
Физиология и клеточная биология

PHYSIOLOGY AND CELL BIOLOGY

УДК 577.33/.34;577.355;577.3.32/.36

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИРОДНЫХ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ КАК ХИМИЧЕСКИХ ФИЛЬТРОВ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ

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

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

Представлены экспериментальные данные, свидетельствующие о возможности использования различных растительных полифенольных соединений в качестве химических фильтров ультрафиолетового излучения диапазонов А и В. Для расчета эффективности солнцезащитного действия регистрировали спектры поглощения разбавленных растворов растительных полифенольных соединений и определяли величину оптической плотности в области 290–400 нм. Установлено, что у большинства исследованных соединений эффективность солнцезащитного действия сравнима или даже превышает эффективность солнцезащитного действия стандартного химического фильтра – бензофенона-3, широко используемого в солнцезащитной косметике. Среди исследованных растительных полифенольных соединений выявлены устойчивые к воздействию ультрафиолетового излучения, а также соединения, в частности ресвератрол и халкон, которые разрушаются с образованием цитотоксических

Образец цитирования:

Албухайдар А., Потапович А. И., Костюк В. А. Количественная оценка эффективности природных полифенольных соединений как химических фильтров УФ-излучения // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 3–12.

For citation:

Albuhaydar A., Potapovich A. I., Kostyuk V. A. Quantity estimation of effectiveness of natural polyphenolic compounds as chemical UV-sunscreens. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 3–12 (in Russ.).

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; заведующий научно-исследовательской лабораторией физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Authors:

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

Alla Potapovich, PhD (biology); chief researcher at the science laboratory of physiology at the department of physiology of human and animals, faculty of biology.

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

kostyuk@bsu.by

продуктов даже при кратковременном воздействии ультрафиолетового излучения. При моделировании повреждающего действия ультрафиолетового излучения на клетки кожи среди устойчивых к нему растительных полифенольных соединений выявлены такие, которые обладают эффективным цитопротекторным действием и представляют интерес как потенциальные компоненты солнцезащитных средств.

Ключевые слова: ультрафиолетовое излучение; солнцезащитные средства; химические ультрафиолетовые фильтры; растительные полифенолы, кератиноциты.

QUANTITY ESTIMATION OF EFFECTIVENESS OF NATURAL POLYPHENOLIC COMPOUNDS AS CHEMICAL UV-SUNSCREENS

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

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

Corresponding author: kostyuk@bsu.by

The aim of research was to quantify *in vitro* the effectiveness of plant polyphenols as chemical UV-sunscreens. Sun protection factor (SPF) of plant polyphenols (PPs) was determined on the base of spectrophotometric analysis of dilute solutions. Human keratinocytes (HaCaT) viability and proliferation were estimated using PrestoBlue™ reagent. UV-resistant sunscreens possessed very high SPF were found among PPs studied. These compounds effectively protected keratinocytes against UV-induced injury *in vitro*. We also found that some PPs e. g. resveratrol and chalcone were easily converted by UV-irradiation into extremely cytotoxic intermediates. Our data strongly suggest that PPs may be important component in cosmetic formulations for skin care and sun protection.

Key words: UV-irradiation; photoprotective compounds; chemical UV-sunscreens; plant polyphenols; keratinocytes.

Введение

Солнечный свет представляет собой электромагнитное излучение в широком диапазоне частот – от ультрафиолетового (УФ) до инфракрасного (ИК). Он абсолютно необходим для существования жизни на Земле, тем не менее избыточная солнечная радиация, в первую очередь ее ультрафиолетовый компонент, оказывает вредное воздействие на кожные покровы и организм человека в целом. Всю область УФ-излучения (УФИ) в медико-биологических исследованиях принято делить на три основных диапазона: УФС (длина световой волны 200–280 нм), УФВ (280–320 нм), УФА (320–400 нм) [1]. Практически весь диапазон УФС-излучения и большая часть УФВ-излучения поглощаются озоновым слоем стратосферы. Однако появление в последнее время так называемых озоновых дыр привело к тому, что доля этих наиболее опасных для человека видов излучения в общей солнечной радиации, достигающей поверхности Земли, существенно увеличилась. Воздействию избыточной солнечной радиации на человека способствует и увлечение пляжным отдыхом. Именно с этими причинами связывают резкое увеличение заболеваемости раком кожи, наблюдающееся в последнее время [1–3]. Одним из наиболее эффективных способов профилактики рака кожи является защита открытых участков тела от избыточного солнечного УФИ. С этой целью широко используются минеральные и органические химические вещества, которые подразделяются на физические (светоотражающие) и химические (светопоглощающие) солнцезащитные средства [4]. Физические УФ-протекторы – обычно микрочастицы минеральных веществ, отражающих солнечное излучение, например диоксид титана и оксид цинка, – считаются наиболее безопасными. Они не впитываются, действуют на коже подобно защитному экрану и не вызывают раздражения и аллергических реакций. Но средства, содержащие только минеральные фильтры, неводостойки и в большинстве случаев имеют сравнительно небольшой фактор защиты. Химические УФ-фильтры – это специально синтезированные вещества, которые поглощают ультрафиолетовое излучение, препятствуя проникновению солнечных лучей в кожу. Однако в результате последующих фотохимических реакций с участием органических фильтров могут образовываться канцерогенные и аллергенные интермедиаты [5]. Поэтому в различных научных центрах ведутся работы по поиску новых компонентов для нетоксичных и гипоаллергенных солнцезащитных композиций. В рамках этих исследований большой интерес представляют растительные полифенольные соединения (РПС). Данный интерес в значительной степени обусловлен тем обстоятельством, что физиологической функцией многих РПС как раз и является защита от воздействия УФИ, и эта функция реализуется благодаря тому, что они представляют собой эффективные химические фильтры, избирательно поглощающие вредное

излучение. В отличие от синтетических природные химические фильтры более безопасны, кроме того, они способны ингибировать клеточные и гуморальные реакции, развивающиеся в коже в результате воздействия солнечного УФ [6–8].

Цель настоящей работы – изучение эффективности фотопротекторного действия 16 природных полифенольных соединений в сравнении со стандартным химическим фильтром – бензофеноном-3, широко используемым в солнцезащитной косметике.

Материалы и методика исследований

В работе использовали коммерческие полифенольные соединения: кверцетин, морин, кемпферол, эпикатехин, рутин, силибин, *транс*-феруловую кислоту (*Sigma*, США); таксифолин, халкон, кризин, цианидин хлорид, леонтоподиевую кислоту, акацетин, байкалеин (*Extrasynthese*, Франция), ресвератрол (*Biomol*, США), бензофенон-3 (*Medena*, Швейцария). Вербаскозид, полученный из культивируемых клеток *Syringa vulgaris*, был любезно предоставлен доктором Roberto Dal Toso (*IRB S. r. l.*, *Altavilla Vicentina*, Италия).

Клеточную культуру кератиноцитов человека (линия HaCaT) выращивали в полной среде DMEM (*Sigma-Aldrich*, Германия) с высоким содержанием глюкозы, 10 % эмбриональной бычьей сывороткой (ЭБС), раствором в концентрации 2 ммоль/л L-глутамин и антибиотиками (100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина) при стандартных условиях (37 °C, 5 % CO₂).

Эксперименты проводили в 96- и 24-луночных планшетах. Для посева в 96-луночные планшеты в лунку вносили 100 мкл клеточной суспензии ($0,5 \cdot 10^4$ клеток на лунку) в полной среде DMEM, в лунку 24-луночных планшетов – 1 мл аналогичной клеточной суспензии ($3 \cdot 10^4$ клеток на лунку). Непосредственно перед УФ-облучением среду в лунках заменяли на изотонический фосфатный буфер (ИФБ) с pH 7,4, содержащий исследуемые РПС, или соответствующий растворитель, используемый для приготовления исходных растворов РПС.

В качестве источника УФ-излучения использовали облучатель ультрафиолетовый ОУФк-05 (Россия), обеспечивающий в эффективном спектральном диапазоне (280–400 нм) интенсивность облучения на расстоянии 0,1 м не менее 25 Вт/м² при соотношении между УФА и УФВ 2 : 1. После облучения ИФБ заменяли на среду DMEM, не содержащую ЭБС, и клетки культивировались в течение 3; 6 или 24 ч при стандартных условиях (37 °C, 5 % CO₂). Для регистрации оптических спектров поглощения использовали спектрофотометр Cary 50 Bio (*Varian*, США). Для приготовления исходных растворов (10 ммоль/л) исследуемых соединений, за исключением вербаскозида, леонтоподиевой кислоты и бензофенона, использовали диметилсульфоксид (DMCO), для растворения вербаскозида и леонтоподиевой кислоты применяли деионизированную воду, бензофенон-3 растворяли в изопропиловом спирте. Для регистрации спектров поглощения готовили соответствующие рабочие растворы (50 мкмоль/л) в ИФБ с pH 7,4.

Пролиферативную активность и жизнеспособность клеток определяли в 96-луночных планшетах, используя реактив PrestoBlue™ (*Invitrogen*, США), содержащий нефлуоресцентный компонент голубого цвета резазурин, который модифицируется жизнеспособными клетками в высокофлуоресцентное соединение красного цвета. Реагент PrestoBlue™ разводили в культуральной среде (1 : 9) и добавляли к клеткам в количестве 100 мкл на лунку. На каждом планшете для определения базового уровня флуоресценции оставляли лунки с культуральной средой без клеток. Флуоресценцию измеряли после инкубации в течение 1,5 ч при 37 °C, используя фильтр (Ex 560 ± 25 нм, Em 590 ± 10 нм).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартной компьютерной программы *Excel*.

Результаты исследования и их обсуждение

Определение эффективности солнцезащитного действия природных полифенолов

Эффективность солнцезащитных средств оценивается величиной так называемого солнцезащитного фактора (SPF), который определяется путем деления энергии УФ, равной минимальной эритемной дозе (МЭД) для защищенной кожи, на энергию УФ, соответствующую МЭД на незащищенной коже [1]. На основании значений SPF можно определить, во сколько раз увеличивает продолжительность безопасного солнечного воздействия на кожу использование защитных средств. Существует межгосударственный стандарт, регламентирующий способ определения SPF для косметической продукции в соответствии с ISO 24444-2013. Это достаточно затратная, трудоемкая и длительная процедура, связанная с привлечением добровольцев. В связи с этим для предварительной оценки эффективности солнцезащитных средств широко используют методы *in vitro*, основанные на измерении поглощения или пропускания УФ-излучения пленками солнцезащитных продуктов на кварцевых пластинах или

их разбавленными растворами [9–14]. В настоящей работе для оценки солнцезащитных свойств исследованных соединений регистрировали их спектры поглощения и определяли величину оптической плотности в области 290–400 нм с шагом 5 нм. Для спектрофотометрирования использовали растворы с концентрацией РПС 50 мкмоль/л, которые для каждого соединения готовили в трех повторах. Для расчета значений SPF использовали апробированное в ряде работ [9; 13; 14] эмпирическое уравнение

$$SPF = CF \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot Abs(\lambda), \quad (1)$$

где CF – поправочный коэффициент, равный 10; $EE(\lambda)$ – эритемный коэффициент при длине волны λ ; $Abs(\lambda)$ – значения оптической плотности анализируемого раствора при длине волны λ . Значения $EE \cdot I$ являются экспериментальными константами, определенными в [15].

Пример расчета SPF для бензофенона-3 с использованием (1) приведен в табл. 1. При оценке SPF солнцезащитных продуктов *in vitro* учитывали, что для спектрофотометрирования используют 0,02 % растворы, т. е. разводят в 5000 раз [9]. Таким образом, приведенное в табл. 1 значение SPF относится к условному крему с содержанием 250 ммоль/л бензофенона-3.

Таблица 1

Пример расчета значений SPF по результатам регистрации спектров поглощения для условного крема с содержанием 250 ммоль/л бензофенона-3

Table 1

Example of calculation of SPF value of cream with 250 mmol/l benzophenone-3 using data from the absorption spectra

Длина волны, нм	$EE \cdot I$	Abs	$EE \cdot I \cdot Abs$
290	0,015	0,611 5	0,009 2
295	0,081 7	0,589 7	0,048 2
300	0,287 4	0,534 7	0,153 7
305	0,327 8	0,487 1	0,159 7
310	0,186 4	0,455 9	0,085 0
315	0,083 7	0,443 1	0,037 1
320	0,018	0,437 7	0,007 9
$\sum_{290}^{320} EE \cdot I \cdot Abs$	–	–	0,500 7
$SPF = CF \cdot \sum_{290}^{320} EE \cdot I \cdot Abs$	–	–	5,01

Аналогичным образом определяли SPF для всех исследованных соединений. По результатам трех независимых экспериментов находили среднее значение и стандартное отклонение, которые приведены в табл. 2. Обычно содержание действующих компонентов в солнцезащитных средствах приводится в единицах не молярной, а процентной концентрации. Поэтому в табл. 2 приведены также значения SPF для условного крема, содержащего 10 % исследованных соединений.

Определение коэффициента УФА/УФВ у природных полифенолов

Поскольку эритема является результатом воздействия УФВ-излучения, солнцезащитный фактор не может быть использован как индикатор защиты от УФА-излучения. А именно этот вид облучения играет главную роль в процессах фотостарения кожи и, как показывают последние исследования, способен активировать процессы, ведущие к развитию рака кожи [2; 3]. Для оценки фотопротекторного действия потенциальных косметических средств широко используют коэффициент УФА/УФВ, позволяющий судить о том, насколько эффективно исследуемое вещество поглощает УФ-излучение в области А по сравнению с поглощением в области В. Для расчета коэффициента УФА/УФВ в данной работе использовали следующее уравнение:

$$\text{УФА/УФВ} = 0,059 \cdot \sum_{320}^{400} \text{Abs}(\lambda)(\text{шаг } 5 \text{ нм}) / 0,125 \cdot \sum_{290}^{320} \text{Abs}(\lambda)(\text{шаг } 5 \text{ нм}), \quad (2)$$

где Abs(λ) – значения оптической плотности анализируемого раствора при длине волны λ ; 0,059 и 0,125 – коэффициенты, позволяющие учесть различие в количестве суммируемых значений Abs для УФ-диапазонов А и В. Значения, рассчитанные с помощью уравнения (2), приведены в табл. 2.

Определение устойчивости РПС, перспективных в качестве солнцезащитных к действию УФ-излучения

Поглощение ультрафиолетового излучения переводит молекулу химического фильтра в возбужденное состояние. Она может вернуться в основное состояние, при этом избыток энергии, принесенный квантом света, перейдет в тепловую энергию, а может подвергнуться дальнейшим физико-химическим превращениям или вступить в реакцию с другими молекулами, что потенциально опасно для клеток кожи. Поэтому необходимым этапом исследований, направленных на поиск эффективных солнцезащитных средств, является выяснение устойчивости потенциальных химических фильтров к воздействию УФ-излучения.

Таблица 2

Значения SPF и УФА/УФВ исследованных РПС

Table 2

SPF values and ratio of UVA/UVB of some plant polyphenols (PPs)

РПС	Молярная масса, г/моль	SPF при содержании в креме		УФА/УФВ
		250 ммоль/л	10 %	
Бензофенон-3	228	4,99 ± 0,10	8,75 ± 0,12	0,33
Таксифолин	304	6,38 ± 0,12	8,39 ± 0,14	0,46
Морин	302	2,63 ± 0,08	3,48 ± 0,12	1,70
Эпикатехин	290	0,10 ± 0,02	0,14 ± 0,04	0,25
Рутин	610	5,25 ± 0,13	3,44 ± 0,16	1,20
Халкон	208	8,15 ± 0,14	15,67 ± 0,17	0,32
Силибин	482	6,44 ± 0,14	5,34 ± 0,16	0,46
Кризин	254	1,62 ± 0,07	2,55 ± 0,07	0,96
Цианидин хлорид	323	4,93 ± 0,12	6,11 ± 0,15	0,52
Кемпферол	286	4,0 ± 0,15	5,59 ± 0,18	1,11
Ресвератрол	228	11,98 ± 0,11	21,02 ± 0,11	0,25
Вербаскозид	624	8,25 ± 0,09	5,29 ± 0,09	0,59
Леонтоподиевая кислота	697	11,83 ± 0,12	6,79 ± 0,12	0,51
Кверцетин	302	4,31 ± 0,10	5,71 ± 0,12	1,50
Феруловая кислота	194	7,15 ± 0,30	14,74 ± 0,60	0,18
Акацетин	284	4,86 ± 0,22	6,85 ± 0,19	0,77
Байкалеин	270	3,65 ± 0,12	5,41 ± 0,12	1,14

В настоящей работе для оценки фотоустойчивости РПС их разбавленные растворы (50 мкмоль/л) подвергали воздействию УФ-излучения различной продолжительности, используя медицинский ультрафиолетовый облучатель ОУФк-05. Для оценки влияния УФ-излучения на РПС регистрировали спектры поглощения в диапазоне 220–600 нм до облучения и через 1; 3; 20 и 40 мин облучения (дозы облучения – 0,15; 0,45; 3,0 и 6,0 Дж/см² соответственно). На основании полученных спектров вычисляли соответствующие значения SPF, приведенные в табл. 3.

Установлено, что облучение в течение 40 мин не оказывает влияния на спектры поглощения таксифолина, эпикатехина, рутина, силибина, цианидин хлорида, вербаскозида и байкалеина (см. табл. 3, рис. 1, а). Несколько менее устойчивы к воздействию УФ-излучения оказались бензофенон-3, кверцетин, леонтоподиевая кислота, кемпферол и морин. Причем в случае морина и кемпферола спектральные изменения в результате воздействия УФ-излучения затрагивали только область 320–420 нм (см. рис. 1, а, 1) и практически не влияли на величину рассчитанных значений SPF. В то же время кризин, акацетин, феруловая кислота и особенно халкон и ресвератрол претерпевают существенные структурные изменения уже после 1 мин воздействия УФ-излучения (суммарная доза облучения составляет 0,15 Дж/см²), о чем свидетельствуют выраженные спектральные изменения и уменьшение значений SPF (см. табл. 3, рис. 1, б).

Таблица 3

Влияние различных доз УФ-излучения на значения SPF РПС

Table 3

Effect of UV-irradiation on SPF values of PPs

РПС	Интенсивность облучения УФ-И, Дж/см ²				
	0	0,15	0,45	3,0	6,0
Бензофенон-3	4,99 ± 0,10	4,38 ± 0,10	4,18 ± 0,10	4,20 ± 0,10	4,19 ± 0,10
Таксифолин	6,38 ± 0,12	Н/о*	Н/о	6,38 ± 0,12	6,39 ± 0,12
Морин	2,63 ± 0,08	Н/о	Н/о	2,62 ± 0,08	2,78 ± 0,08
Эпикатехин	0,10 ± 0,02	Н/о	Н/о	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02
Рутин	5,25 ± 0,13	Н/о	Н/о	5,25 ± 0,13	5,25 ± 0,13
Халкон	8,15 ± 0,14	3,49 ± 0,20	3,33 ± 0,20	3,09 ± 0,23	2,88 ± 0,24
Силибин	6,44 ± 0,14	6,41 ± 0,14	6,46 ± 0,14	6,45 ± 0,14	6,44 ± 0,14
Кризин	1,62 ± 0,07	1,24 ± 0,20	1,32 ± 0,20	1,17 ± 0,1	1,17 ± 0,1
Цианидин хлорид	4,93 ± 0,12	4,91 ± 0,12	4,91 ± 0,12	4,94 ± 0,12	4,93 ± 0,12
Кемпферол	4,0 ± 0,15	Н/о	3,97 ± 0,15	4,02 ± 0,15	4,1 ± 0,15
Ресвератрол	11,98 ± 0,11	4,81 ± 0,20	4,25 ± 0,20	4,93 ± 0,16	4,63 ± 0,10
Вербаскозид	8,25 ± 0,09	Н/о	Н/о	8,23 ± 0,12	8,26 ± 0,10
Леонтоподиевая кислота	11,83 ± 0,12	11,62 ± 0,22	11,48 ± 0,24	10,64 ± 0,24	10,07 ± 0,12
Кверцетин	4,31 ± 0,10	3,95 ± 0,20	3,79 ± 0,20	3,48 ± 0,20	3,16 ± 0,20
Феруловая кислота	7,34 ± 0,18	5,34 ± 0,09	3,91 ± 0,11	3,61 ± 0,13	3,74 ± 0,17
Акацетин	4,77 ± 0,10	3,61 ± 0,90	2,74 ± 1,00	2,19 ± 0,18	2,22 ± 0,10
Байкалеин	3,68 ± 0,15	3,63 ± 0,12	3,62 ± 0,13	3,69 ± 0,12	3,79 ± 0,12

*Показатель не определялся.

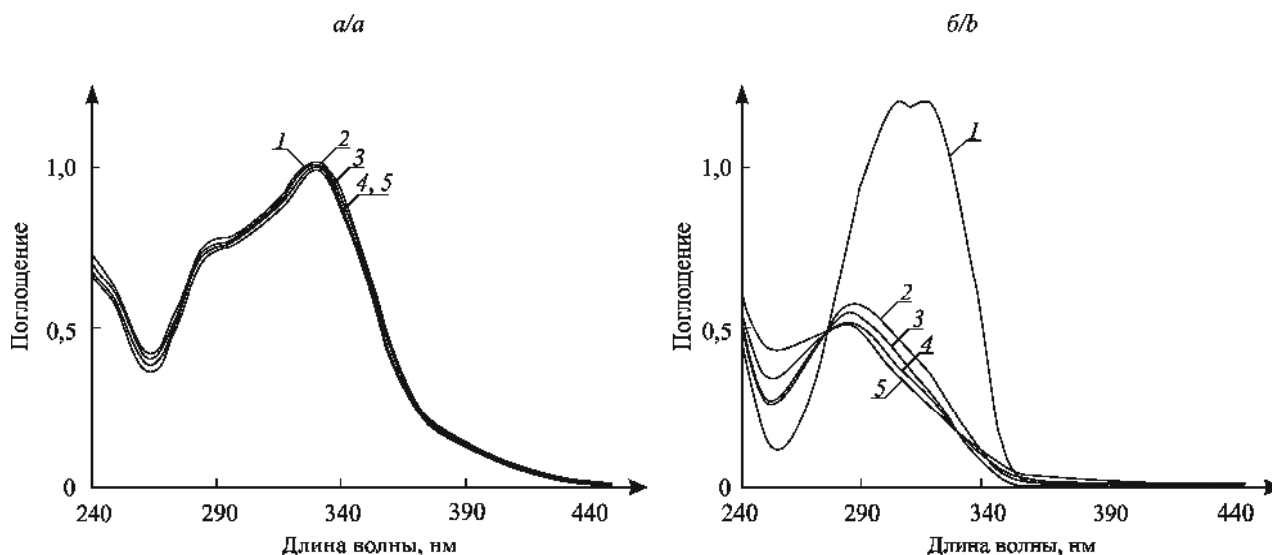


Рис. 1. Спектры поглощения вербаскозида, 50 мкмоль/л (а), и ресвератрола, 50 мкмоль/л (б), в 0,1 ммоль/л ИФБ (рН 7,4) до облучения (1) и через 1; 3; 20 и 40 мин облучения (2–5) (УФА : УФВ = 2 : 1, интенсивность облучения составляет 25 Вт/м²)

Fig. 1. UV-visible absorption spectra of 50 μmol/l verbascoside (a) and resveratrol (b) in 0.1 mmol/l potassium phosphate buffer (pH 7.4) recorded (1) prior to and (2–5) 1; 3; 20 and 40 min after solar-simulated irradiation (UVA : UVB = 2 : 1, irradiance 25 W/m²)

Определение сочетанного действия УФ-излучения и РПС на жизнеспособность клеток кожи линии HaCaT

Поскольку молекулы химического фильтра в возбужденном состоянии и образующиеся при их участии активные интермедиаты могут влиять на структурно-функциональное состояние клеток и ткани, в последующих экспериментах изучали влияние сочетанного воздействия УФ-излучения и РПС на культивируемые клетки кожи линии HaCaT. Установлено (табл. 4), что совместное действие

УФ-излучения (6 Дж/см²) с одним из устойчивых к УФ РПС, а именно таксифолином, рутином, силибином, вербаскозидом или байкалеином, в концентрации 50 мкмоль/л не оказывает влияния на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток, которые определяли, используя реактив PrestoBlue™. В этой группе РПС исключением составлял цианидин хлорид, который при совместном воздействии с УФ через 24 ч снижал количество функционально активных клеток почти в два раза. Влияние УФ на цитотоксичность фотолabile полифенолов исследовали на примере халкона и ресвератрола. Установлено, что в результате сочетанного действия этих соединений с УФ через 24 ч количество жизнеспособных клеток снижается более чем на 70 % по сравнению с контролем. Следует отметить, что используемая в этих экспериментах доза УФ, в отсутствие РПС, не оказывала цитотоксического действия на культивируемые клетки.

Таблица 4

**Влияние сочетанного УФ-излучения и РПС (50 мкмоль/л)
на жизнеспособность клеток кожи линии HaCaT через 24 ч после воздействия**

Table 4

**Mutual effect of UV-irradiation PPs (50 μmol/l) on HaCaT cell viability
24 h after administration**

Экспериментальные условия	Количество жизнеспособных клеток, % к контролю (n = 8)
Контроль	100 ± 6
Контроль + УФ, 6 Дж/см ²	97 ± 7
УФ совместно:	
с таксифолином	93 ± 8
рутином	97 ± 7
силибином	95 ± 5
вербаскозидом	94 ± 6
байкалеином	101 ± 5
бензофеноном-3	85 ± 8
феруловой кислотой	84 ± 6*
кверцетином	78 ± 8*
цианидин хлоридом	54 ± 9**
халконом	27 ± 5***
ресвератролом	27 ± 5***

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 vs контроль.

Для того чтобы оценить цитотоксическое действие РПС в отсутствие УФ, к культивируемым клеткам кожи линии HaCaT добавляли исследуемые соединения в ИФБ в концентрации 50 мкмоль/л, предварительно убрав культуральную среду. Через 40 мин ИФБ заменяли на среду без сыворотки и выдерживали клетки 24 ч в стандартных условиях, после чего определяли жизнеспособность и пролиферативную активность, используя реактив PrestoBlue™ (табл. 5).

Таблица 5

**Влияние 50 мкмоль/л РПС на жизнеспособность клеток
кожи линии HaCaT через 24 ч после воздействия**

Table 5

Effect of PPs (50 μmol/l) on HaCaT cell viability 24 h after administration

Экспериментальные условия	Количество жизнеспособных клеток, % к контролю (n = 8)
Контроль	100 ± 6
Контроль совместно:	
с бензофеноном-3	94 ± 8
феруловой кислотой	99 ± 7
кверцетином	98 ± 6
цианидин хлоридом	101 ± 6
ресвератролом	88 ± 9
халконом	75 ± 7*

*p < 0,01 vs контроль.

Из данных табл. 5 следует, что в использованной концентрации только халкон оказывал статистически достоверное влияние на исследуемый параметр, однако цитотоксический эффект был значительно меньше, чем при сочетанном воздействии халкона и УФИ.

Цитотоксическое действие сочетанного применения ресвератрола или халкона с УФИ подтверждено стандартным тестом на живые и мертвые клетки с использованием витальных флуоресцентных красителей – акридина оранжевого (АО) и этидиум бромид (ЭБ) (рис. 2).

Совместное действие РПС и УФИ, как видно на представленных на рис. 2 флуоресцентных микрофотографиях, приводит к повреждению и гибели клеток HaCaT (см. рис. 2, *г* – *и*), тогда как воздействие только УФ-излучения не оказывало существенного влияния на клетки (см. рис. 2, *б* и *в*). При этом тип клеточной гибели в результате воздействия УФИ и халкона преимущественно апоптотический. Уже через 3 ч после воздействия большой процент клеток, окрашенных только АО (живые), имеют на поверхности апоптотические пузырьки (см. рис. 2, *ж*), максимальное количество апоптотических клеток наблюдается через 6 ч после воздействия (см. рис. 2, *з*). В этот период появляются клетки, имеющие интенсивную красную флуоресценцию за счет окрашивания ядер ЭБ. Эти клетки могут быть как первично некротическими, так и находиться на терминальной стадии апоптоза. Наибольшее количество таких клеток наблюдается через 24 ч после воздействия (см. рис. 2, *и*). При совместном воздействии УФИ и ресвератрола (см. рис. 2, *г* – *е*) количество апоптотических клеток существенно меньше, что дает основание говорить о преимущественно некротическом пути клеточной гибели в этом случае.

Таким образом, при совместном воздействии УФИ и фотолабильных полифенолов образуются цитотоксические продукты, которые могут существенно снизить жизнеспособность кератиноцитов кожи.

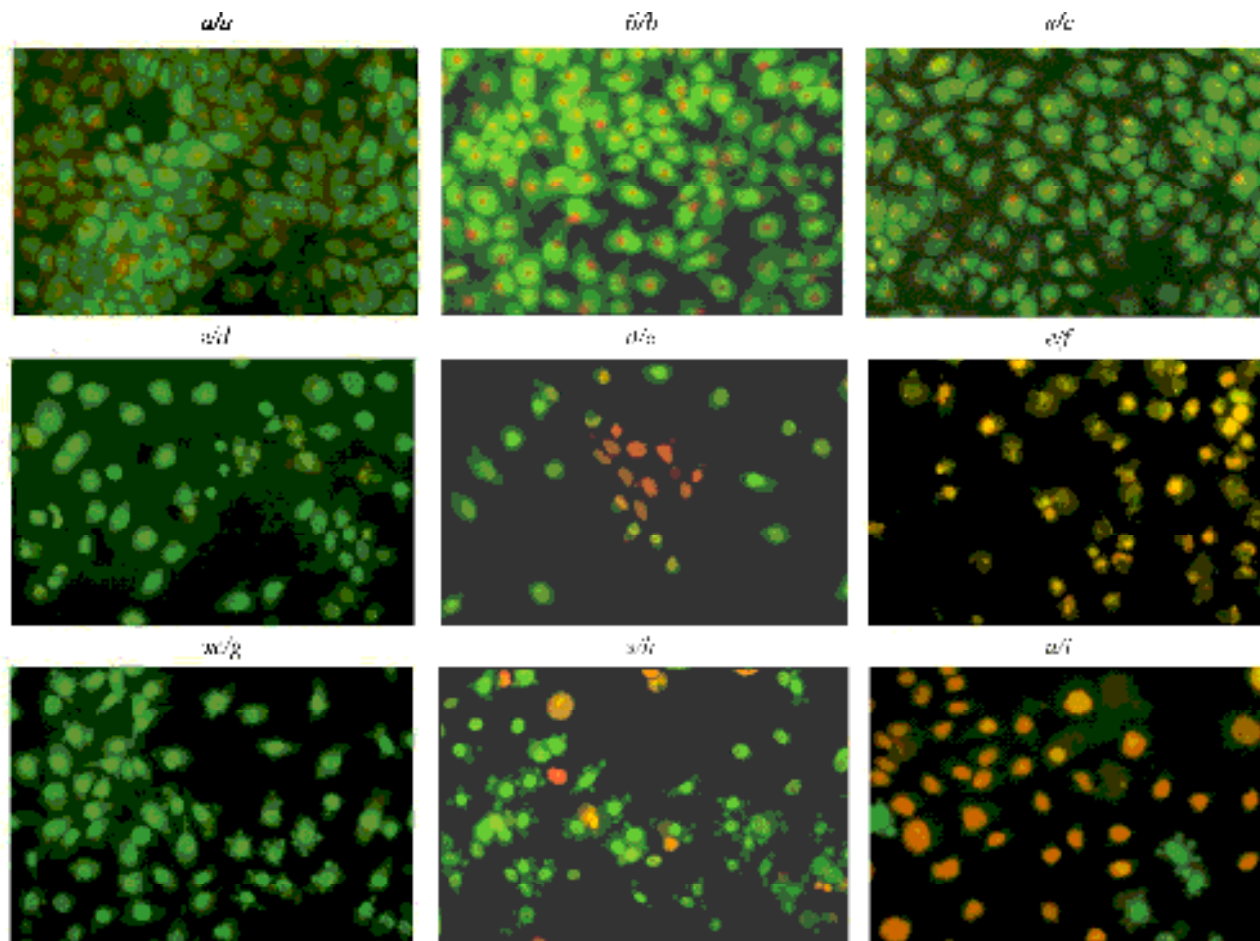


Рис. 2. Репрезентативные флуоресцентные микрофотографии клеток HaCaT через различные сроки после воздействия только УФИ в дозе 6 Дж/см² (*б*, *в*), УФИ совместно с ресвератролом (*г* – *е*) и халконом (*ж* – *и*) в концентрации 50 мкмоль/л: *а* – до воздействия; *г*, *ж* – через 3 ч; *б*, *д*, *з* – через 6 ч; *в*, *е*, *и* – через 24 ч после воздействия. Окрашивание АО и ЭБ

Fig. 2. Representative fluorescence micrographs of the HaCaT cells exposed to UVB + UVA (2 + 4 J/cm²) alone (*b*, *c*) or with resveratrol, 50 μ mol/l (*d* – *f*) and chalcone, 50 μ mol/l (*g* – *i*): *a* – before irradiation; *d*, *g* – 3 h; *b*, *e*, *h* – 6 h; *c*, *f*, *i* – 24 h after irradiation. Cells were stained with acridine orange/ethidium bromide

Напротив, соединения, устойчивые к действию УФ, способны возвращаться из возбужденного состояния в основное без нарушения структуры, сохраняя свои фотопротекторные свойства и не влияя на жизнеспособность кератиноцитов при совместном воздействии с УФ.

Определение *in vitro* эффективности экранирующего действия природных полифенолов, перспективных в качестве солнцезащитных средств

В результате выполнения исследований, данные которых изложены в предыдущих разделах, среди изученных РПС выявлен целый ряд химических УФ-фильтров, способных эффективно поглощать УФ-излучение в диапазонах А и В, сохраняя при этом свои фотопротекторные свойства. Для оценки эффективности их экранирующего действия в условиях *in vitro* использовали модельную систему, включающую культивируемые кератиноциты линии HaCaT. Клетки высевали в 96-луночные планшеты, которые культивировали до достижения 70–80 % конфлюэнта. Для оценки экранирующего действия РПС культуральную среду заменяли на ИФБ с содержанием раствора РПС в концентрации 50 мкмоль/л или без него, после чего планшет с клетками подвергали воздействию УФ-излучения. Чтобы исключить воздействие УФ на контрольные клетки, соответствующие лунки закрывали фольгой. Сразу после облучения ИФБ заменяли на среду без сыворотки и помещали клетки в стандартные условия. Через 24 ч определяли количество жизнеспособных клеток в контрольных и опытных лунках, используя реактив PrestoBlue™. Результаты определения приведены в табл. 6, из которой следует, что все исследованные соединения в концентрации 50 мкмоль/л увеличивают количество жизнеспособных клеток через 24 ч после воздействия УФ и по эффективности цитопротекторного действия их можно расположить в следующий ряд: вербаскозид > байкалеин > рутин > силибин > таксифолин > бензофенон-3.

Таблица 6

Влияние УФ-излучения в дозе 9 Дж/см² (УФА 6 Дж/см² + УФВ 3 Дж/см²) на количество жизнеспособных клеток линии HaCaT через 24 ч после воздействия без наличия экранирующего слоя (ЭС) (толщина – 0,4 см), содержащего 50 мкмоль/л РПС, и при его наличии

Table 6

Effect of UV-irradiation in the total dose 9 J/cm² (UVA 6 J/cm² + UVB 3 J/cm²) with or without sunscreen layer (0.4 cm) of PPs (50 μmol/l) on HaCaT cell viability 24 h after administration

Экспериментальные условия	Жизнеспособные клетки, % к контролю (n = 16)	Экранирующий эффект, % ^{a)}
Контроль	100 ± 8	—
Контроль совместно с УФ, 9 Дж/см ²	56 ± 6 ^{b)}	—
УФ совместно:		
с бензофеноном-3	65 ± 5 ^{b)}	20 ± 5
силибином	69 ± 5 ^{b)}	30 ± 5
таксифолином	68 ± 6 ^{b)}	27 ± 5
рутином	72 ± 8 ^{b)}	37 ± 6
байкалеином	75 ± 6 ^{r)}	43 ± 5
вербаскозидом	80 ± 7 ^{r)}	56 ± 6

^{a)}Экранирующий эффект (ЭЭф) рассчитывался по формуле

$$\text{ЭЭф, \%} = (\text{пжк РПС} - \text{пжк УФ}) / (100 - \text{пжк УФ}) \cdot 100,$$

где пжк УФ – процент жизнеспособных клеток через 24 ч после воздействия УФ без экранирующего слоя; пжк РПС – процент жизнеспособных клеток через 24 ч после воздействия УФ с экранирующим слоем, содержащим РПС; ^{b)}p < 0,01 vs контроль; ^{a)}p < 0,05; ^{r)}p < 0,01 vs УФ.

В целом эффективность цитопротекторного действия возрастает с увеличением значений SPF, рассчитанных на основании их спектров поглощения (см. табл. 2). Принимая во внимание хорошо установленный факт, что УФА-излучение инициирует процессы апоптоза [16], более высокую, чем можно было ожидать из значений SPF, эффективность цитопротекторного действия у байкалеина и рутина можно объяснить тем, что наряду со способностью поглощать УФВ-излучение эти соединения значительно лучше, чем другие РПС, поглощают УФ-излучение в диапазоне А.

Заключение

Таким образом, в результате данных исследований выявлен ряд эффективных природных УФ-фильтров – силибин, таксифолин, рутин, байкалеин, вербаскозид, способных рассеивать энергию поглощенных

квантов света без инициирования фотохимических и биохимических процессов, ведущих к образованию цитотоксичных интермедиатов. Указанные соединения представляют интерес в качестве потенциальных компонентов солнцезащитных средств.

Библиографические ссылки

1. World Health Organization. Environmental health criteria 160: Ultraviolet radiation WHO, Geneva [Electronic resource]. 1994. URL: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc160.htm> (date of access: 15.02.2014).
2. Matsui M. S., DeLeo V. A. Longwave ultraviolet radiation and promotion of skin cancer // *Cancer Cells*. 1991. Vol. 3 (1). P. 8–12.
3. Scharffetter-Kochanek K., Wlaschek M., Brenneisen P., et al. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging // *Biol. Chem.* 1997. Vol. 378 (11). P. 1247–1257.
4. Wolf R., Wolf D., Morganti P., et al. Sunscreens // *Clin. Dermatol.* 2001. Vol. 19 (4). P. 452–459.
5. Chanchal D., Swarnalata S. Herbal photoprotective formulations and their evaluation // *Open Nat. Prod. J.* 2009. Vol. 2. P. 71–76.
6. F'guyer S., Afaq F., Mukhtar H. Photochemoprotection of skin cancer by botanical agents // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 2003. Vol. 19 (2). P. 56–72.
7. Kostyuk V., Potapovich A., Suhan T., et al. Plant polyphenols against UV-C-induced cellular death // *Planta Med.* 2008. Vol. 74 (5). P. 509–514.
8. Potapovich A. I., Kostyuk V. A., Kostyuk T. V., et al. Effects of pre- and post-treatment with plant polyphenols on human keratinocyte responses to solar UV // *Inflamm. Res.* 2013. Vol. 62 (8). P. 773–780.
9. Dutra E. A., Oliveira D. A. G. C., Kedor-Hackmann E. R. M., et al. Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry // *Braz. J. Pharm. Sci.* 2004. Vol. 40 (3). P. 381–385.
10. Mansur J. S., Breder M. N. R., Mansur M. C. A., et al. Determinacao do fator de protecao solar por espectrofotometria // *An. Bras. Dermatol.* 1986. Vol. 61. P. 121–124.
11. Pissavini M., Ferrero L., Alard V., et al. Determination of the in vitro SPF // *Cosmet. Toiletries.* 2003. Vol. 118. P. 63–72.
12. Walters C., Keeney A., Wigal C. T., et al. The spectrophotometric analysis and modeling of sunscreens // *J. Chem. Educ.* 1997. Vol. 74 (1). P. 99–102.
13. Oshawott M. S., Saraf S. Photo protective properties of *Boerhaavia diffusa* // *Biosciences. Biotech. Res.* 2006. Vol. 3. P. 257–260.
14. Santos E. P., Freitas Z. M., Souza K. R., et al. In vitro and in vivo determinations of sun protection factors of sunscreen lotions with octylmethoxycinnamate // *Int. J. Cosmet. Sci.* 1999. Vol. 21 (1). P. 1–5.
15. Sayre R. M., Agin P. P., LeVee G. J., et al. Comparison of in vivo and in vitro testing of suncreening formulas // *Photochem. Photobiol.* 1979. Vol. 29 (3). P. 559–566.
16. Bode A. M., Dong Z. Signal transduction pathways in cancer development and as target for cancer prevention // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 2005. Vol. 79. P. 237–297.

References

1. World Health Organization. Environmental health criteria 160: Ultraviolet radiation WHO, Geneva [Electronic resource]. 1994. URL: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc160.htm> (date of access: 15.02.2014).
2. Matsui M. S., DeLeo V. A. Longwave ultraviolet radiation and promotion of skin cancer. *Cancer Cells*. 1991. Vol. 3 (1). P. 8–12.
3. Scharffetter-Kochanek K., Wlaschek M., Brenneisen P., et al. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol. Chem.* 1997. Vol. 378 (11). P. 1247–1257.
4. Wolf R., Wolf D., Morganti P., et al. Sunscreens. *Clin. Dermatol.* 2001. Vol. 19 (4). P. 452–459.
5. Chanchal D., Swarnalata S. Herbal photoprotective formulations and their evaluation. *Open Nat. Prod. J.* 2009. Vol. 2. P. 71–76.
6. F'guyer S., Afaq F., Mukhtar H. Photochemoprotection of skin cancer by botanical agents. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 2003. Vol. 19 (2). P. 56–72.
7. Kostyuk V., Potapovich A., Suhan T., et al. Plant polyphenols against UV-C-induced cellular death. *Planta Med.* 2008. Vol. 74 (5). P. 509–514. DOI: 10.1055/s-2008-1074499.
8. Potapovich A. I., Kostyuk V. A., Kostyuk T. V., et al. Effects of pre- and post-treatment with plant polyphenols on human keratinocyte responses to solar UV. *Inflamm. Res.* 2013. Vol. 62 (8). P. 773–780. DOI: 10.1007/s00011-013-0634-z.
9. Dutra E. A., Oliveira D. A. G. C., Kedor-Hackmann E. R. M., et al. Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2004. Vol. 40 (3). P. 381–385.
10. Mansur J. S., Breder M. N. R., Mansur M. C. A., et al. Determinacao do fator de protecao solar por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol.* 1986. Vol. 61. P. 121–124.
11. Pissavini M., Ferrero L., Alard V., et al. Determination of the in vitro SPF. *Cosmet. Toiletries.* 2003. Vol. 118. P. 63–72.
12. Walters C., Keeney A., Wigal C. T., et al. The spectrophotometric analysis and modeling of sunscreens. *J. Chem. Educ.* 1997. Vol. 74 (1). P. 99–102.
13. Oshawott M. S., Saraf S. Photo protective properties of *Boerhaavia diffusa*. *Biosciences. Biotech. Res.* 2006. Vol. 3. P. 257–260.
14. Santos E. P., Freitas Z. M., Souza K. R., et al. In vitro and in vivo determinations of sun protection factors of sunscreen lotions with octylmethoxycinnamate. *Int. J. Cosmet. Sci.* 1999. Vol. 21 (1). P. 1–5. DOI: 10.1046/j.1467-2494.1999.181658.x.
15. Sayre R. M., Agin P. P., LeVee G. J., et al. Comparison of in vivo and in vitro testing of suncreening formulas. *Photochem. Photobiol.* 1979. Vol. 29 (3). P. 559–566.
16. Bode A. M., Dong Z. Signal transduction pathways in cancer development and as target for cancer prevention. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 2005. Vol. 79. P. 237–297. DOI: 10.1016/S0079-6603(04)79005-4.

Статья поступила в редакцию 19.01.2017.
Received by editorial board 19.01.2017.