

УДК 577.33/34;577.355;577.3.32/36

## АКТИВАЦИЯ РЕПАРАЦИИ ДНК И ПОДАВЛЕНИЕ АПОПТОЗА В КЕРАТИНОЦИТАХ КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ЦИТОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ

А. И. ПОТАПОВИЧ<sup>1)</sup>, Т. О. СУХАН<sup>1)</sup>, А. АЛБУХАЙДАР<sup>1)</sup>, Т. В. ШМАН<sup>2)</sup>,  
Т. И. ЕРМИЛОВА<sup>2)</sup>, К. де ЛЮКА<sup>3)</sup>, В. А. КОСТЮК<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

<sup>2)</sup>Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,  
ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Боровлянский с/с, Минский район, Беларусь

<sup>3)</sup>«Медена АГ», ул. Индустриальная, 16, 8910, г. Аффольтерн-на-Альбисе, Швейцария

Исследованы ответы культивируемых клеток человека – кератиноцитов – на воздействие ультрафиолетового излучения коротковолнового диапазона без растительных полифенольных соединений и совместно с рядом из них. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о наличии цитопротекторного действия указанных соединений, добавленных сразу после воздействия ультрафиолетом. Цитопротекторная активность снижалась в ряду акацетин – силибин – байкалеин – леонтоподиевая кислота – кверцетин – цианидин хлорид – таксифолин – феруловая кислота. Исследовано влияние ультрафиолетового облучения коротковолнового диапазона без акацетина и в его присутствии на реакцию фосфорилирования гистонов H2AX, запускающую процесс репарации одностранных повреждений ДНК. Установлено, что в ответ на такое облучение в кератиноцитах активируется фосфорилирование гистонов H2AX, и акацетин оказывает существенное влияние на кинетику этой реакции. Сделан вывод, что растительные полифенольные соединения способны уменьшать деструктивное воздействие ультрафиолетового излучения на клетки кожи, активируя процесс репарации генетических повреждений.

**Ключевые слова:** ультрафиолетовое излучение; УФС; растительные полифенольные соединения; репарация ДНК; апоптоз; кератиноциты; гистон H2AX.

### Образец цитирования:

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. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-29-35>

### For citation:

Potapovich 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. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-29-35>

### Авторы:

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

**Татьяна Олеговна Сухан** – кандидат биологических наук; старший 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.

**Татьяна Викторовна Шман** – кандидат биологических наук; заведующий лабораторией иммунологических исследований.

**Татьяна Игоревна Ермилова** – младший научный сотрудник лаборатории иммунологических исследований.

**Кьяра де Люка** – доктор наук (медицина); менеджер по медицинским и нормативным вопросам.

**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, department of human and animal physiology, faculty of biology.

[pot-alla@rambler.ru](mailto:pot-alla@rambler.ru)

**Tatyana O. Suhan**, PhD (biology); senior researcher at the research laboratory of physiology, department of human and animal physiology, faculty of biology.

[tanyasuhan@mail.ru](mailto:tanyasuhan@mail.ru)

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

**Tatyana V. Shman**, PhD (biology); head of the laboratory of immunological research.

**Tatyana I. Ermilova**, junior researcher at the laboratory of immunological research.

[tatyana.ig21@gmail.com](mailto:tatyana.ig21@gmail.com)

**Chiara de Luca**, PhD (medicine); medical and regulatory affairs manager.

[deluca@cibi-nanolab.com](mailto:deluca@cibi-nanolab.com)

**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](mailto:kostyuk@bsu.by)

## DNA REPAIR ACTIVATION AND APOPTOSIS SUPPRESSION IN KERATINOCYTES AS A POSSIBLE MECHANISM OF CYTOPROTECTIVE ACTION OF PLANT POLYPHENOLS UNDER CONDITIONS OF UV-IRRADIATION

A. I. POTAPOVICH<sup>a</sup>, T. O. SUHAN<sup>a</sup>, A. ALBUHAYDAR<sup>a</sup>, T. V. SHMAN<sup>b</sup>,  
T. I. ERMILOVA<sup>b</sup>, C. de LUCA<sup>c</sup>, V. A. KOSTYUK<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Belarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

<sup>b</sup>Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,  
43 Frunzenskaja Street, Baraŭliany 223053, Baraŭlianski siełsaviet, Minsk region, Belarus

<sup>c</sup>«MEDENA AG», 16 Industriestrasse, Affoltern-am-Albis 8910, Switzerland

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

The work investigated the responses of cultured human keratinocytes to ultraviolet radiation in the C range (UVC) with and without a number of plant polyphenolic compounds. The experimental data obtained in this work indicate a cytoprotective effect of the PPs added immediately after UVC exposure. The cytoprotective activity of plant polyphenolic compounds was reduced in the series: acacetin, silybin, baikalein, leontopodium acid, quercetin, cyanidine chloride, taxifolin, trans-ferulic acid. The effect of UVC irradiation with and without of acacetin on the process of phosphorylation of histones H2AX, the triggering mechanism for the repair of single-stranded DNA damage, was also investigated in keratinocytes. It has been established that, H2AX phosphorylation is activated in response to UVC radiation and acacetin has a significant effect on the kinetics of this process. It is concluded that the PPs can reduce the destructive effect of UVR on the skin cells, activating the process of repairing genetic damage.

**Keywords:** ultraviolet radiation in the C range; UVR; plant polyphenolic compounds; inflammatory mediators; keratinocytes; histone H2AX.

### Введение

Экспериментальные данные, подтвержденные эпидемиологическими исследованиями, свидетельствуют, что солнечное ультрафиолетовое излучение (УФИ) является наиболее важным канцерогеном окружающей среды, приводящим к развитию рака кожи. Согласно современной классификации Международной комиссии по освещению (CIE), УФИ делится на три диапазона:

- УФА, или длинноволновый (320–400 нм);
- УФВ, или средневолновый (280–320 нм);
- УФС, или коротковолновый (200–280 нм).

УФИ способно воздействовать на клетки кожи, как непосредственно повреждая хроматин [1], так и инициируя сигнальные процессы, ведущие к выбросу провоспалительных цитокинов и протеолитических ферментов, стимулирующих развитие воспаления, хроническая форма которого является причиной значительной части всех онкологических заболеваний [2; 3]. Результаты многочисленных исследований, направленных на выяснение специфических путей передачи сигнала, участвующих в УФ-индуцированном канцерогенезе кожи, свидетельствуют о том, что клеточный сигнальный ответ зависит от длины волны УФИ. Вместе с тем сигнальные каскады митогенактивируемых протеинкиназ (МАРК), играющих важную роль в развитии множества УФ-индуцированных клеточных ответов, в том числе инициировании апоптоза, активируются при воздействии на клетки кожи УФ-излучения всех диапазонов [4; 5].

Основной мишенью УФ-излучения является ядерная ДНК, в этом случае клеточные ответы инициируются в результате появления одноцепочечных разрывов. Они возникают при воздействии на клетки кожи УФС, но могут быть следствием воздействия УФВ и УФА [1]. Образующаяся при этом ковалентная связь между двумя соседними пиримидиновыми основаниями (тиминном или цитозинном) приводит 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 [6]. Клеточный ответ на возникновение CPDs и 6-4PPs включает активацию эксцизионной репарации нуклеотидов – одного из механизмов репарации ДНК, который позволяет исправить однонитевые повреждения ДНК, используя в качестве матрицы неповрежденную комплементарную цепь [1]. При неполной репарации повреждений ДНК запускается сигнальный каскад, вызывающий приостановку клеточного

цикла и (или) инициирование апоптоза. Одно из наиболее ранних событий репарации ДНК – фосфорилирование белка, называемого гистоном H2AX [7]. Это вариант гистона H2A, являющийся компонентом коровой структуры нуклеосом, вокруг которой обернута ДНК. Фосфорилированный белок, обозначаемый как  $\gamma$ H2AX, необходим для привлечения к участию в репарации других белков. Основываясь на приведенных данных литературы, мы полагаем, что УФС-индуцированное повреждение клеток кожи является адекватной моделью, воспроизводящей молекулярно-биологические последствия фотохимических процессов в коже, иницируемых УФИ, и позволяет проводить поиск новых эффективных природных фотопротекторов, способных ингибировать негативные процессы, уменьшая деструктивное воздействие УФИ. В данной работе было исследовано влияние УФС-облучения на жизнеспособность кератиноцитов линии HaCaT и процессы репарации ДНК без растительных полифенольных соединений (РПС) и в их присутствии.

### Материалы и методы исследования

**Реактивы.** В работе использовались коммерческие полифенольные соединения: кверцетин, транс-феруловая кислота (*Sigma*, США); таксифолин, силибин, цианидин хлорид, леонтоподиевая кислота, акацетин, байкалеин (*Extrasynthese*, Франция). Во всех экспериментах полифенолы растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Также применялись трипсин, среда ДМЕМ, акридиновый оранжевый, этидиум бромид (*Sigma-Aldrich*, Германия), изотонический фосфатный буфер (ИФБ, pH 7,4) (*Lonza*, Бельгия), антибиотики (*Gibco*, США), эмбриональная бычья сыворотка (ЭБС) (*Capricorn*, Польша).

**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. Клетки растили в стандартных условиях (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) в 96- или 6-луночных планшетах в среде ДМЕМ с 10 % ЭБС до 70–80 % конфлюента.

**Моделирование УФС-облучения.** В данной работе применяли бактерицидную лампу G30W Sylva, 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/см<sup>2</sup>. Исследование влияния УФС на жизнеспособность культивируемых клеток без РПС и в их присутствии проводили в 96-луночных планшетах через 24 ч после воздействия. Использовали два экспериментальных протокола. В соответствии с протоколом 1 за 30 мин до облучения к клеткам добавляли среду ДМЕМ без сыворотки, содержащую ДМСО или растворы РПС в ДМСО в дозе 50 мкмоль/л. Клетки культивировались при стандартных условиях (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Непосредственно перед облучением культуральную среду заменяли на ИФБ. Сразу после облучения ИФБ заменяли на среду ДМЕМ без сыворотки. Клетки культивировались при стандартных условиях (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). В соответствии с протоколом 2 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 50 мкмоль/л. Клетки культивировались при стандартных условиях (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

**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 на планшетном флуориметре. Усредненную интенсивность флуоресценции лунок, содержащих контрольные клетки, принимали за 100 %.

**Проточная цитофлуориметрия.** Снимали с 6-луночного планшета контрольные и УФС-обработанные кератиноциты HaCaT (0,5 · 10<sup>6</sup> клеток на образец) через 8 ч после воздействия, окрашивали индикаторами аннексином V-FITC (Ан) и пропидия иодидом (ПИ), используя набор Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (*Sigma*, США) в соответствии с инструкцией производителя, и анализировали с помощью проточного цитометра FACScan (*Becton-Dickinson*, США). Флуоресценцию красителей возбуждали лазером с длиной волны 488 нм, эмиссию Ан и ПИ измеряли при (530 ± 30) нм и (613 ± 20) нм соответственно.

**Тест на живые и мертвые клетки.** Через 18 ч после УФС-облучения (0,06 Дж/см<sup>2</sup>) без РПС и в их присутствии (50 мкмоль/л) прикрепленные клетки подвергали двойному флуоресцентному окрашиванию акридиновым оранжевым (АО) и этидиум бромидом (ЭБ). Клетки визуализировали и фотографировали, используя инвертированный флуоресцентный микроскоп Axiovert 25 (*Zeiss*, Германия).

**Иммунофлуоресценция.** Фосфорилированные гистоны H2AX –  $\gamma$ H2AX – в культуре кератиноцитов HaCaT оценивали с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания, используя первичные антитела

к  $\gamma$ H2AX (pS139) и вторичные антивидовые антитела, конъюгированные с Alexa Fluor488. Клетки предварительно фиксировали в 10 % формалине (pH 7,0). Доступ антител к мишени обеспечивали за счет пермеабилзации клеточной и ядерной мембран 0,3 % раствором тритона X-100 в ИФБ. Неспецифическое связывание минимизировали инкубацией клеток в блокирующем буфере, содержащем бычий сывороточный альбумин. Для визуализации клетки дополнительно окрашивали пропидия иодидом.

**Статистическая обработка результатов.** Полученные данные обрабатывали с использованием стандартной компьютерной программы *Excel*. Статистические материалы 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 УФС на кератиноциты человека линии HaCaT без РПС и в их присутствии.** В предварительных экспериментах было исследовано влияние УФС-излучения на жизнеспособность кератиноцитов человека линии HaCaT через различные интервалы времени после облучения. Как следует из табл. 1, УФС в дозах 0,03 и 0,06 Дж/см<sup>2</sup> не оказывает достоверного влияния на жизнеспособность кератиноцитов через 4 ч после воздействия, при этом через 24 ч количество жизнеспособных кератиноцитов уменьшается более чем на 80 % в сравнении с необлученным контролем.

Таблица 1

**Влияние УФС на жизнеспособность культивируемых HaCaT через 4 и 24 ч после воздействия**

Table 1

**The effect of UV radiation on the viability of cultured HaCaT 4 and 24 h after exposure**

Условия эксперимента	Количество клеток, %	
	4 ч после облучения	24 ч после облучения
Контроль	100,0 ± 14,3	100,0 ± 8,3
УФС: 0,03 Дж/см <sup>2</sup>	90,0 ± 12,3	12,8 ± 6,1 <sup>***a</sup>
0,06 Дж/см <sup>2</sup>	89,7 ± 9,4	16,9 ± 3,9 <sup>***a</sup>

<sup>\*\*\*a</sup> $p < 0,001$  относительно контроля.

Чтобы оценить роль апоптоза в реализации цитотоксического действия УФС, контрольные и облученные клетки через 8 ч после воздействия окрашивали индикаторами Ан и ПИ и анализировали состав клеточных популяций (Ан и ПИ положительные, Ан и ПИ отрицательные), используя метод проточной цитофлуориметрии. Результаты, представленные на рис. 1, свидетельствуют, что облучение кератиноцитов УФС приводит к существенному снижению интактных клеток (Ан и ПИ отрицательные) и возрастанию количества поздних апоптотических (Ан и ПИ положительные) и некротических (Ан отрицательные, ПИ положительные) клеток.

В последующих экспериментах исследовали цитопротекторную активность ряда РПС, добавляемых к клеткам в концентрации 50 мкмоль/л как до УФС-воздействия, так и после него. В первом случае клетки преинкубировали с РПС в течение 30 мин, но облучение клеток и последующую инкубацию проводили в среде, не содержащей РПС. Во втором случае РПС добавляли к клеткам сразу после облучения, и они находились в среде при последующей инкубации клеток. Данные, приведенные в табл. 2, свидетельствуют, что РПС, добавленные после облучения, достоверно увеличивают количество жизнеспособных кератиноцитов через 24 ч после воздействия в сравнении с УФС-облученными клетками, инкубируемыми без РПС. Цитопротекторная активность РПС снижалась в ряду акацетин – силибин – байкалеин – леонтоподиевая кислота – кверцетин – цианидин хлорид – таксифолин – *транс*-феруловая кислота. Вместе с тем РПС, добавленные за 30 мин до облучения и удаленные непосредственно перед облучением, были неэффективны.

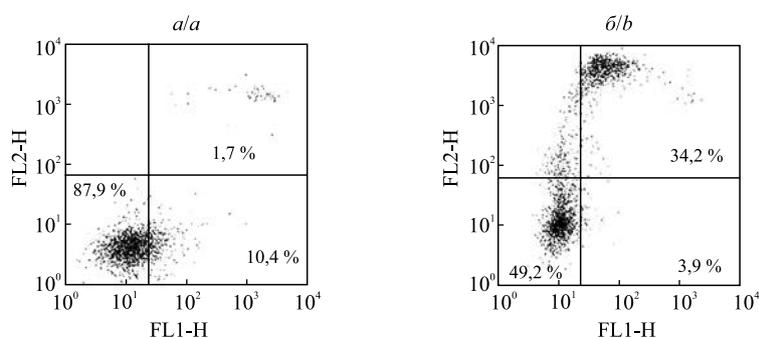


Рис. 1. Результаты проточной цитофлуориметрии контрольных (а) и подвергнутых УФС-облучению (0,06 Дж/см<sup>2</sup>) (б) кератиноцитов HaCaT.

Клетки одновременно окрашивали ПИ и Ан, и интенсивность соответствующей флуоресценции была количественно определена для 100 тыс. клеток. Расположенные в нижнем левом квадранте точки соответствуют живым клеткам, в нижнем правом – ранним апоптотическим, в правом верхнем – поздним апоптотическим и в левом верхнем – клеточным фрагментам и некротическим клеткам

Fig. 1. Flow cytometry analysis of control HaCaT cells (a) and cells exposed to UVC irradiation (0.06 J/cm<sup>2</sup>) (b).

Cells were simultaneously stained with propidiumiodide and annexin V-FITC. Fluorescence signal intensities of 100 thousand cells were quantified. Bottom left quadrant represents live cells; bottom right quadrant represents early apoptotic cells; top left quadrant represents necrotic cells and top right quadrant represents late apoptotic cells

Таблица 2

**Влияние УФС (0,06 Дж/см<sup>2</sup>) на жизнеспособность культивируемых HaCaT через 24 ч после воздействия без РПС и в их присутствии (50 мкмоль/л)**

Table 2

**Effect of UVC radiation (0.06 J/cm<sup>2</sup>) on the viability of cultured HaCaT 24 h after exposure without and in the presence of PPs (50 μmol/L)**

Условия эксперимента	Количество клеток, %		Эффективность цитопротекторного действия РПС*	
	РПС после УФС	РПС до УФС	РПС после УФС	РПС до УФС
Контроль	100 ± 13,5	100 ± 13,5	–	–
УФС	12,8 ± 6,1 <sup>***а</sup>	12,8 ± 6,1 <sup>***а</sup>	–	–
УФС + Бк	22,9 ± 4,5 <sup>***б</sup>	15,1 ± 6,2	1,8	1,2
УФС + Сл	38,5 ± 7,9 <sup>***б</sup>	14,7 ± 2,7	3,0	1,1
УФС + Кв	21,1 ± 6,7 <sup>**б</sup>	15,8 ± 6,7	1,6	1,2
УФС + Тф	15,9 ± 9,2	16,4 ± 9,2	1,2	1,3
УФС + Ак	39,6 ± 7,6 <sup>***б</sup>	Н/о	3,1	Н/о
УФС + Лк	23,3 ± 5,2 <sup>**б</sup>	Н/о	1,8	Н/о
УФС + Цх	19,3 ± 6,5 <sup>**б</sup>	Н/о	1,5	Н/о
УФС + Фк	13,7 ± 5,0	Н/о	1,1	Н/о

Примечание. \*Рассчитывали как отношение количества жизнеспособных клеток в серии УФС + РПС к количеству таковых в серии УФС; <sup>\*\*\*а</sup>*p* < 0,001 относительно контроля; <sup>\*\*б</sup>*p* < 0,01, <sup>\*\*\*б</sup>*p* < 0,001 относительно УФС; Бк – байкалеин; Сл – силибин; Кв – кверцетин; Тф – таксифолин; Ак – акацетин; Лк – леонтоподиевая кислота; Цх – цианидин хлорид; Фк – транс-феруловая кислота. Н/о – не определялось.

Цитопротекторное действие акацетина (рис. 2, в), кверцетина (рис. 2, з), леонтоподиевой кислоты (рис. 2, д) и силибина (рис. 2, е) при УФС-индуцированном повреждении кератиноцитов подтверждено стандартным тестом на живые и мертвые клетки с использованием витальных флуоресцентных красителей – АО и ЭБ. АО окрашивает как живые, так и некротические клетки (зеленое ядро), тогда как ЭБ – только клетки, которые потеряли целостность мембраны (оранжевое или красное ядро). Как следует из приведенных на рис. 2 флуоресцентных микрофотографий, через 18 ч после воздействия УФС в дозе 0,06 Дж/см<sup>2</sup> существенно снижается общее количество клеток по сравнению с контрольными образцами, при этом большая часть оставшихся имеет интенсивную красную флуоресценцию за счет окрашивания ядер ЭБ. В присутствии РПС (50 мкмоль/л) остается большой процент клеток, окрашенных только АО (живые клетки).

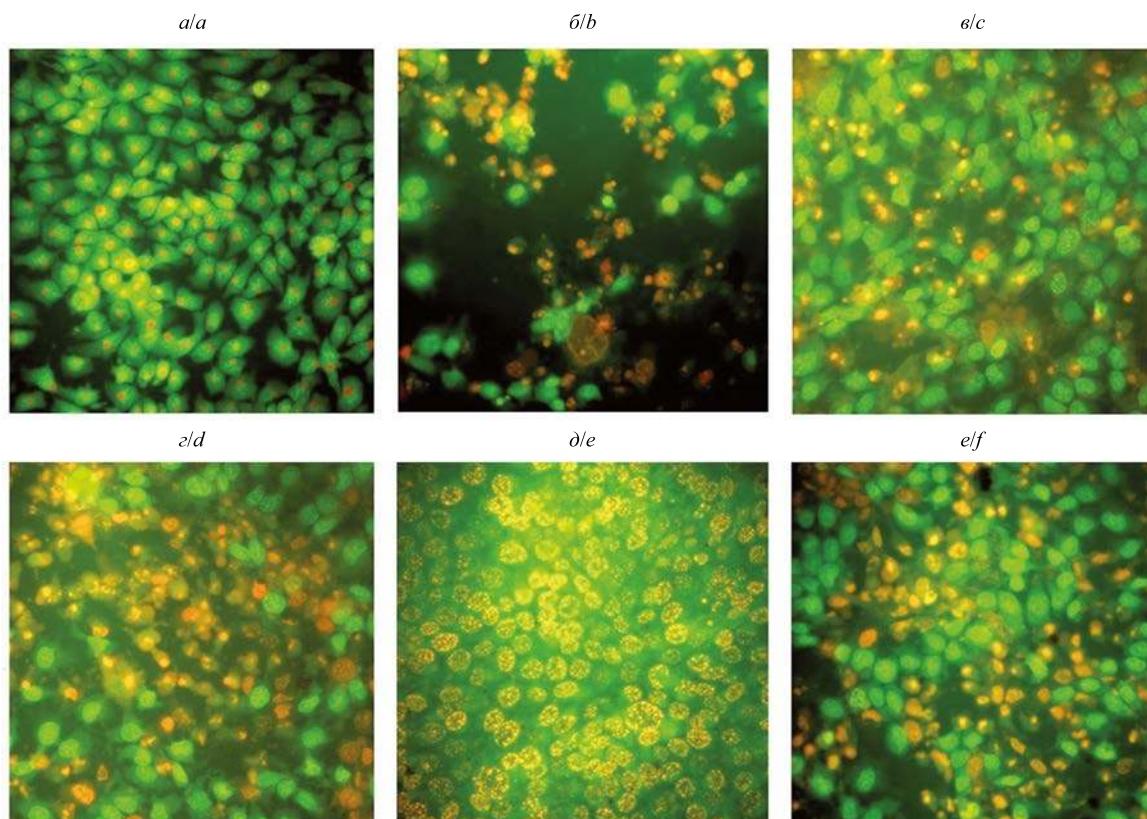


Рис. 2. Репрезентативные флуоресцентные микрофотографии клеток HaCaT до (а) и через 18 ч (б) после воздействия УФС в дозе 0,06 Дж/см<sup>2</sup>, а также УФС совместно с акацетином (в), кверцетином (г), леонтоподиевой кислотой (д) и силибином (е) в концентрации 50 мкмоль/л

Fig. 2. Representative fluorescent micrographs of HaCaT cells before (a) and 18 h after exposure to UVC at a dose of 0.06 J/cm<sup>2</sup> (b), UVC together with: acacetin (c), quercetin (d), leontopodievoy acid (e) and silybin (f) at a concentration of 50 μmol/L

**Влияние УФС-облучения без акацетина и в его присутствии на процесс фосфорилирования гистонов H2AX.** Известно, что при повреждении ДНК инициируется процесс эксцизионной репарации нуклеотидов, который позволяет исправить однонитевые повреждения ДНК, используя в качестве матрицы неповрежденную комплементарную цепь. В том случае, когда не происходит полной репарации повреждений ДНК, запускается сигнальный каскад, вызывающий гибель клеток путем апоптоза. Как свидетельствуют данные проточной цитофлуориметрии (см. рис. 1), такая ситуация имеет место при воздействии на кератиноциты человека линии HaCaT УФС-излучения в дозе 0,06 Дж/см<sup>2</sup>. Поскольку защитный эффект РПС в этом случае может быть обусловлен усилением репарации ДНК, в последующих экспериментах было исследовано влияние УФС-облучения без наиболее эффективного цитопротектора акацетина и в его присутствии на процесс фосфорилирования гистонов H2AX, запускающий механизм репарации однонитевых повреждений ДНК. Кератиноциты HaCaT облучали УФС в дозе 0,06 Дж/см<sup>2</sup> и определяли количество γH2AX через 1 и 4 ч после воздействия с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания, используя первичные антитела к γH2AX (pS139) (рис. 3).

В этих экспериментах установлено, что в ответ на УФС-облучение в кератиноцитах уже через 1 ч после воздействия активируется фосфорилирование H2AX и возрастает количество γH2AX, которое достигает максимума через 4 ч (см. рис. 3), что полностью совпадает с данными, полученными ранее Т. Марти с соавторами [8]. Совершенно другой вид имеет кинетика фосфорилирования H2AX в ответ на воздействие УФС-излучения в присутствии акацетина. В этом случае максимум фосфорилирования H2AX наблюдается уже через 1 ч после воздействия УФС на кератиноциты, а через 4 ч интенсивность фосфорилирования возвращается к исходному уровню. С. Ханасоге и М. Юнгман показано [9], что фосфорилирование H2AX после УФ-облучения запускается интермедиатами процесса репарации ДНК и увеличение количества таких интермедиатов в результате ингибирования ДНК репаративного синтеза приводит к заметному усилению фосфорилирования. В присутствии акацетина процесс фосфорилирования H2AX существенно ускорился и содержание γH2AX в облученных кератиноцитах через 4 ч не отличалось от его содержания в контрольных клетках, что можно рассматривать как доказательство способности акацетина активировать и ускорять процесс репаративного синтеза ДНК после воздействия УФС.

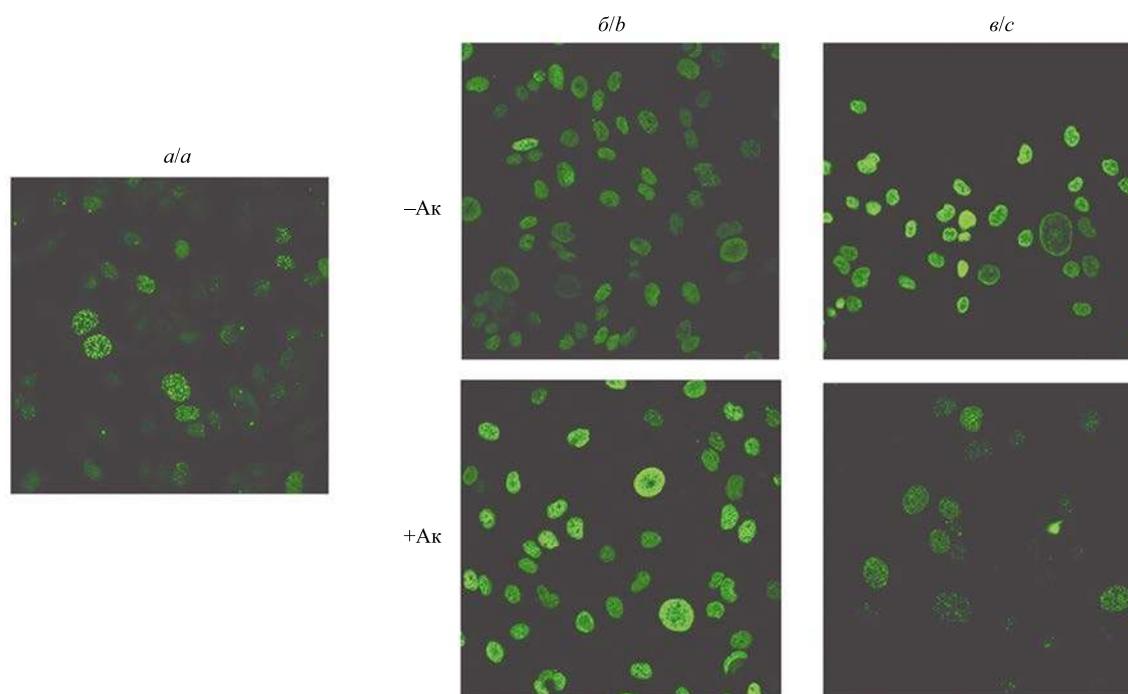


Рис. 3. Репрезентативные флуоресцентные микрофотографии клеток HaCaT до (а), через 1 ч (б) и 4 ч (в) после воздействия УФС в дозе 0,06 Дж/см<sup>2</sup> без акацетина (-Ак) и совместно с ним (+Ак) в концентрации 50 мкмоль/л. Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили, используя первичные антитела к  $\gamma$ H2AX (pS139) и вторичные антитела, конъюгированные с Alexa Fluor488

Fig. 3. Representative fluorescent micrographs of HaCaT cells before (a), after 1 h (b) and 4 h (c) after exposure to UVC at a dose of 0.06 J/cm<sup>2</sup> without (-Ак) and with acacetin (+Ак) at a concentration of 50  $\mu$ mol/L. Immunofluorescent staining was performed using primary antibodies to  $\gamma$ H2AX (pS139) and secondary anti-antibodies conjugated with Alexa Fluor488

### Закключение

В результате исследования молекулярно-биологических процессов, инициируемых УФС-излучением в кератиноцитах без потенциальных УФ-протекторов и в их присутствии, можно сделать вывод, что среди РПС есть ряд соединений, способных уменьшать негативные последствия воздействия УФИ на клетки кожи, активируя репарацию генетических повреждений и тормозя механизмы апоптоза.

### Библиографические ссылки / References

1. Farrell AW, Halliday GM, Lyons JG. Chromatin structure following UV-induced DNA damage – Repair or death? *International Journal of Molecular Sciences*. 2011;12:8063–8085. DOI: 10.3390/ijms12118063.
2. 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.
3. Adams DO, Hamilton TA. Macrophages as destructive cells in host defense. In: Gallin JI, Goldstein IM, Synderman R, chief editors. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. New York: Raven Press; 1992. p. 637–662.
4. Bode AM, Dong Z. Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction. *Science's STKE*. 2003;167:RE2. DOI: 10.1126/stke.2003.167.re2.
5. 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.
6. Setlow RB. Cyclobutane-Type Pyrimidine Dimers in Polynucleotide. *Science*. 1966;153(3734):379–386. DOI: 10.1126/science.153.3734.379.
7. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(10):5858–5868. DOI: 10.1074/jbc.273.10.5858.
8. Marti TM, Hefner E, Feeney L, Natale V, Cleaver JE. H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(26):9891–9896. DOI: 10.1073/pnas.0603779103.
9. Hanasoge S, Ljungman M. H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. *Carcinogenesis*. 2007;28(11):2298–2304.

Статья поступила в редакцию 24.04.2019.  
Received by editorial board 24.04.2019.