

Роль оксидативного стресса в развитии эпителиальных новообразований кожи при дерматогелиозе

Снарская Е.С.^{1,2}, Ткаченко С.Б.², Кузнецова Е.В.²

¹Кафедра кожных и венерических болезней (зав. – проф. В.А. Молочков) ИПО ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва; ²лаборатория по изучению репаративных процессов в коже (зав. – проф. С.Б. Ткаченко) НИЦ Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва

Оксидативный стресс, следующий за воздействием УФ-излучения спектров А и В, приводит к образованию активных форм кислорода, которое влечет за собой целый ряд негативных последствий в виде формирования однонитевых разрывов в ДНК и образования белковых сшивок, что способствует возникновению мутаций и запуску процесса канцерогенеза, а также является иницирующим звеном в каскаде сигнальных путей, опосредованных активацией целого ряда семейств рецепторов: эпидермальный рецептор фактора роста, фибропластический рецептор фактора роста, цитокиновые рецепторы (рецепторы для фактора некроза опухолей α , интерлейкина 1), рецептор смерти Fas. Кроме того, в клетках эпидермиса, подвергавшихся хроническому воздействию УФ-излучения, выявляется особый мутантный тип белка p53, который может детерминировать начальные этапы канцерогенеза или возникать уже в ходе роста опухоли, обеспечивая приобретение новых агрессивных свойств и устойчивости к терапии.

Ключевые слова: ультрафиолетовое излучение; оксидативный стресс; дерматогелиоз (фотостарение); канцерогенез; эпидермальный рецептор фактора роста; фибропластический рецептор фактора роста; AP-1; белок p53.

ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN DEVELOPMENT OF EPITHELIAL TUMORS OF THE SKIN IN DERMATOHELIOSIS

Snarskaya E.S.¹, Tkachenko S.B.², Kuznetsova E.V.²

¹I.M.Setchenov First Moscow State Medical University, 119991, Moscow, Russia; ²Research Center, I.M.Setchenov First Moscow State Medical University, 119991, Moscow, Russia

Oxidative stress, developing after exposure to UV radiation of spectra A and B, leads to the formation of active oxygen species. This event leads to numerous negative consequences – formation of single-strand ruptures in the DNA and formation of protein suturing, promoting the emergence of mutations and triggering carcinogenesis. It also initiates the cascade of signal routes, mediated by stimulation of many receptor families: epidermal growth factor receptor; fibroplastic growth factor receptor; cytokine (TNF α and IL-1) receptors, and Fas receptor. In addition, a special mutant protein p53 is detected in epidermal cells chronically exposed to UV radiation. This protein can determine the initial stages of carcinogenesis or emerge during tumor growth, maintaining tumor acquisition of new aggressive characteristics and drug resistance.

Key words: UV radiation; oxidative stress; dermatoheliosis (photoaging); carcinogenesis; epidermal growth factor receptor; fibroplastic growth factor receptor; AP-1; p53.

Кожа подвергается воздействию различных факторов окружающей среды, и прежде всего ультрафиолетовому излучению (УФИ), кумулятивные дозы которого являются причиной развития дерматогелиоза и эпителиальных злокачественных новообразований кожи [1–3].

Различают прямое и не прямое повреждающее действие УФИ. Прямое воздействие приводит к не-

посредственному повреждению ДНК клеток; не прямое, обусловленное действием продуктов оксидативного стресса (рис. 1), играет важную роль в развитии дерматогелиоза [2]. Оксидативный стресс, обусловленный воздействием УФИ спектров А и В, приводит к образованию активных форм кислорода (супероксидазы, гидроксильных радикалов, синглетного кислорода и перекиси водорода – H₂O₂), что влечет за собой целый ряд негативных последствий в виде формирования однонитевых разрывов ДНК, образования белковых сшивок. Это способствует возникновению мутаций с запуском процесса канцерогенеза, а также является иницирующим звеном в каскаде сигнальных путей, приводящих к деградации коллагена экстрацеллюлярного матрикса и снижению синтеза нового коллагена, нарушению внутри- и внеклеточного гомеостаза, активации

Сведения об авторах:

Снарская Елена Сергеевна, доктор мед. наук, профессор (snarskaya-dok@mail.ru); Ткаченко Сергей Борисович, доктор мед. наук, профессор; Кузнецова Екатерина Владимировна, аспирантка (kuznetsova-ek@bk.ru).

Corresponding author:

Snarskaya Elena, MD, PhD, DSc, prof. (snarskaya-dok@mail.ru).

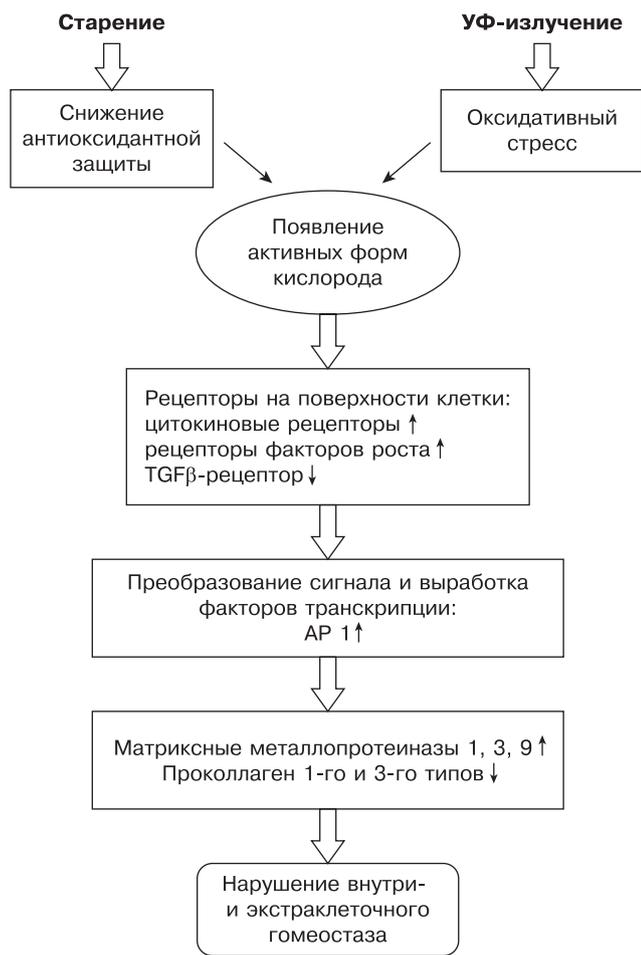


Рис.1. Схема развития оксидативного стресса при старении кожи.

перекисного окисления липидов, накопление которых способно разрушать основные структуры эпидермального барьера. Последнее сопровождается изменением барьерной функции кожи: снижением влажности и повышением pH [2–5].

Данные изменения возникают прежде всего на открытых участках кожного покрова (лицо, шея, область декольте, предплечья и кисти) и клинически проявляются стадийным развитием дерматогелиоза в виде раннего появления статических морщин, участков дисхромии, множественных телеангиэктазий, пальпируемого и видимого гиперкератоза, выраженного эластоза, множественного лентиго, а также возникновения предраковых (актинического и себорейный кератоз) и злокачественных заболеваний кожи (множественный базально-клеточный, метатипический рак кожи) (рис. 2) [3, 5, 6].

Под влиянием активных форм кислорода происходит активация эпидермального рецептора фактора роста (ЭРФР), фибропластического рецептора фактора роста (ФРФР), цитокиновых рецепторов – фактора некроза опухолей α , интерлейкина 1 (ИЛ-1), Fas [7–9].

УФИ способствует быстрому возрастанию активности фосфорилирования уже через несколько минут после экспозиции и, следовательно, активации EGFR в кератиноцитах, чему предшествует выра-



Рис. 2. Множественный базально-клеточный рак кожи; язвенно-нодулярная форма; множественные элементы актинического кератоза, солнечного лентиго на фоне выраженного дерматогелиоза кожи.

ботка H_2O_2 [1, 10]. Известно, что именно активация ЭРФР играет решающую роль в индуцированных УФИ механизмах передачи сигнала внутрь кератиноцитов и активации целого ряда других рецепторов, локализованных на клеточной поверхности [11]. Так, ЭРФР играет важную роль в возрастании способности кератиноцитов к инвазии посредством двух координированных ЭРФР-зависимых механизмов, заключающихся в ослаблении степени межклеточной адгезии через диссоциацию комплекса β -катенин/Е-кадгерин/ α -катенин и усилении миграции клеток за счет деградации компонентов экстрацеллюлярного матрикса, связанного с возросшей секрецией матриксной металлопротеиназы 1 (ММП-1). Эти процессы являются ключевыми механизмами компенсаторного восстановления структур эпидермиса, при повреждении которых развивается дерматогелиоз и канцерогенез [12]. В опыте на трансгенных мышцах серии v -rasHa, отличающихся способностью к быстрому развитию опухолей кожи в ответ на канцерогены человека, путем блокировки УФ-индуцированной активации ЭРФР было показано, что дефицит ЭРФР приводит к уменьшению возникновения и активности роста опухолей кожи на 50 и 80% соответственно. Ингибирование ЭРФР привело к подавлению клеточной пролиферации, усилению апоптоза клеток и отсрочиванию возникновения гиперплазии эпидермиса, провоцируемой УФИ [13].

Механизмы угнетения функций трансформирующего фактора роста β (ТФР β) играют также важную роль в регулировании процессов клеточного роста и синтеза компонентов внеклеточного матрикса [14, 15]. В ответ на воздействие УФИ происходит снижение экспрессии мРНК рецептора типа II ТФР β на 60% в течение 4 ч с момента облучения, оставаясь сниженным в течение 8 ч и возвращаясь к исходным значениям только через 24 ч после воздействия [15]. Выделяют 1, 2 и 3-й подтипы ТФР β , которые в здоровой, защищенной от воздействия УФ коже человека синтезируются в соотношении 1:5:3 соответственно. ТФР β связываются с рецепторами на клеточной поверхности (типа I и II) и реализуют свои эффекты посредством протеинов Smad [15].

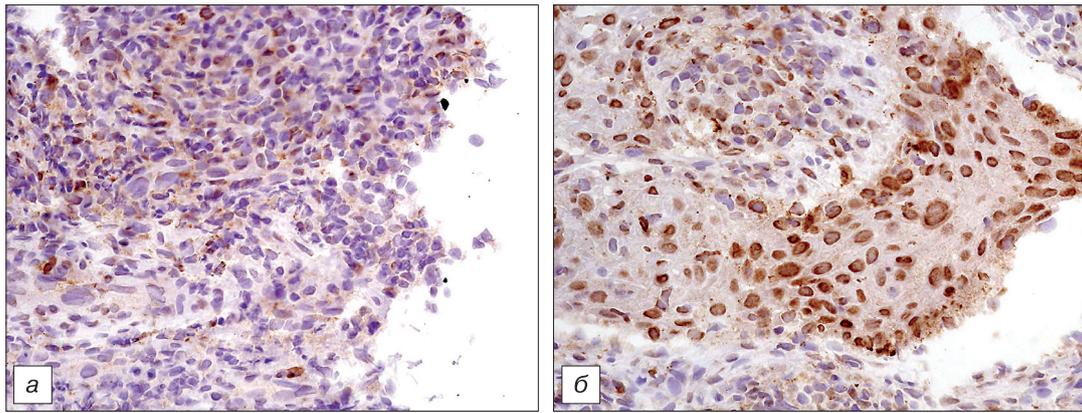


Рис. 3. Иммуногистохимическое исследование при эпителиальных новообразованиях кожи.

a – экспрессия p53 в клетках базально-клеточного рака кожи, развившегося на фоне дерматогелиоза кожи; *б* – экспрессия p53 в клетках метатипического рака кожи, развившегося на фоне прогрессирующего дерматогелиоза.

Данный механизм задействован в опухолевой супрессии, ингибируя пролиферацию эпителиальных клеток, является главным регулятором синтеза экстрацеллюлярного матрикса в коже, стимулирует пролиферацию фибробластов в дерме, синтез коллагена, выработку тканевого ингибитора матричных металлопротеиназ (ТИМП), а также снижает синтез протеолитических ферментов коллагеназы и стромелизина [15, 16].

УФИ активизирует и значимый в отношении процесса дерматогелиоза фактор транскрипции AP-1, который является мощным индуктором транскрипции MMP-1, а также оказывает негативное влияние на синтез проколлагена типа I [17]. Известно, что воздействие УФИ на кожу человека, кратное 15 мин, вызывает не только активную выработку H_2O_2 , но и повышение уровня AP-1, которые остаются на повышенном уровне в течение 24 ч [18, 19]. Кроме того, в течение 8 ч после воздействия УФВ наблюдается снижение синтеза проколлагена [15]. Таким образом, кумулятивный эффект УФ-облучения заключается в прогрессирующей деградации коллагена при нарушении процессов его полноценной репарации [5].

УФИ стимулирует кератиноциты к избыточной продукции провоспалительных цитокинов семейства ИЛ-1 (ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-18 и ИЛ-33). В норме в коже человека содержится незначительное количество неактивных предшественников ИЛ-1 β и ИЛ-18, для секреции и созревания которых необходим протеолиз, опосредованный каспазой 1. Активация последней происходит под влиянием УФИ, следствием чего является повышение уровня ИЛ-1, который в свою очередь запускает вторичный каскад цитокинов и медиаторов воспаления, приводящий к широкому спектру изменений: лейкоцитарной инфильтрации, индукции иммуносупрессии, репарации ДНК или апоптозу [20]. Также под действием УФИ происходит повреждение клеток Лангерганса, приводящее к прогрессирующему истощению механизмов реализации их антигенпрезентативной функции и клеточно-опосредованного иммунного ответа на опухолевые антигены [21].

Большой интерес представляет белок p53, который выявляется в клетках эпидермиса, подвергав-

шихся хроническому воздействию УФИ, а именно его особый мутантный тип, который отличается способностью к накоплению, длительным периодом полураспада и потерей функции инициации апоптоза [3]. В норме функция p53 заключается в распознавании и исправлении ошибок, возникающих в ходе репликации ДНК. При массивных повреждениях ДНК происходит переключение функций p53: приобретая транскрипционные активности и изменяя экспрессию генов-мишеней, он вызывает остановку размножения аномальных клеток (временную или необратимую) либо их гибель, в результате чего устраняется возможность накопления в организме генетически измененных клеток. Выделяют латентный и стрессовый варианты белка p53. Латентный участвует в контроле репликации и рекомбинации ДНК, репарации ошибок репликации, а стрессовый запускает процессы апоптоза, играющего решающую роль в элиминации клеток со значительными повреждениями генетического аппарата, вызванными воздействием УФИ, остановке клеточного цикла, подавления ангиогенеза [22].

Мутации и накопление белка p53 вызывают появление ряда характерных свойств неопластической клетки (понижение чувствительности к различным ростсупрессирующим сигналам, иммортализация, повышение способности выживать в неблагоприятных условиях, генетическая нестабильность, стимуляция неоангиогенеза, блокирование клеточной дифференцировки и т. д.), что позволяет преодолеть несколько этапов опухолевой прогрессии. Причем мутации p53 могут детерминировать начальные этапы канцерогенеза и возникать уже в ходе роста опухоли, обеспечивая приобретение новых агрессивных свойств и устойчивости к терапии [22]. Мы изучили экспрессию белка p53 у 20 больных эпителиальным раком кожи. Биопсийный материал 10 больных язвенно-нодулярных форм базально-клеточного рака кожи в стадии T2N0M0 и 10 больных метатипическим раком кожи был использован для изучения свойств опухоли с помощью иммуногистохимических методов исследования. Экспрессию p53 определяли с помощью антител p53 ("DAKO"). На предварительном этапе антигенные сайты демаскировали

путем нагревания срезов в СВЧ-печи. Использовали общепринятую пероксидазную иммуногистохимическую методику – (визуализация иммунного окрашивания стрептоцид-биотинавициновым методом с использованием набора LSAB (“DAKO”). Для фонового докрасивания применяли гематоксилин. Так, нами было показано, что при развитии базально-клеточного рака кожи на фоне дерматогелиоза мутации p53 составили 20–29% (рис. 3, а), а при прогрессировании опухоли и появлении участков плоскоклеточной дифференцировки, т.е. при метатипическом раке, мутация p53 была выраженной и определялась уже в 50–72% опухолевых клеток (рис. 3, б). Полученные данные демонстрируют неуклонное повышение экспрессии белка p53 при прогрессировании дерматогелиоза, на фоне которого развиваются эпителиальные опухоли, свидетельствуя о неуклонном нарастании степени пролиферативной активности и инвазивности клеток на фоне значительной потери функции контроля апоптоза.

Таким образом, оксидативный стресс, следующий за воздействием УФВ, в совокупности со снижением антиоксидантной защиты влечет за собой разнообразные изменения в клеточном гомеостазе от прямого повреждения ДНК до изменения активности факторов транскрипции, ферментов, широкого спектра факторов роста и провоспалительных цитокинов, в конечном итоге приводя к запуску процессов дерматогелиоза и канцерогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

- Xu Y., Shao Y., Voorhees J.J., Fisher G.J. Oxidative inhibition of receptor type protein-tyrosine phosphatase kappa by ultraviolet irradiation activates epidermal growth factor receptor (EGFR) in human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(37): 27389–97.
- Олисова О.Ю., Громова С.А., Смирённая В.А. Фотостарение кожи: современный взгляд на проблему. *Российский журнал кожных и венерических болезней.* 2010; 2: 58–62. [Olisova O.Yu., Gromova S.A., Smirennaya V.A. Photoaging of the skin: current view on the problem. *Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney.* 2010; 2: 58–62]. (in Russian)
- Снарская Е.С. Фотостарение кожи: современные аспекты. *Вестник дерматологии и венерологии.* 2011; 2: 98–103. [Snarskaya E.S. Skin photoaging: current aspects. *Vestnik dermatologii i venerologii.* 2011; 2: 98–103]. (in Russian)
- Yasui H., Sakurai H. Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 269(1): 131–6.
- Pandel R., Poljšak B., Godic A., Dahmane R. Skin photoaging and the role of antioxidants in its prevention. *ISRN Dermatol.* 2013; 2013: 930164. doi: 10.1155/2013/930164.
- Снарская Е.С., Молочков В.А., Франк Г.А., Завалишина Л.Э. Матриксные металлопротеиназы и их тканевые ингибиторы при базально-клеточном и метатипическом раке кожи. *Архив патологии.* 2005; 3: 14–6. [Snarskaya E.S., Molochkov V.A., Frank G.A., Zavalishina L.E. Matrix metalloproteinases and TIMPs in basal cell and methatypic carcinomas. *Arkhiv patologii.* 2005; 3: 14–6]. (in Russian)
- Warmuth I., Harth Y., Matsui M.S., Wang N., DeLeo V.A. Ultraviolet radiation induces phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* 1994; 54(2): 374–6.
- Xu Y., Voorhees J.J., Fisher G.J. Epidermal growth factor receptor is a critical mediator of ultraviolet B irradiation-induced signal transduction in immortalized human keratinocyte HaCaT cells. *Am. J. Pathol.* 2006; 169(3): 823–30.
- Rittié L., Fisher G.J. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res. Rev.* 2002; 1(4): 705–20.
- Peus D., Vasa R.A., Meves A., Pott M., Beyerle A., Squillace K., Pittelkow M.R. H₂O₂ is an important mediator of UVB-induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes. *Invest. Dermatol.* 1998; 110(6): 966–71.
- Xu Y., Shao Y., Zhou J., Voorhees J.J., Fisher G.J. Ultraviolet irradiation induces epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation in human keratinocytes. *J. Cell Biochem.* 2009; 107(5): 873–80. doi: 10.1002/jcb.22195.
- Jean C., Blanc A., Prade-Houdellier N., Ysebaert L., Hernandez-Pigeon H., Al Saati T., et al Epidermal growth factor receptor/beta-catenin/T-cell factor 4/matrix metalloproteinase 1: a new pathway for regulating keratinocyte invasiveness after UVA irradiation. *Cancer Res.* 2009; 69(8): 3291–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1909.
- El-Abaseri T.B., Fuhrman J., Trempus C., Shendrik I., Tennant R.W., Hansen L.A. Chemoprevention of UV light-induced skin tumorigenesis by inhibition of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* 2005; 65(9): 3958–65.
- Massague J., Blain S.W., Lo R.S. TGF β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell.* 2000; 103(2): 295–309.
- Quan T., He T., Kang S., Voorhees J.J., Fisher G.J. Ultraviolet irradiation alters transforming growth factor beta/smad pathway in human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 2002; 119(2): 499–506.
- Quan T., He T., Kang S., Voorhees J.J., Fisher G.J. Solar ultraviolet irradiation reduces collagen in photoaged human skin by blocking transforming growth factor-beta type II receptor/Smad signaling. *Am. J. Pathol.* 2004; 165(3): 741–51.
- Quan T., He T., Shao Y., Lin L., Kang S., Voorhees J.J., Fisher G.J. Elevated cysteine-rich 61 mediates aberrant collagen homeostasis in chronologically aged and photoaged human skin. *Am. J. Pathol.* 2006; 169(2): 482–90.
- Kang S., Chung J.H., Lee J.H., Fisher G.J., Wan Y.S., Duell E.A., Voorhees J.J. Topical N-acetyl cysteine and genistein prevent ultraviolet-light-induced signaling that leads to photoaging in human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 2003; 120(5): 835–41.
- Fisher G.J., Datta S.C., Talwar H.S., Wang Z.Q., Varani J., Kang S., Voorhees J.J. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature.* 1996; 379(6563): 335–9.
- Nasti T.H., Timares L. Inflammation activation of IL-1 family mediators in response to cutaneous photodamage. *Photochem. Photobiol.* 2012; 88(5): 1111–25. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01182.x.
- Снарская Е.С., Борисова А.И., Чонглян К.А. Развитие множественных опухолей различного генеза в процессе фотостарения кожи. *Российский журнал кожных и венерических болезней.* 2011; 4: 13–8. [Snarskaya E.S., Borisova A.I., Chonglyan K.A. Development of multiple tumors of various genesis in the course of photoaging of skin. *Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney.* 2011; 4: 13–8]. (in Russian)
- Копнин Б.П. Опухолевые супрессоры и мутаторные гены. Российский онкологический научный центр им.Н.Н. Блохина РАМН, Москва. <http://www.rosoncweb.ru/library/pub/02>. [Kopnin B.P. Tumoral suppressors and mutators. N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow]. (in Russian) Available at: <http://www.rosoncweb.ru/library/pub/02>. (Updated Oct 2014)