

28..Haqverdiyev H.T. Geodinamik model of formation of the earthn qlobal deer. (abctrakts) Turtiya-2005.

29.Hagverdiyev A.T. Geodynamics of Earths Crust Evoluton (Theory) 62 Türkiye Jeoloji Kurultayı 13-17 Nisan 2009.

30.Hagverdiyev H.T. Nem Geodinamic Model of the Displacement of Lithspheric Masesses . 62 Türkiye Jeoloji Kurultayı 13-17 Nisan 2009.

31.Haqverdiyev H.T. Kiçik Qafqazın geotektonik inkişafında vulkanizm .Bakı, Bakı, 2004. «şuşa» nəşr. 236 s.

32. HagverdiyevH.T.Global problems of geotectonics. LAMBERT Academic Publishing – 2016. səh. 200.

УДК 577.33/.34;577.355;577.3.32/.36

ВЛИЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ НА УФС-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ЯДЕРНОЙ ДНК В КЕРАТИНОЦИТАХ

DOI: [10.31618/ESU.2413-9335.2020.2.73.661](https://doi.org/10.31618/ESU.2413-9335.2020.2.73.661)

Потапович Алла Ивановна

Ведущий науч сотр кафедры физиологии человека и животных

Албухайдар Ахмед

Аспирант кафедры физиологии человека и животных

Костюк Владимир Андреевич

Профессор кафедры физиологии человека и животных

Белорусский государственный университет,

пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Аннотация. В работе исследованы ответы культивируемых кератиноцитов человека линии HaCaT на воздействие ультрафиолетового излучения (УФИ) диапазона С без и совместно с растительными полифенольными соединениями (РПС). Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о наличии цитопротекторного действия у силибина и акацетина, добавленных в культуральную среду сразу после УФС воздействия. Установлено, что наряду с цитопротекторным действием, оба соединения существенно уменьшают количество одноцепочечных разрывов ДНК в ядрах кератиноцитов линии HaCaT через 2 и 5 ч после воздействия. Сделан вывод, что РПС способны уменьшать деструктивное воздействие УФИ на клетки кожи, снижая количество генетических повреждений.

Abstarct. The work investigated the responses of cultured human keratinocytes to ultraviolet radiation (UVR) in the C range with and without plant polyphenolic compounds (PPs). The experimental data obtained in this work indicate a cytoprotective effect of the PPs added immediately after UVC exposure. It was found that, along with the cytoprotective effect, silibin and acacetin significantly decreased in the number of single-stranded DNA breaks in the nuclei of HaCaT keratinocytes 2 and 5 hours after exposure. It was concluded that PPs are able to reduce the destructive effect of UV radiation on skin cells, reducing the number of genetic damage.

Ключевые слова: УФС; РПС; одноцепочечные разрывы ДНК; ДНК-кометы, кератиноциты HaCaT.

Key words: UVC; PPs; single-strand DNA breaks; DNA comets; HaCaT keratinocytes.

Введение. В тех случаях, когда основной мишенью УФ-излучения является ядерная ДНК, клеточные ответы могут инициироваться в результате появления одноцепочечных разрывов [1]. Одноцепочечные разрывы и образование ковалентной связи между двумя соседними пиримидиновыми основаниями (тиминном или цитозинном) приводят к возникновению димеров пиримидина: циклобутановых димеров (CPDs) и пиримидин-(6, 4)-пиримидиновых фотопродуктов (6-4PPs). В основе циклобутанового димера лежит четырёхуглеродное кольцо, возникающее на месте разрыва двух двойных связей соседних пиримидиновых оснований [2]. CPDs и 6-4PPs возникают при прямом воздействии на ДНК клеток кожи УФС (200 - 280 нм), но могут быть и следствием воздействия УФВ (280 - 320 нм) и УФА (320 - 400 нм), которое опосредовано через активацию процессов образования активных форм кислорода [1]. Таким образом, УФС-индуцированное повреждение клеток кожи является адекватной моделью, воспроизводящей

молекулярно-биологические последствия фотохимических процессов в коже, инициируемых УФИ, и позволяет проводить поиск новых эффективных природных фотопротекторов, способных активировать в клетках репарационные процессы, уменьшая деструктивное воздействие УФИ. Существует большое разнообразие методов исследования повреждений структуры ДНК, однако, чувствительность и специфичность многих из них не достаточны для мониторинга повреждений ДНК, вызванных действием внешних факторов, и выявления генопротекторного эффекта потенциальных фармакологических препаратов. Поэтому большой интерес представляет предложенный в 1984 г. метод «ДНК-комет» (метод гель-электрофореза ДНК отдельных клеток) [3, 4], позволяющий выявлять и анализировать повреждения ДНК как *in vitro*, так и *in vivo*. Используя метод «ДНК-комет» в данной работе, было исследовано влияние растительных полифенолов на УФС-индуцированное

образование одноцепочечных разрывов ДНК в ядрах кератиноцитов.

Материалы и методы исследования. Реактивы и среды. В работе были использованы коммерческие РПС - силибин и акацетин (*Extrasynthese*, Франция). Во всех экспериментах РПС растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Трипсин, среда ДМЕМ, акридиновый оранжевый, этидиум бромид (ЭБ) были приобретены у *Sigma-Aldrich* (Германия), изотонический фосфатный буфер, pH 7,4 (ИФБ) - в фирме *Lonza* (Бельгия), антибиотики - в фирме *Gibco* (США), эмбриональная бычья сыворотка (ЭБС) - в фирме *Capricorn* (Польша).

Клеточные культуры. В качестве объекта исследования использовали культивируемые кератиноциты человека линии HaCaT, подарок доктора N. E. Fusenig (Deutsches Krebsforschungszentrum, Гейдельберг, Германия), являющиеся основным клеточным элементом эпидермиса, естественного барьера, защищающего расположенные ниже слои кожи от внешнего воздействия, в том числе и УФИ.

Моделирование УФС облучения. В данной работе использовали бактерицидную лампу (G 30W Sylvania), 95 % излучения которой является УФС с длиной волны 253,7 нм. Лампа располагалась на расстоянии 10 см от планшета с клетками, обеспечивая интенсивность облучения 1,0 мВт/см².

Исследование влияния УФС на жизнеспособность культивируемых клеток без и в присутствии РПС проводили в 96-луночных планшетах через 24 ч после воздействия. Эксперименты по выявлению одноцепочечных разрывов в ДНК HaCaT, подвергнутых воздействию УФС-излучения, без и с применением РПС проводили в 24-луночных планшетах после достижения 90 - 100 % конfluence монослоя. Непосредственно перед облучением среду заменяли на ИФБ. Сразу после облучения ИФБ заменяли на среду ДМЕМ без сыворотки, содержащую ДМСО (серии Контроль и УФС) или растворы РПС в ДМСО в дозе 50 мкмоль/л (серия УФС + РПС). Клетки культивировались при стандартных условиях (37 °С, 5 % CO₂).

Определение цитотоксического действия УФС без и в присутствии РПС. Количество жизнеспособных клеток определяли с помощью реактива PrestoBlue™ Reagent (*Introvigen*, США) в соответствии с инструкцией. Флуоресценцию образующегося продукта (возбуждение 560 нм, эмиссия 590 нм) измеряли с помощью планшетного флуориметра. Усредненную интенсивность флуоресценции лунок, содержащих контрольные клетки, принимали за 100 %.

Выявление одноцепочечных разрывов в ДНК HaCaT методом ДНК-комет. 50 мкл суспензии контрольных и опытных клеток добавляли к 300 мкл заранее приготовленного 0,7 % раствора легкоплавкой агарозы и наносили смесь на предметные стекла, предварительно покрытые нормальной агарозой. Препараты помещали в лизирующий буфер и выдерживали в темноте 20 ч (4 °С). Последующие денатурацию и электрофорез проводили в щелочной среде (pH 13). Продолжительность электрофореза - 20 мин при напряжении 25 В и силе тока 300 мА. Образцы дважды промывали в нейтрализующем растворе (pH 7,4, 4 °С) и прокрашивали красителем этидиум бромид. Микропрепараты фотографировали, используя флуоресцентный микроскоп.

Статистическая обработка результатов. Обработку полученных результатов производили с использованием стандартной компьютерной программы «Excel». Статистические данные представлены в виде (M ± SD), где M – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение. Для оценки разницы между экспериментальными группами применяли t-критерий Стьюдента, и значения P < 0,05 считались достоверными.

Результаты и обсуждение

Исследование цитотоксического действия УФС на кератиноциты человека линии HaCaT без и в присутствии РПС. Была исследована цитопротекторная активность флаволигнана силибина (рис. 1 а) и флавоноида акацетина (рис. 1 б).

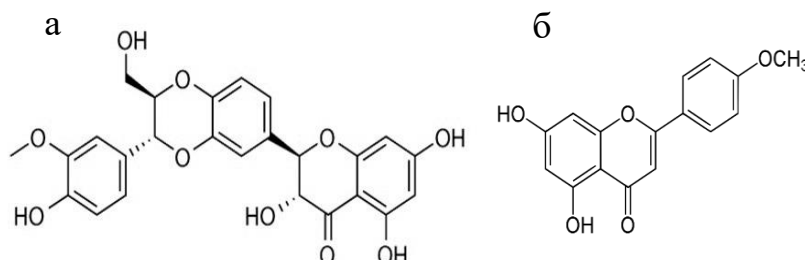


Рис. 1. Структурные формулы исследованных соединений: силибин (а), акацетин (б)

С этой целью РПС добавляли к клеткам сразу после облучения, и они находились в среде при последующей инкубации клеток. Данные, приведенные в таблице 1, свидетельствуют, что оба РПС достоверно увеличивают количество

жизнеспособных кератиноцитов через 24 ч после воздействия в сравнении с УФС-облученными клетками, инкубируемыми без РПС. Вместе с тем, в экспериментах, когда клетки преинкубировали с РПС 30 мин, а их облучение и последующую

инкубацию проводили в среде, не содержащей РПС достоверного увеличения количества

жизнеспособных клеток через 24 ч после облучения не выявлено.

Таблица 1

Влияние УФС (0,06 Дж/см²) на жизнеспособность культивируемых HaCaT через 24 ч после воздействия без и в присутствии РПС (50 мкмоль/л)

Условия эксперимента	Количество клеток, в %	
	Инкубация с РПС после воздействия УФС	Преинкубация с РПС до воздействия УФС
Контроль	100 ± 13,5	100 ± 13,5
УФС	12,8 ± 6,1 ^{***а}	12,8 ± 6,1 ^{***а}
УФС + Ак	39,6 ± 7,6 ^{**b}	15,1 ± 6,2
УФС + Сл	38,5 ± 7,9 ^{**b}	14,7 ± 2,7

^{***а} - P < 0,001 vs контроль; ^{**b} - P < 0,01 vs УФС

Исследования влияния силибина и акацетина на количество одноцепочечных разрывов ядерной ДНК в кератиноцитах, подвергнутых воздействию УФС-излучения в дозе 0,06 Дж/см². Известно, что при прямом воздействии УФС на ДНК в результате быстрых фотохимических процессов происходит повреждение ДНК и образуются CPDs и 6-4PPs. Клеточным ответом на повреждение ДНК является активация механизмов репарации, которые позволяют исправить однонитевые повреждения ДНК, используя в качестве матрицы неповрежденную комплементарную цепь [1]. Однако, при достаточно сильном повреждении полной репарации не происходит, следствием чего является апоптотическая гибель клеток [5]. В предыдущем разделе показано, что РПС достоверно повышают жизнеспособность облученных клеток и снижают их апоптотическую гибель. Поскольку РПС добавляли уже после облучения, и они не могли повлиять на фотохимических процессы повреждения ДНК,

можно сделать вывод, что цитопротекторное действие РПС реализуется на уровне процессов репарации ДНК и внутриклеточного иницирования апоптоза. Следует отметить, что подавление апоптоза в клетках с поврежденным ДНК без устранения этих повреждений связано с высоким риском развития онкологической трансформации. Поэтому при поиске и отборе фармакологических средств, нацеленных на снижение негативного воздействия экспозома, в том числе УФИ, на организм человека, важно оценить способность тестируемых соединений активировать процессы репарации повреждений ДНК. В данной работе с этой целью был использован метод ДНК-комет. Этот метод позволяет визуально оценивать количество однонитевых разрывов после воздействия УФС. На рис. 2 приведены флуоресцентные микрофотографии ДНК-комет, полученных из контрольных клеток HaCaT (рис. 3 а) и клеток через 2 ч (рис. 2 б) и 5 ч (рис. 2в) после воздействия на УФС в дозе 0,06 Дж/см².

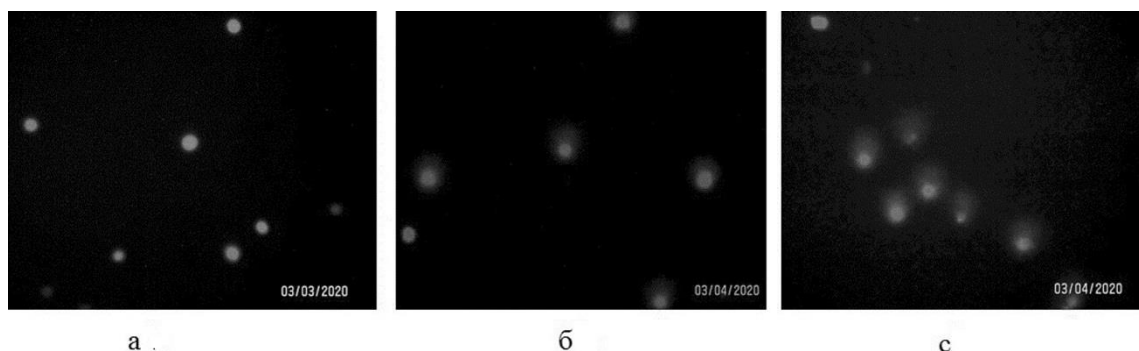


Рис. 2. Репрезентативные флуоресцентные микрофотографии ДНК-комет, полученных из контрольных клеток HaCaT (а) и клеток через 2 ч (б) и 5 ч (в) после воздействия на УФС в дозе 0,06 Дж / см². Окрашивание ЭБ

Полученные микрофотографии ДНК-комет в количестве 100 - 120 для каждого экспериментального условия анализировали визуально и ранжировали на пять категорий в зависимости от количества ДНК в хвосте: 0 - без повреждения (< 5 %); 1 - незначительное повреждение (5 - 20 %), 2 - среднее повреждение

(20 - 40 %); 3 - сильное повреждение (40 - 80 %); 4 - максимальное повреждение (> 80 %). Кометы без головы, также называемые «облаками», не использовались при анализе. Степень поврежденности ДНК выражается как индекс ДНК-комет (ИДК), определяемый по формуле [4]:

$$\text{ИДК} = (0 \times n_0 + 1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3 + 4 \times n_4) / \Sigma,$$

где $n_0 - n_4$ – число ДНК-комет каждой категории, Σ – сумма проанализированных ДНК-комет.

Полученные результаты, характеризующие степень поврежденности ДНК, выраженную как индекс ДНК-комет приведены в таблице 2. Как следует из приведенных данных, величина ИДК существенно возрастает в результате воздействия УФС на кератиноциты. Оба исследованных

соединения достоверно снижали величину ИДК, что указывает на активацию данными соединениями процесса репарации повреждения ДНК. Эти результаты согласуются с полученными нами ранее данными, свидетельствующими, что РПС, в частности акацетин, способны существенно ускорять процесс репарации ДНК на стадии фосфорилирования белка, называемого гистоном H2AX [5].

Таблица 2.

ИДК кератиноцитов линии HaCaT при воздействии УФС-облучения без и с последующим добавлением 50 мкмоль/л РПС

Условия эксперимента	ИДК	
	Время после облучения 2 ч	Время после облучения 5 ч
Контроль	0,13 ± 0,01	0,16 ± 0,01
УФС, 0,06 Дж/см ²	1,57 ± 0,24 ^{***а}	1,88 ± 0,20 ^{***а}
+ силибин	1,11 ± 0,10 ^{**б}	1,59 ± 0,24 ^{**б}
+ акацетин	1,30 ± 0,17 ^{*б}	н/о

^{***а} - P < 0,001 vs контроль; ^{*б} - P < 0,05; ^{**б} - P < 0,01 vs УФС

Заключение

Таким образом, на основании исследования молекулярно-биологических процессов, инициируемых УФС-излучением в кератиноцитах без и в присутствии потенциальных УФ-протекторов, можно заключить, что среди РПС есть соединения, в частности силибин и акацетин, способные уменьшить негативные последствия воздействия экспозомы на генетический материал и тормозить развитие апоптоза клеток кожи, снижая количество одноцепочечных разрывов ДНК в результате активации процесса репарации генетических повреждений.

Библиографические ссылки

1. Farrell A.W., Halliday G.M., Lyons J.G. Chromatin structure following UV-induced DNA damage - Repair or death? // International Journal of Molecular Sciences. 2011. Vol. 12. P. 8063–8085. DOI: 10.3390/ijms12118063.
2. Setlow R.B. Cyclobutane-Type Pyrimidine Dimers in Polynucleotide. // Science. 1966. Vol. 153, No. 3734. P. 379-386. DOI:10.1126/science.153.3734.379.
3. Ostling O., Johanson K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. // Biochemical

and Biophysical Research Communications. 1984. Vol. 123. P. 291–298. DOI:10.1016/0006-291x(84)90411-x

4. Филиппов Э.В. Использование метода «ДНК-комет» для детекции и оценки степени повреждений ДНК клеток организмов растений, животных и человека, вызванных факторами окружающей среды (обзор). // Наука и образование. 2014. № 2. P. 72 – 78. [Filippov E.V. Using the "DNA-comets" method for detection and assessment of the degree of DNA damage to cells of plant, animal, and human organisms caused by environmental factors (review) // Science and Education. 2014. No 2. P. 72 – 78 (InRuss)]

5. Потапович А.И, Сухан Т.О, Албухайдар А., и др. Активация репарации ДНК и подавление апоптоза в кератиноцитах как возможный механизм цитопротекторного действия растительных полифенолов при воздействии УФ-излучения. // Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2019. № 2. С. 29 –35. DOI.org/10.33581/2521-1722-2019-2-29-35 [Potapovich AI, Suhan TO, Albuhaydar A, et al., DNA repair activation and apoptosis suppression in keratinocytes as a possible mechanism of cytoprotective action of plant polyphenols under conditions of UV-irradiation. Journal of the Belarusian State University. Biology. 2019. No 2. P.29 –35. (in Russ.)]