

УДК 577.33/34;577.355;577.3.32/36

СПОСОБНОСТЬ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ СНИЖАТЬ КОЛИЧЕСТВО УФС-ИНДУЦИРОВАННЫХ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ РАЗРЫВОВ ЯДЕРНОЙ ДНК В КЕРАТИНОЦИТАХ

А. И. ПОТАПОВИЧ¹⁾, А. АЛБУХАЙДАР¹⁾, С. В. ГЛУШЕН¹⁾, В. А. КОСТЮК¹⁾

¹⁾*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь*

Исследовано влияние растительных полифенольных соединений (РПС) на жизнеспособность кератиноцитов человека и количество одноцепочечных разрывов ДНК в ядрах этих клеток, подвергнутых воздействию ультрафиолетового излучения диапазона С (УФС). Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что при добавлении силибина и акацетина сразу после УФС-воздействия наряду с цитопротекторным эффектом наблюдается существенное снижение количества одноцепочечных разрывов ДНК в ядрах кератиноцитов линии HaCaT через 2 и 5 ч после облучения. Сделан вывод, что РПС способны уменьшать деструктивное воздействие ультрафиолетового излучения на клетки кожи, сокращая количество генетических повреждений.

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

Образец цитирования:

Потапович АИ, Албухайдар А, Глушен СВ, Костюк ВА. Способность растительных полифенолов снижать количество УФС-индуцированных одноцепочечных разрывов ядерной ДНК в кератиноцитах. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2020;2:84–89. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-2-84-89>

For citation:

Potapovich AI, Albuhaydar A, Gloushen SV, Kostyuk VA. The ability of plant polyphenols to reduce the number of UVC-induced single-stranded nuclear DNA breaks in keratinocytes. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2020;2: 84–89. Russian. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-2-84-89>

Авторы:

Алла Ивановна Потапович – кандидат биологических наук; ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Ахмед Албухайдар – аспирант кафедры физиологии человека и животных биологического факультета. Научный руководитель – В. А. Костюк.

Сергей Витальевич Глушен – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры генетики биологического факультета.

Владимир Андреевич Костюк – доктор химических наук, доцент; заведующий научно-исследовательской лабораторией физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Authors:

Alla I. Potapovich, PhD (biology); leading researcher at the research laboratory of physiology at the department of human and animal physiology, faculty of biology.

pot-alla@rambler.ru

Ahmed Albuhaydar, postgraduate student at the department of human and animal physiology, faculty of biology.

Sergey V. Gloushen, PhD (biology), docent; associate professor at the department of genetics, faculty of biology.

tanyasuhan@mail.ru

Vladimir A. Kostyuk, doctor of science (chemistry), docent; head of the research laboratory of physiology at the department of human and animal physiology, faculty of biology.

kostyuk@bsu.by

THE ABILITY OF PLANT POLYPHENOLS TO REDUCE THE NUMBER OF UVC-INDUCED SINGLE-STRANDED NUCLEAR DNA BREAKS IN KERATINOCYTES

A. I. POTAPOVICH^a, A. ALBUHAYDAR^a, S. V. GLOUSHEN^a, V. A. KOSTYUK^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: V. A. Kostyuk (kostyuk@bsu.by)

The effect of plant polyphenolic compounds (PPs) on the viability of human keratinocytes exposed to ultraviolet (UV) radiation of range C (UVC) and the number of single-stranded DNA breaks in the nuclei of these cells was studied. The experimental data obtained indicate that, along with the cytoprotective effect, the addition of silybin and acacetin immediately after the UVC exposure leads to a significant decrease in the number of single-stranded DNA breaks in the nuclei of HaCaT keratinocytes 2 and 5 h 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.

Keywords: UVC; PPs; single-stranded DNA breaks; DNA comets; HaCaT keratinocytes.

Введение

В тех случаях, когда основной мишенью ультрафиолетового излучения (УФИ) 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 четырехуглеродное кольцо, образующееся на месте разрыва двух двойных связей соседних пиримидиновых оснований [2]. CPDs и 6-4PPs возникают при прямом воздействии на ДНК клеток кожи УФИ коротковолнового диапазона, или УФС (200–280 нм), но могут быть следствием воздействия УФИ средневолнового, или УФВ (280–320 нм), и длинноволнового, или УФА (320–400 нм), диапазонов, которое опосредовано через инициирование процессов образования активных форм кислорода [1]. Таким образом, УФС-индуцированное повреждение клеток кожи является адекватной моделью, воспроизводящей молекулярно-биологические последствия инициируемых УФИ фотохимических процессов в коже, 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 ввиду своей чувствительности и специфичности многие из них недостаточны для мониторинга повреждений ДНК, вызванных действием внешних факторов, и определения генопротекторного эффекта потенциальных фармакологических препаратов. По этой причине 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*. С помощью метода 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 использовались коммерческие растительные полифенольные соединения (РПС) – силибин и акацетин (*Extrasynthese*, Франция). Во всех экспериментах РПС растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Также применялись трипсин, среда ДМЕМ и этидиум бромид (ЭБ) (*Sigma-Aldrich*, Германия), изотонический фосфатный буфер (ИФБ, pH 7,4) (*Lonza*, Бельгия), антибиотики (*Thermo Fisher Scientific*, США), эмбриональная бычья сыворотка (ЭБС) (*Capricorn Scientific*, Германия).

Клеточные культуры. В качестве объекта исследования использовали культивируемые кератиноциты человека линии HaCaT, подарок доктора Н. Е. Фузенига (*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 G30W Sylvania (*Feilo Sylvania*, Германия), 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, как определено калиброванным оптическим УФС-радиометром MS-100 (*UVP Inc.*, Канада).

Исследование влияния УФС на жизнеспособность культивируемых клеток без РПС и в их присутствии проводили в 96-луночных планшетах через 24 ч после облучения. Эксперименты по выявлению одноцепочечных разрывов ДНК в клетках HaCaT, подвергнутых воздействию УФС, без РПС и с их применением проводили в 24-луночных планшетах после достижения 90–100 % конфлюэнтного монослоя. Непосредственно перед облучением среду заменяли на ИФБ. Сразу после облучения ИФБ заменяли на среду ДМЕМ без сыворотки, содержащую ДМСО (контроль и серия 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 РПС и в их присутствии. 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 посредством планшетного флуориметра. Усредненную интенсивность флуоресценции лунок, содержащих контрольные клетки, принимали за 100 %.

Выявление одноцепочечных разрывов ДНК в клетках HaCaT методом ДНК-комет. В ходе эксперимента 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 (рН 13,0). Продолжительность электрофореза – 20 мин при напряжении 25 В и силе тока 300 мА. Образцы дважды промывали в нейтрализующем растворе (рН 7,4, 4 °С) и окрашивали ЭД. Микропрепараты фотографировали цифровой камерой Canon SX130 (Япония), совмещенной с флуоресцентным микроскопом Axiovert 25 (Zeiss, Германия), используя Filter set 15 (EX BP 546/12, BS FT 580, EM LP 590).

Статистическая обработка результатов. Полученные результаты обрабатывали с помощью стандартной компьютерной программы Microsoft Excel. Статистические данные представлялись в виде ($M \pm SD$), где M – среднее арифметическое; SD – стандартное отклонение. Для оценки разницы между экспериментальными группами применяли t -критерий Стьюдента, достоверными считались значения $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

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

С этой целью силибин и акацетин добавляли к клеткам сразу после облучения, и они находились в среде при последующей инкубации клеток. Данные, приведенные на рис. 2, свидетельствуют, что оба соединения достоверно увеличивают количество жизнеспособных кератиноцитов через 24 ч после воздействия УФС в сравнении с облученными клетками, инкубируемыми без РПС.

Исследование влияния силибина и акацетина на количество одноцепочечных разрывов ядерной ДНК в кератиноцитах, подвергнутых воздействию УФС 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 одностранные разрывы ДНК, используя в качестве матрицы неповрежденную комплементарную цепь [1]. Однако при достаточно сильном повреждении полной репарации не происходит, следствием чего становится 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

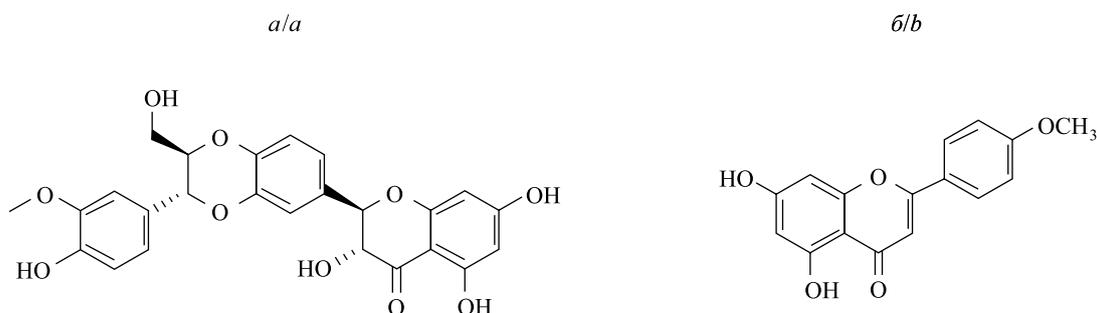


Рис. 1. Структурные формулы исследованных соединений: а – силибин; б – акацетин
Fig. 1. The structure of the investigated compounds: a – silybin; b – acacetin

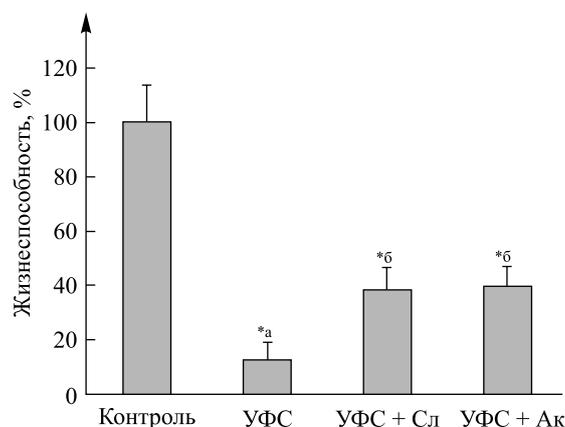


Рис. 2. Жизнеспособность клеток NaCaT, инкубируемых 24 ч после воздействия УФС (0,06 Дж/см²) в среде без РПС и в присутствии 50 мкмоль/л силибина (Сл) и акацетина (Ак).
*^а – $p < 0,0001$ относительно контроля; *^б – $p < 0,001$ относительно УФС
Fig. 2. Viability of NaCaT cells incubated 24 h in medium without PPs and medium with silybin (Сл) or acacetin (Ак) at a concentration of 50 $\mu\text{mol/L}$ after exposure to UVC at a dose of 0.06 J/cm^2 .
*^а – $p < 0.0001$ relative to the control; *^б – $p < 0.001$ relative to the UVC

и они не могли повлиять на фотохимические процессы повреждения ДНК, можно сделать вывод, что цитопротекторное действие РПС реализуется на уровне процессов репарации ДНК и внутриклеточного инициирования апоптоза. Следует отметить, что подавление апоптоза в клетках с поврежденной ДНК без устранения этих повреждений связано с высоким риском развития онкологической трансформации, поэтому при поиске и отборе фармакологических средств, направленных 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. Он позволяет визуально оценивать количество односторонних разрывов после воздействия УФС. На рис. 3 приведены флуоресцентные микрофотографии ДНК-комет, полученных из контрольных клеток NaCaT (см. рис. 3, а) и клеток через 2 ч (см. рис. 3, б) и 5 ч (см. рис. 3, в) после воздействия УФС в дозе 0,06 Дж/см².



Рис. 3. Репрезентативные флуоресцентные микрофотографии ДНК-комет, полученных из контрольных клеток NaCaT (а) и клеток через 2 ч (б) и 5 ч (в) после воздействия УФС в дозе 0,06 Дж/см². Окрашивание ЭБ
Fig. 3. Representative fluorescent micrographs of DNA comets from control NaCaT cells (a) and cells 2 h (b) and 5 h (c) after exposure to UVC at a dose of 0.06 J/cm^2 . Staining EB

Полученные микрофотографии ДНК-комет в количестве 100–120 шт. для каждого экспериментального условия анализировали визуально и ранжировали на пять категорий в зависимости от доли ДНК в хвосте (рис. 4): категория 0 – без повреждения (менее 5 %); категория 1 – незначительное повреждение (5–20 %); категория 2 – среднее повреждение (20–40 %); категория 3 – сильное повреждение (40–80 %); категория 4 – максимальное повреждение (более 80 %). Кометы без головы, также называемые облаками, не использовали при анализе.

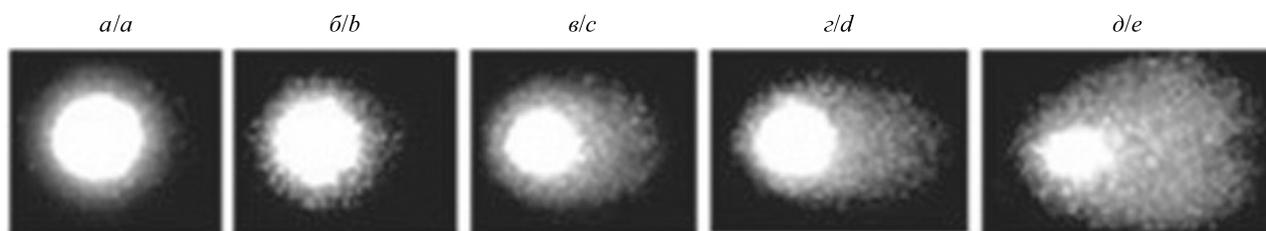


Рис. 4. ДНК-кометы клеток с различной степенью поврежденности ДНК:
а – категория 0; б – категория 1; в – категория 2; г – категория 3; д – категория 4
Fig. 4. DNA comets of cells with various degree of DNA damage:
а – category 0; б – category 1; в – category 2; г – category 3; д – category 4

Степень поврежденности ДНК выражается как индекс ДНК-комет (ИДК), определяемый по формуле [4]

$$\text{ИДК} = \frac{0 \cdot n_0 + 1 \cdot n_1 + 2 \cdot n_2 + 3 \cdot n_3 + 4 \cdot n_4}{\Sigma}$$

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

Полученные результаты, характеризующие степень поврежденности ДНК, выраженную как ИДК, представлены в таблице. Как видно из приведенных данных, величина ИДК существенно возрастает при воздействии УФС на кератиноциты. Оба исследованных соединения достоверно снижали ИДК, что указывает на активацию ими 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].

ИДК кератиноцитов линии HaCaT при воздействии УФС в дозе 0,06 Дж/см² без РПС и с последующим добавлением 50 мкмоль/л РПС

IDC of keratinocytes HaCaT after exposure to UVC at a dose of 0.06 J/cm² without PPs and with following incubation 50 μmol/L PPs

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

Примечание. ^{**а} – $p < 0,001$ относительно контроля; ^{*б} – $p < 0,01$; ^{**б} – $p < 0,001$ относительно УФС; н/о – значение не определено.

Заключение

Таким образом, на основании исследования молекулярно-биологических процессов, инициируемых УФС в кератиноцитах без потенциальных УФ-протекторов и в их присутствии, можно заключить, что среди РПС есть соединения, в частности силибин и акацетин, способные уменьшать 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 AW, Halliday GM, Lyons JG. Chromatin structure following UV-induced DNA damage – repair or death? *International Journal of Molecular Sciences*. 2011;12(11):8063–8085. DOI: 10.3390/ijms12118063.
2. Setlow RB. Cyclobutane-type pyrimidine dimers in polynucleotides. *Science*. 1966;153(3734):379–386. DOI: 10.1126/science.153.3734.379.
3. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1984;123(1):291–298. DOI: 10.1016/0006-291X(84)90411-X.

4. Филиппов ЭВ. 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;2:72–78.
5. Потапович АИ, Сухан ТО, Албухайдар А, Шман ТВ, Ермилова ТИ, де Люка К, Костюк ВА. 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;2:29–35. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-2-29-35.

References

1. Farrell AW, Halliday GM, Lyons JG. Chromatin structure following UV-induced DNA damage – repair or death? *International Journal of Molecular Sciences*. 2011;12(11):8063–8085. DOI: 10.3390/ijms12118063.
2. Setlow RB. Cyclobutane-type pyrimidine dimers in polynucleotides. *Science*. 1966;153(3734):379–386. DOI: 10.1126/science.153.3734.379.
3. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1984;123(1):291–298. DOI: 10.1016/0006-291X(84)90411-X.
4. Filippov EV. [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)]. *Nauka i obrazovanie*. 2014;2:72–78. Russian.
5. Potapovic AI, Suhan TO, Albuhaydar A, Shman TV, Ermilova TI, de Luca C, Kostyuk VA. 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;2:29–35. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-2-29-35.

Статья поступила в редколлегию 20.04.2020.
Received by editorial board 20.04.2020.