

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДНЫХ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ПОСТРАДИАЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ В КЕРАТИНОЦИТАХ, ЭКСПОНИРОВАННЫХ К УФ-ИЗЛУЧЕНИЮ

А.И. Потапович, А. Албухайдар, Т.О. Сухан, В.А. Костюк

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

e-mail: kostyuk@bsu.by

Введение

Известно, что клеточные ответы на воздействие ультрафиолетового излучения (УФИ) опосредованы активными формами (АФ) кислорода и азота. Еще несколько лет назад внутриклеточную продукцию АФ кислорода, главным образом синглетного кислорода и супероксид радикала, при воздействии УФИ рассматривали только как результат инициирования быстрых фотохимических процессов возбужденными эндогенными фотосенсибилизаторами (например, рибофлавином) непосредственно во время облучения [1, 2]. Однако в последние годы было показано, что повышенная продукция АФ кислорода, а также монооксида азота и пероксинитрита наблюдается в облученных клетках и после прекращения воздействия УФИ [3, 4]. Такая пролонгированная продукция биорадикалов (30 мин и более) осуществляется в результате активации фермент-контролируемых редокс реакций. Ключевую роль в этом процессе играют кератиноциты – основной клеточный компонент кожи. После воздействия солнечного УФ-излучения они производят воспалительные медиаторы, в том числе простагландины, хемокины, цитокины и молекулы адгезии [4–6], которые в свою очередь активируют иммуннокомпетентные клетки, продуцирующие в области формирующегося воспаления большое количество оксида азота, супероксида, H_2O_2 и гипохлорита [7]. Мы предположили, что ведущую роль в развитии воспалительной реакции клеток кожи при воздействии УФ-облучения играют АФ кислорода и азота, образующиеся в пострадиационный период. С целью проверки данной гипотезы нами было исследовано действие перехватчиков АФ кислорода и азота на различные этапы в последовательности событий, иницируемых в клетках кожи при воздействии УФ-излучения. В качестве перехватчиков АФ кислорода и азота были использованы природные полифенольные соединения (ППС). Для моделирования воспалительных процессов, протекающих в коже, использовали культивируемые кератиноциты.

Методы исследования

Реактивы. Соли, растворители, трипсин, детергенты, кверцетин (Кв), рутин (Рут) приобретены в фирме *Sigma-Aldrich*, ресвератрол (Рв) – в фирме *BioMol* (Италия), вербаскозид (Вб) любезно предоставлен доктором Р. Дальтоза (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 $4 \times 10^4 / \text{см}^2$. ННЕК культивировали в стандартных условиях (37 °C, 5% CO_2) в ростовой среде КРС: (KGM-Gold™ BulletKit™, Lonza, Бельгия).

Эксперименты с исследуемыми соединениями (10 мкмоль/л) проводили в 6- и 96-луночных планшетах в среде КВМ-Gold (Keratinocyte Basal Medium Gold). Использовали два экспериментальных протокола. В соответствии с протоколом 1, ППС преинкубировали с клетками 30 минут, после чего культуральную среду заменяли на ИФБ и облучали клетки УФИ, используя симулятор солнечного излучения (Dermalight Vario Dr. Hoehnle AG, UV Technology, Planegg, Германия). Сразу после облучения ИФБ заменяли на культуральную

среду. В соответствии с протоколом 2, клетки также облучали в ИФБ, а сразу после облучения ИФБ заменяли на культуральную среду, содержащую ППС. В обоих случаях дальнейшие экспериментальные процедуры выполнялись одинаково.

Определение внутриклеточной продукции монооксида азота (NO) и пероксинитрита. 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 пероксинитрита) и подвергали воздействию УФИ (УФА 2,5 Дж/см² + УФВ 0,25 Дж/см²). 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, MgCl₂, 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 β -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).

Анализ уровня секреции цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8 проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с помощью коммерческих наборов фирмы SABiosciences - Qiagen SpA. Для анализа использовали культуральную среду, которая была собрана через 18 ч после УФ-излучения.

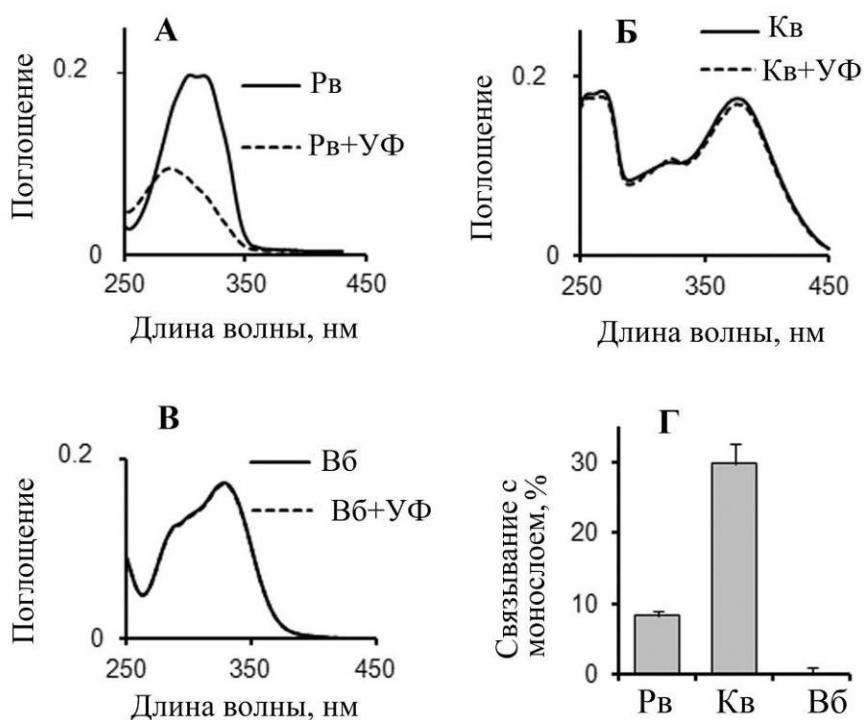
Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов производили с использованием стандартной компьютерной программы «Excel». Статистические данные представлены в виде $M \pm SD$, где M – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение.

Результаты и обсуждение

Исследование чувствительности ППС к УФ-излучению и оценка способности ППС связываться с поверхностью клеточного монослоя.

Для оценки устойчивости ППС к УФ-излучению регистрировали спектры поглощения анализируемых соединений в УФ- и видимой области (250-450 нм) до и после воздействия УФ продолжительностью 30 секунд (UVA 1,0 Дж/см² + UVB 0,1 Дж/см²). Установлено, что при таком воздействии в молекуле ресвератрола происходило практически полное разрушение хромофора с максимумом поглощения при 306 нм (рисунок 1А). В отличие от ресвератрола, фотостабильность кверцетина и вербаскозида была значительно выше, о чем свидетельствует отсутствие спектральных изменений (рисунок 1Б, 1В). Следует отметить, что у вербаскозида спектральные изменения отсутствовали даже после 10 мин облучения (данные не приведены).

Для оценки степени поглощения и связывания ППС кератиноцитами определяли их содержание в среде культивирования до и через 30 мин после добавления. Установлено, что за это время связываются или поглощаются клеточным монослоем около 30% кверцетина, 10% ресвератрола и менее чем 1% вербаскозида (рисунок 1Г).



А, Б, В - типичные спектральные изменения ресвератрола (А), кверцетина (Б) и вербаскозида (В) при воздействии УФ продолжительностью 30 секунд (UVA 1,0 Дж/см² + UVB 0,1 Дж/см²); Г – степень связывания и поглощения ППС нормальными кератиноцитами после 30 мин инкубации

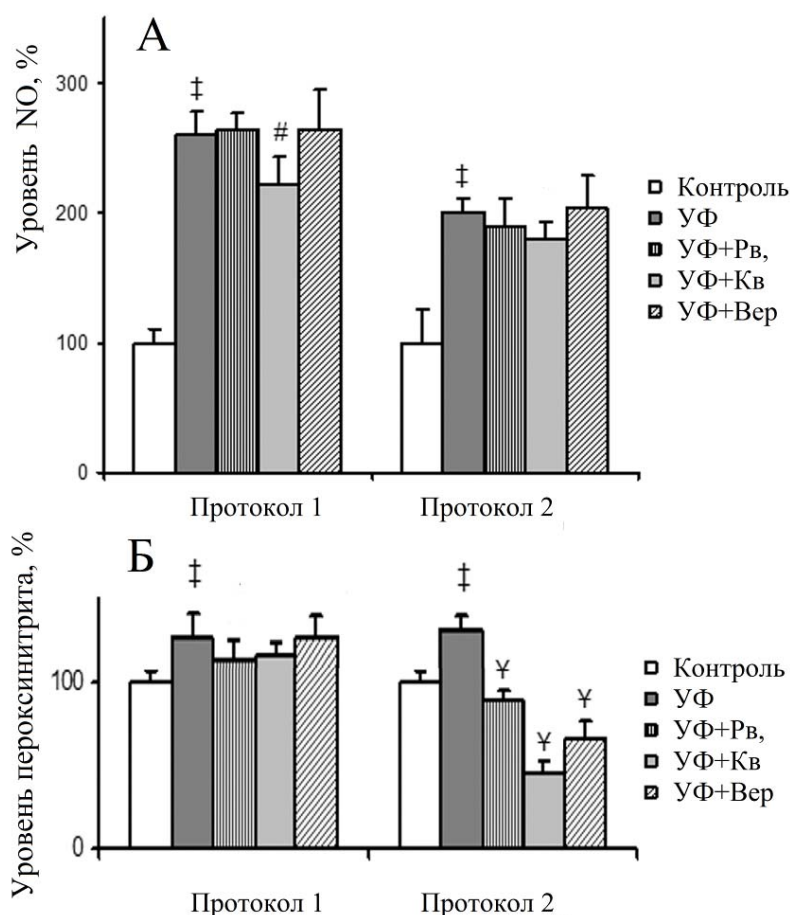
Рисунок 1 – Устойчивость природных полифенольных соединений к действию УФ-излучения и степень их связывания с клеточным монослоем

Влияние различных схем применения природных полифенольных соединений на редокс-ответы клеток кожи, индуцированные УФ-излучением.

Известно, что монооксида азота играет важную регуляторную роль в развитии воспаления. В последнее время для определения внутриклеточного уровня NO используют флуоресцентный зонд DAF-2 DA. Проникая в клетки, этот краситель легко взаимодействует с N₂O₃, промежуточным продуктом окислительного превращения NO, превращаясь в DAF-2T, который обладает сильной зеленой флуоресценцией. Увеличение уровня флуоресценции клеток указывает на увеличение внутриклеточного содержания монооксида азота. В наших экспериментах данный метод был использован для определения внутриклеточного содержания NO после облучения кератиноцитов УФИ без и в присутствии ППС. Полученные результаты приведены на рисунке 2А. Как видно из рисунка, продукция NO существенно увеличивается в течение первого часа после облучения, однако ППС, добавленные как до, так и после облучения не оказывали существенного воздействия на продукцию NO в кератиноцитах.

Повышение внутриклеточного уровня NO ведет к образованию целого ряда токсичных интермедиатов, одним из которых является пероксинитрит, образующийся в результате взаимодействия монооксида азота и анион-радикала кислорода. В данной работе для исследования УФ-индуцированной продукции пероксинитрита, использовали флуоресцентный зонд дигидрорадамин. Установлено, УФ-облучение кератиноцитов приводит к достоверному увеличению внутриклеточного содержания пероксинитрита в первые 60 минут после прекращения воздействия УФИ. ППС, добавленные к клеткам до облучения, не оказывали существенного воздействия на накопление в них пероксинитрита. В тоже время ППС, добавленные сразу после УФ-облучения, не только полностью

ингибировали этот процесс, но и снижали внутриклеточное содержание пероксинитрита до уровня ниже базального (рисунок 2Б).



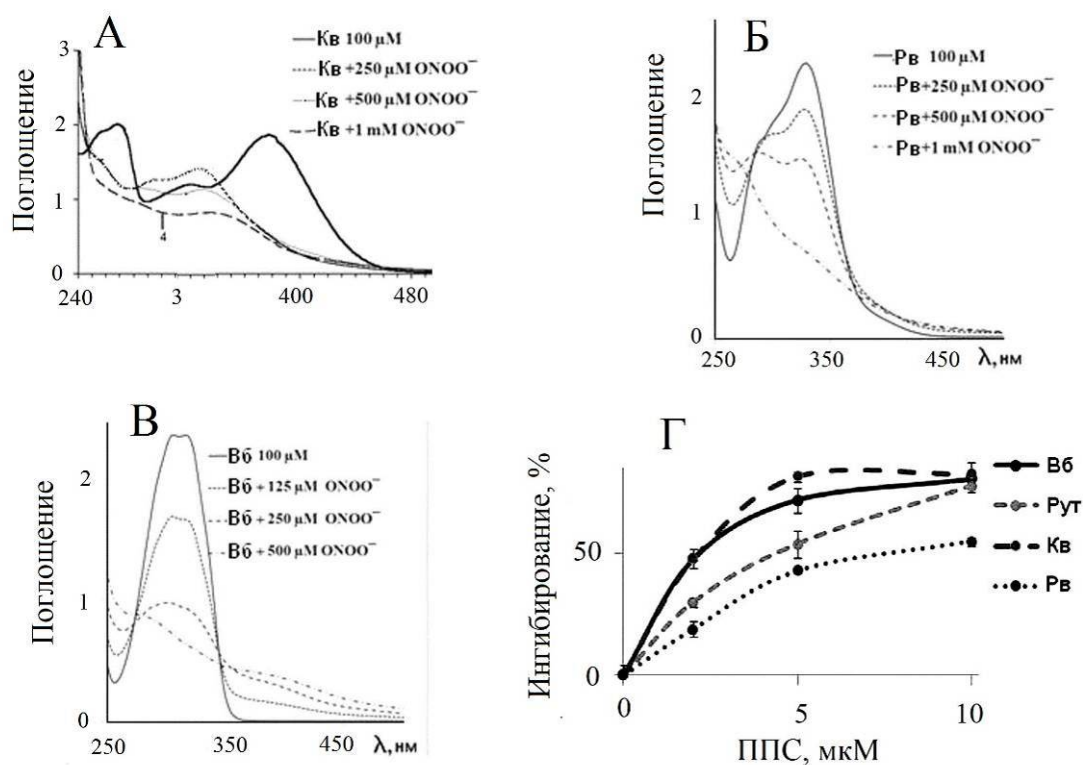
Внутриклеточное содержание монооксида азота (А) и пероксинитрита (Б) в процентах к контролю через 1 ч после воздействия УФИ (УФА 2,5 Дж/см² + УФВ 0,25 Дж/см²):

ресвератрол, кверцетин – 10 мкмоль/л, вербаскозид – 50 мкмоль/л

‡ - $p < 0,001$ vs контроль; # - $p < 0,05$ vs УФ, ¥ - $p < 0,001$ vs УФ

Рисунок 2 – Влияние УФИ без и при использовании ППС в соответствии с протоколом 1 и 2 на внутриклеточный уровень NO и пероксинитрита

Поскольку данный феномен может быть обусловлен антиоксидантными свойствами ППС, в последующих экспериментах была исследована способность ППС вступать в редокс-реакции с пероксинитритом. О возможности такого взаимодействия судили по изменению спектров поглощения анализируемых соединений в УФ- и видимой области. Установлено, что исследованные соединения легко окисляются пероксинитритом, о чем свидетельствуют характерные спектральные изменения, приведенные на рисунке 3 А-В. Чтобы оценить насколько эффективно ППС ингибируют редокс-реакции пероксинитрита с эндогенными субстратами, было исследовано их влияние на пероксинитрит-зависимое окисление триптофана, данные приведены на рисунке 3 Г. Как следует из рисунка, наиболее эффективно ингибировали окисление триптофана кверцетин и вербаскозид, ресвератрол обладал несколько менее выраженным действием.

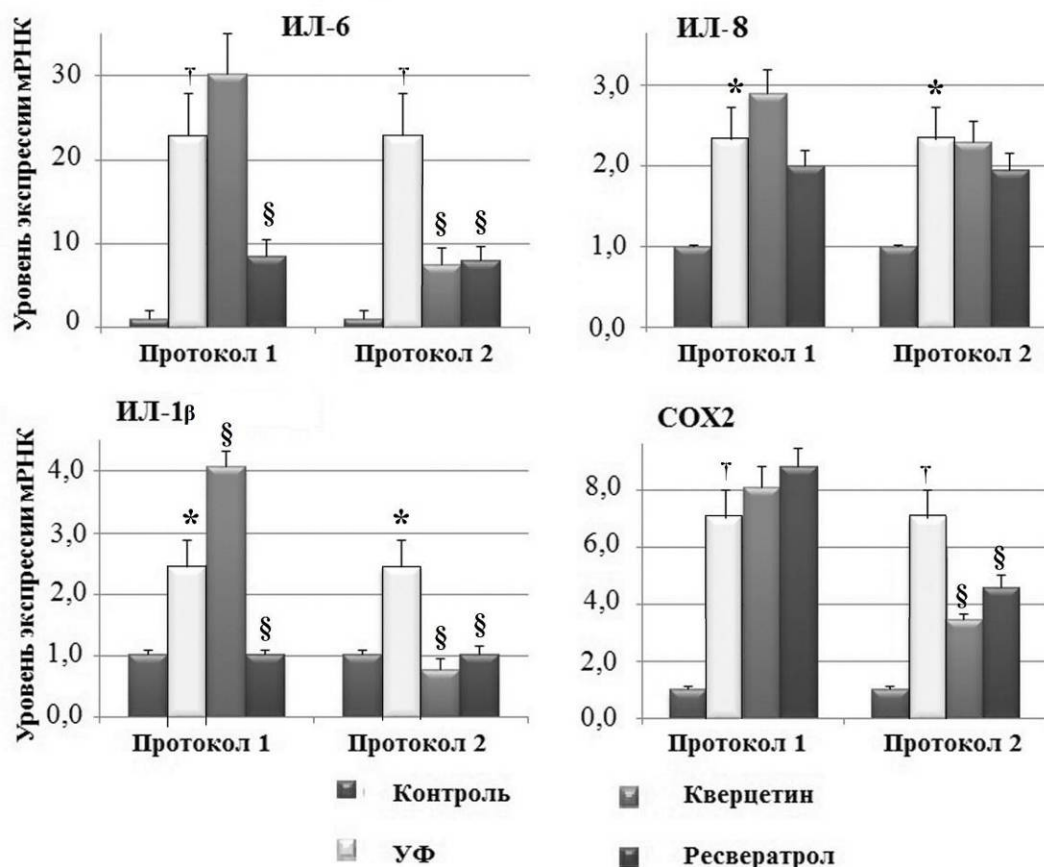


А, Б, В - типичные спектральные изменения при окислении кверцетина (А), ресвератрола (Б) и вербаскозида (В) пероксинитритом; Г - Зависимость степени ингибирования окислительной модификации свободного триптофана (25 мкмоль/л) пероксинитритом (50 мкмоль/л) от концентрации ППС
Рисунок 3 – Взаимодействие природных полифенольных соединений с пероксинитритом

Влияние различных схем применения природных полифенольных соединений на воспалительные ответы клеток кожи, индуцированные УФ-излучением.

Влияние природных полифенолов (кверцетин и ресвератрол) на воспалительные ответы нормальных кератиноцитов, подвергнутых воздействию УФ исследовали через 6 ч после облучения субтоксичной дозой (UVA 1,0 Дж/см² + UVB 0,1 Дж/см²), используя метод ПЦР в режиме реального времени (рисунок 4) и метод твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) (рисунок 5). В предыдущих исследованиях было показано, что эта доза и время после облучения являются оптимальными для тестирования противовоспалительных средств. Для оценки противовоспалительного действия ППС использовали два разных экспериментальных протокола. В соответствии с протоколом 1 воздействию УФ предшествовала преинкубация клеток с ППС, в соответствии с протоколом 2, ППС добавляли к клеткам сразу после облучения. В обоих случаях клетки облучали в изотоническом фосфатном буфере, не содержащем ППС. Тем самым исключался эффект «физического фильтра», связанного с тем, что исследованные ППС обладают интенсивным поглощением в УФ диапазоне спектра, поэтому культуральная среда, содержащая исследуемый препарат, способна экранировать поверхность клеточного монослоя от воздействия УФ-излучения. Облучение кератиноцитов субтоксичной дозой УФ (УФА 1,0 Дж/см²+УФВ 0,1 Дж/см²) приводит к существенному (в 2–20 раз) увеличению экспрессии мРНК таких провоспалительных медиаторов как интерлейкины ИЛ-6, ИЛ-1β, ИЛ-8 а также мРНК индуцибельного фермента циклооксигеназа-2 (СОХ2), катализирующего образование простагландинов, важнейших медиаторов воспаления. Установлено, что кверцетин, добавленный в культуральную среду до начала облучения (протокол 1) в

концентрации 10 мкмоль/л оказывал противовоспалительный эффект (рисунок 3), а именно достоверно снижал уровень экспрессии мРНК ИЛ-6 и ИЛ-1 β . В тоже время ресвератрол (10 мкмоль/л), добавленный к клеткам в соответствии с протоколом 1 не оказывал противовоспалительного действия, и даже напротив достоверно увеличивал экспрессию ИЛ-1 β . При добавлении ППС в культуральную среду после воздействия УФ (протокол 2), оба исследованных полифенола достоверно снижали уровень экспрессии мРНК ИЛ-6, ИЛ-1 β и СОХ2.



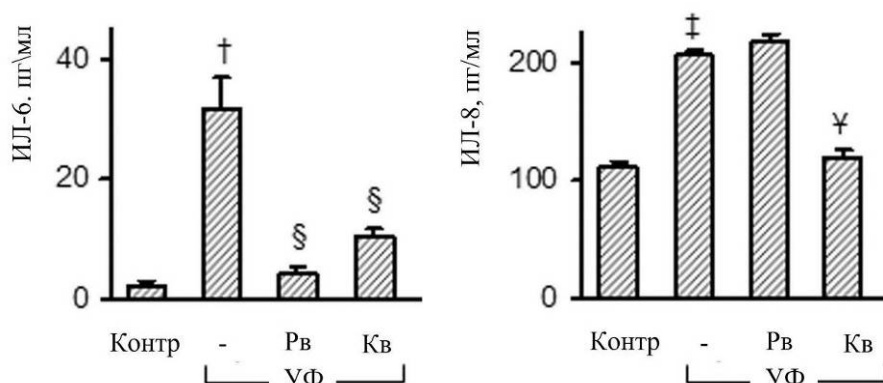
Уровень экспрессии мРНК провоспалительных медиаторов в нормальных кератиноцитах через 6 ч после воздействия УФ (УФА 1,0 Дж/см²+УФВ 0,1 Дж/см²): ресвератрол, кверцетин – 10 мкмоль/л

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

Рисунок 4 – Влияние добавления ППС до (протокол 1) и сразу после облучения (протокол 2) на УФ-индуцированную экспрессию мРНК

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 УФ не только уровень экспрессии мРНК воспалительных медиаторов, но и на их секрецию клеткой. Результаты количественного анализа секреции ИЛ-6 и ИЛ-8 на уровне белка методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) (рисунок 5), хорошо согласуются с результатами определения соответствующих мРНК методом ПЦР в реальном времени (рисунок 4). В частности, количество ИЛ-6 и ИЛ-8 в культуральной среде через 18 часов после УФ-воздействия увеличилось в 30 и 2 раза (мРНК в 24 и 2,3 раза), соответственно. В том случае, когда к клеткам сразу после УФ-облучения добавляли

кверцетин и ресвератрол наблюдалось значительное снижение секреции ИЛ-6. Кверцетин также снижал секрецию ИЛ-8 до базального уровня.



Содержание цитокинов в культуральной среде через 18 ч после воздействия УФИ (УФА 1,0 Дж/см² + УФВ 0,1 Дж/см²): ресвератрол, кверцетин –10 мкмоль/л
[†] - $p < 0,001$ vs контроль; [§] - $p < 0,01$ vs УФ; [¥] - $p < 0,001$ vs УФ

Рисунок 5 – Влияние добавления ППС без преинкубации (протокол 2) на УФ-индуцированную секрецию воспалительных цитокинов кератиноцитами

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что кверцетин и ресвератрол эффективно подавляют воспалительный ответ кератиноцитов, воздействуя на клеточные биохимические и физиологические процессы, которые протекают в пострadiaционный период и ведут к повышению продукции и секреции медиаторов воспаления. Следует отметить, что кверцетин подавляет воспалительный ответ кератиноцитов и в том случае, когда его добавляют к клеткам до УФ-облучения. По-видимому, этот феномен можно объяснить тем, что во время преинкубации примерно 30 % всего добавленного кверцетина связывается и, возможно, поглощается кератиноцитами (рисунок 1Г). При замене культуральной среды на ИФБ, а затем (после воздействия УФИ) замене ИФБ на среду без ППС, кверцетин остается связанным с клеточной поверхностью в количестве достаточном для эффективного воздействия на развитие воспалительного ответа. Ресвератрол также достаточно эффективно взаимодействует с кератиноцитами (рисунок 1Г). Однако, основываясь на данных, приведенных на рис.1А можно предположить с достаточной степенью достоверности, что практически весь связанный с клетками ресвератрол подвергается деструкции во время УФ-экспозиции клеток. В следствие этого УФ-индуцированный воспалительный ответ кератиноцитов, преинкубированных с ресвератролом, не только не снижается, но даже усиливается (рисунок 4). По-видимому, в этом случае имеет место синергизм провоспалительного действия УФ-излучения и продуктов фотодеструкции ресвератрола.

Выводы

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

- оксидантный гомеостаз и сигнальные пути, опосредующие увеличение экспрессии мРНК и секреции воспалительных медиаторов, могут быть мишенью фотозащитного действия фармакологических препаратов;
- природные полифенольные соединения существенно уменьшают воспалительный ответ клеток кожи, вызванный воздействием УФ-облучения, подавляя биохимические и физиологические процессы, активирующиеся в пострadiaционный период и ведущие к продукции медиаторов воспаления;

• результаты данной работы свидетельствуют, что ППС могут быть важным компонентом лечебно-профилактической косметики, разрабатываемой для ухода за кожей после интенсивного солнечного воздействия.

Список литературы

1. Darr, D. Free radicals in cutaneous biology / D. Darr, I. Fridovich // *J Invest Dermatol.* – 1994. – Vol. 102. – P. 671–675.
2. 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.
3. Direct monitoring of UV-induced free radical generation in HaCaT keratinocytes / G.R. Aitken [et al.] // *Clin Exp Dermatol.* – 2007. – Vol. 32. – P. 722–777.
4. Valencia, A. Nox1-based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced reactive oxygen species in human keratinocytes / A. Valencia, I.E. Kochevar // *J Invest Dermatol.* – 2008. – Vol. 128. – P. 214 – 222.
5. H₂O₂ 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.
6. Contribution of UVB and UVA to UV-dependent stimulation of cyclooxygenase-2 expression in artificial epidermis / A. Mahns [et al.] // *Photochem Photobiol Sci.* – 2004. – Vol. 3. – P. 257–262.
7. Adams, D.O. Macrophages as destructive cells in host defense / D.O. Adams, T.A. Hamilton // *In the Inflammation: basic principles and clinical correlates* - Raven Press, New York, 1992. - P. 637-662.

EFFECT OF NATURAL POLYPHENOLIC COMPOUNDS ON POST-IRRADIATION EVENTS IN KERATINOCYTES EXPOSED TO UV LIGHT

A.I. Potapovich, A. Albuhydar, T.O. Suhan, V.A. Kostyuk

Belarusian State University, Minsk, Belarus

e-mail: kostyuk@bsu.by

BACKGROUND: Anti-inflammatory effect of plant polyphenols (PPs) has been demonstrated in cellular studies. The further understanding of the anti-inflammatory mechanisms of action of PPs and clarification of the relationship between their anti-inflammatory and antioxidant properties may result in a new therapeutic approach to skin cancers.

OBJECTIVE: To elucidate the underlying mechanism we analyzed the ability of PPs to attenuate inflammatory and oxidative cellular responses exposed to UV irradiation.

METHODS: Normal human epidermal keratinocytes (NHEK) were subjected to physiologically relevant dose of solar-simulated UV irradiation. Two protocols for cell treatment with PPs were utilized in order to distinguish between the effects of pre- and post-exposure administration.

RESULTS: All polyphenols tested were able to significantly affect UV-activated inflammatory signaling. However, a clear difference between the effectiveness of pre- and post-treatment with polyphenols was found. In particular, UV-induced elevation of ROS level, in the cells pretreated with PPs was slightly lower than that in untreated cells while treatment of the cells with PPs after UV-irradiation completely abolished the effect of UV. It was also found that post-treatment with PPs efficiently prevented the UV-induced overexpression of *IL-1 beta*, *IL-6* and *COX2* mRNAs.

CONCLUSION: Our data strongly suggest that PPs predominantly affect delayed molecular and cellular events initiated in keratinocytes by solar UV rather than primary photochemical reactions. PPs may be important component in cosmetic formulations for post-sun skin care.