

УДК 577.33/34;577.355;577.3.32/36

КЛЕТОЧНЫЕ ОТВЕТЫ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ДОЗ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И ИХ МОДУЛЯЦИЯ РАСТИТЕЛЬНЫМИ ПОЛИФЕНОЛАМИ

А. АЛБУХАЙДАР¹⁾, А. И. ПОТАПОВИЧ¹⁾, В. А. КОСТЮК¹⁾, Л. Г. КОРКИНА²⁾

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

²⁾Центр инновационных биотехнологических исследований «Нанолаб», проезд Одоевского, 3, корп. 7, 117574, г. Москва, Россия

Исследованы ответы культивируемых клеток человека – кератиноцитов и фибробластов – на воздействие физиологических доз ультрафиолетового излучения без растительных полифенольных соединений и совместно с такими из них, как рутин, кверцетин, таксифолин, силибин и байкалеин. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о наличии синергизма в действии физиологических доз ультрафиолетового излучения и указанных соединений на воспалительные сигнальные пути в кератиноцитах и фибробластах. Сделан вывод, что выявленный синергизм, способствуя адаптации кожи к последующему воздействию ультрафиолета, может быть одним из механизмов фотозащитного действия растительных полифенольных соединений.

Ключевые слова: ультрафиолетовое излучение; растительные полифенольные соединения; медиаторы воспаления; кератиноциты; фибробласты.

CELL RESPONSES TO THE IMPACT OF PHYSIOLOGICAL DOSES OF ULTRAVIOLET RADIATION AND THEIR MODULATION BY PLANT POLYPHENOLS

A. ALBUHAYDAR^a, A. I. POTAPOVICH^a, V. A. KOSTYUK^a, L. G. KORKINA^b

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

^bCentre for Innovative Biotechnological Investigations «Nanolab»,
3 Odоеvsky Passage, 7 building, Moscow 117574, Russia

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

In this study it was investigated the responses of cultured human cells – keratinocytes and fibroblasts to physiological doses of ultraviolet radiation (UVR) applied with or without plant polyphenolic compounds: rutin, quercetin, taxofolin,

Образец цитирования:

Албухайдар А, Потапович АИ, Костюк ВА, Коркина ЛГ. Клеточные ответы на воздействие физиологических доз ультрафиолетового излучения и их модуляция растительными полифенолами. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;2:13–21. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-13-21>

For citation:

Albuhaydar A, Potapovich AI, Kostyuk VA, Korkina LG. Cell responses to the impact of physiological doses of ultraviolet radiation and their modulation by plant polyphenols. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;2:13–21. Russian. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-13-21>

Авторы:

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

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

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

Людмила Георгиевна Коркина – доктор медицинских наук; профессор.

Authors:

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

Alla I. Potapovich, PhD (biology); leading researcher at the research laboratory of physiology, department of human and animal physiology, faculty of biology.
pot-alla@rambler.ru

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

Lyudmila G. Korkina, doctor of science (medicine); full professor.
korkina@cibi-nanolab.com

silybin and baicalein. Experimental data obtained in this work indicate the presence of synergism in the action of physiological doses of UVR and plant polyphenolic compounds on inflammatory signaling pathways in keratinocytes and fibroblasts. It is concluded that the identified synergies can contribute to the adaptation of the skin to subsequent exposure to UVR, and thus be one of the photoprotective mechanisms of the plant polyphenolic compounds.

Keywords: ultraviolet radiation; plant polyphenolic compounds; inflammatory mediators; keratinocytes; fibroblasts.

Введение

В зависимости от интенсивности воздействия на кожу солнечный ультрафиолет оказывает как благотворное, так и негативное влияние на организм человека. Общеизвестно, что под действием солнечной УФ-радиации в коже инициируется процесс образования из холестерина холекальциферола (витамина Д3), необходимого для всасывания кальция в кишечнике и обеспечения нормального развития костной ткани. Вместе с тем избыточное воздействие ультрафиолета является основным природным фактором, ответственным за множество патологических нарушений в коже, включая солнечную эритему, преждевременное старение и рак [1–3]. Важную роль в этих процессах играют кератиноциты кожи, которые формируют многослойный эпителий (эпидермис) и в наибольшей степени подвержены воздействию солнечного ультрафиолетового излучения (УФИ). В многочисленных исследованиях установлено, что кератиноциты в ответ на солнечную УФ-радиацию производят воспалительные медиаторы, в том числе простагландины, хемокины, цитокины и молекулы адгезии, которые, в свою очередь, активируют иммунокомпетентные клетки, продуцирующие в области формирующегося воспаления большое количество оксида азота, супероксида, H_2O_2 и гипохлорита [4–7].

В последние годы возрос интерес к исследованиям последствий воздействия солнечного УФИ на фибробласты – клеточный элемент расположенной под эпидермисом соединительно-тканной части кожи, т. е. дермы, в которую проникает 20–30 % УФИ длинноволнового диапазона, или УФА (320–400 нм), и почти 10 % – средневолнового, или УФВ (280–320 нм) [8]. Имеющиеся экспериментальные данные свидетельствуют, что преждевременное старение кожи под воздействием солнечного света обусловлено уменьшением в дерме количества фибробластов, а также снижением их функциональной активности. В результате резко падает содержание волокон коллагена и эластина, обеспечивающих упругость и эластичность кожи, и гиалуроновой кислоты, удерживающей в ней воду. Кожа становится морщинистой и дряблой [9; 10].

В данной работе исследованы воспалительные и редокс-ответы кератиноцитов и фибробластов на воздействие физиологических доз УФ-излучения совместно с рядом растительных полифенольных соединений (РПС) и без них.

Материалы и методы исследования

Реактивы. Были использованы коммерческие полифенольные соединения: рутин, кверцетин (*Sigma*, США); таксифолин, силибин и байкалеин (*Extrasynthese*, Франция). Во всех экспериментах полифенолы растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Также применялись трипсин, соли и растворители (*Sigma-Aldrich*, Германия), изотонический фосфатный буфер (ИФБ, pH 7,4) (*Lonza*, Бельгия), антибиотики (*Gibco*, США).

Клеточные культуры. Работа выполнена на культивируемых кератиноцитах человека линии HaCaT и нормальных фибробластах человека линии FL (human lung fibroblasts). Непосредственно для экспериментов клетки растили до полного кофлюента в 6-луночных планшетах в среде ДМЕМ (*Sigma-Aldrich*, Германия) с 10 % эмбриональной бычьей сывороткой при стандартных условиях (37 °C, 5 % CO_2).

Моделирование УФ-облучения. В качестве источника УФ-излучения использовали облучатель ультрафиолетовый ОУФк-05 (Россия), обеспечивающий в эффективном спектральном диапазоне (280–400 нм) интенсивность облучения на расстоянии 5 см не менее 50,0 Вт/м² при соотношении УФА и УФВ 2 : 1. Непосредственно перед облучением среду заменяли на ИФБ. Сразу после облучения ИФБ заменяли на среду ДМЕМ без сыворотки, содержащую ДМСО или растворы РПС в ДМСО в дозе 10 или 50 мкмоль/л. Клетки культивировались при стандартных условиях (37 °C, 5 % CO_2). Через 6 ч после добавления препаратов образцы среды и адгезивные клетки (на планшетах) замораживали при –80 °C.

Определение цитотоксического действия УФИ. Исследование влияния УФИ на жизнеспособность культивируемых клеток через 24 ч после воздействия проводили в 96-луночных планшетах. Количество клеток определяли с помощью реактива PrestoBlueTM Reagent (*Introvigen*, США) в соответствии с инструкцией. Флуоресценцию образующегося продукта (возбуждение 560 нм, эмиссия 590 нм) измеряли в планшетном флуориметре. Усредненную интенсивность флуоресценции лунок, содержащих контрольные клетки, принимали за 100 %.

Анализ экспрессии мРНК. Выделение общей РНК проводили с использованием набора GeneElute™ Mammalian Total RNA Kit (*Sigma-Aldrich*, Германия). О ее чистоте судили по отношению поглощения 260/280 нм, которое во всех экспериментах было в пределах 2,0–2,1. Количество РНК определяли по оптической плотности раствора при 260 нм. РНК (2 мкг) переводили в кДНК с помощью набора iScript cDNA Synthesis Kit (*Bio-Rad*, США). Режим обратной транскрипции: 5 мин при 25 °С, 30 мин при 42 °С, 5 мин при 85 °С; объем реакционной смеси 40 мкл. Количественный анализ содержания мРНК интересующих генов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени детектором Real-Time PCR Detector Chromo4 Four-Color (*Bio-Rad*, США), используя набор реагентов IQ SYBR green Supermix (*Bio-Rad*, США). Реакции проводили в объеме 25 мкл, в стандартных 96-луночных оптических планшетах (*Sarstedt AG*, Германия). Температурный профиль реакции: 95 °С – 15 с, 60 °С – 1 мин, 65 °С – 5 с; 36 циклов. Специфичность продуктов ПЦР подтверждалась анализом кривой плавления.

Все коммерческие наборы использовали в соответствии с инструкцией. Результаты ПЦР оценивали с помощью сравнительного Ct-метода ($\Delta\Delta Ct$) [11]. Экспрессию генов-мишеней нормализовали по конститутивным генам (β -актин и 18s rRNA) и представляли как относительное увеличение экспрессии в опытных клетках по сравнению с контрольными.

Использованные в работе праймеры были разработаны при помощи интернет-ресурса Primer-BLAST¹ (NCBI) и синтезированы в *Eurofins MWG Operon* (Германия) и *Праймтех* (Беларусь).

Анализ уровня секреции цитокинов. Уровни цитокинов (пг/мг клеточного белка) в культуральной среде HaCaT определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с помощью коммерческих наборов фирмы *SABiosciences – Qiagen SpA* (Италия) в соответствии с инструкцией. Содержание белка в среде находили методом Бредфорда, используя реактив *Bio-Rad* (*Bio-Rad*, США).

Определение степени фосфорилирования протеинкиназы В, альфа (Akt1), и внеклеточной сигнальнорегулируемой киназы 1 и 2 (ERK1/2) в HaCaT. Фосфопротеинкиназы Akt1 (фосфо-Akt1) и ERK1/2 (фосфо-ERK1/2) в HaCaT определяли с помощью модифицированного твердофазного иммуноферментного анализа непосредственно в 96-луночном планшете с использованием набора CASE™ Kit (*SABiosciences*, США) через 20 мин после воздействия УФИ (2,5 Дж/см²) без кверцетина и совместно с ним (50 мкмоль/л). Перед анализом клетки HaCaT фиксировали 4 % формальдегидом. Результаты были выражены в процентном количестве активированного (фосфорилированного) белка относительно общего белка Akt1 или ERK1/2.

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД), глутатион-S-трансферазы (GST) и содержания восстановленного глутатиона (GSH) в фибробластах человека. Активность СОД измеряли косвенным спектрофотометрическим методом, основанным на ингибировании автоокисления кверцетина, как описано в [12]. Активность GST находили по методу [13], используя хлор-2,3-динитробензол в качестве субстрата. Содержание внутриклеточного GSH определяли с помощью флуоресцентного реагента ThioGlo-1 (*SABiosciences*, Италия) методом [14]. Флуоресценцию образующегося продукта (возбуждение 355 нм, эмиссия 535 нм) измеряли с использованием планшетного флуориметра.

Статистическая обработка результатов. Полученные данные обрабатывали с использованием стандартной компьютерной программы *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, и значения $P < 0,05$ считались достоверными.

Результаты исследования и их обсуждение

Цитотоксическое действие УФИ (6,0 Дж/см²) на кератиноциты и фибробласты человека. В наших экспериментах интенсивность облучения клеточного монослоя соответствовала интенсивности солнечного УФ-облучения объектов на земной поверхности в полдень летом (50,0 Вт/м²), и, как свидетельствуют данные табл. 1, такое воздействие не оказывало цитотоксического влияния на клетки.

Таблица 1

Влияние УФИ (6,0 Дж/см²) на жизнеспособность культивируемых клеток
через 24 ч после воздействия, %

Table 1

The effect of UV radiation (6.0 J/cm²) on the viability
of cultured cells 24 h after exposure, %

Условия эксперимента	Кератиноциты	Фибробласты
Контроль	100 ± 6	100 ± 28
УФИ	97 ± 7	111 ± 35

¹Доступно по: <http://ncbi.nlm.nih.gov>.

Экспрессия мРНК медиаторов воспаления при воздействии на кератиноциты человека линии HaCaT физиологических доз УФФИ без РПС и совместно с ними. В экспериментах исследовали экспрессию мРНК провоспалительных цитокинов: интерлейкинов *IL-6*, *IL-1B*, *IL-8*; циклооксигеназы-2 (*COX-2*) – фермента, синтезирующего инициаторы воспалительного каскада простагландины; матриксной металлопротеиназы-1 (*MMP-1*) – фермента, расщепляющего структурные белки внеклеточного матрикса; фермента супероксиддисмутазы-2 (*СОД-2*) – ключевого элемента антиоксидантной защиты; регулятора транспорта воды и водного баланса аквапорина-3 (*AQP-3*). Эксперимент включал 3 серии:

- кератиноциты, не подвергавшиеся воздействию УФФИ (контроль);
- кератиноциты, инкубируемые 6 ч после воздействия физиологических доз УФФИ (6,0 Дж/см²) в среде, не содержащей РПС (серия УФФИ);
- кератиноциты, инкубируемые 6 ч после воздействия УФФИ в среде, содержащей РПС в концентрации 10 и 50 мкмоль/л (серия УФФИ + РПС).

Как следует из табл. 2, воздействие УФФИ не оказывает существенного влияния на экспрессию мРНК исследованных медиаторов в кератиноцитах. Выявлено только незначительное увеличение экспрессии *СОХ-2* и *IL-6*. В то же время в клетках серии УФФИ + РПС наблюдался существенный рост экспрессии мРНК медиаторов воспаления. В наибольшей степени увеличивалась экспрессия мРНК цитокинов *IL-6* и *IL-8*, а также фермента *СОХ-2*. При этом наибольший эффект на экспрессию мРНК УФ-облученных клеток оказывал байкалеин.

Таблица 2

Экспрессия мРНК медиаторов воспаления через 6 ч после воздействия на кератиноциты человека линии HaCaT УФФИ (6,0 Дж/см²) без РПС и совместно с ними (50 мкмоль/л)

Table 2

Expression of mRNA of inflammatory mediators 6 h after exposure of human keratinocytes (HaCaT) to UVR (6.0 J/cm²) applied with or without PPs (50 μmol/L)

Медиатор	Контроль	УФФИ	УФФИ + Кв	УФФИ + Тф	УФФИ + Бк
<i>СОД-2</i>	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,7 ± 0,4 ^{*a}	1,1 ± 0,1
<i>AQP-3</i>	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,4 ± 0,4 ^{*a}	1,1 ± 0,1
<i>IL-1B</i>	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,3	0,6 ± 0,1
<i>IL-8</i>	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,4 ± 0,3 ^{*a}	1,4 ± 0,4 ^{*a}	2,5 ± 0,2 ^{***a}
<i>COX-2</i>	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,23	1,6 ± 0,4 ^{*a}	1,3 ± 0,2	1,9 ± 0,1 ^{***a}
<i>IL-6</i>	1,0 ± 0,05	1,2 ± 0,2 ^{*a}	4,1 ± 0,7 ^{***a}	6,7 ± 1,7 ^{***a}	11,2 ± 0,5 ^{***a}
<i>MMP-1</i>	1,0 ± 0,05	0,8 ± 0,1 ^{*a}	0,9 ± 0,2	1,5 ± 0,5 ^{*a}	1,5 ± 0,3 ^{*a}

Примечание. Кв – кверцетин, Тф – таксифолин, Бк – байкалеин; ^{*a}*p* < 0,05, ^{***a}*p* < 0,001 относительно контроля.

Таблица 3

Экспрессия мРНК медиаторов воспаления через 6 ч после воздействия на кератиноциты человека линии HaCaT УФФИ (6,0 Дж/см²) без РПС и совместно с ними (10 мкмоль/л)

Table 3

Expression of mRNA of inflammatory mediators 6 h after exposure of human keratinocytes (HaCaT) to UVR (6.0 J/cm²) applied with or without PPs (10 μmol/L)

Медиатор	Контроль	УФФИ	УФФИ + Кв	УФФИ + Тф	УФФИ + Бк
<i>IL-8</i>	1,0 ± 0,03	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,4	1,1 ± 0,6	1,8 ± 1,3 ^{*a}
<i>COX-2</i>	1,0 ± 0,03	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,4	1,2 ± 0,6	1,1 ± 0,9
<i>IL-6</i>	1,0 ± 0,03	1,2 ± 0,2	2,0 ± 0,7 ^{*a}	2,8 ± 1,4 ^{*a}	3,6 ± 1,8 ^{*a}

Примечание. Кв – кверцетин, Тф – таксифолин, Бк – байкалеин; ^{*a}*p* < 0,05 относительно контроля.

Как следует из табл. 3, синергетический эффект РПС в серии УФФИ + РПС был дозозависимый. При снижении концентрации тестируемых соединений в культуральной среде до 10 мкмоль/л наблюдалось и уменьшение экспрессии мРНК *IL-6*, *IL-8* и *СОХ-2*.

Следует отметить, что в отсутствие предварительного УФ-облучения кератиноцитов РПС в дозе 50 мкмоль/л не оказывали заметного воздействия на экспрессию мРНК медиаторов воспаления, за исключением *IL-8*. Все исследованные РПС достоверно снижали экспрессию этого цитокина в 2 раза и более (табл. 4).

Таблица 4

Экспрессия мРНК медиаторов воспаления через 6 ч после воздействия на кератиноциты человека линии HaCaT РПС (50 мкмоль/л)

Table 4

Expression of mRNA of inflammatory mediators 6 h after treatment of human keratinocytes (HaCaT) with PPs (50 $\mu\text{mol/L}$)

Медиатор	Контроль	Кверцетин	Таксифолин	Байкалеин
<i>AQP-3</i>	1,0 \pm 0,1	1,4 \pm 0,6	1,2 \pm 0,3	1,2 \pm 0,3
<i>IL-1B</i>	1,0 \pm 0,1	1,4 \pm 0,8	1,2 \pm 0,8	1,2 \pm 0,4
<i>IL-8</i>	1,0 \pm 0,2	0,5 \pm 0,3 ^{***a}	0,4 \pm 0,3 ^{***a}	0,4 \pm 0,1 ^{***a}
<i>COX-2</i>	1,0 \pm 0,1	1,0 \pm 0,6	1,0 \pm 0,6	0,8 \pm 0,3
<i>IL-6</i>	1,0 \pm 0,6	1,7 \pm 0,9 ^{*a}	0,8 \pm 0,6	0,7 \pm 0,1 ^{*a}
<i>MMP-1</i>	1,0 \pm 0,01	1,0 \pm 0,6	1,0 \pm 0,6	0,9 \pm 0,5

^a $p < 0,05$, ^{***a} $p < 0,001$ относительно контроля.

Секреция медиаторов воспаления при воздействии на кератиноциты человека линии HaCaT УФИ без кверцетина и совместно с ним. Синергетический эффект на продукцию и секрецию воспалительных цитокинов *IL-6* и *IL-8* кератиноцитами при действии УФИ и РПС, в частности кверцетина, был подтвержден методом твердофазного иммуноферментного анализа на белковом уровне (табл. 5).

Таблица 5

Секреция медиаторов воспаления через 24 ч после воздействия на кератиноциты человека линии HaCaT УФИ (2,5 Дж/см²) без кверцетина и совместно с ним (50 мкмоль/л)

Table 5

Secretion of inflammatory mediators 24 h after exposure of human keratinocytes (HaCaT) to UVR (2.5 J/cm²) applied with or without quercetin (50 $\mu\text{mol/L}$)

Цитокин	Уровень цитокинов в ростовой среде, пмоль/мг белка		
	Контроль	УФИ	УФИ + Кв
<i>IL-6</i>	1,1 \pm 0,04	1,9 \pm 0,6 ^{*a}	10,1 \pm 2,1 ^{*b}
<i>IL-8</i>	5,7 \pm 0,3	8,7 \pm 1,5 ^{*a}	15,9 \pm 2,8 ^{*b}

Примечание. Кв – кверцетин; ^a $p < 0,05$ относительно контроля; ^b $p < 0,05$ относительно УФИ.

Экспрессия мРНК медиаторов воспаления при воздействии на фибробласты человека физиологических доз УФИ без РПС и совместно с ними. Исследовали экспрессию мРНК *IL-6*, *IL-1B*, *IL-8*; *COX-2*, *MMP-1*, *СОД-2* и *AQP-3*. Эксперимент включал три серии:

- фибробласты, не подвергавшиеся воздействию УФИ (контроль);
- фибробласты, инкубируемые 6 ч после воздействия УФИ (6,0 Дж/см²) в среде, не содержащей РПС (серия УФИ);
- фибробласты, инкубируемые 6 ч после воздействия УФИ в среде, содержащей РПС в концентрации 10 или 50 мкмоль/л (серия УФИ + РПС).

Как и в экспериментах с кератиноцитами, УФИ не оказывало существенного влияния на экспрессию мРНК провоспалительных цитокинов *COX-2* и *СОД-2*. Однако в обработанных УФИ клетках существенно увеличивалась экспрессия мРНК *AQP-3* и особенно (в 3 раза) экспрессия *MMP-1* (табл. 6).

Таблица 6

Экспрессия мРНК медиаторов воспаления через 6 ч
после воздействия на фибробласты человека
УФИ (6,0 Дж/см²) без РПС и совместно с ними (50 мкмоль/л)

Table 6

Expression of mRNA of inflammatory mediators 6 h
after exposure of human fibroblasts to UVR (6.0 J/cm²)
applied with or without PPs (50 μmol/L)

Медиатор	Контроль	УФИ	УФИ + Кв	УФИ + Тф	УФИ + Бк
<i>СОД-2</i>	1,0 ± 0,3	1,2 ± 0,4	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,5 ± 0,4 ^{*a}
<i>AQP-3</i>	1,0 ± 0,1	1,5 ± 0,3 ^{*a}	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,2 ^{*a}	2,1 ± 0,5 ^{*a,*b}
<i>IL-1B</i>	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,3	0,7 ± 0,1 ^{*a}	0,7 ± 0,1 ^{*a}	0,4 ± 0,1 ^{***a}
<i>IL-8</i>	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,7 ± 0,2 ^{*a}	1,0 ± 0,1	2,6 ± 0,6 ^{***a}
<i>COX-2</i>	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,2	3,8 ± 0,6 ^{***a}	1,6 ± 0,2 ^{***a}	3,3 ± 0,93 ^{***a}
<i>IL-6</i>	1,0 ± 0,02	1,1 ± 0,3	2,5 ± 0,4 ^{***a}	1,9 ± 0,3	3,8 ± 1,1 ^{***a}
<i>MMP-1</i>	1,0 ± 0,1	3,0 ± 0,33 ^{***a}	2,8 ± 1 ^{***a}	4,4 ± 0,9 ^{*b}	12,1 ± 2,4 ^{***a,*b}

Примечание. Кв – кверцетин, Тф – таксифолин, Бк – байкалеин; ^{*a}*p* < 0,05, ^{***a}*p* < 0,001 относительно контроля; ^{*b}*p* < 0,05 относительно УФИ.

Таким образом, несмотря на отсутствие воспалительной реакции со стороны фибробластов, физиологические дозы УФИ существенно повышают в этих клетках экспрессию *MMP-1* – одной из основных матриксных металлопротеиназ, которые расщепляют дермальный коллаген и эластин и с активацией которых связывают процессы фотостарения кожи [10].

Как следует из табл. 6, внесение сразу после облучения в культуральную среду РПС оказывало существенное влияние на экспрессию мРНК медиаторов воспаления. Аналогично случаю с кератиноцитами в наибольшей степени увеличивалась экспрессия мРНК цитокинов *IL-6*, *IL-8* и *COX-2*, а наибольший эффект на экспрессию мРНК УФ-облученных клеток оказывал байкалеин. В присутствии такового также значительно увеличивалась экспрессия мРНК *MMP-1*, тогда как действие кверцетина и таксифолина было незначительно.

При снижении концентрации тестируемых соединений в культуральной среде до 10 мкмоль/л их синергетический эффект на экспрессию мРНК *IL-6*, *IL-8* и *COX-2* существенно уменьшался (табл. 7).

Таблица 7

Экспрессия мРНК медиаторов воспаления через 6 ч после воздействия
на фибробласты человека УФИ (6,0 Дж/см²) без РПС и совместно с ними (10 мкмоль/л)

Table 7

Expression of mRNA of inflammatory mediators 6 h after exposure of human fibroblasts
to UVR (6.0 J/cm²) applied with or without PPs (10 μmol/L)

Медиатор	Контроль	УФИ	УФИ + Кв	УФИ + Тф	УФИ + Бк
<i>IL-8</i>	1,0 ± 0,02	0,9 ± 0,2	1,3 ± 0,2 ^{*a}	1,3 ± 0,2 ^{*a}	2,2 ± 0,3 ^{***a}
<i>COX-2</i>	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,3	1,9 ± 0,4 ^{***a}	1,5 ± 0,2 ^{*a}	1,8 ± 0,3 ^{***a}
<i>IL-6</i>	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,3	2,0 ± 0,3 ^{***a}	1,8 ± 0,2 ^{***a}	2,4 ± 0,2 ^{***a}

Примечание. Кв – кверцетин, Тф – таксифолин, Бк – байкалеин; ^{*a}*p* < 0,05, ^{***a}*p* < 0,001 относительно контроля.

При исследовании действия РПС в дозе 50 мкмоль/л на фибробласты, не подвергавшиеся УФ-облучению, выявлено некоторое увеличение экспрессии мРНК ряда воспалительных медиаторов. При этом если кверцетин достоверно увеличивал экспрессию мРНК только *COX-2*, то байкалеин увеличивал экспрессию *IL-6*, *IL-8* и *COX-2* (табл. 8). Вместе с тем исследованные РПС понижали экспрессию мРНК *MMP-1*.

Таблица 8

Экспрессия мРНК медиаторов воспаления через 6 ч
после воздействия на фибробласты человека РПС (50 мкмоль/л)

Table 8

Expression of mRNA of inflammatory mediators 6 h
after treatment of human fibroblasts with PPs (50 μ mol/L)

Медиатор	Контроль	Кверцетин	Таксифолин	Байкалеин
<i>AQP-3</i>	1,0 \pm 0,1	1,0 \pm 0,3	1,0 \pm 0,2	0,8 \pm 0,4
<i>IL-1B</i>	1,0 \pm 0,1	1,1 \pm 0,4	0,9 \pm 0,2	1,2 \pm 0,6
<i>IL-8</i>	1,0 \pm 0,1	1,1 \pm 0,4	1,2 \pm 0,3	2,0 \pm 0,8 ^{*a}
<i>COX-2</i>	1,0 \pm 0,2	1,7 \pm 0,5 ^{*a}	1,4 \pm 0,3 ^{*a}	1,9 \pm 0,6 ^{*a}
<i>IL-6</i>	1,0 \pm 0,1	0,8 \pm 0,3	1,6 \pm 0,3	2,3 \pm 1,0
<i>MMP-1</i>	1,0 \pm 0,1	0,5 \pm 0,3 ^{*a}	0,8 \pm 0,5	0,4 \pm 0,2 ^{***a}

^{*a} $p < 0,05$, ^{***a} $p < 0,001$ относительно контроля.

Активность глутатион-S-трансферазы, содержание СОД и восстановленного глутатиона в фибробластах человека при воздействии УФФИ без РПС и совместно с ними. Определяли содержание основного антиоксидантного фермента СОД, активность фермента GST, катализирующего второй этап детоксикации, и содержание GSH в культивируемых фибробластах, не подвергавшихся воздействию УФ-излучения (контроль), в фибробластах, инкубируемых 24 ч после воздействия УФФИ (9,0 Дж/см²) в среде, не содержащей РПС, и фибробластах, инкубируемых 24 ч после воздействия УФФИ в среде, содержащей РПС (рутин, кверцетин, таксифолин или силибин) в концентрации 50 мкмоль/л.

Таблица 9

Влияние УФ-излучения (9,0 Дж/см²) на состояние антиоксидантной
системы фибробластов без РПС и в присутствии их через 24 ч после воздействия

Table 9

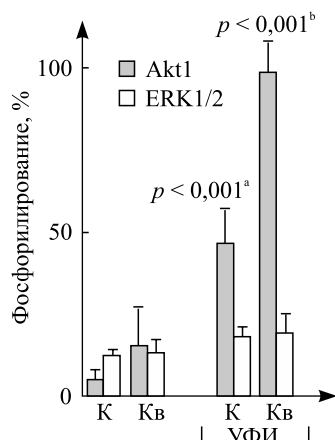
Effect of UV radiation (9.0 J/cm²) applied with or without PPs (50 μ mol/L)
on the state of antioxidant system 24 h after exposure

Условия экспериментов	Содержание СОД, нг/мг белка	Активность GST, нмоль/мин/мг	Содержание GSH, нмоль/мг белка
Контроль	2256 \pm 711	4,32 \pm 0,57	53,7 \pm 20,1
УФФИ	2444 \pm 780	3,98 \pm 0,70	50,5 \pm 22,8
УФФИ + Рт	2220 \pm 525	3,17 \pm 0,39 ^{***a}	46,8 \pm 20,3
УФФИ + Тф	3440 \pm 730 ^{**a}	3,83 \pm 0,52	26,2 \pm 10,8 ^{*a}
УФФИ + Кв	2420 \pm 800	3,39 \pm 0,58 [*]	35,5 \pm 9,4 ^{*a}
УФФИ + Сл	2715 \pm 900 ^{**a}	3,63 \pm 0,58 ^{*a}	32,9 \pm 14,9 ^{*a}

Примечание. Рт – рутин, Тф – таксифолин, Кв – кверцетин, Сл – силибин; ^{*a} $p < 0,05$, ^{**a} $p < 0,01$ относительно контроля.

Как следует из данных, приведенных в табл. 9, воздействие УФФИ в суммарной дозе 9,0 Дж/см² на культивируемые фибробласты не приводит к достоверному изменению активности исследованных ферментов и содержания GSH. В том случае, когда фибробласты инкубировали с РПС после воздействия УФФИ, показано, что полифенольные соединения (таксифолин и силибин) достоверно увеличивали в клетках содержание СОД, но снижали активность GST (рутин, кверцетин и силибин). Также установлено, что в этих условиях все исследованные РПС снижают уровень внутриклеточного GSH, и в случае таксифолина, кверцетина и силибина выявленные различия были достоверны. При этом существенного влияния РПС в дозе 50 мкмоль/л на уровень GSH в фибробластах, не подвергнутых УФ-облучению, не выявлено (результаты не приведены).

В последние годы растет интерес к возможному использованию растительных соединений с антиоксидантными свойствами для предотвращения ряда патологических процессов, в том числе каскада негативных реакций в коже, инициируемых воздействием солнечной радиации [15]. Следует отметить,



Степень фосфорилирования Akt1 и ERK1/2 в HaCaT через 20 мин после воздействия УФВ (2,5 Дж/см²) без кверцетина и совместно с ним (50 мкмоль/л):

К – контрольные клетки; Кв – клетки, инкубируемые с кверцетином;

^a – относительно контроля, ^b – относительно УФВ

The degree of phosphorylation of Akt1 and ERK1/2 in HaCaT 20 min after exposure to UVR (2.5 J/cm²) applied with or without quercetin (50 μmol/L):

K – control cells; Kv – cells incubated with quercetin;

^a – relative to the control; ^b – relative to the UVR

кверцетина еще больше увеличивало степень фосфорилирования Akt1 (см. рисунок). Сигнальный путь через Akt широко обсуждается как критический путь выживания клеток в случае негативного внешнего воздействия [18]. Результаты данного исследования свидетельствуют, что физиологическое УФ-облучение может активировать передачу сигналов выживания через Akt1, а РПС дополнительно активируют этот путь.

Закключение

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о наличии синергизма в действии физиологических доз УФВ и РПС на воспалительные сигнальные пути в кератиноцитах и фибробластах. Поскольку кратковременное острое воспаление обычно носит адаптивный характер [19], можно допустить, что выявленный синергизм способствует адаптации кожи к последующему воздействию УФВ и тем самым служит одним из механизмов фотозащитного действия РПС.

Библиографические ссылки

1. Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Brenneisen P, Schauen M, Blandschun R, Wenk J. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;378(11):1247–1257.
2. Fisher GJ, Wang Z, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *The New England Journal of Medicine*. 1997;337:1419–1428. DOI: 10.1056/NEJM199711133372003.
3. Bode AM, Dong Z. Signal transduction pathways in cancer development and as targets for cancer prevention. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 2005;79:237–297. DOI: 10.1016/S0079-6603(04)79005-4.
4. Valencia A, Kochevar IE. Nox1-based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced reactive oxygen species in human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 2008;128:214–222. DOI: 10.1038/sj.jid.5700960.
5. Peus D, Vasa RA, Meves A, Pott M, Beyerle A, Squillace K, Pittelkow MR. H₂O₂ is an important mediator of UVB induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 1998;110:966–971. DOI: 10.1046/j.1523-1747.1998.00210.x.
6. Mahns A, Wolber R, Stab F, Klotz LO, Sies H. Contribution of UVB and UVA to UV-dependent stimulation of cyclooxygenase-2 expression in artificial epidermis. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2004;3:257–262. DOI: 10.1039/b309067a.
7. Adams DO, Hamilton TA. Macrophages as destructive cells in host defense. In: Gallin JI, Goldstein IM, Synderman R, editors. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. New York: Raven Press; 1992. p. 637–662.
8. Bruls WA, van Weelden H, van der Leun JC. Transmission of UV-radiation through human epidermal layers as a factor influencing the minimal erythema dose. *Photochemistry and Photobiology*. 1984;39:63–67.
9. Хэбиф ТП. *Кожные болезни. Диагностика и лечение*. 3-е издание. Кубанова АА, редактор. Москва: МЕДпресс-информ; 2008.

10. Bonamigo RR, Dornelles SIT, editors. *Dermatology in Public Health Environments: A Comprehensive Textbook*. New York: Springer; 2018.
11. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta c(t)) method. *Methods*. 2001;25:402–408.
12. Kostyuk VA, Potapovich AI. Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. *Biochemistry International*. 1989;19:1117–1124.
13. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 1974;249:7130–7139.
14. Tyurin VA, Tyurina YY, Borisenko GG, Sokolova TV, Ritov VB, Quinn PJ, et al. Oxidative stress following traumatic brain injury in rats: quantitation of biomarkers and detection of free radical intermediates. *Journal of Neurochemistry*. 2000;75(5):2178–2189.
15. Korkina LG, Pastore S, De Luca C, Kostyuk VA. Metabolism of plant polyphenols in the skin: beneficial versus deleterious effects. *Current Drug Metabolism*. 2008;9:710–729.
16. Potapovich AI, Kostyuk VA, Kostyuk TV, De Luca C, Korkina LG. Effects of pre- and post-treatment with plant polyphenols on human keratinocyte responses to solar UV. *Inflammation Research*. 2013;62(8):773–780.
17. He YY, Council SE, Feng L, Chignell CF. UVA-induced cell cycle progression is mediated by a disintegrin and metalloprotease/epidermal growth factor receptor/AKT/Cyclin D1 pathways in keratinocytes. *Cancer Research*. 2008;68:3752–3758.
18. Meeran SM, Katiyar N, Singh T, Katiyar SK. Loss of endogenous interleukin-12 activates survival signals in ultraviolet-exposed mouse skin and skin tumors. *Neoplasia*. 2009;11:846–855.
19. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunology Today*. 1994;15:74–80.

References

1. Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Brenneisen P, Schauen M, Blanduschun R, Wenk J. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;378(11):1247–1257.
2. Fisher GJ, Wang Z, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *The New England Journal of Medicine*. 1997;337:1419–1428. DOI: 10.1056/NEJM199711133372003.
3. Bode AM, Dong Z. Signal transduction pathways in cancer development and as targets for cancer prevention. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 2005;79:237–297. DOI: 10.1016/S0079-6603(04)79005-4.
4. Valencia A, Kochevar IE. Nox1-based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced reactive oxygen species in human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 2008;128:214–222. DOI: 10.1038/sj.jid.5700960.
5. Peus D, Vasa RA, Meves A, Pott M, Beyerle A, Squillace K, Pittelkow MR. H₂O₂ is an important mediator of UVB induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 1998;110:966–971. DOI: 10.1046/j.1523-1747.1998.00210.x.
6. Mahns A, Wolber R, Stab F, Klotz LO, Sies H. Contribution of UVB and UVA to UV-dependent stimulation of cyclooxygenase-2 expression in artificial epidermis. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2004;3:257–262. DOI: 10.1039/b309067a.
7. Adams DO, Hamilton TA. Macrophages as destructive cells in host defense. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, editors. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. New York: Raven Press; 1992. p. 637–662.
8. Bruls WA, van Weelden H, van der Leun JC. Transimission of UV-radiation through human epidermal layers as a factor influencing the minimal erythema dose. *Photochemistry and Photobiology*. 1984;39:63–67.
9. Hebb TP. *Skin diseases. Diagnosis and treatment*. 3rd edition. New York: Elsevier; 2005.
Russian edition: Khebif TP. *Kozhnye bolezni. Diagnostika i lechenie*. Kubanova AA, editor. Moscow: MEDpress inform; 2008.
10. Bonamigo RR, Dornelles SIT, editors. *Dermatology in Public Health Environments: A Comprehensive Textbook*. New York: Springer; 2018.
11. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta c(t)) method. *Methods*. 2001;25:402–408.
12. Kostyuk VA, Potapovich AI. Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. *Biochemistry International*. 1989;19:1117–1124.
13. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 1974;249:7130–7139.
14. Tyurin VA, Tyurina YY, Borisenko GG, Sokolova TV, Ritov VB, Quinn PJ, et al. Oxidative stress following traumatic brain injury in rats: quantitation of biomarkers and detection of free radical intermediates. *Journal of Neurochemistry*. 2000;75(5):2178–2189.
15. Korkina LG, Pastore S, De Luca C, Kostyuk VA. Metabolism of plant polyphenols in the skin: beneficial versus deleterious effects. *Current Drug Metabolism*. 2008;9:710–729.
16. Potapovich AI, Kostyuk VA, Kostyuk TV, De Luca C, Korkina LG. Effects of pre- and post-treatment with plant polyphenols on human keratinocyte responses to solar UV. *Inflammation Research*. 2013;62(8):773–780.
17. He YY, Council SE, Feng L, Chignell CF. UVA-induced cell cycle progression is mediated by a disintegrin and metalloprotease/epidermal growth factor receptor/AKT/Cyclin D1 pathways in keratinocytes. *Cancer Research*. 2008;68:3752–3758.
18. Meeran SM, Katiyar N, Singh T, Katiyar SK. Loss of endogenous interleukin-12 activates survival signals in ultraviolet-exposed mouse skin and skin tumors. *Neoplasia*. 2009;11:846–855.
19. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunology Today*. 1994;15:74–80.

Статья поступила в редакцию 15.04.2019.
Received by editorial board 15.04.2019.