
Физиология и клеточная биология

PHYSIOLOGY AND CELL BIOLOGY

УДК 577.33/34, 577.355, 577.3.32/36

ВЛИЯНИЕ КВЕРЦЕТИНА И ЕГО МИКРОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ФОРМ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК И ДЕГРАДАЦИЮ ЯДЕРНОЙ ДНК В КЕРАТИНОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

А. И. ПОТАПОВИЧ¹⁾, Т. В. КОСТЮК¹⁾, Т. Г. ШУТОВА²⁾, В. А. КОСТЮК¹⁾

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

²⁾Институт химии новых материалов НАН Беларуси, ул. Ф. Скорины, 36, 220141, г. Минск, Беларусь

Аннотация. Представлены экспериментальные данные, свидетельствующие о возможности использования кумохинона для моделирования окислительного стресса и изучения его последствий в культивируемых кератиноцитах человека линии HaCaT. Показано, что гибель клеток, повреждение ДНК и появление атипичных ДНК-комет в кератиноцитах, подвергнутых воздействию кумохинона, связаны не с его генотоксичностью, а главным образом с развитием окислительного стресса. Установлено, что кверцетин оказывает цитопротекторное действие и уменьшает степень повреждения ядерной ДНК в условиях окислительного стресса, инициируемого кумохиноном. Этот эффект существенно возрастает при использовании микроструктурированных форм кверцетина, что может быть обусловлено увеличением его клеточной доступности.

Ключевые слова: кератиноциты HaCaT; п-бензохиноны; кверцетин; микроструктуры; окислительный стресс; повреждение ДНК; ДНК-кометы.

Образец цитирования:

Потапович АИ, Костюк ТВ, Шутова ТГ, Костюк ВА. Влияние кверцетина и его микроструктурированных форм на жизнеспособность клеток и деградацию ядерной ДНК в кератиноцитах человека при моделировании окислительного стресса. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2024;2:46–54. EDN: ORFOSU

For citation:

Potapovich AI, Kostyuk TV, Shutava TG, Kostyuk VA. Effect of quercetin and its microstructured forms on cell viability and nuclear DNA degradation in human keratinocytes when modeling oxidative stress. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2024;2:46–54. Russian. EDN: ORFOSU

Сведения об авторах см. на с. 54

Information about the authors see p. 54

EFFECT OF QUERCETIN AND ITS MICROSTRUCTURED FORMS ON CELL VIABILITY AND NUCLEAR DNA DEGRADATION IN HUMAN KERATINOCYTES WHEN MODELLING OXIDATIVE STRESS

A. I. POTAPOVICH^a, T. V. KOSTYUK^a, T. G. SHUTAVA^b, V. A. KOSTYUK^a

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

^bInstitute of Chemistry of New Materials, National Academy of Sciences of Belarus,
36 F. Skaryny Street, Minsk 220141, Belarus

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

Abstract. Experimental data are presented indicating the possibility of using cumoquinone to model oxidative stress and study its consequences in cultured human keratinocytes of the HaCaT line. It has been shown that cell death, DNA damage and the appearance of atypical DNA comets in keratinocytes exposed to cumoquinone are associated not with its genotoxicity, but mainly with the development of oxidative stress. It has been established that quercetin has a cytoprotective effect and reduces the degree of damage to nuclear DNA under conditions of oxidative stress initiated by cumoquinone. This effect increases significantly when microstructured forms of quercetin are used, which may be due to an increase in its cellular availability.

Keywords: HaCaT keratinocytes; p-benzoquinones; quercetin; microstructures; oxidative stress; DNA damage; DNA comets.

Введение

Общеизвестно, что негативное влияние различных факторов внешней среды на аэробные организмы во многих случаях реализуется посредством активации продукции активных форм кислорода (АФК) и инициирования окислительного стресса. Структурно-функциональные нарушения и гибель клеток в результате окислительного стресса и чрезмерного образования АФК могут быть важным патогенетическим фактором возникновения и прогрессирования различных заболеваний. В связи с этим весьма актуальным является создание клеточных моделей, позволяющих изучать последствия воздействия окислительного стресса на структурно-функциональное состояние клеток, и их использование для поиска средств фармакологической коррекции возникающих нарушений. В качестве таких средств большой интерес представляют растительные полифенольные соединения, в частности флавоноиды, обладающие широким спектром биологической активности [1; 2]. Тем не менее клиническое применение флавоноидов ограничено в основном низкой растворимостью в воде, что обуславливает их слабое поглощение клетками и плохое проникновение через кожу. Для преодоления этих ограничений молекулы потенциальных лекарств могут быть включены в липосомы или полимерные нано- и микрочастицы, обладающие большим потенциалом для использования в качестве их переносчиков [3].

Среди органических соединений, способных инициировать развитие окислительного стресса в клетках и тканях, особый интерес представляют хиноны [4]. Окислительный стресс возникает, когда хинон восстанавливается цитоплазматическими редуктазами до радикала семихинона, который, в свою очередь, восстанавливает кислород до супероксидных радикалов, окисляясь обратно до хинона. Кроме того, большинство хинонов образуют конъюгаты с восстановленным глутатионом, которые также вовлекаются в циклические окислительно-восстановительные реакции и активацию кислорода [4]. Инициирование окислительного стресса в значительной степени обуславливает цитотоксическое действие хинонов. В частности, показано, что в анаэробных условиях, при которых снижается возможность образования АФК, существенно уменьшается цитотоксическое действие тимохинона и доксорубина [5]. Среди производных п-бензохинона высокой способностью индуцировать окислительный стресс обладают тетраметил-п-бензохинон (дурохинон) (рис. 1, а) и 2,3,5-триметил-п-бензохинон (кумохинон) (рис. 1, б) [6; 7]. В данной работе эти соединения были использованы для моделирования патогенетических процессов в кератиноцитах человека в целях оценки фармакологической эффективности нативного и микроструктурированного кверцетина в условиях окислительного стресса.

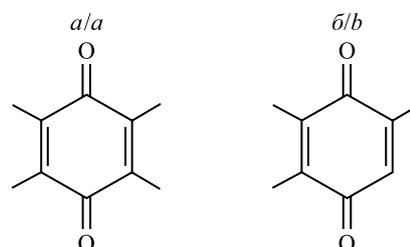


Рис. 1. Структура исследованных п-бензохинонов:
а – дурухинон; б – кумохинон

Fig. 1. Structure of the studied p-benzoquinones:
а – duroquinone; б – cumoquinone

Материалы и методы исследования

Реагенты. Модифицированная среда Игла (DMEM), этидиумбромид, кверцетин, додецилсульфат натрия, трипсин, полиэтиленимин, полистиролсульфонат натрия, полиаллиламингидрохлорид, декстран-сульфат были приобретены у компании *Sigma-Aldrich* (Германия), антибиотики – у фирмы *Gibco* (США), изотонический фосфатный буфер (ИФБ; pH 7,4) куплен у компании *Lonza* (Бельгия), эмбриональная бычья сыворотка (ЭБС) приобретена у фирмы *Capricorn Scientific* (Польша). Коммерческий дуροхинон, очищенный методом перекристаллизации, и кумохинон, полученный путем контролируемого окисления коммерческого 2,3,5-триметилгидрохинона [8], были любезно предоставлены профессором О. И. Шадыро (химический факультет БГУ). Микроструктура (PAH/PPS)₄ на основе полиаллиламингидрохлорида и полистиролсульфоната и микроструктура (Hit/DS)₄ на основе хитозана и декстрансульфата, имеющие средний размер (1,1 ± 0,3) мкм, формировались методом послойной сборки в водных растворах. Оба типа микроструктур, содержащих 10 мг/мл кверцетина, растворялись в 0,9 % NaCl.

Клеточные культуры. Иммуортилизованная клеточная линия кератиноцитов человека HaCaT предоставлена доктором Н. Е. Фузенигом (Немецкий центр исследования рака (*Deutsches Krebsforschungszentrum*), Гейдельберг, Германия).

Общая схема проведения экспериментов. Клетки культивировали во флаконах T25 (*Sarstedt*, США) в среде DMEM, содержащей 10 % ЭБС, при стандартных условиях (37 °C; 5 % CO₂). Экспозицию с исследуемыми веществами проводили в 96- и 24-луночных планшетах. Для получения необходимой концентрации растворы препаратов добавляли к среде инкубации, не содержащей сыворотки.

Анализ жизнеспособности клеток. Изучение влияния производных п-бензохинона на жизнеспособность культивируемых клеток проводили в 96-луночных планшетах с помощью реагента PrestoBlue™ (*Introvigen*, США) согласно инструкции. Величину флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (*Varian*, Австралия) после инкубации при температуре 37 °C в течение 1,5–2,0 ч, используя фильтр с $\lambda_{ex} = (560 \pm 25)$ нм, $\lambda_{em} = (590 \pm 10)$ нм. Усредненную интенсивность флуоресценции лунок, содержащих контрольные клетки, принимали за 100 %.

Оценка целостности клеток по выходу лактатдегидрогеназы (ЛДГ). В этих экспериментах клетки растили в 24-луночных планшетах. Активность ЛДГ определяли прямым спектрофотометрическим методом в 1 мл ИФБ, содержащего 30 мкмоль/л пирувата и 30 мкмоль/л НАДН, по величине изменения оптической плотности при 340 нм за 1 мин. Процент высвобождения ЛДГ (процент повреждения клеток) рассчитывали путем деления активности ЛДГ в среде культивирования на суммарную активность ЛДГ в среде и лизатах адгезированных клеток.

Анализ повреждений ДНК с помощью метода ДНК-комет. Клетки, высеянные в 24-луночный планшет, культивировали в течение 2 ч после добавления кумохинона. Щелочной комет-анализ проводили по описанной в работах [9; 10] методике: клетки трипсинизировали, 50 мкл клеточной суспензии каждой экспериментальной серии добавляли к 300 мкл 0,7 % легкоплавкой агарозы и наносили полученную смесь на предметные стекла, предварительно покрытые агарозой с нормальной температурой плавления. Препараты помещали в лизирующий буфер и выдерживали в темноте при температуре 4 °C в течение 20 ч. Затем предметные стекла 20 мин инкубировали в щелочном буфере для электрофореза (0,3 моль/л NaOH и 1 ммоль/л ЭДТА; pH 13) и проводили электрофорез при силе тока 300 мА на протяжении 20 мин. Образцы дважды промывали в нейтрализующем растворе (pH 7,4; 4 °C), фиксировали последовательно в 70 % этаноле и 96 % этаноле в течение 5 мин, сушили на воздухе и окрашивали этидиумбромидом. Кометы наблюдали при 200-кратном увеличении с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert-25 (*Carl Zeiss*, Германия) и документировали с помощью цифровой камеры. Процент ДНК в хвосте (поврежденная ДНК) был рассчитан для каждой кометы с использованием инструмента «гистограммы» программы *Photoshop* (версия 7). Данные трех независимых экспериментов усредняли для каждого экспериментального условия ($n \approx 50$ клеток).

Определение содержания восстановленного глутатиона. Содержание восстановленного глутатиона определяли с помощью реакции с флуоресцентным реагентом ThioGlo-1 (*SABiosciences*, Италия) [11] в 96-луночных планшетах. При анализе образцов в лунки добавляли 200 мкл рабочего раствора ThioGlo-1. Планшет инкубировали на шейкере в темноте при комнатной температуре в течение 5 мин и измеряли интенсивность флуоресценции в лунках, используя планшетный флуориметр ($\lambda_{ex} = 355$ нм, $\lambda_{em} = 535$ нм). Содержание восстановленного глутатиона в пробах рассчитывали по калибровочному графику, построенному с использованием его рабочего раствора. Тиоловые группы белков определяли как дополнительную реакцию флуоресценции после добавления додецилсульфата натрия (4 ммоль/л) к тем же образцам и их последующей инкубации на шейкере в темноте в течение 60 мин.

Статистический анализ. Полученные данные были сведены в таблицы и проанализированы программой *Excel*. Результаты представлены как среднее ± стандартное отклонение. Статистическая значимость (p) оценивалась с использованием двустороннего непарного критерия Стьюдента. Достоверными считались значения $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Исследование цитотоксических эффектов п-бензохинонов в отношении кератиноцитов человека.

При анализе жизнеспособности клеток через 24 ч инкубации в среде ДМЕМ, содержащей производные п-бензохинона в диапазоне концентраций 50–200 мкмоль/л, установлено, что исследуемые соединения оказывают дозозависимое влияние на жизнеспособность кератиноцитов. При этом кумохинон обладает гораздо более выраженным цитотоксическим действием, вызывая полную гибель клеток в концентрации 200 мкмоль/л, тогда как при использовании дурохинона в этой же концентрации жизнеспособность клеток снижается только на $(33 \pm 17) \%$. В ходе исследований по изучению влияния продолжительности воздействия кумохинона (200 мкмоль/л) на жизнеспособность и целостность кератиноцитов установлено, что он оказывает незначительное, но достоверное цитотоксическое действие уже через 2 ч инкубации с клетками. При этом через 4 ч инкубации жизнеспособность кератиноцитов снизилась более чем на 90 %, а целостность клеточной мембраны была нарушена более чем у 30 % клеток (рис. 2, а).

Общеизвестно, что при развитии окислительного стресса происходит интенсивное расходование антиоксидантов, в первую очередь восстановленного глутатиона, а также окисление тиоловых групп белков. В связи с этим было исследовано влияние кумохинона на уровень данных маркеров окислительного стресса в кератиноцитах.

Как следует из данных, представленных на рис. 2, б, инкубация кератиноцитов с кумохиноном (200 мкмоль/л) в течение 1 ч приводит к существенному уменьшению содержания восстановленных тиолов, при этом уровень восстановленного глутатиона снижается на 57 %. Таким образом, уже через 1 ч после внесения кумохинона в культуральную среду клетки находятся в условиях окислительного стресса, который может рассматриваться как причина последующего снижения их жизнеспособности и нарушения целостности плазматической мембраны.

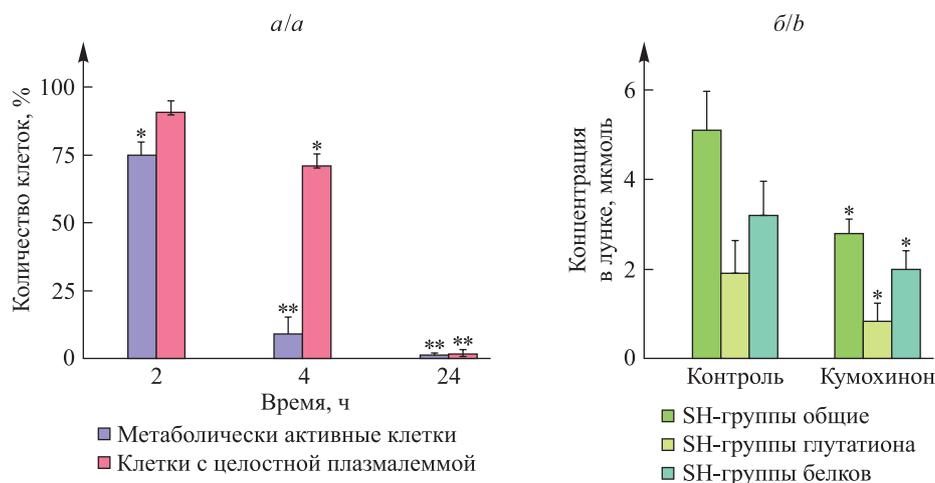


Рис. 2. Влияние продолжительности инкубации кератиноцитов с кумохиноном (200 мкмоль/л) на их жизнеспособность (метаболическую активность) и целостность плазматической мембраны (данные представлены как процент к контролю) (а). Содержание восстановленного глутатиона и тиоловых групп белков в кератиноцитах через 1 ч инкубации с кумохиноном (200 мкмоль/л) (б).

Звездочкой отмечены значения $p < 0,001$ относительно контроля, двумя звездочками – значения $p < 0,000\,001$ относительно контроля

Fig. 2. Effect of the length of incubation of keratinocytes with cumoquinone (200 $\mu\text{mol/L}$) on their viability (metabolic activity) and plasma membrane integrity (data are presented as a percentage of control) (a).

Content of reduced glutathione and protein thiol groups in keratinocytes after 1 h of incubation with cumoquinone (200 $\mu\text{mol/L}$) (b).

An asterisk indicates values $p < 0.001$ relative to control, two asterisks indicate values $p < 0.000\,001$ relative to control

Существует большое разнообразие методов исследования повреждений структуры ДНК, однако чувствительность и специфичность многих из них оказываются недостаточными для мониторинга повреждений ДНК, вызванных действием внешних факторов, и выявления генопротекторного эффекта потенциальных фармакологических препаратов. По этой причине большой интерес представляет предложенный в 1984 г. метод ДНК-комет (метод гель-электрофореза ДНК отдельных клеток) [12], позволяющий выявлять и анализировать повреждения ДНК как *in vitro*, так и *in vivo*. С использованием метода ДНК-комет в данной работе было исследовано состояние ядерной ДНК кератиноцитов человека через 2 ч инкубации с кумохиноном в диапазоне концентраций 50–200 мкмоль/л (рис. 3).

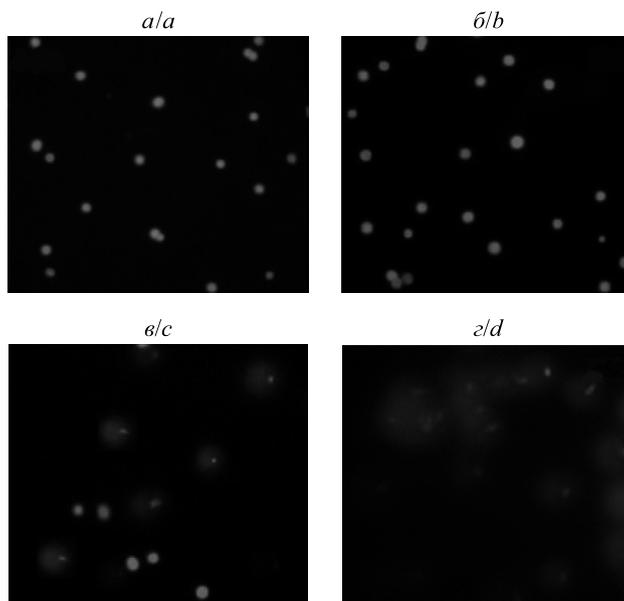


Рис. 3. Репрезентативные флуоресцентные микрофотографии ДНК-комет, полученных из контрольных клеток HaCaT (a) и культивируемых клеток HaCaT через 2 ч инкубации с кумохиноном в концентрации 50 мкмоль/л (б), 100 мкмоль/л (в) и 200 мкмоль/л (г) (окрашивание этидиумбромидом)

Fig. 3. Representative fluorescent micrographs of DNA comets obtained from control HaCaT cells (a) and cultured HaCaT cells after 2 h of incubation with cumoquinone at a concentration of 50 μmol/L (b), 100 μmol/L (c) and 200 μmol/L (d) (ethidium bromide staining)

Установлено, что инкубация кератиноцитов с кумохиноном в течение 2 ч приводит к появлению клеток с поврежденной ДНК, причем количество таких клеток возрастает с увеличением концентрации кумохинона в культуральной среде (см. рис. 3; табл. 1). Следует отметить, что в клетках с поврежденным хроматином выявлены только атипичные ДНК-кометы. После воздействия кумохинона в концентрации 200 мкмоль/л атипичные ДНК-кометы составляли 99 % всех задокументированных комет (см. рис. 3, г), а после воздействия кумохинона в концентрации 100 мкмоль/л – около 50 %, тогда как остальные кометы по визуальному ранжированию [13] относились только к категории 0 (см. рис. 3, в), т. е. не содержали поврежденную ДНК. При воздействии кумохинона в концентрации 50 мкмоль/л кометы категории 0 составляли практически 100 % (см. рис. 1, б).

Таблица 1

Степень повреждения ядерной ДНК кератиноцитов
 через 2 ч инкубации с кумохиноном

Table 1

The degree of damage to nuclear DNA of keratinocytes
 after 2 h of incubation with cumoquinone

Экспериментальные условия	Процент клеток с фрагментированной ДНК	Процент ДНК в хвосте атипичных ДНК-комет
Контроль	0 ± 0,1	0 ± 0,2
Кумохинон (50 мкмоль/л)	1,0 ± 0,2	0 ± 0,2
Кумохинон (100 мкмоль/л)	49,0 ± 1,4*	89,3 ± 1,4**
Кумохинон (200 мкмоль/л)	99,0 ± 1,4**	91,3 ± 1,4**

* $p < 0,000\,000\,1$ относительно контроля.
 ** $p < 0,000\,000\,001$ относительно контроля.

Атипичные ДНК-кометы, или, как их еще называют, клетки-призраки, облака либо ежи, имеют нестандартную морфологию, при этом общим для них является практически полное отсутствие головы и наличие широкого диффузионного хвоста, содержащего от 70 до 100 % всей ядерной ДНК [14]. Суще-

ствуют различные гипотезы, объясняющие возможность образования атипичных ДНК-комет, но все они предполагают активацию в клетке процессов, ведущих к расщеплению ДНК, в первую очередь развитие окислительного стресса, который приводит к апоптозу и активации ДНК-эндонуклеаз, включая каспазонезависимую эндонуклеазу G [14]. ДНК-кометы, которые могут быть зарегистрированы с помощью цифровой камеры, содержат фрагменты ДНК длиной 10–300 тыс. пар нуклеотидов и характерны для начального этапа апоптоза, в последующем они подвергаются дальнейшему расщеплению до фрагментов, кратных 180–200 парам нуклеотидов, и ввиду слабого свечения уже не детектируются [14].

Значения, приведенные в табл. 2, хорошо согласуются с данными, полученными в работе [15]: через 2 ч после обработки клеток р-нитрофенолом, N-лауроилсаркозином и D-ментолом (веществами, не являющимися генотоксикантами) в цитотоксических концентрациях были выявлены ДНК-кометы с сильно поврежденной ДНК на фоне отсутствия ДНК-комет со средней или низкой степенью повреждения ДНК. Принимая во внимание эти результаты, а также данные, свидетельствующие о развитии окислительного стресса в кератиноцитах человека, подвергнутых воздействию кумохинона, можно сделать вывод о том, что появление атипичных ДНК-комет обусловлено не прямым генотоксическим действием кумохинона, а его способностью продуцировать АФК и влиять на редокс-статус клеток.

Исследование влияния нативного и микроструктурированного кверцетина на цитотоксические эффекты кумохинона в отношении кератиноцитов человека. Клеточная модель, основанная на воздействии кумохинона на кератиноциты, была использована для оценки фармакологической эффективности нативного и микроструктурированного кверцетина в условиях окислительного стресса. С этой целью исследуемые препараты вносили в культуральную среду одновременно с кумохиноном и через 4 ч инкубации оценивали жизнеспособность клеток.

Установлено, что через 4 ч инкубации с кумохиноном количество жизнеспособных клеток снижалось почти на 100 %. Однако, если кератиноциты инкубировались с кумохиноном в присутствии кверцетина или его микроструктурных форм (Кв(РАН/PPS)₄ и Кв(Hit/DS)₄), количество жизнеспособных клеток было существенно больше, чем при инкубации только с кумохиноном (см. табл. 2). При этом защитные эффекты Кв(РАН/PPS)₄ и Кв(Hit/DS)₄ были статистически значимы.

Таблица 2

Влияние кверцетина (50 мкмоль/л) и его микроструктурных форм (50 мкмоль/л по кверцетину) на жизнеспособность кератиноцитов через 4 ч инкубации с кумохиноном (200 мкмоль/л)

Table 2

Effect of quercetin (50 μmol/L) and its microstructured forms (50 μmol/L for quercetin) on the viability of keratinocytes after 4 h of incubation with cumoquinone (200 μmol/L)

Экспериментальные условия	Количество жизнеспособных клеток, %
Контроль	100,0 ± 7,5
Кумохинон	1,8 ± 4,4*
Кумохинон + кверцетин	12,2 ± 7,6
Кумохинон + Кв(РАН/PPS) ₄	23,5 ± 9,2**
Кумохинон + Кв(Hit/DS) ₄	30,0 ± 11,3***

* $p < 0,00001$ относительно контроля.

** $p < 0,01$ относительно кумохинона.

*** $p < 0,001$ относительно кумохинона.

В последующих экспериментах методом ДНК-комет была определена электрофоретическая подвижность ДНК кератиноцитов через 2 ч инкубации с кумохиноном (200 мкмоль/л) в присутствии кверцетина (50 мкмоль/л), Кв(РАН/PPS)₄ или Кв(Hit/DS)₄ (50 мкмоль/л по кверцетину) и без них. Как видно из рис. 4, через 2 ч инкубации с кумохиноном клетки с неповрежденной ДНК практически отсутствовали (см. рис. 4, $\delta - \varepsilon$), тогда как при добавлении в культуральную среду кумохинона и исследуемых препаратов – кверцетина (см. рис. 4, $u - m$), Кв(РАН/PPS)₄ (см. рис. 4, $n - p$) или Кв(Hit/DS)₄ (см. рис. 4, $c - \phi$) – количество клеток с неповрежденной ядерной ДНК составляло 20–30 %.

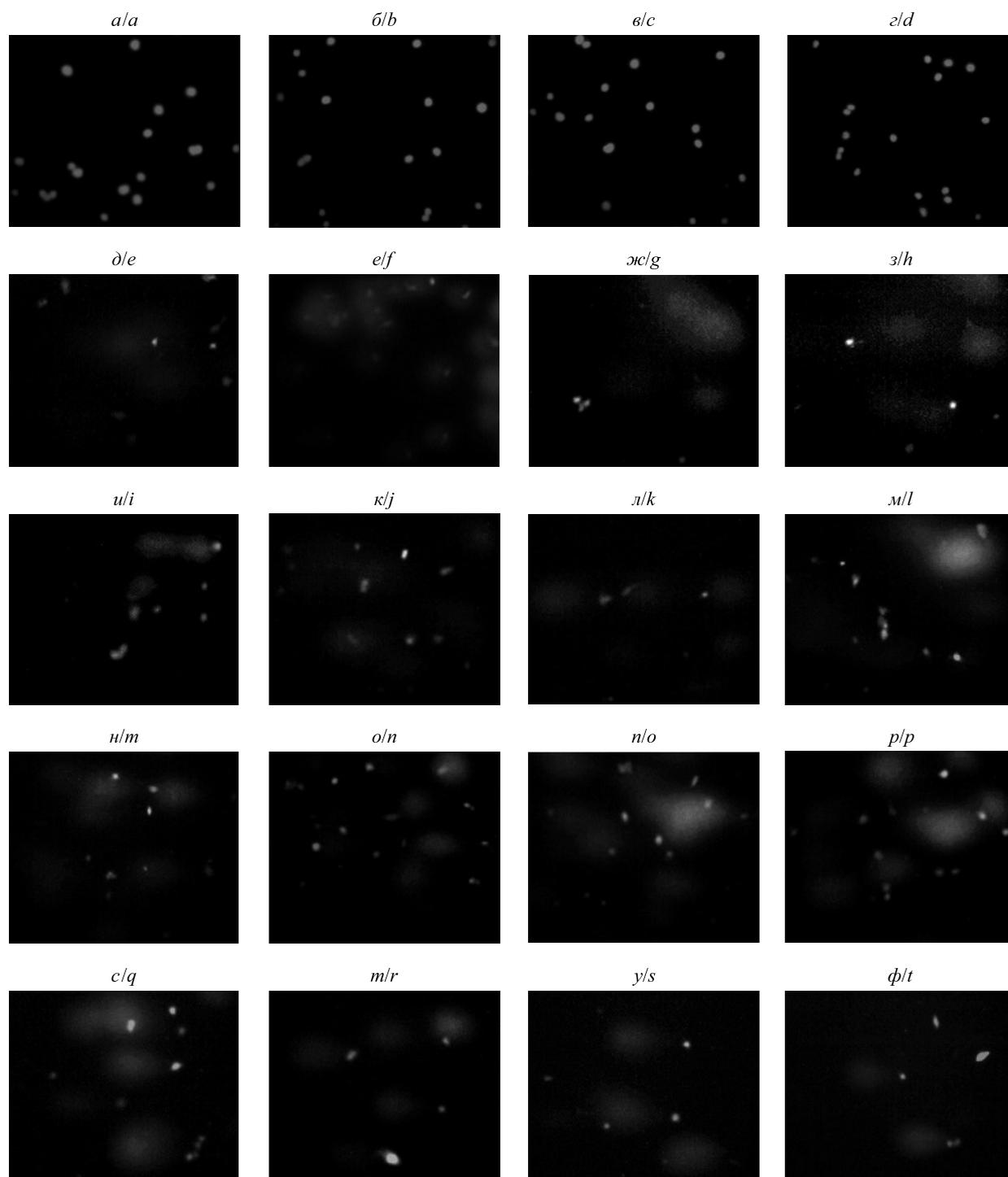


Рис. 4. Репрезентативные флуоресцентные микрофотографии ДНК-комет, полученных из контрольных клеток HaCaT (*a–г*) и культивируемых клеток HaCaT через 2 ч инкубации только с кумохиноном (200 мкмоль/л) (*д–з*), с кумохиноном и кверцетином (50 мкмоль/л) (*и–м*), кумохиноном и Кв(ПАН/PPS)₄ (50 мкмоль/л) (*н–р*), кумохиноном и Кв(Hit/DS)₄ (50 мкмоль/л) (*с–ф*) (окрашивание этидиумбромидом)

Fig. 4. Representative fluorescent micrographs of DNA comets obtained from control HaCaT cells (*a–d*) and cultured HaCaT cells after 2 h of incubation with cumoquinone only (200 $\mu\text{mol/L}$) (*e–h*), with cumoquinone and quercetin (50 $\mu\text{mol/L}$) (*i–l*), with cumoquinone and Kv(ПАН/PPS)₄ (50 $\mu\text{mol/L}$) (*m–p*), with cumoquinone and Kv(Hit/DS)₄ (50 $\mu\text{mol/L}$) (*q–t*) (Kv – quercetin; ethidium bromide staining)

Таким образом, кверцетин и его микроструктурные формы уменьшают степень повреждения ядерной ДНК кумохином. Хорошо известно, что кверцетин является эффективным антиоксидантом [1]. Поскольку цитотоксическое действие кумохинона обусловлено иницированием окислительного стресса, можно допустить, что выявленные в данной работе эффекты кверцетина и его микроструктурных форм связаны со способностью нейтрализовать АФК и ингибировать свободнорадикальные процессы, ведущие к развитию окислительного стресса и апоптозу. Следует отметить, что микроструктурирование кверцетина увеличивает его биодоступность и повышает эффективность цитопротекторного действия в условиях клеточного окислительного стресса.

Заключение

В настоящем исследовании показано, что кумохинон может быть использован для моделирования окислительного стресса и изучения его последствий в культивируемых клетках. Гибель клеток, повреждение ДНК и появление атипичных ДНК-комет в кератиноцитах человека линии HaCaT, подвергнутых воздействию кумохинона, обусловлены не его генотоксичностью, а развитием окислительного стресса и активацией ДНК-эндонуклеаз. Установлено, что кверцетин оказывает цитопротекторное действие и уменьшает степень повреждения ядерной ДНК в условиях окислительного стресса, иницируемого кумохином. Защитный эффект существенно возрастает при использовании микроструктурированных форм кверцетина, что может быть связано с увеличением его клеточной доступности.

Библиографические ссылки / References

1. Kostyuk VA, Potapovich AI. *Bioradicals and bioantioxidants*. Minsk: Belarusian State University; 2004. 179 p. Russian.
2. Korkina LG, De Luca C, Kostyuk VA, Pastore S. Plant polyphenols and tumors: from mechanisms to therapies, prevention, and protection against toxicity of anti-cancer treatments. *Current Medicinal Chemistry*. 2009;16(30):3943–3965. DOI: 10.2174/092986709789352312.
3. Zou Y, Qian Y, Rong X, Cao K, McClements DJ, Hu K. Encapsulation of quercetin in biopolymer-coated zein nanoparticles: formation, stability, antioxidant capacity, and bioaccessibility. *Food Hydrocolloids*. 2021;120:106980. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2021.106980.
4. O'Brien PJ. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions*. 1991;80(1):1–41. DOI: 10.1016/0009-2797(91)90029-7.
5. Potapovich AI, Ignatovich LV, Kostyuk VA, Shadyro OI. Effect of oxygen level on the cytotoxic effect of doxorubicin and thymoquinone. *News of Biomedical Sciences*. 2021;21(4):167–172. Russian.
6. Moore GA, Rossi L, Nicotera P, Orrenius S, O'Brien PJ. Quinone toxicity in hepatocytes: studies on mitochondrial Ca²⁺ release induced by benzoquinone derivatives. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1987;259(2):283–295. DOI: 10.1016/0003-9861(87)90495-4.
7. Potapovich A, Kostyuk V. Cell-cell death communication by signals passing through non-aqueous environments. *Results in Chemistry*. 2021;3:100107. DOI: 10.1016/j.rechem.2021.100107.
8. Shadyro OI, Edimecheva IP, Glushonok GK, Ostrovskaya NI, Polozov GI, Murase H, et al. Effects of phenolic compounds on reactions involving various organic radicals. *Free Radical Research*. 2003;37(10):1087–1097. DOI: 10.1080/10715760310001600417.
9. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 1988;175(1):184–191. DOI: 10.1016/0014-4827(88)90265-0.
10. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2000;35(3):206–221. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J.
11. 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. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2000.0752178.x.
12. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1984;123:291–298. DOI: 10.1016/0006-291x(84)90411-x.
13. Filippov EV. Using the «DNA comet» method to detect and assess the degree of DNA damage in the cells of plants, animals and humans caused by environmental factors. *Nauka i obrazovanie*. 2014;2:72–78. Russian. EDN: SUFCTF.
14. Zhanataev AK, Anisina EA, Chayka ZV, Miroshkina IA, Durnev AD. Phenomenon of atypical DNA comets. *Tsitologiya*. 2017;59(3):163–168. Russian.
15. Hartmann A, Speit G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicology Letters*. 1997;90:183–188. DOI: 10.1016/S0378-4274(96)03847-7.

Получена 30.04.2024 / исправлена 03.05.2024 / принята 21.05.2024.
Received 30.04.2024 / revised 03.05.2024 / accepted 21.05.2024.

Авторы:

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

Татьяна Владимировна Костюк – научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Татьяна Геннадьевна Шутова – кандидат химических наук, доцент; ведущий научный сотрудник лаборатории органических композиционных материалов.

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

Authors:

Alla I. Potapovich, PhD (biology), docent; leading researcher at the laboratory of physiology, department of human and animal physiology, faculty of biology.

pot-alla@rambler.ru

Tatyana V. Kostyuk, researcher at the laboratory of physiology, department of human and animal physiology, faculty of biology.

tanyasuhan@mail.ru

Tatsiana G. Shutava, PhD (chemistry), docent; leading researcher at the laboratory of organic composite materials.

shutova@ichnm.basnet.by

Vladimir A. Kostyuk, doctor of science (chemistry), full professor; head of the laboratory of physiology, department of human and animal physiology, faculty of biology.

kostyuk@bsu.by
