

## ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ ОТВЕТОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

В.А. Костюк, А.И. Потапович

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

e-mail: kostyuk@bsu.by

### Введение

Общепризнанно, что ультрафиолетовое излучение (УФИ) является основным природным фактором, ответственным за множество патологических образований на коже, включая солнечную эритему, преждевременное старение и рак [1–3]. Уменьшение озонового слоя стратосферы приводит к тому, что земной поверхности достигает большее количество ультрафиолетовой радиации. Накопленные за последние годы данные многочисленных исследований подтверждают концепцию о том, что множество вредных эффектов УФИ обусловлено активными формами кислорода (АФК), такими как синглетный кислород, супероксид радикалы и гидроксил радикал [4–7]. Еще одной причиной повреждения тканей при воздействии УФИ является воспаление, которое также играет важную роль в развитии рака кожи. Оно возникает как вследствие гиперпродукции активных форм кислорода и перекисного окисления в клеточных мембранах, так и в результате секреции кератиноцитами воспалительных цитокинов (интерлейкин 6, интерлейкин 1 $\alpha$ , фактор некроза опухолей  $\alpha$ ) и увеличения продукции ферментом простагландинсинтетаза простагландинов, которые привлекают в место воспаления макрофаги и нейтрофилы. Образование цитотоксичных агентов при воспалении является проявлением защитной функции организма, направленной на устранение (уничтожение) болезнетворного агента при минимальном повреждении собственных клеток и тканей. Однако воздействие на организм некоторых физико-химических факторов сопровождается обширным некрозом тканей в очаге воспаления и провоцирует процесс хронического воспаления [8]. Если острое воспаление носит выраженный адаптивный характер, то хроническое воспаление, напротив, это патология, которая является основой для развития онкологических, сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний. Таким образом, местное применение или пероральный приём антиоксидантов наряду с широко известными физическими и химическими средствами фотозащиты, являются многообещающей стратегией по снижению вредных эффектов УФИ. Целью данной работы явилось исследование возможности использования растительных полифенольных соединений (РПС) для коррекции клеточных ответов при воздействии ультрафиолетового излучения.

### Методы исследования

*Реактивы.* Соли, растворители, трипсин, детергенты, РПС: вербаскозид (Вб), кверцетин (Кв), рутин (Рут), полидатин (Пд) приобретены у фирмы *Sigma-Aldrich*, ресвератрол (Рв) у фирмы *BioMol* (Италия). Во всех экспериментах полифенолы растворяли в диметилсульфоксиде.

*Общая схема проведения экспериментов.* В работе использовали клеточную линию кератиноцитов *ННЕК*, полученную из биопсии кожи здоровых доноров. Кусочки кожи отмывали изотоническим фосфатным буфером (ИФБ) и обрабатывали смесью 0,05% трипсина и 0,01% натриевой соли этилендиамина тетраацетата при 37°C в течение 3 часов. Клетки собирались каждые 30 мин и помещались в 6-луночные планшеты в количестве 4x10<sup>4</sup>/см<sup>2</sup>. *ННЕК* культивировали в стандартных условиях (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) в ростовой среде КРС: (KGM-Gold™ BulletKit™, Lonza, Бельгия).

Экспозицию с исследуемыми соединениями (Вб, Рут, 50 мкмоль/л; Кв, Рв, Пд, 10 мкмоль/л) проводили в 6-луночных планшетах в среде KBM-Gold (Keratinocyte Basal Medium Gold), в течение 30 мин. Затем среду с РПС заменяли на ИФБ и подвергали клетки

воздействию УФИ (УФА 1 Дж/см<sup>2</sup> + УФБ 0,1 Дж/см<sup>2</sup>), используя симулятор солнечного излучения (Dermalight Vario Dr. Hoehnle AG, UV Technology, Planegg, Германия). После УФ-воздействия возвращали среду с РПС и инкубировали клетки в течение 6 часов.

Общая РНК была выделена, используя набор реактивов GenElute<sup>™</sup> Mammalian Total RNA Kit (Sigma- Aldrich, Милан, Италия), в соответствии с инструкцией. Количество РНК определяли спектрофотометрически по поглощению при 260 нм. Отношение поглощения 260:280 во всех образцах было в пределах 1,8–2,1.

*Определение внутриклеточной продукции монооксида азота и пероксидов.* Нормальные кератиноциты высевали в 96-луночные планшеты. После достижения полного монослоя клетки нагружали в течение 30 мин 2,5 мкмоль/л DAF-2DA (зонд NO) или 10 мкмоль/л дигидрородамина (зонд ROOH) и затем подвергали воздействию УФИ (УФА 2,5 Дж/см<sup>2</sup>+УФБ 0,25 Дж/см<sup>2</sup>) без или в присутствии РПС. Через 60 мин после облучения культуральную среду заменяли на ИФБ и измеряли флуоресценцию клеточного слоя (возбуждение 485 нм, эмиссия 535 нм) с помощью планшетного флуориметра. С контрольными образцами выполнялись те же процедуры, исключая воздействие УФИ.

*Анализ экспрессии мРНК* проводили методом ПЦР в реальном времени детектором Real-Time PCR Detector Chromo4 Four-Color (Bio-Rad, США). Реакционная смесь включала в себя интеркалирующий краситель SYBR Green (Fermentas, Литва), пассивный краситель ROX, термостабильную реакционную смесь Riality™, содержащую Taq-полимеразу, дНТФ, MgCl<sub>2</sub>, ПЦР-буфер, праймеры и матрицу (ДНК). Реакции проводили в объёме 25 мкл в стандартных 96-луночных оптических планшетах (Sarstedt AG, Германия). Температурный профиль реакции: 95°C – 15 с, 60°C – 1 мин; 36 циклов. Продукты ПЦР проверяли на специфичность методом кривой плавления. Результаты полимеразной цепной реакции оценивали с помощью сравнительного Ct метода ( $\Delta\Delta Ct$ ). Экспрессию генов-мишеней нормализовали по стабильным генам  $\beta$ -актин и GAPDH и представляли как относительное увеличение экспрессии в опытных клетках по сравнению с контрольными.

Все праймеры были разработаны при помощи интернет-ресурса Primer-BLAST (NCBI): <http://ncbi.nlm.nih.gov> и синтезированы в Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Германия).

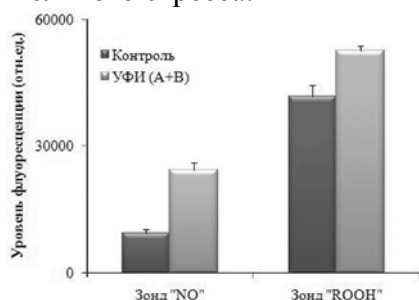
*Статистическая обработка результатов.* Статистическую обработку результатов производили с использованием стандартной компьютерной программы «Excel». Статистические данные представлены в виде  $M \pm SD$ , где  $M$  – среднее арифметическое,  $SD$  – стандартное отклонение.

### **Результаты и обсуждение**

*Влияние УФИ на продукцию монооксида азота и суммарных пероксидов в культивируемых кератиноцитах.* Продукцию внутриклеточных пероксидов оценивали флуориметрически, используя дигидрородамин. Дигидрородамин, соединение не обладающее флуоресцентными свойствами. Однако в живых клетках он, в результате окисления различными пероксидами, в первую очередь пероксинитритом, превращается в сильно флуоресцентный родамин. Количество образующегося родамина и, следовательно, степень флуоресценции зависят от внутриклеточной концентрации пероксидов. Чем больше в клетке пероксидов, тем выше относительный уровень родаминовой флуоресценции. Внутриклеточный уровень монооксида азота определяли с помощью флуоресцентного зонда DAF-2 DA. Проникая в клетки, этот краситель легко взаимодействует с N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, промежуточным продуктом окислительного превращения NO, превращаясь в DAF-2T, который обладает сильной зеленой флуоресценцией. Как и в случае анализа пероксидов чем выше уровень флуоресценции клеток, тем больше внутриклеточное содержание монооксида азота.

Как видно из данных, приведенных на рисунке 1, облучение кератиноцитов УФИ приводит к существенному увеличению в них внутриклеточного уровня монооксида азота

и пероксидов, что свидетельствует о том, что клетки находятся в состоянии окислительного стресса.



Уровень флуоресценции клеток нагруженных 2,5 мкмоль/л DAF-2DA (зонд NO) или 10 мкмоль/л дигидрородамина (зонд ROOH) без (контроль) и через 1 ч после воздействия УФИ (УФА 2,5 Дж/см<sup>2</sup>+УФВ 0,25 Дж/см<sup>2</sup>).

Рисунок 1 – Влияние ультрафиолетового излучения на продукцию в культивируемых кератиноцитах монооксида азота и пероксидов

*Влияние УФИ на уровень экспрессии мРНК воспалительных медиаторов.* Оптимальное время экспозиции (30 с), доза УФИ (УФА 1,0 Дж/см<sup>2</sup>+УФВ 0,1 Дж/см<sup>2</sup>) и продолжительность временного интервала от облучения до низкотемпературной (-80°C) фиксации клеток, т.е. продолжительность постэкспозиции (6 ч) были определены в предварительных исследованиях. Используя данные экспериментальные условия, было исследовано влияние УФИ на относительный уровень экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов – ФНО $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , хемокинов – ИЛ-8 и MCP1, белка адгезии ICAM1, обеспечивающих развитие воспалительного процесса, привлечение и удержание в области воспаления иммунокомпетентных клеток. Было также исследовано влияние УФИ на уровень экспрессии ферментов, участвующих в развитии воспалительного процесса – простагландинсинтетазы (COX2), матриксных протеиназ MMP1, MMP9 и ключевых ферментов клеточной системы детоксикации – CYP1A1 и CYP1B1. Как видно из данных, приведенных в таблице 1, кратковременное облучение кератиноцитов УФИ приводит к существенному (в 2–8 раз) увеличению экспрессии мРНК ряда провоспалительных медиаторов: ФНО $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-8, COX2 и некоторому снижению экспрессии противовоспалительного белка ИЛ-1P1. Воздействие УФИ приводит также к увеличению экспрессии мРНК ферментов CYP1A1 и CYP1B1, что свидетельствует об активации сигнальных путей, опосредованных арил углеводным рецептором (AhR). Известно, что AhR, который называют сенсором ксенобиотиков, активирует пути сигнальной трансдукции, заканчивающиеся на регуляторных элементах многочисленных генов, кодирующих ферменты для фазы I и II детоксикации (CYP1, GST).

Таблица 1 – Относительный уровень экспрессии мРНК воспалительных медиаторов в нормальных кератиноцитах через 6 ч после воздействия УФИ (УФА 1,0 Дж/см<sup>2</sup>+0,1 УФВ Дж/см<sup>2</sup>)

Анализируемый медиатор	Контрольные клетки (без воздействия УФИ)	Клетки облученные УФИ
ФНО $\alpha$	1,0 $\pm$ 0,05	1,6 $\pm$ 0,30*
ИЛ-6	1,0 $\pm$ 0,05	8,0 $\pm$ 1,60**
ИЛ-8	1,0 $\pm$ 0,05	5,8 $\pm$ 1,30**
COX2	1,0 $\pm$ 0,05	4,2 $\pm$ 1,00**
ИЛ-1 $\alpha$	1,0 $\pm$ 0,05	1,2 $\pm$ 0,30
ИЛ-1 $\beta$	1,0 $\pm$ 0,05	2,2 $\pm$ 0,05*
ИЛ-1P1	1,0 $\pm$ 0,05	0,7 $\pm$ 0,05*
MCP1	1,0 $\pm$ 0,05	0,9 $\pm$ 0,10
MMP1	1,0 $\pm$ 0,05	0,8 $\pm$ 0,20
MMP9	1,0 $\pm$ 0,05	0,9 $\pm$ 0,20
ICAM1	1,0 $\pm$ 0,05	0,7 $\pm$ 0,20*
CYP1A1	1,0 $\pm$ 0,05	1,6 $\pm$ 0,30*
CYP1B1	1,0 $\pm$ 0,05	2,8 $\pm$ 0,40**

Примечание: \* – P<0,05; \*\* – P<0,01 по отношению к контролю.

*Влияние УФИ на продукцию нормальными кератиноцитами ФНО $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ-8.*

Увеличение экспрессии мРНК, как правило, приводит к увеличению скорости синтеза белка, кодируемого данной конкретной мРНК. Однако содержание такого белка в клетке и тем более количество секретируемого клеткой сигнального белка, в частности цитокина, зависит от целого ряда других факторов. Поэтому представляло интерес выяснить влияние УФИ не только уровень экспрессии мРНК воспалительных медиаторов, но и на их секрецию клеткой. С этой целью методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) было исследовано содержание ФНО $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ-8 в культуральной среде облученных и не облученных УФИ кератиноцитов. Полученные данные приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Содержание ФНО $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ-8 в культуральной среде облученных и не облученных УФИ кератиноцитов через 18 ч после воздействия

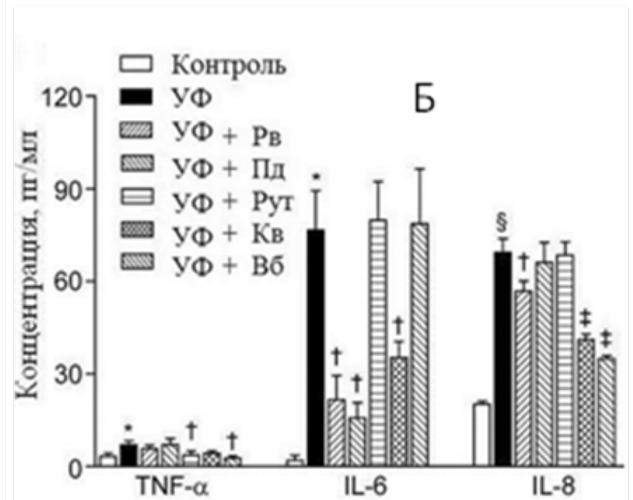
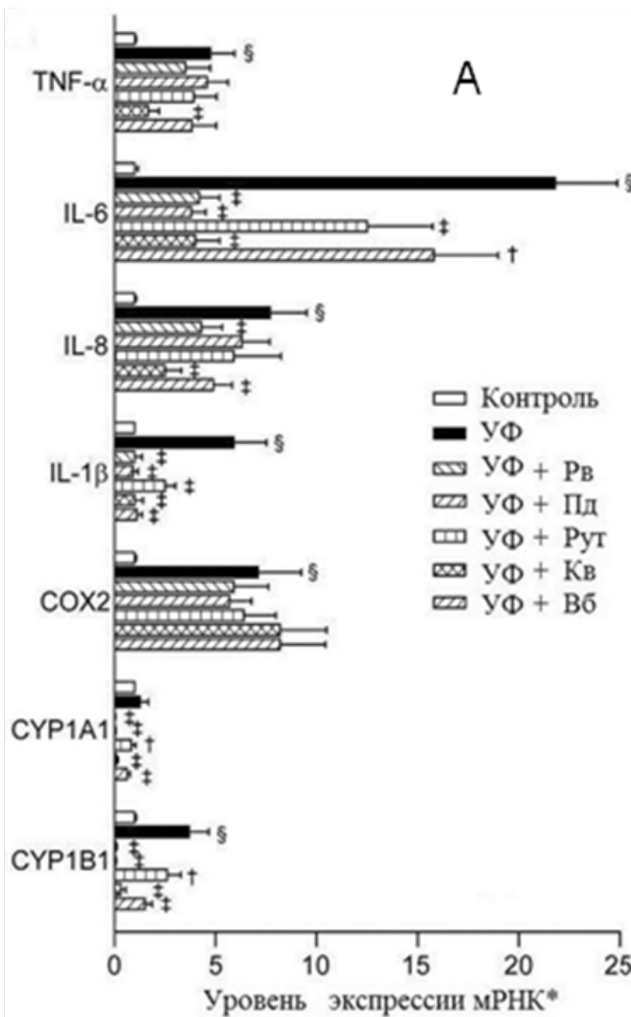
Анализируемый медиатор	Содержание цитокинов в культуральной среде, пикограмм/мл	
	Контрольные клетки (без воздействия УФИ)	Клетки облученные УФИ
ФНО $\alpha$	3,3 $\pm$ 1,1	7,0 $\pm$ 1,3*
ИЛ-6	2,0 $\pm$ 1,5	76,0 $\pm$ 15,6**
ИЛ-8	20,2 $\pm$ 1,0	69,3 $\pm$ 4,5**

Примечание: \* – P<0,05; \*\* – P<0,01 по отношению к контролю.

Как следует из данных, приведенных в таблице 2, через 18 ч после воздействия УФИ на нормальные кератиноциты человека наблюдается существенное увеличение секреции цитокинов в культуральную среду по сравнению с необлученными клетками. Таким образом, данные по продукции и секреции белка, полученные методом твердофазного иммуноферментного анализа находится в хорошем соответствии с данными по экспрессии мРНК, полученными методом ПЦР в реальном времени.

*Исследование влияния РПС на степень УФ-индуцированной экспрессии ключевых воспалительных медиаторов.*

В данном разделе было исследовано влияние РПС на уровень экспрессии ключевых воспалительных медиаторов как на уровне мРНК (рисунок 2А), так и на белковом уровне (рисунок 2Б). Установлено, что все исследованные РПС существенно снижают экспрессию мРНК провоспалительных медиаторов. Наиболее сильное противовоспалительное действие оказывал кверцетин, который существенно уменьшал УФ-индуцированную гиперэкспрессию мРНК всех исследованных медиаторов, исключая экспрессию СОХ2. Кверцетин также достоверно снижал секрецию кератиноцитами ИЛ-6 и ИЛ-8. Наименьшей противовоспалительной эффективностью обладал рутин, снижавший только УФ-индуцированную гиперэкспрессию мРНК ИЛ-6 и ИЛ-1 $\beta$ .



Уровень экспрессии мРНК через 6 ч (А) и содержание цитокинов в культуральной среде через 18 ч (Б) после воздействия УФИ (УФА 1,0 Дж/см<sup>2</sup>+УФВ 0,1 Дж/см<sup>2</sup>) без и в присутствии РПС: ресвератрол, полидатин, кверцетин – 10 мкмоль/мл, рутин, вербаскозид – 50 мкмоль/мл.

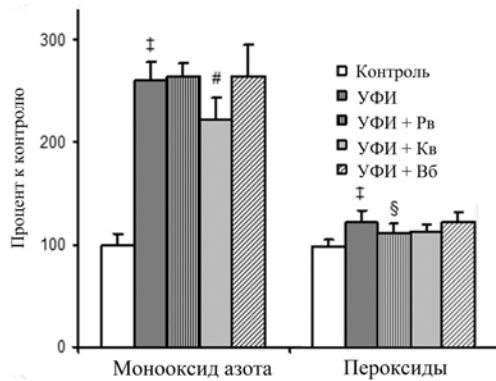
Рисунок 2 – Влияние РПС на экспрессию мРНК и секрецию медиаторов воспаления после воздействия УФИ на культивируемые кератиноциты

\* –  $p < 0,05$ ; † –  $p < 0,01$ , ‡ –  $p < 0,001$  vs контроль; § –  $p < 0,01$ , †† –  $p < 0,001$  vs УФ

Наряду с подавлением продукции провоспалительных цитокинов все исследованные полифенолы снижали УФ-индуцированную гиперэкспрессию CYP1A1 и CYP1B1. При этом кверцетин и ресвератрол снижали уровень экспрессии мРНК CYP1A1 и CYP1B1 значительно ниже базального уровня (рисунок 2А).

#### Исследование влияния РПС и УФИ на внутриклеточный уровень NO и пероксидов

В предыдущем разделе было показано, что воздействие УФИ вызывает увеличение внутриклеточной концентрации пероксидов и монооксида азота. Известно, что оксидативный стресс может опосредовать развитие воспаления. Принимая во внимание, что РПС оказывают выраженный противовоспалительный эффект, существенно уменьшая уровень УФ-индуцированной экспрессии воспалительных медиаторов, мы предположили, что этот эффект может быть обусловлен их антиоксидантным (препятствующим образованию NO и пероксидов) действием. В связи с этим была проведена серия экспериментов с целью установить влияют ли РПС на эффекты УФИ в отношении внутриклеточного уровня NO и пероксидов. Результаты данных исследований приведены на рисунке 3.



Внутриклеточное содержание монооксида азота (клетки нагружены 2,5 мкмоль/л DAF-2DA) и пероксидов (клетки нагружены 10 мкмоль/л дигидрородамина) в процентах к контролю через 1 ч после воздействия УФИ (УФА 2,5 Дж/см<sup>2</sup>+УФВ 0,25 Дж/см<sup>2</sup>) без и после 30 мин преинкубации с РПС: Рв, Кв – 10 мкмоль/мл, Вб – 50 мкмоль/мл

Рисунок 3 – Влияние РПС и УФИ на внутриклеточный уровень NO и пероксидов

Как видно из рисунка преинкубация кератиноцитов с РПС в течение 30 мин не вызывает существенного влияния на гиперпродукцию NO и пероксидов, индуцированную УФИ. Таким образом, можно заключить, что УФ-индуцированная продукция NO и пероксидов не является звеном, в результате воздействия на которое реализуется действие РПС на УФ-вызванные воспалительные ответы кератиноцитов.

### Выводы

Используя культивируемые кератиноциты человека для моделирования воздействия солнечного УФИ на кожу, установлено:

- механизмы поддержания оксидантного гомеостаза и сигнальные пути, опосредующие увеличение экспрессии мРНК и секреции воспалительных медиаторов могут быть мишенью фотозащитного действия фармакологических препаратов;
- растительные полифенольные соединения существенно уменьшают воспалительный ответ клеток кожи, вызванный воздействием УФ-облучения.

### Список литературы

1. Matsui, M.S. Longwave ultraviolet radiation and promotion of skin cancer / M.S. Matsui, V.A. DeLeo // *Cancer Cells*. – 1991, – Vol. 3. – P. 8–12.
2. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging / K. Scharffetter-Kochanek et al. // *Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 378. – P. 1247–1257.
3. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light / G.J. Fisher et al. // *J. Med.* – 1997. – Vol. 337. – P. 1419–1428.
4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is an important mediator of UVB induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes / D. Peus et al. // *J. Invest. Dermatol.* – 1998. – Vol. 110. – P. 966–971.
5. Darr, D. Free radicals in cutaneous biology / D. Darr, I. Fridovich // *J. Invest. Dermatol.* – 1994. – Vol. 102. – P. 671–675.
6. Superoxide anion is generated from cellular metabolites by solar radiation and its components / M.L. Cunningham et al. // *J. Free Radic. Biol. Med.* – 1985. – Vol. 1. – P. 381–385.
7. Hanson, K.M. Observation and quantification of ultraviolet-induced reactive oxygen species in ex vivo human skin / K.M. Hanson, R.M. Clegg // *Photochem. Photobiol.* – 2002. – Vol. 76. – P. 57–63.
8. Activated neutrophils induce prolonged DNA damage in neighboring cells / E. Shacter et al. // *Carcinogenesis*, – 1988. – Vol. 9. – P. 2297–2304.