

## Giảm tổn thương DNA gây ra bởi tia cực tím và sự chết tế bào trong da người với việc thoa kem chống nắng enzyme sửa chữa DNA có chứa photolyase: Gợi ý cho việc ngăn ngừa ung thư da

ENZO BERARDESCA<sup>1</sup>, MARCO BERTONA<sup>2</sup>, KARMELA ALTABAS<sup>3</sup>,  
VELIMIR ALTABAS<sup>3</sup> and ENZO EMANUELE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Viện Da liễu San Gallicano, IRCCS, Rome; <sup>2</sup>Khoa học Y tế, Đại học Pavia, Pavia, Italy; <sup>3</sup>Khoa học Y tế, Bệnh viện Lâm sàng 'Sestre Milosrdnice', Zagreb, Croatia

Nhận ngày 23 tháng 8 năm 2011; Chấp nhận ngày 3 tháng 11 năm 2011

DOI: 10.3892/mmr.2011.673

*Thông tin được trình bày trong bài viết này thảo luận về các enzyme sửa chữa DNA và tác động có lợi của chúng lên các tế bào da người. Nó được cung cấp cho thông tin và sự giáo dục của bạn.*

Các tác giả của nghiên cứu này kết luận rằng khi các enzyme sửa chữa DNA bao bọc liposome (photolyase) được bào chế trong công thức kem chống nắng, các sản phẩm đó làm giảm tuyệt đối tổn thương DNA qua trung gian ssUVR.

Nếu tổn thương DNA không được sửa chữa hoặc các tế bào bị tổn thương không được loại bỏ bởi quá trình chết tế bào, điều này có thể dẫn đến sự biến đổi tế bào, sự tăng sinh không kiểm soát và thậm chí có thể hình thành khối u da. Trong bối cảnh này, quá trình chết tế bào mang lại một cơ chế bảo vệ hiệu quả chống lại ung thư.

Tuy nhiên, nghiên cứu gợi ý rằng sự bổ sung photolyase vào kem chống nắng bảo vệ chống lại sự độc hại do ánh nắng gây ra bởi ssUVR bằng cách ức chế tổn thương DNA và sự khởi phát liên quan của quá trình chết tế bào apoptotic.

Phát hiện của họ thể hiện cái nhìn sâu sắc về sự ngăn ngừa ung thư trên da người:

- Các kết quả của họ không chỉ xác nhận mà còn mở rộng đáng kể các phát hiện trước đó về tính hữu dụng của photolyase đối với sự bảo vệ quang học của người.
- Họ đã kỳ vọng khi không có liposome bao bọc photolyase trong một công thức, và tìm ra rằng quá trình chết tế bào đã gia tăng đáng kể sau khi chiếu xạ ssUVR lặp lại, là kết quả của tổn thương DNA do quang học trực tiếp. Với photosomes, quá trình chết tế bào giảm tới 82%.
- Các tác giả cho rằng sự kết hợp của các enzyme sửa chữa DNA (photolyase và endonuclease) có thể mang đến tác dụng mở rộng do cơ chế tác động của chúng khác nhau và độc lập rõ rệt.
- Kem chống nắng có chứa photolyase ưu việt hơn kem chống nắng đơn độc trong việc làm giảm cả sự hình thành các CPD và quá trình chết tế bào apoptotic.

*Pharma Cosmetics không có bất kỳ lợi ích tài chính nào trong bài viết đính kèm*



# Giảm tổn thương DNA gây ra bởi tia cực tím và sự chết tế bào trong da người với việc thoa kem chống nắng enzyme sửa chữa DNA có chứa photolyase: Gợi ý cho việc ngăn ngừa ung thư da

ENZO BERARDESCA<sup>1</sup>, MARCO BERTONA<sup>2</sup>, KARMELA ALTABAS<sup>3</sup>,  
VELIMIR ALTABAS<sup>3</sup> and ENZO EMANUELE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Viện Da liễu San Gallicano, IRCCS, Rome; <sup>2</sup>Khoa học Y tế, Đại học Pavia, Pavia, Italy; <sup>3</sup>Khoa nội, Bệnh viện lâm sàng 'Sestre Milosrdnice', Zagreb, Croatia

Nhận ngày 23 tháng 8 năm 2011; Chấp nhận ngày 3 tháng 11 năm 2011

DOI: 10.3892/mmr.2011.673

**Tóm tắt.** Da người tiếp xúc với tia cực tím (UVR) dẫn đến sự hình thành các thương tổn do quang học của DNA tạo cơ hội gây nên lão hóa quang học, biến đổi gen, chết tế bào và khởi phát ung thư. Photolyase là một enzyme sửa chữa DNA đảo ngược thương tổn gây ra bởi sự tiếp xúc với UVR. Chúng tôi đã tìm cách khám phá xem việc bổ sung photolyase có tăng cường khả năng bảo vệ của kem chống nắng truyền thống (SS) hay không bằng cách giảm sự hình thành in vivo của các dimer pyrimidin loại cyclobutan (CPD) và quá trình chết tế bào ở da người. Mười tình nguyện viên (kiểu da Fitzpatrick loại II) đã được tiếp xúc với UVR mô phỏng mặt trời (ss) với liều gây ban đỏ tối thiểu gấp 3 lần trong 4 ngày liên tiếp. Ba mươi phút trước mỗi lần tiếp xúc, vật liệu của thí nghiệm [phương tiện, SS (SPF 50) riêng lẻ, và SS kèm với photolyase từ *Anacystis nidulans*] được thoa ngoài da trên ba vị trí khác nhau. Một vị trí bổ sung không được xử lý và một vị trí khác chỉ được tiếp nhận ssUVR. Các mẫu sinh thiết được lấy 72 giờ sau lần chiếu xạ cuối cùng. Lượng CPD và mức độ chết tế bào được đo bằng phương pháp ELISA. Photolyase kèm SS thể hiện sự ưu việt hơn so với SS riêng lẻ trong việc làm giảm cả sự hình thành CPD lẫn quá trình chết tế bào apoptotic (cả 2 đều có  $P < 0.001$ ). Kết luận, sự bổ sung photolyase vào SS truyền thống góp phần ngăn chặn đáng kể tổn thương DNA gây ra bởi UVR và quá trình chết tế bào khi bôi trên da người.

## Giới thiệu

Da người tiếp xúc với tia cực tím mặt trời (UVR), đặc biệt là tia cực tím B (UVB; 290-320 nm), dẫn đến sự hình thành các thương tổn do quang học của DNA tạo cơ hội gây nên lão hóa quang học, biến đổi gen, chết tế bào và khởi phát ung thư.

*Correspondence to:* Dr Enzo Emanuele, Department of Health Sciences, University of Pavia, Via Bassi 21, I-27100 Pavia, Italy  
E-mail: enzo.em@libero.it

**Key words:** photolyase, ultraviolet radiation, skin, cyclobutane-type pyrimidine dimers, apoptosis, skin cancer

Các nghiên cứu trước đó đã cho thấy thành phần UVB của tia cực tím mặt trời gây ra sự hình thành hai sản phẩm quang học chính: cis-syn cyclobutene pyrimidine dimers (CPDs) và các sản phẩm quang học (6-4) pyrimidine-pyrimidine (3,4). Trong các sản phẩm quang DNA được sinh ra khi DNA hấp thụ tia UVB, CPDs – được hình thành từ quang [2 + 2] sự thay đổi chu kỳ của liên kết đôi 5,6 của hai nucleotide pyrimidin liền kề chiếm ưu thế. CPDs làm gián đoạn quá trình sao chép và phiên mã DNA bình thường và cuối cùng có khuynh hướng gây ung thư da. Bằng chứng cũng gợi ý rằng các tế bào bị tổn thương nặng do UVB tiến hành quá trình chết tế bào dưới sự hỗ trợ của các tế bào bình thường bao quanh. Do đó, quá trình chết tế bào qua trung gian UVB gần đây được chú ý như một cơ chế bảo vệ ngăn ngừa sự biến đổi ác tính bằng cách loại bỏ các tế bào mang tải lượng tổn thương DNA gây ra bởi UVB cao.

Sự bảo vệ quang học là chiến lược ngăn ngừa và trị liệu đầu tiên chống lại tổn thương DNA gây ra bởi UVR và ung thư da. Ngoài các biện pháp hành vi truyền thống, tức là mặc quần áo chống nắng, hạn chế tiếp xúc với ánh nắng mặt trời ở mức tối thiểu và sử dụng các sản phẩm chống nắng, một cách tiếp cận cải tiến đối với một vấn đề lâm sàng đáng lo ngại về sự bảo vệ quang học là dạng dùng ngoài da của các enzyme sửa chữa DNA. Hai phương pháp khác nhau đã được công bố gần đây: sử dụng endonuclease V T4 và photolyase. Việc sử dụng endonuclease V T4 đã được chỉ ra là hữu ích về mặt lâm sàng trong việc bảo vệ các bệnh nhân bị khiếm khuyết sửa chữa cắt bỏ nucleotide khỏi các tổn thương da tiền ác tính và ác tính. Mặt khác, việc sử dụng photolyase, một enzyme ngoại lai, đã được tìm thấy trong các cơ quan khác nhau, cũng có khả năng loại bỏ các CPD gây ra bởi UVB từ các tế bào da người bình thường in vivo và dường như hiệu quả hơn so với T4 endonuclease V trong việc sửa chữa tổn thương.

Photolyase là một flavoenzyme sửa chữa DNA đơn phân có kích thước 50-60 kDa, giúp phục hồi các tổn thương do tiếp xúc với UVR. Enzyme này có mặt trong hầu hết các cơ thể sinh vật sống tiếp xúc với ánh mặt trời, ngoại lệ duy nhất là nhau thai động vật có vú, như người. Các nghiên cứu trong ống nghiệm trước đó đã cho thấy rằng CPD được sửa chữa hiệu quả bằng photolyase thông qua một chu trình quang xúc tác, được gọi là tái kích hoạt quang, sử dụng năng lượng ánh sáng xanh. Do đó tái kích hoạt có thể được định nghĩa là sự

tiếp xúc đồng thời và liên tiếp của sinh vật với ánh sáng xanh/gần UV (300–500nm; phổ tác động tối đa: 430–460 nm) (12,16). Photolyase từ vi khuẩn lam *Anacystis nidulans* chứa một nhóm mang màu thu ánh sáng 8-hydroxy-5-deazaflavin (8-HDF), và dinucleotide adenin flavin (FAD), rất quan trọng đối với hoạt động xúc tác (17). Trong một nghiên cứu lâm sàng trước đó, Stege *et al* (18) cùng cộng sự đã chỉ ra rằng việc dùng ngoài da các công thức liposome chứa photolyase chiết xuất từ *Anacystis nidulans* lên da người mang lại sự bảo vệ chống lại tổn thương gây ra do UVB, như ban đỏ và các phản ứng quá mẫn miễn dịch. Dựa trên tiền đề, chúng tôi đã giả thuyết rằng việc bổ sung photolyase có thể cải thiện sự bảo vệ mang lại từ kem chống nắng truyền thống (SS) bằng cách giảm hình thành CPD ở cấp độ DNA và ngăn ngừa chết tế bào gây ra bởi UVR. Để thử nghiệm khả năng này, chúng tôi đã so sánh tác động phân tử của các dạng bào chế chứa SS phổ rộng riêng lẻ (SPF 50) và sự kết hợp của cả SS lẫn photolyase trong in vivo da người.

### Vật liệu và phương pháp

**Đối tượng.** Mười tình nguyện viên người da trắng khỏe mạnh (5 đàn ông và 5 phụ nữ, độ tuổi từ 25–36) với kiểu da Fitzpatrick loại II đã tham gia trong nghiên cứu này. Các đối tượng với tiền sử bệnh da liễu do quang học và ung thư da đã được loại trừ. Không có đối tượng nào đang dùng thuốc kháng viêm hay thuốc nhạy cảm ánh sáng. Nghiên cứu được tiến hành vào mùa đông để giảm thiểu tác dụng của sự tiếp xúc với ánh nắng mặt trời xung quanh. Chấp thuận của Hội đồng xét duyệt và sự đồng ý đã được thông báo từ tất cả những người tham gia.

**Vật liệu thí nghiệm.** Vật liệu thí nghiệm được cung cấp bởi Biodue S.p.A. (Tavarnelle Val Di Pesa, Ý). SS (SPF 50) chứa Tinosorb M, dung dịch 50% (4%), Parsol MCX (8%), Tinosorb S (5%), Eusolex 9020 (2%) và Eusolex OCR (1%). Dạng bào chế photolyase chứa bộ lọc tương tự cộng với photolyase chiết xuất từ vi khuẩn lam *Anacystis nidulans* trong một dạng bào chế liposomal (1%). Phương tiện là các chất dưỡng ẩm thương mại có sẵn trên thị trường.

**Mô phỏng mặt trời.** Tia bức xạ mô phỏng mặt trời được tạo thành bởi một hệ thống mô phỏng mặt trời Oriol (Mẫu 81292; L.O.T. Oriol, Leatherhead, Anh Quốc) chứa một đèn hồ quang xenon 1 kW với hai gương lưỡng sắc, một ống chuẩn trực và một bộ lọc WG320 1-mm. Thiết kế quang học của hệ thống mô phỏng mặt trời đặc biệt này mang lại một vùng chiếu xạ đồng đều (290–400 nm) lên bề mặt da khi định vị 11 cm từ nguồn, trong đó ~10% là UVB (280–320 nm) và phần còn lại là UVA. Bức xạ quang phổ được đo với máy đo quang phổ OL754 (Optronics, Orlando, FL, Mỹ), được hiệu chuẩn về bước sóng và cường độ chống lại các đèn tiêu chuẩn. Máy đo quang phổ được sử dụng để hiệu chỉnh máy đo bức xạ cầm tay IL700 (International Light, Newburyport, MA, Mỹ), sau đó được sử dụng để theo dõi nhanh chóng đầu ra của đèn hàng ngày.

**Chiếu xạ và phác đồ điều trị.** 2 tuần trước khi chiếu xạ thử nghiệm, liều gây ban đỏ tối thiểu (MED) đã được xác định cho mỗi cá nhân chho UVR mô phỏng mặt trời (290–400 nm) và biểu hiện với đơn vị mJ/cm<sup>2</sup> bằng cách sử dụng một mẫu giấy bạc có chất kết dính chống ánh sáng được phát hiện trước đây để cung cấp lượng UV cao hơn và thấp hơn

Table I. Treatment description of the five experimental sites.

Site	Condition	Solar-simulated UVR	Category
1	Baseline	-	Reference
2	UVR only	+	UVR only positive control
3	Vehicle	+	Vehicle + UVR
4	Sunscreen alone	+	Sunscreen + UVR
5	Sunscreen plus photolyase	+	Sunscreen + photolyase + UVR

mức MED dự kiến của các đối tượng có kiểu hình II đối với UVR mô phỏng mặt trời. Các vị trí đã được thử nghiệm 24 giờ sau khi chiếu xạ và MED được xác định là vị trí cho thấy biểu hiện ban đỏ đồng nhất, tối thiểu. Trước khi chiếu xạ, 5 vùng hình tròn (đường kính 10 mm) đã được đánh dấu trên vùng lưng dưới không tiếp xúc của mỗi người tham gia. Trong 4 ngày liên tiếp, 4 vị trí (các vị trí 2–5 được chỉ định) đã được tiếp xúc với ssUVR mô phỏng mặt trời tại 3 thời điểm MED. Vị trí 1 không nhận ssUVR (tương quan). 30 phút trước mỗi lần chiếu xạ, các sản phẩm sau đã được sử dụng cho vị trí 3–5 theo thứ tự: phương tiện (kem dưỡng ẩm nền), SS riêng lẻ và SS kết hợp photolyase. Không có sản phẩm nào được sử dụng cho vị trí 2 (chỉ có UVR). Các đối tượng đã báo cáo với trung tâm nghiên cứu cho tất cả các lần chiếu xạ, và tất cả sản phẩm thử nghiệm được thực hiện bởi các điều tra viên. 72 giờ sau lần tiếp xúc cuối cùng với ssUVR, các mẫu da thu được qua sinh thiết 4-mm từ tất cả các vị trí để phân tích phân tử.

**Chiết xuất DNA.** Các mẫu sinh thiết da được cắt làm đôi, một nửa được rửa đông ở nhiệt độ phòng, băm nhỏ và ly giải bằng 3 chu kỳ đông lạnh (trong một bồn nước đá khô ethanol) và rửa đông (ở 950C). Các mẫu được tiêu hóa trong 12 giờ ở 600C với proteinase K trong NaCl 100 mmol/l và EDTA 10 mmol/l (pH 8.0). Proteinase K bị bất hoạt ở nhiệt độ 950C trong 10 phút, và các chất đồng nhất được chiết xuất bằng cách sử dụng bộ phân lập DNA Puregene (Gentra Systems, Minneapolis, MN, Mỹ). Bộ này chứa 2 thuốc thử chính: các dung dịch ly giải tế bào và kết tủa protein. Trong một thời gian ngắn, DNA được chiết xuất từ các chất đồng nhất bằng dung dịch đệm ly giải và sau đó được xử lý với RNase A. Bộ phân lập loại bỏ các protein bằng cách sử dụng dung dịch kết tủa protein, tiếp theo là 2-propanol để tạo thành viên DNA.

**Phương pháp ELISA cho CPDs.** Sự xác định CPD trong DNA chiết xuất từ các chất đồng nhất được thực hiện bằng phương pháp ELISA, như đã được miêu tả trước đó. Tóm tắt, DNA tinh khiết được pha loãng trong 0.6 µg/ml đệm saline-sodium citrate (SSC) 2X và sau đó được làm biến tính bằng cách đun sôi trong 5 phút. Các mẫu được đặt trên đá, và 100 µl của mỗi mẫu được bổ sung vào các giếng được xử lý với protamine sulfate 1% trong đĩa ELISA 96 giếng. Kháng thể sơ cấp được pha loãng theo tỷ lệ 1:2,000 tới 0.25 µg/ml trong dung dịch chặn Tween-20 0.05%/Bovine serum albumin (BSA) 0.25%/Nước muối đệm phosphate 1X (PBS). Một liên hợp alkaline phosphatase được pha loãng theo tỷ lệ 1:10,000

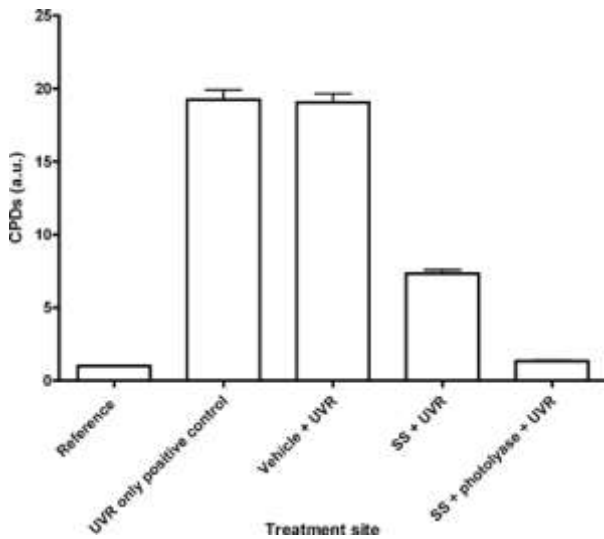


Figure 1. Effect of a sunscreen (SS) with or without photolyase on CPD formation after repetitive ultraviolet radiation (UVR) exposure. ANOVA followed by Newman-Keuls tests was used to analyze CPDs. Repetitive irradiation significantly increased the formation of CPDs in both UVR only positive control and vehicle + UVR sites ( $P < 0.001$  vs. baseline). SS alone significantly, but not completely, prevented CPD formation ( $P < 0.001$  vs. UVR only positive control and vehicle + UVR sites). However, topical SS + photolyase was significantly better than SS alone ( $P < 0.001$ ).

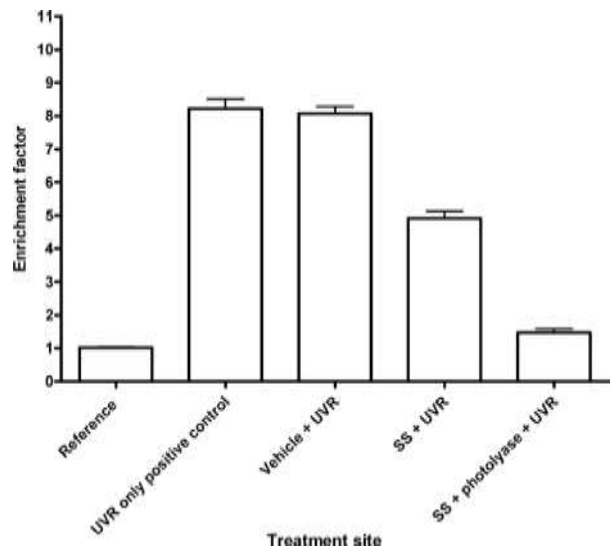


Figure 2. Effect of a sunscreen (SS) with or without photolyase on apoptosis in skin biopsies after repetitive ultraviolet radiation (UVR) exposure. ANOVA followed by Newman-Keuls tests was used to analyze apoptosis. Repetitive irradiation significantly increased apoptosis in both the UVR only positive control and vehicle + UVR sites ( $P < 0.001$  vs. baseline). SS alone significantly, but not completely, prevented apoptosis ( $P < 0.001$  vs. UVR only positive control and vehicle + UVR sites). However, topical SS + photolyase was significantly better than SS alone ( $P < 0.001$ ).

trong dung dịch chặn được sử dụng như kháng thể thứ cấp. Sau khi ủ với kháng thể thứ cấp, các giếng được rửa với 1X PBS, và các CPD được định lượng bằng nitrophenyl phosphate disodium-substrate. Độ hấp thụ được đọc tại 405 nm. Mỗi thí nghiệm được thực hiện hai lần, và các kết quả được lấy trung bình cộng. Độ hấp thụ cao hơn tương quan với CPD cao hơn. Các kết quả được vẽ theo đơn vị tùy ý liên quan đến các giá trị của vị trí kiểm soát đường cơ sở.

**Đánh giá sự chết tế bào.** Sự chết tế bào trong các chất đồng nhất của da được đo bằng phép đo màu phân tích ELISA Plus Phát hiện Tế bào chết, theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Roche Diagnostics, Basel, Thụy Sĩ). Nguyên tắc của thử nghiệm này dựa trên việc phát hiện mono và oligonucleosomes trong các đoạn tế bào chất của ly giải tế bào bằng việc sử dụng các kháng thể biotinyl hóa kháng histone- và peroxidase-đôi kháng DNA. Độ hấp thụ được đọc tại 405 nm. Độ hấp thụ cao hơn cũng tương quan với sự gia tăng trong việc chết tế bào. Hệ số làm giàu được sử dụng như một thông số của quá trình chết tế bào và được thể hiện trên trục y như là độ lệch chuẩn +/- trung bình từ các thí nghiệm được thực hiện trùng lặp. Một hệ số làm giàu bằng 1 được coi là đại diện cho quá trình chết tế bào tự nhiên hoặc nền ở vị trí kiểm soát ban đầu.

**Phân tích thống kê.** Tất cả phép tính được thực hiện trong GraphPad Prism 4.0 và SPSS 14.0. Dữ liệu được kiểm tra cho sự phân phối bình thường bằng thử nghiệm Shapiro-Wilk. Tất cả các biến số đều có phân phối Gaussian, và do đó các phân tích tham số đã được khai thác. Các biến số được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn hoặc số đếm, nếu thích hợp. ANOVA một chiều sau khi thử nghiệm so sánh nhiều lần post hoc được sử dụng để phân tích những sự khác nhau liên nhóm. Do tính chất khám phá của nghiên cứu,

không có hiệu chỉnh Bonferroni nào được sử dụng. Ý nghĩa thống kê được xác định tại  $P < 0.05$  bằng cách sử dụng các thử nghiệm hai bên.

**Kết quả**

MED trung bình cho UVR mô phỏng mặt trời là  $59 \pm 10$  mJ/cm<sup>2</sup>. Các MED được ghi lại cho mỗi cá nhân và lịch thí nghiệm được bắt đầu bằng cách sử dụng hệ mô phỏng mặt trời dựa trên MED khởi đầu cho mỗi cá nhân.

**CPDs.** Tác động của một kem chống nắng có hoặc không có photolyase trên sự hình thành CPD sau khi tiếp xúc liên tục với UVR trên da người in vivo được miêu tả trong Hình 1. Sự chiếu xạ liên tục làm tăng đáng kể sự hình thành các CPD trên cả vị trí kiểm soát tích cực chỉ UVR và phương tiện + UVR (cao hơn 19 lần ở cả 2 vị trí so với ban đầu,  $P < 0.001$ ). SS riêng lẻ ngăn ngừa hình thành CPD đáng kể nhưng không hoàn toàn, làm giảm tới 62% ( $P < 0.001$  so với các vị trí kiểm soát tích cực chỉ UVR và phương tiện + UVR). Tuy nhiên, SS dùng ngoài + photolyase ngăn ngừa hình thành CPD tới ~93%, và do đó tốt hơn nhiều so với SS riêng lẻ ( $P < 0.001$ ).

**Chết tế bào.** ELISAPlus Phát hiện Tế bào chết đã được sử dụng để định lượng phân đoạn DNA trong các tế bào chết rụng dựa trên sự phát hiện mono- và oligonucleosomes trong các phần tế bào chất của ly giải tế bào thu được từ sinh thiết da dưới các điều kiện thí nghiệm khác nhau. Như được thể hiện trong Hình 2, sự chiếu xạ liên tục thúc đẩy đáng kể quá trình chết rụng tế bào trong cả hai vị trí kiểm soát tích cực chỉ UVR và phương tiện + UVR (cao hơn 8.1 lần ở cả 2 vị trí so với ban đầu,  $P < 0.001$ ). SS riêng lẻ ngăn ngừa hình thành CPD đáng kể nhưng không hoàn toàn, làm giảm 40% ( $P < 0.001$  so với cả vị trí kiểm soát tích cực chỉ UVR và phương tiện + UVR).



Tuy nhiên, SS + photolyase bôi ngoài da ngăn ngừa quá trình chết rụng tế bào tới ~82% và do đó tốt hơn so với SS riêng lẻ ( $P < 0.001$ ).

## Bàn luận

Sự kích hoạt quang học, trong đó ánh sáng khả kiến được sử dụng để chống lại các tác động có hại của sự tổn thương DNA gây ra bởi UVR, được tìm thấy trong thực vật và nhiều vi sinh vật quang hợp, nhưng không có trong người. Ở loài thú có túi Nam Mỹ (*Monodelphis domestica*), có chứa một loại men quang phân tử CPD nội sinh, sự kích hoạt quang học đã được chứng minh là có tác dụng bảo vệ da và mắt rõ ràng khỏi một số tác động miễn dịch và độc tế bào của UVR. Gần đây, việc dùng ngoài liposome chứa photolyase đã được chứng minh là mang lại một mức độ bảo vệ cao hơn cho da người tiếp xúc với UVR. (18).

Dữ liệu từ nghiên cứu này cho thấy rằng việc bổ sung photolyase vào SS truyền thống cải thiện đáng kể sự bảo vệ chống lại cả các tổn thương DNA do ssUVR lẫn sự chết rụng tế bào apoptotic trong da. Đáng chú ý, mô hình in vivo được sử dụng trong nghiên cứu này bao gồm sự tiếp xúc lặp lại với ssUVR. Vì sự tích tụ của các tổn thương DNA còn sót lại thông qua sự tiếp xúc lặp lại với ssUVR được cho là đóng vai trò chính trong việc phát triển ung thư da, kết quả của chúng tôi chỉ ra rõ ràng rằng các dạng bào chế ngoài da chứa photolyase ưu việt hơn so với kem chống nắng truyền thống trong việc làm giảm ung thư và tổn thương da tiền ung thư cũng như lão hóa da.

Các kết quả của chúng tôi không chỉ xác nhận mà còn mở rộng đáng kể các phát hiện trước đây về sự hữu ích của photolyase đối với việc bảo vệ quang học cho người. Decome cùng cộng sự trước đó đã chỉ ra rằng photolyase kích hoạt quang học UVA bao gồm trong liposomes sửa chữa CPD một cách hiệu quả và làm giảm mức độ phá hủy chuỗi đơn gấp 2.6 tới 3.3 lần sau một liều duy nhất của UVB trong các tế bào keratin người. Ở người, cho đến nay, các dạng bào chế dùng ngoài da chứa photolyase mới chỉ được thử nghiệm trong một số nghiên cứu hạn chế. Stege cùng cộng sự đã thể hiện rằng chế phẩm dùng ngoài da của liposomes chứa photolyase in vivo đối với da được chiếu xạ UVB và tiếp xúc liên tục với ánh sáng kích hoạt quang học làm giảm lượng dimer gây ra do chiếu xạ UVB tới 45-50%. Chú ý, phác đồ được Stege cùng cộng sự sử dụng khác biệt đáng kể so với cái hiện hành. Đầu tiên, trong thí nghiệm của họ, Stege cùng cộng sự đã sử dụng liposomes chứa photolyase mà không có sự bổ sung SS. Thứ hai, trong nghiên cứu hiện tại chúng tôi đã sử dụng một phác đồ chiếu xạ nhiều lần, mô phỏng sự tiếp xúc lâu dài với ánh sáng mặt trời nghiêm ngặt hơn. Những sự khác biệt này trong thiết kế thí nghiệm và trong chế phẩm được sử dụng có thể giải thích tác dụng bảo vệ cao hơn của kem chứa photolyase chống lại sự hình thành CPD in vivo. Thực vậy, sự kết hợp của SS và photolyase gần như loại bỏ hoàn toàn các CPD gây ra bởi chiếu xạ ssUVR. Thêm nữa, sự loại bỏ CPD từ da người được chiếu xạ ssUVR qua việc sử dụng SS cộng với photolyase dẫn đến mức độ bảo vệ cao hơn chống lại sự chết rụng tế bào apoptotic trong da người. Nói chung, UVR không chỉ gây tổn thương DNA trong các tế bào biểu bì, mà còn can thiệp vào cân bằng nội môi của da, được duy trì bởi một cơ chế phân phối đặc trưng của các phân tử ngăn ngừa và kích thích chết tế bào. Nếu tổn thương DNA không được sửa chữa

hay các tế bào bị tổn thương không được loại bỏ bằng quá trình chết rụng tế bào, điều này có thể dẫn tới sự biến đổi tế bào, tăng sinh không kiểm soát và thậm chí là hình thành khối u da. Trong bài viết này, quá trình chết rụng tế bào mang lại một cơ chế bảo vệ hiệu quả chống lại ung thư. Như đã mong đợi, chúng tôi tìm thấy rằng quá trình chết tế bào tăng đáng kể sau khi chiếu xạ lặp lại với SSUVR. Tuy nhiên khi da được tiền điều trị với SS cộng photolyase, quá trình chết tế bào, là kết quả của tổn thương quang học DNA trực tiếp, được giảm tới 82%. Do đó nghiên cứu hiện tại cho thấy rằng sự bổ sung photolyase vào SS bảo vệ chống lại độc quang học do ssUVR bằng cách ức chế tổn thương SNA và sự khởi phát liên quan của chết tế bào apoptotic.

Một số lưu ý của nhận xét công đức nghiên cứu này. Kích thước mẫu nhỏ, và nhân rộng trong một quần thể lớn hơn là cần thiết. Thứ hai, nhóm nghiên cứu đồng nhất về chủng tộc, do đó kết quả có thể không chính xác với các nhóm chủng tộc khác. Thứ ba, chúng tôi không thể loại trừ khả năng có một lượng kem chống nắng riêng lẻ cao hơn được bôi lên da có thể làm giảm hình thành in vivo CPD sâu hơn. Tuy nhiên, khi nghiên cứu được thiết kế, chúng tôi quyết định dùng một phác đồ nghiêm ngặt để cho phép so sánh với các nghiên cứu trước đó. Cường độ sử dụng kem chống nắng được sử dụng trong nghiên cứu này được dùng cho đánh giá SPF (2 mg/cm<sup>2</sup>) và phù hợp với các nghiên cứu trước đây trong phạm vi bảo vệ quang học của kem chống nắng. Cho dù cường độ sử dụng SS riêng lẻ cao hơn có thể làm giảm hình thành CPD sâu hơn và chết rụng tế bào da in vivo nằm ngoài phạm vi báo cáo của chúng tôi, nhưng đáng được xem xét kỹ lưỡng hơn. Thứ tư, nghiên cứu này tập trung vào các tác động phân tử của photolyase. Do đó, chúng tôi không có dữ liệu so sánh trực tiếp giữa photolyase và hệ enzyme sửa chữa DNA khác như T4 endonuclease V. Cơ chế hoạt động của việc sửa chữa DNA của T4 endonuclease V khác biệt đáng kể so với photolyase. T4 endonuclease V hình thành một đường cắt chuỗi đơn trong DNA tại vị trí của CPD trong một cách thức độc lập. Cơ chế cắt bao gồm tác động theo thứ tự của hai hoạt động độc lập của endonuclease V: một glycolase DNA phân cắt liên kết glycosylic của 5'-pyrimidine của một dimer và một apyrimidine endonuclease phân cắt liên kết phosphodiester giữa 2 pyrimidine.

Các giới hạn này còn hạn chế, nghiên cứu này cho thấy rằng photolyase dùng ngoài da được bổ sung vào SS làm giảm tổn thương DNA qua trung gian ssUVR và chết rụng tế bào ngay cả khi ở nồng độ thấp, có tác dụng thẩm mỹ, cho thấy rằng chiến lược này có thể được sử dụng để ngăn ngừa hóa quang học. Do đó, các phát hiện hiện tại mang lại cái nhìn sâu sắc đáng cân nhắc về việc ngăn ngừa ung thư da ở người.

## References

- Marrot L and Meunier JR: Skin DNA photodamage and its biological consequences. *J Am Acad Dermatol* 58 (Suppl 2): 139-148, 2008.
- Ichihashi M, Ueda M, Budiyanoto A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, Tsuru K and Horikawa T: UV-induced skin damage. *Toxicology* 189: 21-39, 2003.
- Batista LF, Kaina B, Meneghini R and Menck CF: How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis. *Mutat Res* 681: 197-208, 2009.
- Rastogi RP, Richa, Kumar A, Tyagi MB and Sinha RP: Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J Nucleic Acids* 2010: 592980, 2010.
- Vink AA and Roza L: Biological consequences of cyclobutane pyrimidine dimers. *J Photochem Photobiol B* 65: 101-104, 2001.
- Durbeej B and Eriksson LA: On the formation of cyclobutane pyrimidine dimers in UV-irradiated DNA: Why are thymines more reactive? *Photochem Photobiol* 78: 159-167, 2003.

7. Assefa Z, van Laethem A, Garmyn M and Agostinis P: Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: on the role of cytosolic factors. *Biochim Biophys Acta* 1755: 90-106, 2005.
8. Lautenschlager S, Wulf HC and Pittelkow MR: Photoprotection. *Lancet* 370: 528-537, 2007.
9. Wang SQ, Balagula Y and Osterwalder U: Photoprotection: a review of the current and future technologies. *Dermatol Ther* 23: 31-47, 2010.
10. Stege H: Effect of xenogenic repair enzymes on photoimmunology and photocarcinogenesis. *J Photochem Photobiol B* 65: 105-108, 2001.
11. Zahid S and Brownell I: Repairing DNA damage in xeroderma pigmentosum: T4N5 lotion and gene therapy. *J Drugs Dermatol* 7: 405-408, 2008.
12. Thoma F: Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair. *EMBO J* 18: 6585-6598, 1999.
13. Sancar A: Structure and function of photolyase and in vivo enzymology: 50th anniversary. *J Biol Chem* 283: 32153-32157, 2008.
14. Garinis GA, Jans J and van der Horst GT: Photolyases: capturing the light to battle skin cancer. *Future Oncol* 2: 191-199, 2006.
15. Decome L, De Méo M, Geffard A, Doucet O, Duménil G and Botta A: Evaluation of photolyase (Photosome) repair activity in human keratinocytes after a single dose of ultraviolet B irradiation using the comet assay. *J Photochem Photobiol B* 79: 101-108, 2005.
16. Weber S: Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase. *Biochim Biophys Acta* 1707: 1-23, 2005.
17. Kort R, Komori H, Adachi S, Miki K and Eker A: DNA apophotolyase from *Anacystis nidulans*: 1.8 Å structure, 8-HDF reconstitution and X-ray-induced FAD reduction. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60: 1205-1213, 2004.
18. Stege H, Roza L, Vink AA, Grewe M, Ruzicka T, Grether-Beck S and Krutmann J: Enzyme plus light therapy to repair DNA damage in ultraviolet-B-irradiated human skin. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1790-1795, 2000.
19. Yarosh DB, Boumakis S, Brown AB, Canning MT, Galvin JW, Both DM, Kraus E, O'Connor A and Brown DA: Measurement of UVB-induced DNA damage and its consequences in models of immunosuppression. *Methods* 28: 55-62, 2002.
20. Sancar GB: Enzymatic photoreactivation: 50 years and counting. *Mutat Res* 451: 25-37, 2000.
21. Ley RD, Applegate LA, Fry RJ and Sanchez AB: Photo-reactivation of ultraviolet radiation-induced skin and eye tumors of *Monodelphis domestica*. *Cancer Res* 51: 6539-6542, 1991.
22. Aragane Y, Kulms D, Metze D, Wilkes G, Pöppelmann B, Luger TA and Schwarz T: Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J Cell Biol* 140: 171-182, 1998.
23. Wu Y, Matsui MS, Chen JZ, Jin X, Shu CM, Jin GY, Dong GH, Wang YK, Gao XH, Chen HD and Li YH: Antioxidants add protection to a broad-spectrum sunscreen. *Clin Exp Dermatol* 36: 178-187, 2011.
24. Erb P, Ji J, Wernli M, Kump E, Glaser A and Büchner SA: Role of apoptosis in basal cell and squamous cell carcinoma formation. *Immunol Lett* 100: 68-72, 2005.
25. Erb P, Ji J, Kump E, Mielgo A and Wernli M: Apoptosis and pathogenesis of melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Adv Exp Med Biol* 624: 283-295, 2008.
26. Massari LP, Kastelan M and Gruber F: Epidermal malignant tumors: pathogenesis, influence of UV light and apoptosis. *Coll Antropol* 31 (Suppl 1): 83-85, 2007.
27. De Fine Olivarius F, Wulf HC, Crosby J and Norval M: Sunscreen protection against cis-urocanic acid production in human skin. *Acta Derm Venereol* 79: 426-430, 1999.
28. Bodekaer M, Faurschou A, Philipsen PA and Wulf HC: Sun protection factor persistence during a day with physical activity and bathing. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 24: 296-300, 2008.

