phenazine methosulfate)

ROS – reaktivne kisikove zvrsti (angl. reactive oxygen species)

THP-1 – monociti, ki izvirajo iz akutne monocitne levkemije

TLR – tollu podobni receptor (angl. toll-like receptor)

TNF – faktor tumorske nekroze (angl. tumor necrosis factor)

# 1 UVOD

Porjavelost je v zahodnem svetu še vedno modna in predstavlja simbol lepote in zdravja. Temu pa ni bilo vedno tako, saj so še v 18. stoletju porjavelost povezovali z nižjim slojem. Delavci, predvsem kmetje, so bili med opravljanjem svojega dela izpostavljeni soncu ter posledično bolj zagorele polti od predstavnikov višjega sloja, pri katerih je bela koža veljala za prefinjeno. Preobrat se je zgodil leta 1920, ko se je modna ikona Coco Chanel iz dopustovanja na Azurni obali nehote vrnila z rjava polto. V tistem času je veljala za ženski idol, tako da se je kaj kmalu zatem začel trend porjavele polti in še danes je tako. Šele v zadnjih desetletjih pa se opozarja tudi na negativne posledice sončenja (1,2).

Porjavelost kože je naravni obrambni mehanizem kože kot odgovor na izpostavljenost ultravijoličnemu sevanju. Prekomerno sončenje pa lahko privede do razvoja sončnih opeklin, prezgodnjega staranja ter različnih bolezni kože (3).

## 1.1 ULTRAVIJILOČNO SEVANJE

Ultravijolično (UV) sevanje je elektromagnetno valovanje z valovno dolžino od 100 do 400 nm, ki ga oddaja sonce. UV žarke delimo na UVA (320 - 400 nm), UVB (280 - 320 nm) in UVC (280 - 100 nm) žarke. Zaradi neprepustnosti ozonske plasti v stratosferi UVC žarki zemeljske površine ne dosežejo, prav tako se v ozonski plasti absorbira tudi del UVB žarkov. Med UV žarki, ki dosežejo zemljo je 95 - 99 % UVA žarkov ter 1 - 5 % UVB žarkov (4).

UVA žarki imajo daljšo valovno dolžino kot UVB žarki, zato v kožo penetrirajo globlje, do dermisa, medtem ko UVB žarki prodirajo le do bazalne plasti epidermisa. Slednji imajo zaradi svoje kratkovalovne dolžine tudi večjo energijo, ki povzroči neposredno poškodbo bioloških molekul. UVA sevanje povzroči takojšnjo porjavitev, ki traja nekaj dni, saj oksidira le melanin, ki je v koži že prisoten. UVB sevanje pa je odgovorno za dolgotrajno porjavitev, in sicer tako, da stimulira melanogenezo v melanocitih (5).

Pretirano izpostavljanje UV sevanju pusti na koži negativne posledice. Poleg sončnih opeklin, katerih glavni krivec je UVB sevanje, lahko pride tudi do prezgodnjega staranja kože, t. i. fotostaranja, in imunosupresije, ki je posledica UVA sevanja. Oba tipa sevanj lahko povzročita razvoj različnih bolezni in bolezenskih stanj kože (melanom, bazalnocelični rak, aktinične keratoze, fotosenzibilnostne reakcije, itd.). Fotostarana koža

je posledica intrinzičnih in ekstrinzičnih dejavnikov, pri slednjih pa ima kar 95 % vpliv UV sevanje (6).

## 1.2 NEGATIVNE POSLEDICE UV SEVANJA

### 1.2.1 SPREMEMBE NA NIVOJU TKIVA IN CELIC

V fotostarani koži pravzaprav poteka kronično vnetje, saj je porušeno ravnotežje med vnetnimi in protivnetnimi citokini, število Langerhansovih celic je zmanjšano, število vnetnih pa povečano (4). Zato ima takšna koža zmanjšano sposobnost imunskega odgovora, pa tudi celjenje poškodb traja dlje časa. UVA sevanje torej deluje imunosupresivno - zmanjša oz. zavira delovanje imunskega sistema, hkrati pa v koži izzove vnetje, tako da se koža ne more primerno braniti (7).

Motena proliferacija keratinocitov povzroči nastanek epidermalnih hiperplazij in atrofij ter povečanje debeline epidermisa. Poškodovan kolagen ne zmore več opravljati svoje funkcije, zato se zmanjšata tako tonus kože kot tudi debelina dermisa (7). Zaradi izgube elastičnih in kolagenskih vlaken se razvijejo bolj drobne in globlje gube, koža pa ima neravno, hrapavo površino (4). Povečana je tudi aktivnost matriksnih metaloproteaz, kar vodi do še večje razgradnje kolagena. Študije fotostaranja so pokazale, da UVA sevanje v fibroblastih sproži mutacije, in sicer delecije v mitohondrijski DNA, ki igrajo pomembno vlogo pri obstoju teh celic. Na ta način povzroči UVA sevanje zmanjšanje števila fibroblastov, hkrati pa še spodbuja delovanje kolagenaze, ki cepi kolagen v medceličnini (8).

UVA sevanje lahko zaradi globine prodiranja poškoduje stene krvnih kapilar v dermisu in tako spodbudi razvoj pajčevinastih ven in teleangiektazij. Tudi delovanje melanocitov je moteno, kar se kaže v obliki hiper- ali hipopigmetacij. Poleg poškodovanih vlaken v dermisu, ki postajajo vedno bolj trda, pa se zmanjša tudi koncentracija glikozaminoglikanov, ki so odgovorni tako za vlaženje kot tudi turgor kože. Pri tem koža izgublja naravno moč hidratiranosti in prožnosti ter postaja vedno bolj toga. Fotostarana koža je že na pogled bolj suha (lat. *Xerosis cutis*) in zaradi odsotnosti leska daje vtis »usnja« (7).

### **1.2.2 SPREMEMBE NA MOLEKULSKEM NIVOJU**

Pri interakciji fotona s kromoforom pride do nastanka radikalov, ki sprožijo oksidativni stres, t. i. UV stres. UV sevanje na ta način povzroči poškodbe komponent v koži, tako lipidov, kjer najpogosteje sproži lipidno peroksidacijo, kot tudi molekul DNA ter proteinov, na katere prav tako deluje oksidativno (8).

Pri molekulah DNA lahko UV sevanje inducira oksidacijo, fragmentacijo, spremeni izražanje genov ali celo povzroči mutacijo. Tipična poškodba DNA, ki jo sproži UVB sevanje, je dimerizacija pirimidinov. UVA žarki pa po absorpciji povzročijo nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (angl. reactive oxygen species, ROS), ki neposredno oksidirajo nukleinske baze. UV sevanje je sposobno inducirati specifične mutacije v onkogenih, tj. timin - gvanin tranzicije v genu p53, ki lahko vodijo do nastanka melanoma. Na membranskih lipidih UV sevanje najpogosteje povzroči lipidno peroksidacijo in sproži nastanek hidroperoksidov, aldehidov in epoksidov, ki so t. i. sekundarni mutageni in so za celico lahko toksični. UV sevanje deluje oksidativno tudi na proteine, poleg tega pa povzroča njihovo fragmentacijo ter vpliva na delovanje encimov. Radikali in ROS, ki nastanejo kot posledica UV sevanja, pa sprožijo neposredno cepitev peptidne vezi (8).

### **1.3 KOZMETIČNI IZDELKI ZA ZAŠČITO PRED SONCEM**

Bistvenega pomena je torej osveščanje ljudi, da zdrava porjavelost ne obstaja, ter da še tako kratko izpostavljanje soncu na koži pusti posledice. Zato je pomembno, da se pred soncem znamo zaščititi. Idealni izdelki za zaščito pred soncem, zahvaljujoč UV filtrom, nudijo širokospikalno zaščito pred negativnimi vplivi sončnih žarkov (8). Ob pravilni uporabi le-teh se lahko izognemo sončnim opeklinam, fotostaranju in fotokarcinogenezi (9).

### **1.4 UV FILTRI**

UV filtre najdemo predvsem v kozmetičnih izdelkih, so pa pogosto dodani tudi v živilih, embalaži, zdravilih, plastiki in tekstu, kjer preprečujejo razgradnjo polimerov in pigmentov pod vplivom UV svetlobe ter na ta način povečajo njihovo stabilnost. V Evropi je za uporabo v kozmetičnih izdelkih dovoljenih 27 UV filtrov (Aneks VII, »Direktiva sveta z dne 27. julija 1976 o približevanju zakonodaje držav članic v zvezi s kozmetičnimi izdelki (76/768/EGS) (UL L 262, 27.9.1976, str. 169)«). Od leta 1956, ko je bil na voljo

prvi komercialni produkt za zaščito pred soncem Ambre Solaire® (L'Oréal), se je razvoj teh spojin enormno povečal (10).

Ključnega pomena je širokospikalna zaščita kože, ki pa jo je moč doseči le z uporabo kombinacije UV filtrov, ki ščitijo tako pred UVA kot tudi pred UVB žarki (11). Glede na mehanizem zaščite delimo UV filtre na organske absorbente (kemijski UV filtri) ter anorganske blokatorje (fizikalni UV filtri). Organski UV filtri se po absorpciji fotona vzbudijo na višji energijski nivo, presežek energije pa sprostijo v obliki toplote (derivati kafre tudi v obliki izomerizacije). Anorganski pa ščitijo kožo tako, da UV žarke razpršijo oz. sipajo (12).

Poleg sinteznih UV filtrov se na trgu pojavlja tudi vedno več naravnih, med katerimi so ciklodekstrini in beta-karoten, vendar pa je njihova UV zaščita bistveno manjša. Pomembnejšo vlogo igrajo rastlinski ekstrakti z antioksidativnimi učinki kot sta npr. ekstrakt aloe vere in tamarinda, ki inhibirata z UVB inducirano imunosupresijo in zmanjšata proizvodnjo protivnetnih citokinov v keratinocitih (8).

#### **1.4.1 ANORGANSKI UV FILTRI**

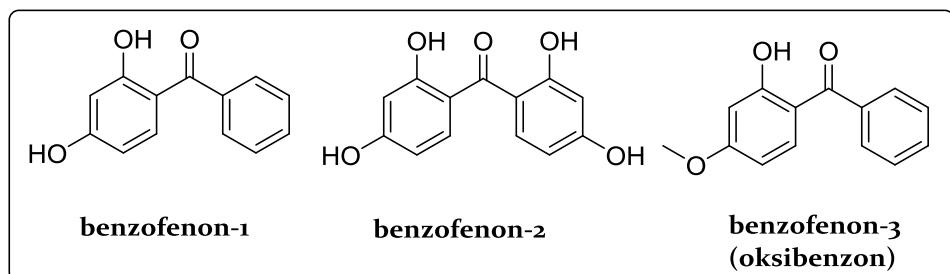
Najbolj prepoznavna predstavnika anorganskih UV filtrov sta titanov dioksid in cinkov oksid. Spojini sta fotostabilni in nudita zaščito tako, da svetlobo odbijata oz. jo sipata. ZnO nudi boljšo zaščito v UVA območju, medtem ko TiO<sub>2</sub> nudi zaščito tako pred UVA kot pred UVB žarki. Njuna slabost je, da na koži puščata bele sledove zaradi delcev velikih med 200 - 500 nm, ki sipajo svetlobo tudi v vidnem delu spektra. Rešitev te slabosti so nanotehnološko pridobljeni delci, ki zaradi manjše velikosti delcev (20 - 50 nm) ne puščajo belih sledi, temveč omogočajo transparenten nanos. Vendar pa se ob tem poraja vprašanje UV zaščite, saj odbijajo manj UV sevanja, prav tako pa zaradi svoje majhnosti predstavljajo tveganje za sistemsko absorpcijo (4). Občasno se v izdelke dodaja železov(III) oksid, ki izboljša videz nanosa s svojim rjavim odtenkom (13).

#### **1.4.2 ORGANSKI UV FILTRI**

##### *Benzofenoni*

Najpogostejsi predstavniki te skupine so benzofenon-1 (2,4-dihidroksibenzofenon; BP-1), benzofenon-2 (2,2',4,4'-tetrahidroksibenzofenon; BP-2) in benzofenon-3 (2-hidroksi-4-metoksibenzofenon, oksibenon; BP-3) (*Slika 1*). Benzofenone uvrščamo med aromatske ketone, ki absorbirajo v območju med 270 - 350 nm (9). Koži nudijo odlično zaščito pred

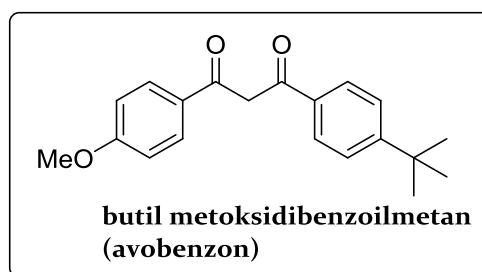
UVA žarki, vendar so zaradi fotolabilnosti pogosto podvrženi oksidacijam, nastali produkti pa lahko izzovejo fotosenzibilnostne reakcije. Dokazali so tudi njihovo absorpcijo v kožo in prehajanje v sistemski krvni obtok (4).



*Slika 1.* Kemijska struktura BP-1, BP-2 in BP-3.

#### *Derivati dibenzoilmetana*

Edini derivat dibenzoilmetana, ki se uporablja kot UV filter, je avobenzon (butil metoksidibenzoilmetan) (*Slika 2*), znan tudi pod komercialnim imenom Eusolex®, katerega patent je v lasti Merck-a. Avobenzon je širokospektralni UV filter z absorpcijskim maksimumom pri 357 nm. Njegova slabost je fotolabilnost, saj se njegova UV zaščita po enourni izpostavljenosti UV sevanju zmanjša za 50 - 60 %. Poleg tega se lahko absorbira v sistemski krvni obtok in povzroča fotoalergijske reakcije (4).

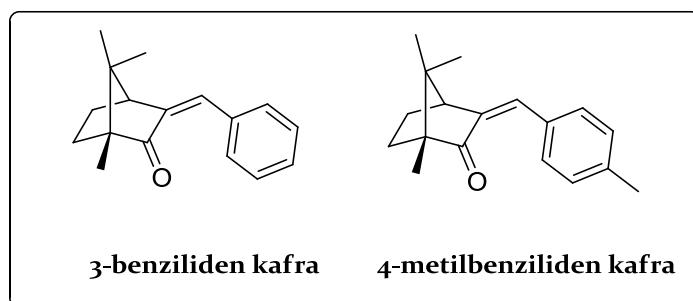


*Slika 2.* Kemijska struktura avobenzona.

#### *Derivati kafre*

Najpogostejši predstavniki so ekamsul (tereftaliden dikafra sulfonska kislina), 3-benziliden kafra (3-BC) (*Slika 3*) in 4-metilbenziliden kafra (4-MBC) (*Slika 3*). Ekamsul je derivat

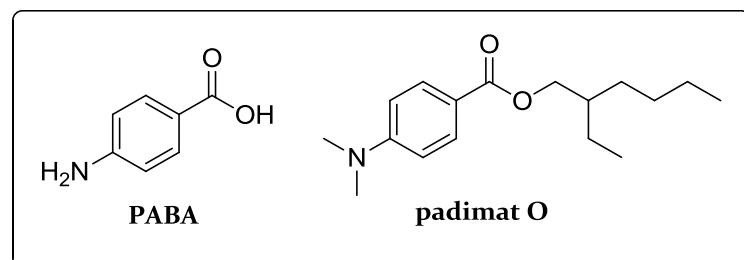
kafre, ki učinkovito ščiti kožo pred celotnim UVA in UVB spektrom (290 - 400 nm) (14). Odličen UV filter, znan po svoji fotostabilnosti, je patentiran s strani L'Oréala (njegovo komercialno ime je Mexoryl SX®) (15). Preprečuje UV inducirano pigmentacijo, dimerizacijo pirimidinov in akumulacijo proteina p53 (4). Ne prodira v kožo in ni fotoalergen, prav nasprotno - preprečuje namreč nastanek fotodermatoz (14). 3-BC in 4-MBC, ki sta učinkovita kot UVB filtra, sta za uporabo v kozmetičnih izdelkih dovoljena le v Evropi. Oba prehajata v kožo, tudi v sistemski krvni obtok, ter povzročata kontaktne alergije (4).



*Slika 3.* Kemijska struktura 3-BC in 4-MBC.

#### *Para-aminobenzojska kislina in njeni derivati*

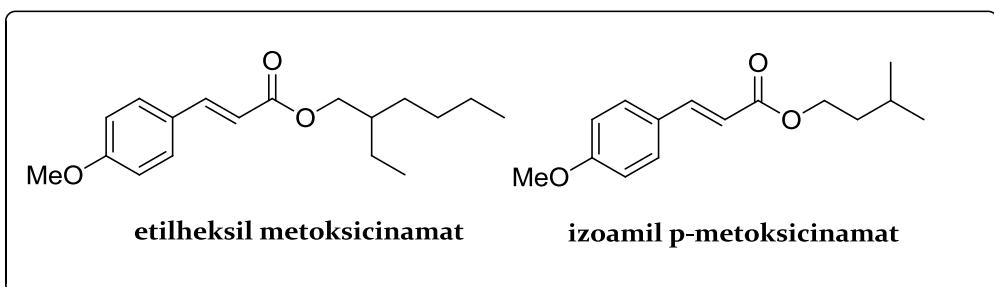
Najpogostejši derivat *para*-aminobenzojske kisline (PABA) (*Slika 4*) je padimat O (2-etylheksil dimetil *para*-aminobenzojska kislina, OD-PABA) (*Slika 4*). PABA velja za najmočnejši UVB filter. Ima sposobnost vezave na keratinocite, zato se z vodo ali potenjem ne odstrani. Povzroča kontaktne alergije in neželena obarvanja kože, zato so ga umaknili iz seznama dovoljenih UV filtrov. OD-PABA ima bolj lipofilen značaj, na aromatskem delu ima namreč pripeto še stransko verigo, ki omejuje njegovo penetracijo v kožo. Njegova UV zaščita je manjša in ne povzroča obarvanja kože (4).



*Slika 4.* Kemijska struktura PABA in OD-PABA.

### *Cinamati*

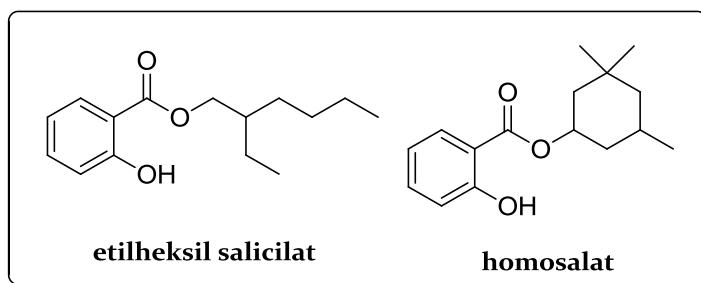
Najbolj znana predstavnika sta oktil metoksicinamat (etilheksil metoksicinamat, OMC) in izopentenil-4-metokxicinamat (izoamil para-metokxicinamat, IMC) (*Slika 5*). Cinamati še vedno veljajo za najbolj priljubljene UVB filtre. So znani fotoalergeni, povzročajo pa tudi preobčutljivostne reakcije. OMC uspešno ščiti DNA, tako da preprečuje dimerizacijo pirimidinov (4).



*Slika 5.* Kemijska struktura etilheksil metoksicinamata in izoamil p-metoksicinamata.

### *Salicilati*

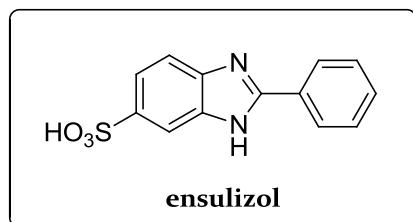
Najpogosteje uporabljena salicilata sta oktil salicilat (2-etilheksil salicilat, OS) in homosalat (HMS) (*Slika 6*). Salicilati so najšibkejši predstavniki UVB filtrov z razponom UV zaščite med 295 - 315 nm. Njihova prednost je fotostabilnost, ki jo izkoriščamo za preprečitev fotorazgradnje nestabilnih UV filtrov v izdelkih. Kljub visokim koncentracijam v končnih izdelkih naj ne bi povzročali preobčutljivostnih reakcij (4).



*Slika 6.* Kemijska struktura etilheksil salicilata in homosalata.

### *Derivati sulfonske kislina*

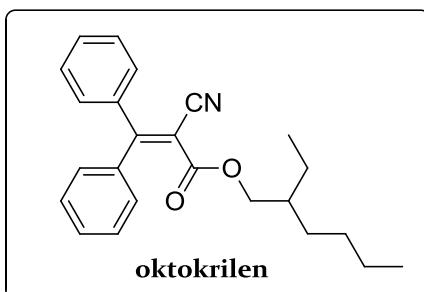
Edini predstavnik te skupine je ensulizol (fenilbenzimidazol sulfonska kislina) (*Slika 7*), ki je eden izmed redkih vodotopnih UVB filtrov in se zaradi hidrofilnega značaja pogosto uporablja v lahkih emulzijah za zaščito obraza pred UV žarki (4).



*Slika 7.* Kemijska struktura ensulizola.

### *Oktokrilen*

Je šibek UVB absorbent (*Slika 8*), ki izboljša fotostabilnost drugih UV filtrov (4). Njegova slabost je prodiranje v kožo in fotosenzibilizacija le-te. Povzroča nastanek radikalov, ki poškodujejo DNA in spodbudijo nastanek melanoma. V omejenem obsegu prehaja v sistemski krvni obtok (16).



*Slika 8.* Kemijska struktura oktokrilena.

## **1.5 TOKSIKOLOGIJA UV FILTROV**

Vedno večja osveščenost ljudi o škodljivih učinkih sončenja je privedla do večje uporabe izdelkov za zaščito pred soncem. Tržne raziskave so pokazale, da se prodaja teh izdelkov iz leta v leto povečuje. Ocenuje se, da se na svetovnem trgu letno proizvede okoli 10.000 ton UV filtrov, njihova uporaba pa bo zaradi priporočil zdravstvenih organov verjetno

samo še naraščala. Ob tem so se pojavili pomisleki o varnosti teh sredstev, zato je pomembno, da se preuči njihov potencialen toksikološki vpliv na ljudi, živali in okolje (10).

### **1.5.1 VPLIV NA OKOLJE IN VODNE ORGANIZME**

S kopanjem, plavanjem, tuširanjem in ostalimi oblikami vodne rekreacije se UV filtri spirajo s kože ter tako prehajajo v okolje. V zadnjem času se zato poraja ekološko vprašanje o toksičnosti teh kemikalij. Tako anorganski kot organski UV filtri predstavljajo razvijajočo se skupino onesnaževalcev okolja s potencialno nevarnimi učinki na ekosisteme. Zaradi visoke lipofilnosti in slabe biorazgradljivosti se akumulirajo v rečnih sedimentih in organizmih (12).

Narejene so bile študije, v katerih so naredili pregled vodnih organizmov v različnih vodnih habitatih (reke, jezera, morja). Z visoko selektivnimi in občutljivimi analiznimi metodami so uspeli določiti koncentracije nekaterih predstavnikov UV filterov v školjkah in ribah. Celokupne koncentracije teh lipofilnih spojin so znašale celo do 7,1 µg/g maščobe v školjkah ter do 3,1 µg/g maščobe v ribah (12). *In vivo* eksperimenti na ribah opozarjajo na akutno in kronično toksičnost UV filterov. BP-3, 4-MBC in 3-BC imajo močno estrogeno delovanje ter moteč vpliv na androgene. Pri vodnih bolhah (lat. *Daphnia magna*) sta 3-BC in BP-3 izkazala škodljive učinke na reprodukcijo, BP-3 pa je pri ribah črnoglavih pisancih (lat. *Pimephales promelas*) povzročil izgubo sekundarnih spolnih znakov ter zaviranje spermatogeneze (17). UV filtri imajo velik vpliv tudi na ekosisteme koralnih grebenov v tropskih morjih, saj zavirajo rast alg in povzročajo posledično beljenje koral (12).

Zaenkrat je sicer na voljo še premalo podatkov, ki bi omogočali razumevanje globalne porazdelitve UV filterov in njihovih metabolitov ter njihovih učinkov na ekosisteme. Njihova toksičnost je trenutno opredeljena za nizko, vendar pa dolgoročno predstavljajo potencialno tveganje (12).

### **1.5.2 VPLIV NA ENDOGENO SINTEZO VITAMINA D**

UV filtri predstavljajo dilemo o endogeni sintezi vitamina D, ki poteka pod vplivom UVB žarkov (9). Narejene so bile namreč študije, ki povezujejo pomanjkanje vitamina D z nastankom rakavih obolenj (18). PABA inhibira sintezo vitamina D tako *in vivo* kot *in vitro*. Teoretično bi pravilna uporaba izdelkov za zaščito pred soncem moralta zmanjšati raven vitamina D, vendar pa so številne študije pokazale, da se izdelke za zaščito pred

soncem le redko uporablja v pravih odmerkih, tako da v realnosti to skorajda ni mogoče (9). Marks in sodelavci so dokazali, da so imeli uporabniki izdelkov za zaščito pred soncem enako raven vitamina D kot kontrolna skupina, ki tega ni počela. S tem so ovrgli vse očitke, ki so postavljeni vprašanje o tveganju hipovitaminoze D, saj lahko vitamin D vnesemo tudi peroralno (18).

### **1.5.3 CITOTOKSIČNOST IN GENOTOKSIČNOST**

UV svetloba lahko sproži fotokatalizo  $TiO_2$  in  $ZnO$ , pri čemer nastanejo radikali in ROS (hidroksilni radikal, vodikov peroksid), ki imajo citotoksično in genotoksično delovanje (13). *In vitro* študija na celicah mišjega limfoma in pljučnih celicah hrčka je dokazala mutageno delovanje nanodelcev  $TiO_2$  pod vplivom UV sevanja (9).

Fotolabilni organski UV filtri lahko izzovejo nastanek radikalov in ROS, ki poškodujejo DNA ter povzročajo mutacije. Raziskava o citotoksičnosti in genotoksičnosti avobenzona je pokazala, da le-ta postane pod vplivom UV sevanja močno reaktiv in lahko sproži nastajanje singletnega kisika (19). PABA inducira nastanek ROS, ki oksidativno poškodujejo DNA, povzroči pa tudi dimerizacijo timinov, kar lahko privede do apoptoze (20).

### **1.5.4 SISTEMSKA IN DERMALNA ABSORPCIJA**

Vodooodporni izdelki zaradi večje lipofilnosti predstavljajo potencialno nevarnost za dermalno in sistemsko absorpcijo ter akumuliranje v podkožju (21). Dermalno absorbirani UV filtri imajo lahko številne neželene učinke. Benzofenoni, derivati kafre, cinamati in salicilati zaradi relativno nizke molekulske mase in lipofilne narave prodirajo v kožo (20). Kopičenje le-teh lahko sproži fotosenzibilnostno reakcijo ali kontaktno preobčutljivost (8). Tako denimo BP-3 povzroča nastanek ROS ter oksidacijo linolenske kisline, ki igra pomembno vlogo pri fotosenzibilnostnih reakcijah (22). Sposobnost tvorbe radikalov imata tudi znan fotoalergen oktokrilen ter OMC, ki so ga odkrili v plazmi in urinu tudi po štirih dneh od topikalnega nanosa (20).

Znano je, da sta topikalno nanesena BP-1 in BP-3 prisotna v človeškem urinu tudi do 48 ur po nanosu (8). Metabolite PABA pa so določili v urinu še celo po 8 dneh od nanosa na kožo. Te analize opominjajo na počasno presnovo teh substanc (12). Analize materinega mleka pa so pokazale, da 78,8 % žensk med nosečnostjo uporablja kozmetične izdelke, ki

vsebujejo UV filtre. V 76,5 % teh primerov so jih v vzorcih materinega mleka tudi odkrili. V vzorcih sta se najpogosteje pojavljala OMC in BP-3 (23).

Študije o sistemski in dermalni absorpciji nanodelcev TiO<sub>2</sub> so si zelo nasprotuječe. Nekatere trdijo, da ti netopni delci ne prodirajo v kožo in ne predstavljajo potencialnega tveganja za sistemsko toksičnost. Prav tako naj bi intravensko prisotni nanodelci TiO<sub>2</sub> predstavljali nizko toksičnost (24). Medtem ko drugi trdijo, da nanodelci TiO<sub>2</sub> prodirajo v kožo pri oslabljeni barierni funkciji kože in pri poškodovanem *stratum corneum* (25), denimo pri stanju kože kot je atopički dermatitis (26). Preučevanja nanodelcev ZnO so pokazala, da tvorijo komplekse s proteini, preko tvorbe ROS pa sprožijo apoptozo fibroblastov (20). Ključnega pomena za preprečitev prehoda nanostrukturiranih delcev v kožo in poškodbe le-te je zatorej intaktna, zdrava rožena plast (*stratum corneum*) (9).

#### **1.5.5 ENDOKRINA AKTIVNOST**

Raziskave, ki dokazujejo, da so UV filtri endokrini motilci pri ljudeh in živalih so vse številčnejše (27). Nekateri UV filtri naj bi v telesu izražali estrogeno aktivnost ter tako posnemali učinke oz. delovanje estrogena (13). UV filtrom 4-MBC, OD-PABA, OMC, BP-3 in HMS so *in vitro* na celicah MCF-7 določili agonistično estrogeno delovanje (28). Vseh pet je tudi povečalo proliferacijo MCF-7 celic, kar odraža močan agonizem na estrogenskih receptorjih (21).

Polemike o estrogeni aktivnosti nekaterih UV filtrov so sprožile nadaljnje raziskave o njihovem potencialnem delovanju na androgene receptorje v humanih celičnih linijah MDA-kb2, ki izražajo veliko število androgenih in glukokortikoidnih receptorjev, medtem ko je izražanje estrogenkskega receptorja nizko. Ugotovili so, da so UV filtri, kot so 4-MBC, 3-BC, BP-3 in HMS, antagonisti androgenkskega receptorja (28, 29). Ti podatki opozarjajo, da imajo omenjeni UV filtri poleg estrogene aktivnosti tudi antiandrogeno (28). Pri preučevanju interakcij različnih UV filtrov s progesteronskim receptorjem je OMC izkazal šibek estrogeni agonizem in močan progesteronski antagonizem (29).

Reprodukтивno toksičnost UV filtrov so študirali na podganah, hranjenih z različnimi UV filteri pre- in postnatalno. Ugotovili so, da 4-MBC, 3-BC, OMC, BP-1 in BP-3 spodbudijo rast uterusa mladih podgan (23). 4-MBC in 3-BC pa sta tudi odgovorna za zapozneno adolescenco pri samcih. Pri slednjih je 4-MBC vplival na razvoj hipofize in živčnega sistema ter povzročil spremembe v genski ekspresiji reproduktivnih organov (30). 4-MBC

in OMC delujeta tudi na ščitnico, tako da znižata koncentracijo ščitničnih hormonov T4 in T3, hkrati pa povišata nivo tirotropina (31). Podatki kažejo, da ti endokrino-aktivni ksenobiotiki vplivajo tako na razvoj reproduktivnih kot živčnih sistemov (30).

Pri študiji na prostovoljcih, ki so kremo z 10 % vsebnostjo BP-3 nanašali na kožo po celotnem telesu v priporočenem odmerku ( $2 \text{ mg/cm}^2$ ), so analize plazme pokazale, da doseže koncentracija BP-3 po štirih urah od topikalnega nanosa vrednost  $200 \text{ ng/mL}$  pri ženskah oziroma  $300 \text{ ng/mL}$  pri moških. Poleg tega je bilo opaziti tudi razlike v ravneh hormonov inhibina B, estradiola ter testosterona. Po štirih dneh pa med preiskovanimi in kontrolnimi prostovoljci bistvenih razlik ni bilo več zaznati. Ta študija odraža akutno toksičnost in hormonsko motnjo, ki jo povzroči BP-3 (9).

#### **1.5.6 IMUNOTOKSIČNOST**

Sporno estrogeno delovanje UV filterov na celice reproduktivnih organov postavlja vprašanje o njihovem vplivu na celice imunskega sistema. O imunotoksičnih učinkih UV filterov danes še ni veliko znanega, dosedanje študije so pokazale le, da vezava nekaterih UV filterov na estrogenski receptor limfocitov T povzroči spremembe v sproščanju citokinov. To privede do porušenja ravnotežja med vnetnimi ter protivnetnimi citokini. Vzpostavljeni ravnotežje med vnetnimi in protivnetnimi citokini je ključno za normalno delovanje imunskega sistema, če le-tega ni, lahko nastopijo številne bolezni (alergijske, avtoimunske bolezni, rakava obolenja, itd.). Rachoń in sodelavci so *in vitro* na mišjih splenocitih preučili delovanje BP-2 in OMC. Ugotovili so, da oba UV filtra, v koncentracijah  $10^{-5} \text{ M}$ , oponašata učinke estrogena na imunske celice. Zmanjšata sintezo IFN- $\gamma$  ter povečata produkcijo IL-10, kar je tipičen učinek estradiola. Ti rezultati kažejo, da UV filtri delujejo imunomodulatorno na celice imunskega sistema (32).

## **2 NAMEN DELA**

Dejstvo, da UV filtri predstavljajo novo skupino endokrinih motilcev, tako pri ljudeh kot živalih, je porodilo idejo o raziskovanju njihovega potencialnega delovanja na imunske celice. Glede na to, da so nekaterim UV filtrom določili imunomodulatorno delovanje na mišijh splenocitih, nas je zanimalo, ali pride do takšnega učinka tudi na humanih imunskih celicah.

Namen našega dela je imunološka karakterizacija nekaterih predstavnikov UV filtrov na humanih monocitnih celičnih linijah THP-1.

V prvem delu bomo z metodo MTS preverili citotoksičnost omenjenih spojin ter določili koncentracijo, ki še ne izkazuje bistvenega vpliva na metabolno aktivnost celic. Pri omenjeni koncentraciji bomo preučili potencialen vpliv UV filtrov na proizvodnjo protivnetnih in vnetnih citokinov. V drugem delu bomo tako monocyte THP-1 z dodatkom forbol 12-miristat 13-acetata diferencirali do makrofagov ter jih nadalje aktivirali z LPS v prisotnosti ali odsotnosti izbranih UV filtrov, po 24-urni izpostavljenosti bomo s pretočno citometrijo določili količino izloženih citokinov v celični supernatant. Z analizo podatkov in primerjavo rezultatov med z LPS-om aktiviranimi in z UV filtri tretiranimi LPS-aktiviranimi celicami bomo ovrednotili imunomodulatorni vpliv UV filtrov.

## **3 MATERIALI IN METODE**

### **3.1 MATERIALI**

#### **3.1.1 KEMIKALIJE**

<u>Kemikalija</u>	<u>Proizvajalec</u>
Antibiotik in antimikotik (raztopina penicilina, streptomicina in amfotericina)	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
Barvilo tripan modro, raztopina	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
DMSO	Merck Chemicals, Darmstadt, Nemčija
Komplet za določevanje citokinov (BD™ CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit II)	Becton Dickinson, CA, ZDA
LPS (L4641, <i>Salmonella Enterica</i> )	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
Merkaptoetanol	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
PMA	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
Reagent za MTS (Cell Filter 96 AQueous One Solution Reagent)	Promega, WI, ZDA
RPMI 1640	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
UV filter – 2,4-dihidroksibenzofenon	Aldrich Chemistry, MO, ZDA
UV filter – 2-ethylheksil 4-(dimetilamino) benzoat	Aldrich Chemistry, MO, ZDA
UV filter – 2-ethylheksil-4-metoksicinamat	Aldrich Chemistry, MO, ZDA
UV filter – 2-ethylheksilsalicilat	Aldrich Chemistry, MO, ZDA
UV filter – 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon	Aldrich Chemistry, MO, ZDA

#### **3.1.2 LABORATORIJSKA OPREMA**

<u>Aparatura / Material</u>	<u>Proizvajalec</u>
75 mm <sup>2</sup> vsebniki za gojenje celičnih kultur	TPP, Trasadingen, Švica
Avtoklav	A-21 Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
Avtomatiziran števec celic (Countess™)	Invitrogen, CA, ZDA
Centrifuga (Centric 322A / 150)	Tehnica, Železniki, Slovenija

Centrifugirke (15, 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
ChemBioDraw Ultra 12.0 (program za poimenovanje in risanje spojin)	CambridgeSoft, MA, ZDA
Hladilnik in zamrzovalnik	Gorenje, Velenje, Slovenija
Inkubator	Heraus Holding GmbH, Hanau, Nemčija
Invertni svetlobni mikroskop (Olympus CK40)	Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Nemčija
Komora z laminarnim pretokom zraka	Waldner Electronics FAZ 3, Wangen, Nemčija
Mikrocentrifugirke (0,5 mL, 1,5 mL, 2mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
Mikrotitrske ploščice za gojenje celičnih kultur (s 6, 12, 24, 96 vdolbinicami)	TPP, Trasadingen, Švica
Neubauerjev hemocitometer	Brand, Wertheim, Germany
Precizna tehtnica	Gibertini Elettronica, Milano, Italija
Pretočni citometer (FACScalibur)	Bio-Rad Laboratories, CA, ZDA
Spektrofotometer (Synergy HT Multi-Mode Microplate reader)	BioTek, VT, ZDA
Stresalnik Vibromix	Tehnica, Železniki, Slovenija
Vodna kopel	Memmert, Schwabach, Nemčija
Vrtinčnik (Vortex Genie 2)	Scientific Industries, FL, ZDA
Zamrzovalnik (-80 °C)	Forma Scientific, ON, Kanada

### 3.1.3 MEDIJI IN PUFRI

Pri delu smo kot gojišče za celice uporabljali RPMI 1640 medij, ki smo mu predhodno dodali fetalni goveji serum (angl. fetal bovine serum, FBS) in aminokislino L-glutamin. Z dodatkom antibiotika in antimikotika smo preprečili potencialno bakterijsko in glivično kontaminacijo, z merkaptoetanolom pa adhezijo celic na plastične površine. Tako smo pripravili optimizirani RPMI 1640 medij, ki je vseboval 500 mL RPMI 1640, 50 mL FBS, 5 mL 200 mM L-glutamina, 5 mL raztopine antibiotika in antimikotika ter 0,5 mL 50 mM 2-merkaptoetanola. Optimiziran RPMI 1640 medij, v nadaljevanju RPMI 1640 medij, nudi celicam THP-1 idealna hranila ter optimalne pogoje za rast.

Celice smo spirali z raztopino fosfatnega pufra (angl. phosphate buffered saline, PBS). PBS ima fiziološki pH (tj. 7,4) in vsebuje 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 2,0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> v prečiščeni vodi. Za preprečitev kontaminacije smo PBS po pripravi avtoklavirali ter hranili v hladilniku.

## 3.2 METODE

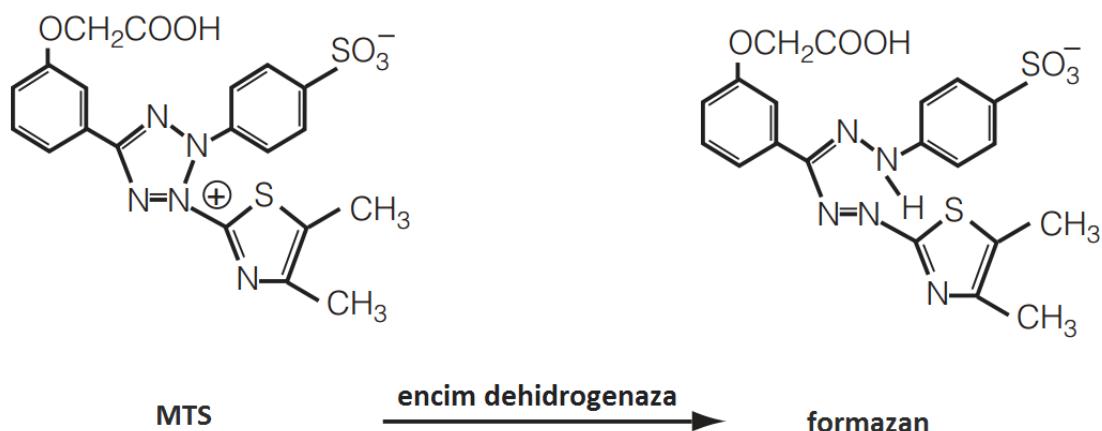
### 3.2.1 CELIČNE KULTURE

Poleg osnovne zaščite za delo s celičnimi kulturami - halje in lateks rokavic, smo pred delom površine in orokavičene roke razkužili s 70 % etanolom. Eksperimentalno delo s celičnimi kulturami je v celoti potekalo v posebej prilagojenem laboratoriju, in sicer v komori z laminarnim pretokom zraka, ki smo jo vsaj 20 minut pred začetkom dela obsevali z UV svetlobo. Celice smo hranili v 75 mm<sup>2</sup> vsebnikih, le-te pa v inkubatorju pri temperaturi 37 °C in atmosferi s 5 % vsebnostjo ogljikovega dioksida. Zamrznjene celice smo hranili v mediju z 10 % DMSO, zaprte v kriovialah v tekočem dušiku. Po odtalitvi na vodni kopeli smo celice prenesli v centrifugirke z ustreznim medijem, ki smo ga po centrifugiranju zamenjali s svežim. Svež medij smo hranili v hladilniku, pred dodatkom celicam pa smo ga segreli na vodni kopeli do temperature 37 °C. Stanje celic smo pred začetkom dela preverili pod invertnim svetlobnim mikroskopom in z uporabo Neubauerjevega hemocitometra določili število živih celic v mediju. Celice smo rahlo resuspendirali ter jih v volumskem razmerju 1:1 združili z barvilom tripan modro. Nastalo zmes smo s pipeto nanesli na komorico za štetje ter pod mikroskopom prešteli žive celice v vseh štirih kvadratih. Dobljeno število smo delili s 4, pomnožili s faktorjem redčenja 2 ter konstanto 10<sup>4</sup> in tako določili število celic v enem mL medija. Razrasle celice smo po določenem času, navadno vsakih 48 ur, redčili do ustrezne koncentracije (3 x 10<sup>5</sup> celic/mL) ter zamenjali iztrošen medij s svežim, segretim na 37 °C. Na ta način smo celicam zagotovili optimalne pogoje za rast.

Pri delu smo uporabljali celične linije THP-1, ki smo jih gojili v optimiziranem RPMI 1640 mediju. Celice THP-1 so humani monociti, ki izvirajo iz akutne monocitne levkemije enoletnega fantka. So okrogle oblike in neadhezivne celice, ki imajo sposobnost fagocitoze ter proizvajanja IL-1 (33).

### 3.2.2 MTS TEST

MTS test je test celičnega preživetja, ki se uporablja pri študijah proliferacije, citotoksičnosti in kemosenzitivnosti. Gre za spektrofotometrično metodo pri kateri izmerimo absorbanco obarvanega produkta, ki nastane le v metabolno aktivnih celicah. Preiskovanim celičnim kulturam dodamo tri ure pred meritvijo reagent, sestavljen iz MTS reagenta [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol] in reagenta za prenos elektronov (fenazin metosulfat, angl. phenazine methosulfate, PMS). Encim dehidrogenaza povzroči v metabolno aktivnih celicah s pomočjo PMS redukcijo MTS reagenta do formazanskega produkta (*Slika 9*) (34). Nastali produkt je topen v mediju celičnih kultur in absorbira pri valovni dolžini od 490 do 500 nm (35).



*Slika 9.* Pretvorba MTS reagenta v formazan poteče le v metabolno aktivnih celicah pod vplivom encima dehidrogenaze.

Za opredelitev citotoksičnosti UV filterov z metodo MTS smo najprej pripravili štiri različne koncentracije posameznih UV filterov (*Tabela I*). V sterilne vsebnike smo natehtali določeno maso UV filtra ter kot topilo dodali DMSO. Tako smo pripravili dve osnovni raztopini posameznega UV filtra - 500 in 100 mM, ki smo jih nadalje redčili do 500, 250, 100 in 50 µM.

*Tabela I.* IUPAC in trivialna imena, okrajšave ter molske mase za posamezen UV filter.

IUPAC ime	Trivialno ime	Okrajšava	Molska masa (g mol <sup>-1</sup> )
2,4-dihidroksibenzofenon	Benzofenon-1	BP-1	214,22
2-hidroksi-4-metoksibenzofenon	Benzofenon-3	BP-3	228,24
2-etylheksil 4-(dimetilamino) benzoat	Padimat O	OD-PABA	277,40
2-etylheksil-4-metoksicinamat	Oktil metoksicinamat	OMC	290,40
2-etylheksilsalicilat	Oktil salicilat	OS	250,33

Na mikrotitrsko ploščo s 24 vdolbinicami smo nanesli po 1 mL celične suspenzije s koncentracijo  $2 \times 10^5$  celic/mL. Celice smo tretirali z raztopinami posameznih UV filtrov pri štirih različnih koncentracijah. V eno vdolbinico smo dodali celično kulturo samo, ki nam je služila kot kontrola. Poleg tretiranih in netretiranih celic, smo pripravili tudi slepi vzorec, v katerem je bil samo RPMI 1640 medij. Naredili smo tudi referenco za DMSO, saj je bil uporabljen kot topilo pri pripravi raztopin UV filtrov. Slednji namreč izkazuje citotoksično delovanje, zato smo želeli preveriti njegov vpliv na viabilnost celic pri največjemu uporabljenemu volumnu. Celične kulture smo nato dobro resuspendirali ter jih prenesli na tri mikrotitrske plošče s 96 vdolbinicami ter prvo inkubirali 24 ur, drugo 48 ur in tretjo 72 ur pri temperaturi 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>. Tri ure pred pretekom inkubacije smo v vsako vdolbinico dodali po 10 µL reagenta za MTS test. Na spektrofotometru smo pri valovni dolžini 492 nm izmerili absorbanco nastalega formazana. Rezultate meritev smo obdelali s programom MS Excel ter jih podali relativno glede na netretirane celice.

### **3.2.3 DIFERENCIACIJA CELIC S PMA IN AKTIVACIJA LE-TEH Z LPS**

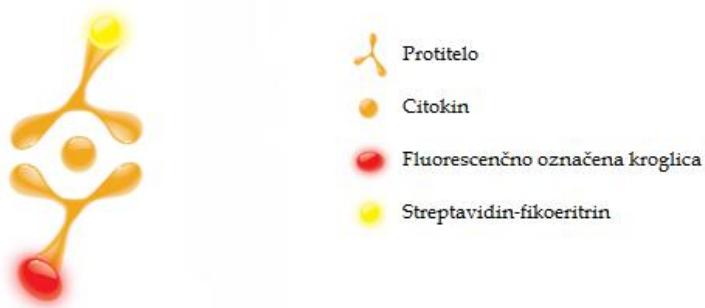
Za diferenciacijo monocitov do makrofagov smo uporabili forbol miristat acetat (angl. phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA). PMA je močan tumor-promotor in se uporablja v biomedicinskih raziskavah kot specifičen aktivator protein kinaze C, ki preko signalne kaskade sproži aktivacijo jedrnega faktorja kapa B (angl. nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-κB) (36). Monociti THP-1 se po stimulaciji s PMA diferencirajo v vnetne makrofage, ki med drugim izražajo tudi estrogenske receptorje, ti pa lahko predstavljajo potencialno vezavno mesto za preučevane UV filtre. Makrofagi imajo sposobnost fagocitoze in sproščanja vnetnih ter protivnetnih citokinov. V literaturi smo

zasledili, da je bil pri študijah, izvedenih na celičnih linijah THP-1, uporabljen PMA pri koncentraciji 50 nM, zato smo tudi pri našem delu uporabili omenjeno koncentracijo (37). Makrofage smo spodbudili k proizvodnji in sproščanju citokinov z dodatkom bakterijskega lipopolisaharida (LPS). LPS so endotoksi, ki po vezavi na TLR4 (angl. toll-like receptor 4) sprožijo pospešeno nastajanje in izločanje vnetnih citokinov (38). Tako aktivacija makrofagov z LPS povzroči transkripcijo genov, ki so odgovorni za vnetno regulacijo pri imunskega odzivu. LPS, ki smo ga uporabili pri eksperimentalnem delu, izhaja iz celične stene bakterije *Salmonella enterica*.

Pri določevanju citokinov smo naredili dve biološki ponovitvi. V ta namen smo celice 72 ur pred dodatkom PMA ločili v dva  $75 \text{ mm}^2$  vsebnika in na ta način omogočili neodvisno, ločeno rast dveh celičnih kultur THP-1. Po preteklih 72 urah smo celice centrifugirali, odstranili iztrošen medij ter jih resuspendirali v svežem mediju, ki ni vseboval merkaptoetanola, saj le-ta preprečuje adherenco celic. Pripravili smo dve celični kulturi s koncentracijo  $5 \times 10^5$  celic/mL, ki smo jima dodali PMA v končni koncentraciji 50 ng/mL. Celice THP-1 z dodanim 50 nM PMA smo nanesli po 1 mL na mikrotitrsko ploščo z 12 vdolbinicami. Po 48-urni diferenciaciji monocitov THP-1 v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> smo preverili stanje celic pod invertnim svetlobnim mikroskopom. Celice so se adherirale na površino, po izgledu pa so bile zaradi pridobljenih izrastkov podobne makrofagom. Celičnim kulturam smo odstranili supernatant, v katerem so bile neadherirane celice in iztrošen medij, ter ga shranili v ustrezno označene vsebnike, ki smo jih centrifugirali 4 minute pri 1600 rpm. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant, ostalemu sedimentu pa dodali 20 µL PBS in 20 µL barvila tripan modro ter nato s pomočjo avtomatiziranega števca določili število nevezanih celic v 1 mL medija. Preko znane začetne koncentracije celic v vdolbinici smo izračunali delež adheriranih celic. Makrofagom pa smo dodali 1 mL svežega medija ter izbrane kulture tretirali tako, da je bila končna koncentracija raztopine posameznega UV filtra 100 µM. Po eno urni inkubaciji smo tretiranim celicam dodali še LPS v končni koncentraciji 1 µg/mL ter jih tako spodbudili k proizvodnji citokinov. Poleg tretiranih celic smo naredili tudi referenčno paralelo za LPS, kjer smo celični kulturi, diferencirani s PMA, dodali samo LPS.

### 3.2.4 DOLOČANJE CITOKINOV

Celičnim kulturam THP-1 smo po 24-urni inkubaciji odstranili supernatant v ustrezeno označene vsebnike. Ker so citokini podvrženi encimski razgradnji, moramo vzorce v primeru kasnejšega določevanja zamrzniti in hraniti pri temperaturi -80 °C. Z uporabo kompleta za določevanje citokinov BD™ CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit II, v nadaljevanju BD CBA, smo po protokolu proizvajalca določili naslednje citokine: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  in IFN- $\gamma$ . Detekcija citokinov s kompletom BD CBA temelji na visoki specifičnosti protiteles za določen citokin. Protitelo, na katerega je vezana fluorescentno označena kroglica, se veže na točno določeno vrsto citokina v vzorcu. Komplet BD CBA vključuje šest različnih populacij kroglic, njihova edinstvena velikost in fluorescentni signal pa nam podata informacijo o vrsti citokina (39). Z biotinom konjugirano protitelo, na katerega je vezan streptavidin-fikoeritrin (angl. phycoerythrin, PE), se veže na vse analite, ki jih je zajelo prvo protitelo. S PE označeno protitelo imenujemo tudi detekcijski reagent, saj oddaja rumeni fluorescentni signal, ki je proporcionalen deležu analita v vzorcu. Protitelo s kroglico, analit in detekcijski reagent tvorijo t.i. sendvič kompleksi (*Slika 10*) (40).



*Slika 10.* Visoko specifično protitelo za določeno vrsto citokina je označeno s fluorescentno kroglico. Ob vezavi na analit, zajame analit tudi z biotinom konjugirano protitelo, ki je označeno s PE, ob čemer se tvorijo kompleksi, t.i. sendviči.

Te komplekse smo nato analizirali s pretočnim citometrom, po pridobitvi eksperimentalnih podatkov pa smo z uporabo programske opreme FlowJoe™ identificirali posamezen citokin in njegovo koncentracijo v vzorcu. Meritve smo obdelali s programom MS Excel ter rezultate podali kot delež izločenega citokina glede na celice aktivirane z LPS-om, katerih koncentracijo izločenih citokinov v supernatantu smo normalizirali na 100 % pri obeh bioloških ponovitvah.

## **4 REZULTATI IN RAZPRAVA**

Zaskrbljujoča dermalna absorpcija UV filtrov in njihovo prehajanje v sistemski krvni obtok je sprožilo številna raziskovanja o potencialni toksičnosti teh spojin. Poleg že znane estrogene aktivnosti nekaterih UV filtrov (21), so dosedanje študije razkrile tudi njihovo citotoksično in genotoksično delovanje preko nastanka radikalov in ROS (20). Rachoń in sodelavci so *in vitro* na mišjih splenocitih dokazali imunomodulatorno delovanje BP-2 in OMC (32). Polemike o imunomodulaciji UV filtrov so spodbudile naše raziskovanje, ki smo ga usmerili v imunološko karakterizacijo nekaterih predstavnikov UV filtrov na humanih imunskih celicah.

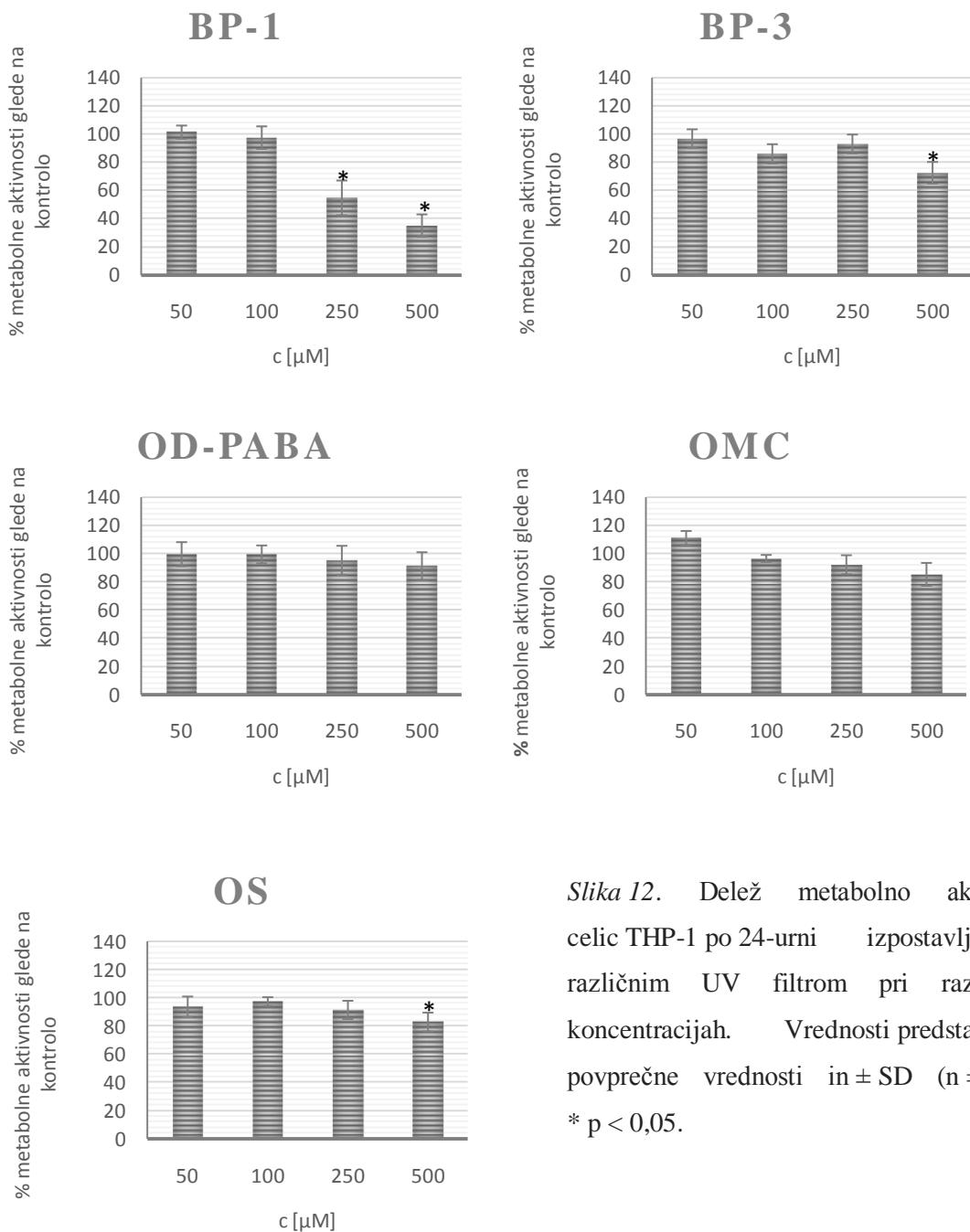
### **4.1 IMUNOCITOTOKSIČNOST UV FILTROV**

V prvem delu eksperimentalnega dela smo tako ovrednotili citotoksični učinek UV filtrov na humane imunske celice THP-1. Celice smo tretirali z naslednjimi UV filtri: BP-1, BP-3, OD-PABA, OMC in OS, v štirih različnih koncentracijah - 50, 100, 250 in 500 µM. Z metodo MTS smo preverili delež metabolno aktivnih celic po 24-, 48- in 72-urni izpostavljenosti UV filtrom. Kot topilo pri pripravi raztopin UV filtrov smo uporabili DMSO, za katerega smo naredili referenco v največjem uporabljenem volumnu. Ugotovili smo, da kljub znanemu citotoksičnemu delovanju, v tako majhni koncentraciji ne izkazuje vpliva na metabolno aktivnost celic. Prav tako smo naredili tudi slepe vrednosti za posamezne UV filtre, ti bi namreč zaradi absorpcijske narave lahko imeli moteč vpliv na meritve. Vendar pa smo v primerjavi z medijem ugotovili, da pri valovni dolžini 492 nm ne absorbirajo in ne izkazujejo motečega vpliva na meritve. Eksperimentalne podatke, pridobljene na spektrofotometru, smo obdelali s programom MS Excel ter rezultate podali kot delež metabolno aktivnih celic glede na netretirane celice.

*Slike 12, 13 in 14* prikazujejo vpliv posameznih UV filtrov na metabolno aktivnost celic THP-1 v štirih različnih koncentracijah po treh različnih časovnih točkah. Vrednosti predstavljajo povprečje meritev in standardni odklon za tri biološke ponovitve. Z \* označeni stolpec pa predstavlja koncentracijo UV filtra pri kateri je že izkazan statistično značilen vpliv na metabolno aktivnost celic v primerjavi s kontrolo ( $p < 0,05$ ).

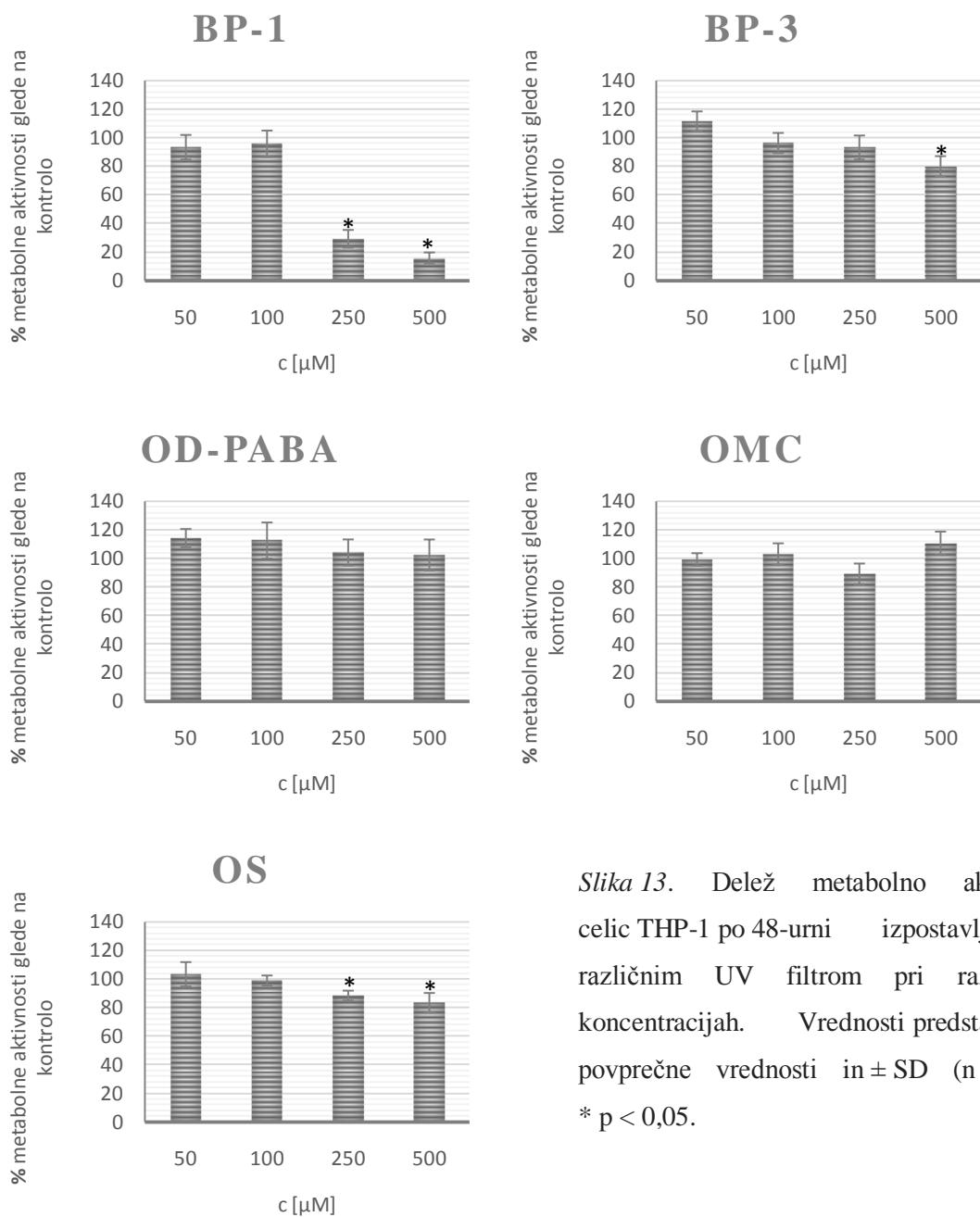
Po 24-urni izpostavljenosti celic THP-1 je moč opaziti statistično značilen vpliv na metabolno aktivnost celic pri 250 in 500 µM BP-1, slednji zmanjša metabolno aktivnost

celic tudi do 65 %. BP-3, analog BP-1, je izkazal manj škodljive učinke, saj do statistično značilnega vpliva na metabolno aktivnost celic pride šele pri 500 µM raztopini, kjer ta glede na kontrolo pada za 30 %. Statistično značilen vpliv izraža tudi 500 µM OS, ki zmanjša število metabolno aktivnih celic za 20 %. OD-PABA in OMC po 24-urnem tretirjanju celic ne izkazujeta bistvenega vpliva na metabolno aktivnost, šibek učinek teh spojin je bilo zaznati le pri najvišji koncentraciji (*Slika 12*).



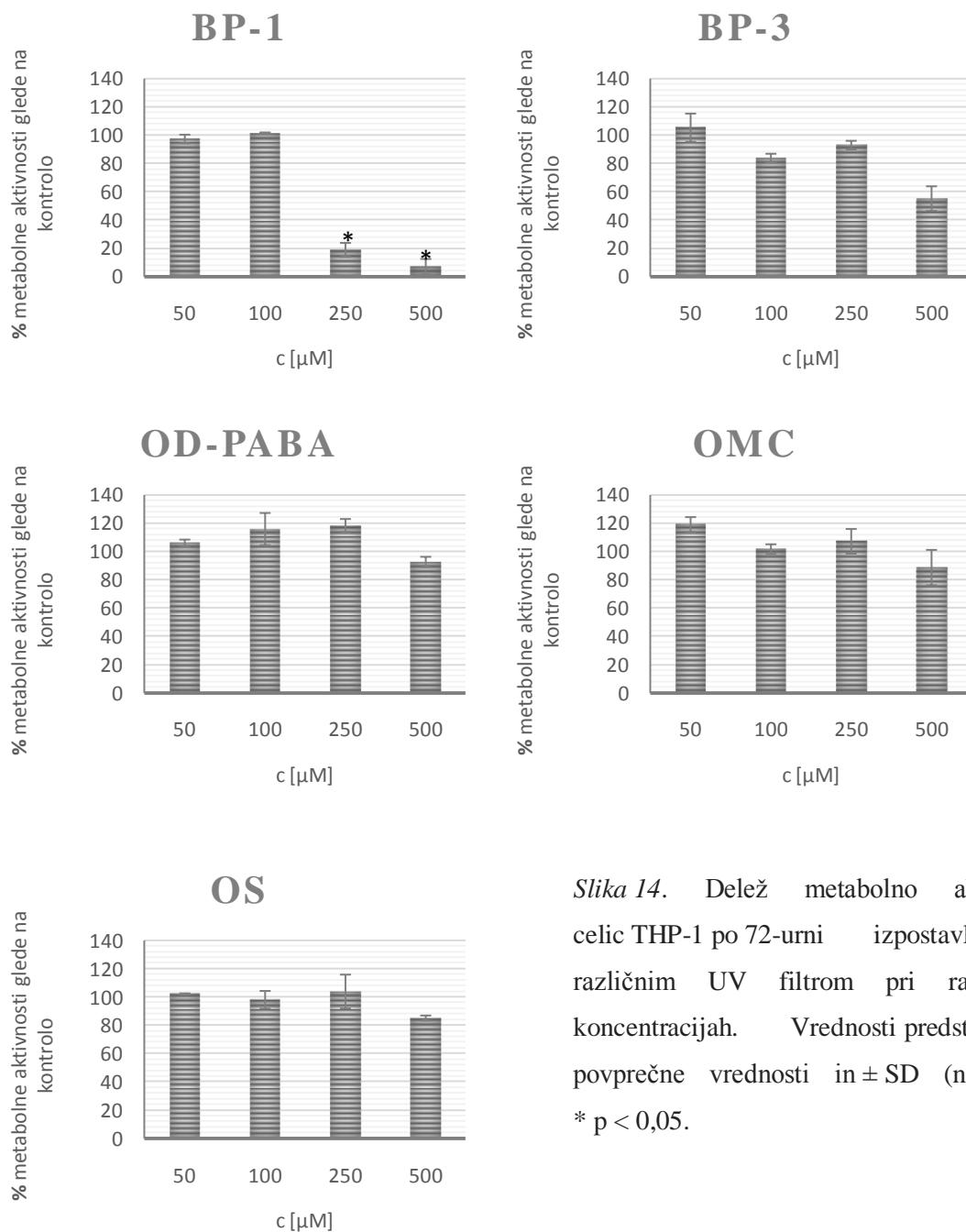
*Slika 12.* Delež metabolno aktivnih celic THP-1 po 24-urni izpostavljenosti različnim UV filtrom pri različnih koncentracijah. Vrednosti predstavljajo povprečne vrednosti in  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).  
\*  $p < 0,05$ .

Po 48-urni izpostavljenosti celic THP-1 250 in 500  $\mu\text{M}$  BP-1 se je metabolna aktivnost celic bistveno zmanjšala, in sicer za 70 % pri 250  $\mu\text{M}$  ter za 85 % pri 500  $\mu\text{M}$ . Obe koncentraciji BP-1 imata statistično značilen vpliv na metabolno aktivnost celic. Slednjega ima tudi 500  $\mu\text{M}$  BP-3, ki število metabolno aktivnih celic zmanjša za 20 %. Podoben učinek opazimo tudi pri 250 in 500  $\mu\text{M}$  koncentraciji OS, medtem ko OD-PABA in OMC tudi v najvišji koncentraciji nista izražala citotoksičnega vpliva (*Slika 13*).



*Slika 13.* Delež metabolno aktivnih celic THP-1 po 48-urni izpostavljenosti različnim UV filtrom pri različnih koncentracijah. Vrednosti predstavljajo povprečne vrednosti in  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).  
\*  $p < 0,05$ .

Po 72-urni izpostavljenosti celic THP-1 UV filtrom statistično značilen vpliv izkazuje le še BP-1 pri koncentraciji 250 in 500  $\mu\text{M}$ . Število aktivnih celic se pri omenjenih koncentracijah zmanjša kar za 80 in 95 %, medtem ko njegov analog BP-3 pri koncentraciji 500  $\mu\text{M}$  zmanjša metabolno aktivnost celic za 55 %. OS je izkazal šibek vpliv pri koncentraciji 500  $\mu\text{M}$ , vendar za razliko od prvih dveh časovnih točk, ne izraža statistično značilnega vpliva. OD-PABA in OMC tudi po 72-urnem tretiraju celic nista pokazala vpliva na metabolno aktivnost celic (*Slika 14*).



*Slika 14.* Delež metabolne aktivnosti celic THP-1 po 72-urni izpostavljenosti različnim UV filtrom pri različnih koncentracijah. Vrednosti predstavljajo povprečne vrednosti in  $\pm \text{SD}$  ( $n = 2$ ).  
\*  $p < 0,05$ .

Od preiskovanih UV filterov se je za najbolj citotoksičnega izkazal BP-1, saj je po 72-urnem tretiranju celic THP-1 v 500 µM koncentraciji zmanjšal število aktivnih celic kar za 95 %. Opaziti je bilo tudi statistično značilni vpliv na metabolno aktivnost celic THP-1 pri 250 in 500 µM koncentraciji v vseh treh časovnih točkah. Pri njegovem analogu BP-3 smo določili šibkejši citotoksični učinek, saj se je po 72-urni izpostavljenosti 500 µM BP-3 delež metabolno aktivnih celic zmanjšal le za 45 %. Razlog za njuno različno delovanje je najverjetneje majhna razlika v strukturi; BP-1 ima namreč na p- mestu pripeto hidroksilno skupino, BP-3 pa metoksi skupino. Iz tega vidika se zdi BP-3 bolj varen za uporabo v izdelkih za zaščito pred soncem kot njegov analog BP-1, vendar pa moramo ob tem upoštevati dejstvo, da se BP-3 v telesu metabolizira do BP-1. OS je v vseh treh časovnih tretmajih celic izkazal blago citotoksičnost, saj je bil v vseh treh točkah zmanjšan delež metabolno aktivnih celic skorajda konstanten, od 15 do 17 %. OD-PABA in OMC pa na podlagi rezultatov izvedenega MTS testa nista pokazala značilnega vpliva na metabolno aktivnost celic.

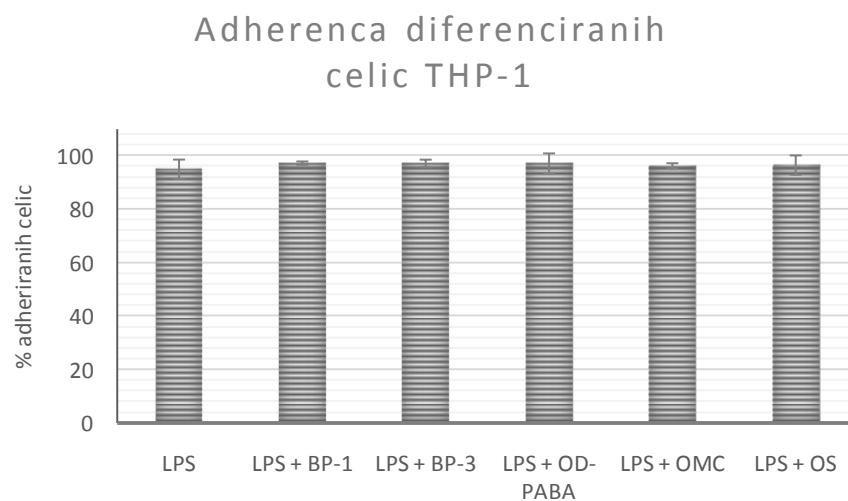
Z MTS testom lahko poleg citotoksičnosti ugotavljamo tudi vpliv spojin na proliferacijo celic. *In vitro* študije na celicah MCF-7 so razkrile proliferacijski učinek 4-MBC, OD-PABA, OMC, BP-3 in HMS, le-tega bi lahko preučili tudi na humanih imunskih celicah (28, 29). Glede na naše rezultate je proliferacijski učinek BP-3 odvisen od vrste celic, pri celicah THP-1 je bil namreč učinek bistveno manjši kot pri celicah MCF-7.

Za vse preiskovane UV filtre bi bilo smiselno preučiti tudi citotoksični vpliv po daljših časovnih obdobjih, predvsem pri nižjih koncentracijah, saj realno gledano tako visokim koncentracijam nismo izpostavljeni. Bolj verjetna je izpostavljenost nižjim koncentracijam v daljšem časovnem območju, predvsem pri vsakodnevni uporabi kozmetičnih izdelkov za zaščito pred soncem. Glede na že znano prehajanje nekaterih UV filterov v sistemski krvni obtok (4,8) bi bilo zaželeno ugotoviti kakšna je dermalna absorpcija posameznih UV filterov in delež njihovega prehajanja v sistemski krvni obtok. Tako bi lahko okvirno določili koncentracijo, ki smo ji dejansko izpostavljeni ter v nadaljnjih študijah preučili potencialne učinke posameznih UV filterov v omenjeni koncentraciji.

## 4.2 IMUNOMODULATORNI UČINEK UV FILTROV

Ker ni bilo pri nobenem od preiskovanih UV filtrov po 24-urnem tretiranju celic THP-1 opaziti bistvenega vpliva na metabolno aktivnost celic pri  $100 \mu\text{M}$  koncentraciji, smo se odločili pri tej koncentraciji preveriti še vpliv posameznih UV filtrov na proizvodnjo citokinov. V drugem delu smo tako preverili potencialen imunomodulatorni učinek UV filtrov na humane imunske celice THP-1, in sicer smo naredili pregled sprememb v izločanju naslednjih citokinov: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  in IFN- $\gamma$ . Komplet za določevanje citokinov BD CBA omogoča določanje citokinov celic T pomagalk 1 (angl. T helper cell 1, Th1 cell) in citokinov celic T pomagalke 2 (angl. T helper cell 2, Th2 cell). Prve izločajo vnetne citokine (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- $\gamma$  in TNF- $\alpha$ ) in so vključene v celični imunski odziv. Pomembne so pri fagocitozi, citotoksični aktivnosti ter pri razvoju in funkciji limfocitov T. Druge pa izločajo protivnetne citokine (IL-4, IL-5 in IL-10) in sodelujejo pri humoralem imunskejem odzivu.

Monocyte THP-1 smo diferencirali z dodatkom PMA do makrofagov, ki so zaradi izraženih estrogenских receptorjev molekulam UV filtrov nudili potencialno vezavno mesto. Po 48-urni diferenciaciji smo z odvzemom supernatanta in mikroskopom preverili adherenco celic (*Slika 15*). Adherirane celice so bile bistvenega pomena, saj odražajo diferenciacijo monocitov do makrofagov, ki imajo sposobnost izločanja tako vnetnih kot tudi protivnetnih citokinov.

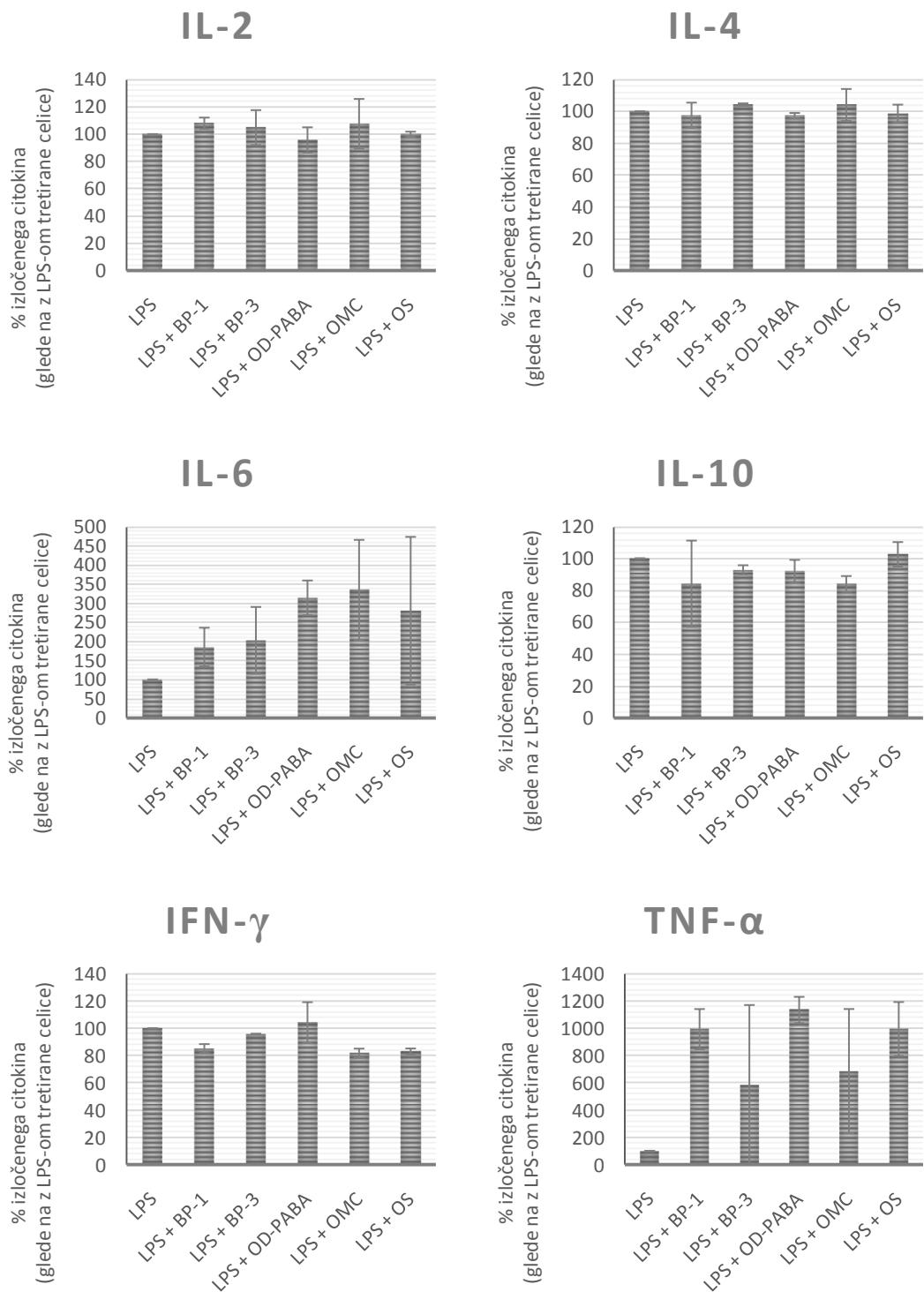


*Slika 15.* Grafikon prikazuje delež adheriranih celic za posamezne celične kulture. V vseh primerih je bila adhezija celic večja od 95 %.

Adherirane makrofage smo nadalje tretirali s 100 µM raztopinami posameznih UV filtrov ter jih z dodatkom LPS spodbudili k proizvodnji citokinov. Poleg tretiranih celic smo naredili tudi referenčno paralelo za LPS, kjer smo celični kulturi, diferencirani s PMA, dodali samo LPS. S kompletom za določevanje citokinov BD CBA ter uporabo pretočnega citometra smo določili citokine v celičnem supernatantu po 24 urah. Eksperimentalne podatke smo obdelali s programsko opremo Flow Joe™ ter programom MS Excel. Rezultate smo podali kot delež izločenega citokina glede na koncentracijo izločenih citokinov v supernatantu pri celicah aktiviranih samo z LPS, ki smo jo normalizirali na 100 % pri obeh bioloških ponovitvah. Relativno velike standardne deviacije so posledica majhnega števila bioloških ponovitev, zaradi le dveh bioloških ponovitev pa tudi ni bilo mogoče vrednotenje statistično značilnega vpliva posameznih UV filtrov na proizvodnjo citokinov.

Analiza citokinov v supernatantih tretiranih in netretiranih celic je razkrila znatno razliko v proizvodnji IL-6 in TNF- $\alpha$  ter skorajda zanemarljive spremembe v proizvodnji IL-2, IL-4, IL-10 ter IFN- $\gamma$ . Na proizvodnjo slednjih UV filtri pri dveh bioloških ponovitvah niso izkazovali omembe vrednega vpliva, medtem ko so imeli na proizvodnjo IL-6 in TNF- $\alpha$  močan spodbujevalni učinek, saj se je delež IL-6 povečal tudi do trikrat, delež TNF- $\alpha$  pa celo do enajstkrat v primerjavi z LPS-aktiviranimi celicami. Največji vpliv na proizvodnjo IL-6 so izkazali OMC, OD-PABA in OS, ki so v primerjavi z referenčno paralelo (le LPS) povečali proizvodnjo tudi do trikrat. Oba predstavnika benzofenonov BP-1 in BP-3 pa sta povzročila do dvakratno povečano izločanje IL-6. Pri proizvodnji TNF- $\alpha$  je prišlo do znatne razlike med tretiranimi celicami in referenčno paralelo, in sicer v primeru BP-3 do šestkrat, v primeru OMC do sedemkrat, v primeru BP-1 in OS do desetkrat, pri celicah tretiranih z OD-PABA pa celo do enajstkrat več proizvedenega TNF- $\alpha$  (*Slika 16*).

Prav vsi preiskovani UV filtri so s spremembou koncentracije IL-6 in TNF- $\alpha$  pokazali imunomodulatorni učinek na celice THP-1. UV filtri so povzročili zvišanje koncentracije IL-6 in TNF- $\alpha$ . IL-6 je citokin, ki deluje hkrati vnetno in protivnetno, vnetno delovanje povzroči sproščanje IL-1 in TNF- $\alpha$  ter inhibira aktivacijo IL-10, medtem ko je protivnetno delovanje ravno nasprotno (41). Predvidevamo, da bi se po daljšem tretiranju celic pokazale tudi razlike v sproščanju IL-10, saj le-tega posredno aktivira protivnetno delovanje IL-6. Prav tako bi bilo verjetno zaznati spremembe v sproščanju IL-1 in TNF- $\alpha$ , katerih izločanje inhibira protivnetno delovanje IL-6.



*Slika 16.* Delež posameznega izločenega citokina v odvisnosti od preiskovanega UV filtra (100 µM) ob kostimulaciji z LPS (1 µg/mL) glede na referenčno paralelo za LPS (1 µg/mL) po 24-urni izpostavljenosti. Vrednosti predstavljajo povprečne vrednosti in  $\pm$  SD ( $n = 2$ ).

Največja odstopanja deleža izločenega citokina glede na LPS je bilo zaznati pri TNF- $\alpha$ , katerega velike količine makrofagi sprostijo zlasti ob zaznavi LPS (42). Celice THP-1 so torej sprostile TNF- $\alpha$  kot odgovor na LPS, vendar pa je pri tretiranih celicah prišlo do močno ojačanega odgovora, v primeru OD-PABA kar do enajstkrat večjega deleža izločenega citokina. TNF- $\alpha$  stimulira proizvodnjo vnetnih citokinov, predvsem IL-1 in IL-6, preko aktivacije NF- $\kappa$ B pa lahko sproži tudi apoptozo celic. Zadnja trditev opominja na morebitno citotoksičnost OD-PABA in OMC, ki sta se pri MTS testu izkazala kot spojini brez omembe vrednega vpliva na metabolno aktivnost. Zaželeno bi bilo preučiti njun vpliv na metabolno aktivnost celic po daljšem tretiranju, saj zaradi visokega deleža izločenega TNF- $\alpha$  najverjetneje inducirata apoptozo celic. Prav vsi UV filtri so posredno preko TNF- $\alpha$  verjetno povečali tudi izločanje IL-1, vendar pa nam komplet za določevanje citokinov BD CBA detekcijo le-tega ni omogočal. Aktiviran IL-1 nadalje sproži proizvodnjo IL-8, ki se ob aktivaciji makrofagov z LPS sprosti skupaj z IL-6, IL-10 in TNF- $\alpha$ , vendar ga tako kot IL-1 z uporabljenim kompletom ni bilo mogoče določati. IL-10, katerega sproščanje lahko povzroči protivnetni IL-6, je protivnetni citokin, ki blokira NF- $\kappa$ B in inhibira sintezo vnetnih citokinov, kot so IL-2, TNF- $\alpha$  in IFN- $\gamma$  (43). Slednji je aktivator makrofagov in ima imunomodulatorni učinek (44). Glede na pridobljene rezultate predvidevamo tudi povečano koncentracijo IL-1 in IL-8, po daljšem tretiranju pa bi se najverjetneje sprostil tudi IL-10 (45).

Pregled nastalih citokinov nakazuje na sporen imunomodulatorni učinek UV filtrov. Dejstvo, da so UV filtri krivci za porušenje ravnotežja med vnetnimi in protivnetnimi citokinimi, ki je ključnega pomena za normalno delovanje imunskega sistema, je močno zaskrbljujoče. Potrebne bi bile nadaljnje raziskave na področju imunomodulacije UV filtrov, predvsem pa bi bilo zaželeno določiti kritično koncentracijo, pri kateri se pričnejo kazati učinki UV filtrov ter sama raziskava le-teh.

## 5 SKLEP

V predstavljenem raziskovalnem delu smo ovrednotili imunocitotksičnost in imunomodulatorni učinek UV filtrov na humanih imunskeih celicah THP-1. V prvem koraku smo z MTS testom ugotavljali vpliv štirih različnih koncentracij posameznih UV filtrov na metabolno aktivnost celic po 24-, 48- in 72-urni izpostavljenosti. Od preiskovanih UV filtrov se je za najbolj citotksičnega izkazal BP-1, ki je po 72-urnem tretiranju celic THP-1 v 500 µM koncentraciji zmanjšal število aktivnih celic kar za 95 %. Pri njegovem analogu BP-3 smo določili šibkejši citotksični učinek, OS je v vseh treh časovnih tretmajih celic izkazal nekakšno konstantno blago citotksičnost, OD-PABA in OMC pa tekom MTS testa nista izkazala signifikantnega vpliva na metabolno aktivnost celic. V drugem delu smo preverili vpliv UV filtrov na proizvodnjo citokinov, makrofage smo tako tretirali z necitotksičnimi 100 µM raztopinami posameznih UV filtrov in jih z dodatkom LPS spodbudili k nastajanju citokinov. Pregled citokinov po 24 urah je razkril znatno razliko v proizvodnji IL-6 in TNF- $\alpha$  ter skorajda zanemarljive spremembe v proizvodnji IL-2, IL-4, IL-10 ter IFN- $\gamma$  ob kostimulaciji z LPS. UV filtri so imeli na proizvodnjo IL-6 in TNF- $\alpha$  močan spodbujevalni učinek, delež IL-6 se je v primeru tretiranja celic z OMC povečal tudi do trikrat, delež TNF- $\alpha$  v primeru tretiranja celic z OD-PABA pa kar do enajstkrat v primerjavi s celicami aktiviranimi le z LPS. Prav vsi preiskovani UV filtri so s povečanjem koncentracije IL-6 in TNF- $\alpha$  pokazali imunostimulatorni učinek na imunske celice THP-1. Tudi OD-PABA in OMC, ki sta se pri MTS testu izkazala kot varni spojini, bi lahko delovala citotksično, saj s povečanjem TNF- $\alpha$  aktivirata NF-κB, kar pa lahko vodi v apoptozo celic.

Dejstvo, da so UV filtri krivci za porušenje ravnotežja med vnetnimi in protivnetnimi citokini, ki je ključnega pomena za normalno delovanje imunskega sistema, je močno zaskrbljujoče. Kot predmet nadalnjih raziskav bi bila smiselna določitev okvirne koncentracije UV filtrov, kateri smo izpostavljeni ob pravilni uporabi izdelkov za zaščito pred soncem, saj preučevanim koncentracijam realno gledano nismo izpostavljeni. Zaradi vedno večje osveščenosti ljudi o škodljivih učinkih sončenja in posledično večje uporabe izdelkov za zaščito pred soncem, bi bilo bistvenega pomena razkriti vplive teh spojin v omenjeni koncentraciji. Rešitev vidimo predvsem v razvoju novih UV filtrov, ki so fotostabilni in ne prehajajo v kožo, zaradi vpliva na vodne organizme pa bi bil zaželen tudi razvoj biorazgradljivih UV filtrov.

## **6 LITERATURA**

- (1) Randle H: Suntanning: Differences in Perceptions Throughout History. Mayo Clinic Proceedings 1997; 72: 461-466.
- (2) Arthey S, Clarke V: Suntanning and sun protection: A review of the psychological literature. Social Science and Medicine 1995; 40: 265-274.
- (3) Fisher G, Wang Z, Datta S, Varani J, Kang S, Voorhees J: Pathophysiology of Premature Skin Aging Induced by Ultraviolet Light. The New England Journal of Medicine 1997; 337: 1419-1429.
- (4) Sambandan D, Ratner D: Sunscreens: An overview and update. Journal of the American Academy of Dermatology 2011; 64: 748-758.
- (5) Miyamura Y, Coelho SG, Schlenz K, Batzer J, Smuda C, Choi W, Brenner M, Passeron T, Zhang G, Kolbe L, Wolber R, Hearing VJ: The deceptive nature of UVA tanning versus the modest protective effects of UVB tanning on human skin. Pigment Cell Melanoma Research 2011; 24: 136-147.
- (6) Gruijl F: Skin cancer and solar UV radiation. European Journal of Cancer 1999; 35: 2003-2009.
- (7) Goihman-Yahr M: Skin Ageing and Photoageing. Clinics in dermatology 1996; 13: 153-160.
- (8) Maier T, Korting H: Sunscreens – Which and What for? Skin Pharmacology and Physiology 2005; 18: 253–262.
- (9) Burnett M, Wang S: Current sunscreen controversies: a critical review. Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine 2011; 27, 58–67.
- (10) Wahie S, Lloyd J, Farr J: Sunscreen ingredients and labelling: a survey of products available in the UK. Clinical and Experimental Dermatology 2007; 32: 359–364.
- (11) Scherschun L, Lim H: Photoprotection by Sunscreens. American Journal of Clinical Dermatology 2001; 2: 131-134.

- (12) Gago-Ferrero P, Díaz-Cruz M, Barceló D: An overview of UV-absorbing compounds (organic UV filters) in aquatic biota. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2012; 404: 2597–2610.
- (13) Serpone N, Dondi D, Albini A: Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. *Inorganica Chimica Acta* 2007; 360: 794–802.
- (14) Chatelain E, Gabard B: Photostabilization of butyl methoxydibenzoylmethane (Avobenzene) and ethylhexyl methoxycinnamate by bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb S), a new UV broadband filter. *Photochemistry and Photobiology* 2001; 74: 401-406.
- (15) Deflandre A, Lang G: Photostability assessment of sunscreens. Benzylidene camphor and dibenzoylmethane derivatives. *International Journal of Cosmetic Science* 1988; 10: 53-62.
- (16) Hanson KM, Gratton E, Bardeen CJ: Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. *Free Radical Biology and Medicine* 2006; 41: 1205-1212.
- (17) Fent K, Kunz P, Zenker A, Rapp M: A tentative environmental risk assessment of the UV-filters 3-(4-methylbenzylidene-camphor), 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate, benzophenone-3, benzophenone-4 and 3-benzylidene camphor. *Marine Environmental Research* 2010; 69: S4–S6
- (18) Marks R, Foley P, Jolley D: The Effect of Regular Sunscreen Use on Vitamin D Levels in an Australian Population. *Archives of Dermatology* 1995; 131:415-421.
- (19) Benevenuto C, Fontanezi B, Polizello A, Spadaro A, Freitas J: Evaluation Of Phototoxicity Of UV-filter Combinations Using Fibroblasts 3T3 Culture. 27th Congress of the International Federation of Societies of Cosmetic Chemists Johannesburg 2012; 386-387.
- (20) Gilbert E, Pirot F, Bertholle V, Roussel L, Falson F, Padois K: Commonly used UV filter toxicity on biological functions: review of last decade studies. *International Journal of Cosmetic Science* 2013; 35: 208-19.

- (21) Kunz P, Fent K: Multiple hormonal activities of UV filters and comparison of in vivo and in vitro estrogenic activity of ethyl-4-aminobenzoate in fish. *Aquatic Toxicology* 2006; 79: 305–324.
- (22) Placzek M, Dendorfer M, Przybilla B, Gilbertz K, Eberlein B: Photosensitizing Properties of Compounds Related to Benzophenone. *Acta Dermato-Venereologica* 2013; 92: 30-32
- (23) Schlumpf M, Kypke K, Vökttd C, Birchlerd M: Endocrine Active UV Filters: Developmental Toxicity and Exposure Through Breast Milk. *Chimia* 2008; 62: 345–351.
- (24) Nohynek G, Antignac E, Re T, Gerhard J, Toutain H: Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2010; 243: 239–259.
- (25) Sadrieh N, Wokovich AM, Gopee NV, Zheng J, Haines D, Parmiter D, Siitonnen PH, Cozart CR, Patri AK, McNeil SE, Howard PC, Doub WH, Buhse LF: Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano- and submicron-size TiO<sub>2</sub> particles. *Toxicological Sciences* 2010; 115: 156-166.
- (26) Miquel-Jeanjean C, Crépel F, Raufast V, Payre B, Datas L, Bessou-Touya S, Duplan H: Penetration study of formulated nanosized titanium dioxide in models of damaged and sun-irradiated skins. *Photochemistry and Photobiology* 2012; 88: 1513-1521.
- (27) Burnett ME, Wang SQ: Current sunscreen controversies: a critical review. *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine* 2011; 27: 58-67.
- (28) Ma R, Cotton B, Lichtensteiger W, Schlumpf M: UV filters with antagonistic action at androgen receptors in the MDA-kb2 cell transcriptional-activation assay. *Toxicological Sciences* 2003; 74: 43-50.
- (29) Schreurs RH, Sonneveld E, Jansen JH, Seinen W, van der Burg B: Interaction of polycyclic musks and UV filters with the estrogen receptor (ER), androgen receptor (AR), and progesterone receptor (PR) in reporter gene bioassays. *Toxicological Sciences* 2005; 83: 264-72.
- (30) Schlumpf M, Schmid P, Durrer S, Conscience M, Maerkel K, Henseler M, Gruetter M, Herzog I, Reolon S, Ceccatelli R, Faass O, Stutz E, Jarry H, Wuttke W, Lichtensteiger

W: Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters - an update. Toxicology 2004; 205: 113-22.

- (31) Axelstad M, Boberg J, Hougaard KS, Christiansen S, Jacobsen PR, Mandrup KR, Nellemann C, Lund SP, Hass U: Effects of pre- and postnatal exposure to the UV-filter octyl methoxycinnamate (OMC) on the reproductive, auditory and neurological development of rat offspring. Toxicology and Applied Pharmacology 2011; 250: 278-90.
- (32) Rachón D, Rimoldi G, Wuttke W: In vitro effects of benzophenone-2 and octylmethoxycinnamate on the production of interferon-gamma and interleukin-10 by murine splenocytes. Immunopharmacology and Immunotoxicology 2006; 28: 501-510.
- (33) Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K: Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). International Journal of Cancer 1980; 2: 171-176.
- (34) Barltrop J: 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazoly)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple watersoluble formazans as cell-viability indicators. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 1991; 1: 611-614.
- (35) Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG: Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. Cancer Communication 1991; 7: 207-212.
- (36) Niedel J, Kuhn L, Vandenbark G: Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 1983; 80: 36-40.
- (37) Park E, Jung H, Yang H, Yoo M, Kim C, Kim K: Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. Inflammation Research 2007; 56: 45-50.
- (38) Beutler B: TLR4 as the mammalian endotoxin sensor. Current Topics in Microbiology and Immunology 2002; 270: 109-20.
- (39) Navodila proizvajalca za določevanje citokinov - protokol Cytokine Kit II - Instruction Manual, BD<sup>TM</sup> Cytometric Bead Array, BD

- (40) Navodila proizvajalca za določevanje citokinov - protokol Diaclone Diaplex - Instructions for use, DIAPLEX Accessory kit, Cell Sciences
- (41) Petersen A, Pedersen B. The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of Applied Physiology* 2005; 98: 1154-1162.
- (42) Walsh L, Trinchieri G, Waldorf H, Whitaker D, Murphy G: Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1991; 88: 4220-4224.
- (43) Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology* 2010; 10: 170-181.
- (44) Schoenborn J, Wilson C: Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Advances in Immunology* 2007; 96: 41-101.
- (45) Hoch M, Eberle A, Peterli R, Peters T, Seboek D, Keller U, Muller B, Linscheid P: LPS induces interleukin-6 and interleukin-8 but not tumor necrosis factor-alpha in human adipocytes. *Cytokine* 2008; 41: 29-37.