

ЦИТОПРОТЕКТОРНОЕ И АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ СВОБОДНОГО И НАНОСТРУКТУРИРОВАННОГО КВЕРЦЕТИНА ПРИ *трет*-БУТИЛГИДРОПЕРОКСИД-ИНДУЦИРОВАННОМ ПОВРЕЖДЕНИИ КЛЕТОК

А. И. ПОТАПОВИЧ¹⁾, Т. В. КОСТЮК¹⁾,
Т. Г. ШУТОВА²⁾, Т. В. РОМАНОВСКАЯ¹⁾, 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. Исследовано цитопротекторное и антиоксидантное действие кверцетина, вносимого в культуральную среду в виде раствора в диметилсульфоксиде и в виде водной суспензии кверцетинсодержащих желатиновых наночастиц. Окислительный стресс в кератиноцитах линии HaCaT индуцирован путем добавления *трет*-бутилгидропероксида. Наличие окислительного стресса определено по снижению внутриклеточного содержания восстановленного глутатиона и SH-групп белков. Исследуемые препараты внесены в среду ДМЕМ без сыворотки непосредственно перед добавлением *трет*-бутилгидропероксида. Степень повреждения клеток оценена по выходу фермента лактатдегидрогеназы и с помощью теста на живые и мертвые клетки. Апоптотические и некротические клетки выявлены методом проточной цитофлуориметрии с использованием аналитического набора, включающего аннексин V, меченный флуорохромом FITC, и пропидия иодид. Полученные результаты свидетельствуют о том, что как свободный, так и наноструктурированный кверцетин эффективно предотвращают оксидативное повреждение и гибель клеток, вызываемые *трет*-бутилгидропероксидом. Таким образом, включение кверцетина в желатиновые наночастицы позволяет использовать данное вещество в виде водных суспензий без снижения его антиоксидантных свойств и цитопротекторной активности.

Образец цитирования:

Потапович АИ, Костюк ТВ, Шутова ТГ, Романовская ТВ, Костюк ВА. Цитопротекторное и антиоксидантное действие свободного и наноструктурированного кверцетина при *трет*-бутилгидропероксид-индуцированном повреждении клеток. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2025; 2:16–24.
EDN: DGWMPZ

For citation:

Potapovich AI, Kostyuk TV, Shutava TG, Ramanouskaya TV, Kostyuk VA. Cytoprotective and antioxidant effects of free and nanostructured quercetin in *tert*-butyl hydroperoxide-induced cell damage. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2025;2:16–24. Russian.
EDN: DGWMPZ

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 материалов и технологий ЖК-устройств.

Татьяна Владимировна Романовская – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры генетики биологического факультета.

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

<https://orcid.org/0009-0001-1815-8557>

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 materials and technologies of LCD devices.

shutova@ichnm.by

Tatsiana V. Ramanouskaya, PhD (biology), docent; associate professor at the department of genetics, faculty of biology.

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

<https://orcid.org/0000-0002-1246-4131>

Ключевые слова: кератиноциты линии HaCaT; *tert*-бутилгидропероксид; кверцетин; желатиновые наночастицы; окислительный стресс; проточная цитофлуориметрия.

Благодарность. Работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований «Конвергенция-2025» (задание 3.03.11).

CYTOPROTECTIVE AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF FREE AND NANOSTRUCTURED QUERCETIN IN *tert*-BUTYL HYDROPEROXIDE-INDUCED CELL DAMAGE

A. I. POTAPOVICH^a, T. V. KOSTYUK^a,
T. G. SHUTAVA^b, T. V. RAMANOUSKAYA^a, 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. The cytoprotective and antioxidant effects of quercetin introduced into the cultural medium in the form of a solution in dimethyl sulfoxide and as an aqueous suspension of quercetin-loaded gelatin nanoparticles were investigated. Oxidative stress in HaCaT keratinocytes was induced by the addition of *tert*-butyl hydroperoxide. Its presence was determined by a decrease in intracellular levels of reduced glutathione and SH groups of proteins. The studied preparations were introduced into the serum-free DMEM medium immediately prior to *tert*-butyl hydroperoxide addition. Cell damage was assessed by measuring lactate dehydrogenase release and through live and dead cell assays. Apoptotic and necrotic cells were identified via flow cytometry using the staining kit containing FITC-labelled annexin V and propidium iodide. The results demonstrate that both free and nanostructured quercetin effectively mitigate oxidative damage and cell death induced by *tert*-butyl hydroperoxide. These findings suggest that incorporating quercetin into gelatin nanoparticles allows the use of this substance in aqueous suspensions without compromising its antioxidant properties and cytoprotective activity.

Keywords: HaCaT keratinocytes; *tert*-butyl hydroperoxide; quercetin; gelatin nanoparticles; oxidative stress; flow cytometry.

Acknowledgements. The work was carried out within the framework of the state programme of scientific research «Convergence-2025» (assignment 3.03.11).

Введение

В контексте молекулярной фармакологии нанотехнологии открывают новые горизонты для разработки инновационных лекарственных форм. Их использование способствует расширению спектра применения молекулярных фармакологических средств – от улучшения проникновения веществ через биологические барьеры (например, гематоэнцефалический барьер) до создания новых методов диагностики и мониторинга состояния организма на молекулярном уровне. Нанотехнологии позволяют разрабатывать носители с функциональными поверхностными группами, способными взаимодействовать с определенными клетками или тканями, что повышает селективность доставки лекарств и эффективность лечения [1]. Включение веществ, обладающих высокой биологической активностью, но низкой растворимостью, таких как флавоноиды, в биосовместимые и биоразлагаемые наноструктуры может существенно повысить их биодоступность. Одним из наиболее фармакологически перспективных флавоноидов является кверцетин – мощный антиоксидант, оказывающий противовоспалительное действие. Исследования показывают, что он способен модулировать работу иммунной системы, снижать воспаление и защищать клетки от окислительного стресса [2]. Кверцетин рассматривается как потенциальное средство для профилактики и лечения различных заболеваний, включая паразитарные инфекции, сердечно-сосудистые и воспалительные патологии [3; 4]. В связи с низкой растворимостью кверцетина значительная часть перорально введенного вещества метаболизируется в кишечнике, и лишь небольшая

часть всасывается в порталы вены, что объясняет низкую биодоступность данного флавоноида. Для повышения эффективности его доставки используют наноносители на основе липидов – липосомы, наноструктурированные липидные носители, твердолипидные наночастицы (НЧ), мицеллы и гидрогели из природных или синтетических полимеров [5–7]. Ранее нами было показано, что в качестве средств доставки фармакологически активных субстанций в культивируемые клетки человека могут применяться желатиновые НЧ [8]. В настоящей работе исследовано цитопротекторное и антиоксидантное действие кверцетина, вносимого в культуральную среду в виде раствора в диметилсульфоксиде и в виде водной суспензии наноструктурированного кверцетина, включенного в НЧ, при *трет*-бутилгидропероксид-индуцированном повреждении кератиноцитов человека.

Материалы и методы исследования

Реагенты. В работе использовали модифицированную среду Игла (DMEM), акридиновый оранжевый, этидиумбромид, кверцетин, *трет*-бутилгидропероксид (*t*ВНР), желатин типа А (300 Блум) (*Sigma-Aldrich*, Германия), изотонический фосфатный буфер (рН 7,4) (*Lonza*, Бельгия), эмбриональную бычью сыворотку (*Capricorn Scientific*, Польша).

Клеточные культуры. Иммуortalizованная клеточная линия кератиноцитов человека HaCaT была предоставлена доктором Н. Фузенигом (Гейдельберг, Германия). Клетки культивировали во флаконах T25 (*Sarstedt*, США) в среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, при стандартных условиях (37 °С; 5 % CO₂). Экспозицию с исследуемыми веществами проводили в 96- и 24-луночных планшетах (*Sarstedt*).

Получение желатиновых нанокapsул. Желатиновые нанокapsулы получали методом двухстадийной десольватации без использования поверхностно-активных веществ по модифицированной методике, приведенной в работе [9]. Средний гидродинамический диаметр желатиновых нанокapsул был равен (264 ± 5) нм. Для получения кверцетинсодержащих желатиновых НЧ (Кв-НЧ) к 15 мл водной дисперсии желатиновых нанокapsул с концентрацией 1,4 мг/мл добавляли по каплям 3 мл раствора кверцетина в этиловом спирте с концентрацией 0,24 мг/мл при постоянной обработке ультразвуком. Далее Кв-НЧ отделяли центрифугированием и редиспергировали в 2 мл дистиллированной воды. Полученный образец содержал около 0,052 ммоль кверцетина на 1 г НЧ.

Общая схема проведения экспериментов. Окислительный стресс инициировали добавлением *t*ВНР. Исследуемые препараты (раствор кверцетина в диметилсульфоксиде и водную суспензию Кв-НЧ) вносили в среду DMEM, не содержащую сыворотки, непосредственно перед добавлением *t*ВНР.

Нарушение целостности клеток оценивали по выходу из клеток фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и с помощью теста на живые и мертвые клетки, используя смесь флуоресцентных красителей акридинового оранжевого и этидиумбромида. Окрашенные клетки визуализировали и фотографировали с применением флуоресцентного микроскопа в сочетании с системой анализа изображений *Celena S (Logos Biosystems, Республика Корея)*. Активность ЛДГ определяли прямым спектрофотометрическим методом в 1 мл изотонического фосфатного буфера, содержащего 330 мкмоль/л пирувата и 100 мкмоль/л НАДН, по величине изменения оптической плотности при 340 нм за 1 мин с использованием спектрофотометра *Cary-50 (Varian, Австралия)*. Процент повреждения клеток рассчитывали путем деления активности ЛДГ в среде культивирования на суммарную активность ЛДГ в среде культивирования и лизатах адгезированных клеток.

Апоптотические и некротические клетки выявляли методом проточной цитофлуориметрии на приборе *LongCyte B5R3V3 (Challenbio, Китай)* с использованием аналитического набора, включающего аннексин V, меченный флуорохромом FITC (аннексин V-FITC), и пропидия иодид (PI) (*BioLegend, США*), согласно инструкции.

Содержание SH-групп глутатиона и тиолов белков определяли, используя реагент *ThioGlo-1 (SABiosciences, Италия)* [10]. При анализе образцов в лунки планшета добавляли 200 мкл раствора 10 ммоль/л додецилсульфата натрия, содержащего 10 мкмоль/л реагента *ThioGlo-1*. Планшет инкубировали на шейкере в темноте при комнатной температуре в течение 60 мин и измеряли интенсивность флуоресценции в лунках с использованием флуоресцентного спектрофотометра *Cary Eclipse (Varian)* при $\lambda_{\text{ex}} = 355$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 535$ нм. Количество SH-групп в образцах рассчитывали с помощью калибровочного графика.

Статистический анализ. Полученные данные анализировали с использованием программы *Excel*. Результаты представляли как среднее значение ± стандартное отклонение. Для оценки статистической значимости (*p*) использовали двусторонний непарный критерий Стьюдента. Статистически достоверными считали значения $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Внесение *t*ВНР в концентрации 0,5 ммоль/л в среду культивирования кератиноцитов человека линии HaCaT приводит к снижению в ходе инкубации количества восстановленного глутатиона (GSH) и SH-групп белков (табл. 1). Эти результаты согласуются с данными различных авторов, показавших, что *t*ВНР способен инициировать в клетках гиперпродукцию активных форм кислорода и развитие окислительного стресса [11; 12], одним из важнейших маркеров которого является снижение внутриклеточного уровня GSH и SH-групп белков [10].

Таблица 1

Содержание GSH и SH-групп белков в кератиноцитах линии HaCaT через 1, 2 и 4 ч инкубации с *t*ВНР в концентрации 0,5 ммоль/л

Table 1

Content of GSH and SH groups of proteins in HaCaT keratinocytes after 1, 2 and 4 h of incubation with *t*ВНР at a concentration of 0.5 mmol/L

Время воздействия <i>t</i> ВНР, ч	Содержание GSH и SH-белков, нмоль на 1 мл лизата клеток
0 (контроль)	18,7 ± 1,0
1	18,4 ± 2,4
2	17,4 ± 1,2**
4	12,5 ± 1,2*

* $p \leq 0,000001$ относительно контроля.

** $p \leq 0,03$ относительно контроля.

Известно, что продукция избыточного количества активных форм кислорода приводит к ингибированию клеточного метаболизма, следствием чего может быть некротическая или апоптотическая гибель клеток [13]. Для выяснения механизма клеточной гибели, вызванной окислительным стрессом, инициируемым *t*ВНР, использовали метод двойного окрашивания (аннексин V-FITC и PI). Белок аннексин V избирательно связывается с фосфатидилсеринем (PS). В нормальных клетках PS расположен только на внутренней стороне плазматической мембраны и недоступен для аннексина V. Во время апоптоза асимметрия мембраны нарушается, и PS перемещается на внешнюю сторону мембраны, что позволяет ему связываться с аннексином V-FITC. В результате поверхность клеток демонстрирует зеленую флуоресценцию, при этом ядра некротических и поздних апоптотических клеток окрашиваются в красный цвет интеркалирующим красителем PI. Флуоресценцию клеток и соотношение нормальных, ранних апоптотических, некротических и поздних апоптотических клеток оценивали методом проточной цитофлуориметрии (рис. 1). Как следует из данных, представленных на рис. 1, через 4 ч инкубации с *t*ВНР почти половина всех клеток (примерно 43 %) находятся в состоянии апоптоза, тогда как количество некротических клеток составляет менее 7 %.

В последующих экспериментах было исследовано влияние кверцетина, вносимого в культуральную среду в виде раствора в диметилсульфоксиде и в виде водной суспензии Кв-НЧ, на количество в клетках GSH и SH-групп белков через 4 ч инкубации с *t*ВНР (табл. 2).

Таблица 2

Содержание GSH и SH-групп белков в кератиноцитах линии HaCaT через 4 ч инкубации с *t*ВНР в присутствии исследуемых препаратов и без них

Table 2

Content of GSH and SH groups of proteins in HaCaT keratinocytes after 4 h of incubation with *t*ВНР in the presence of the studied drugs and without them

Экспериментальные условия	Содержание GSH и SH-белков, нмоль на 1 мл лизата клеток
Контроль	18,9 ± 0,6
Инкубация с <i>t</i> ВНР (0,5 ммоль/л)	14,1 ± 0,6*
Инкубация с <i>t</i> ВНР (0,5 ммоль/л) и кверцетином (25 мкмоль/л)	18,7 ± 1,4**
Инкубация с <i>t</i> ВНР (0,5 ммоль/л) и кверцетином (50 мкмоль/л)	18,7 ± 0,6**

Окончание табл. 2
 Ending of the table 2

Экспериментальные условия	Содержание GSH и SH-белков, нмоль на 1 мл лизата клеток
Инкубация с <i>t</i> ВНР (0,5 ммоль/л) и Кв-НЧ (25 мкмоль/л)	19,6 ± 1,2**
Инкубация с <i>t</i> ВНР (0,5 ммоль/л) и Кв-НЧ (50 мкмоль/л)	19,5 ± 1,4**

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

** $p < 0,000\,01$ относительно инкубации с *t*ВНР.

Установлено, что свободный и наноструктурированный кверцетин уже в концентрации 25 мкмоль/л полностью устраняет *t*ВНР-индуцированное снижение уровня GSH и SH-групп белков в кератиноцитах через 4 ч воздействия *t*ВНР, что может свидетельствовать об отсутствии окислительного стресса в этих клетках. Методом проточной цитофлуориметрии было оценено соотношение нормальных, ранних апоптотических, некротических и поздних апоптотических клеток через 4 ч инкубации с *t*ВНР в присутствии свободного и наноструктурированного кверцетина и без него (рис. 2).

Как видно из данных, представленных на рис. 2, внесение в культуральную среду свободного и наноструктурированного кверцетина совместно с *t*ВНР полностью устраняет его цитотоксический эффект: соотношение нормальных, ранних апоптотических, некротических и поздних апоптотических клеток в этих экспериментах (см. рис. 2, б и в) соответствует результатам, полученным для контрольных клеток (см. рис. 1, а).

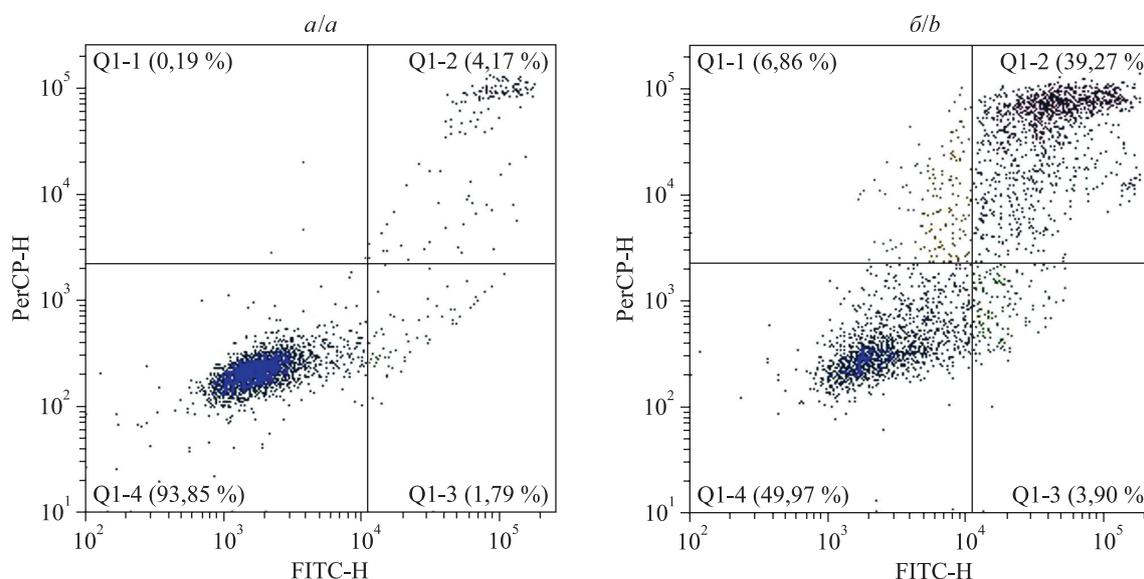


Рис. 1. Результаты оценки методом проточной цитофлуориметрии состояния контрольных клеток (а) и клеток через 4 ч инкубации с *t*ВНР в концентрации 0,75 ммоль/л (б).

Приведена интенсивность флуоресцентного сигнала 10 000 клеток (окрашивание аннексином V-FITC и PI).

Нижний левый квадрант представляет флуоресценцию нормальных клеток (аннексин V отрицательный, PI отрицательный), нижний правый квадрант – флуоресценцию ранних апоптотических клеток (аннексин V положительный, PI отрицательный), верхний правый квадрант – флуоресценцию поздних апоптотических клеток (аннексин V положительный, PI положительный), верхний левый квадрант – флуоресценцию некротических клеток (аннексин V отрицательный, PI положительный)

Fig. 1. Results of flow cytometry analysis of the state of control cells (a)

and cells after 4 h of incubation with *t*BHP at a concentration of 0.75 mmol/L (b).

Fluorescent signal intensity of 10 000 cells is shown (annexin V-FITC and PI staining).

The lower left quadrant represents the fluorescence of normal cells (annexin V negative, PI negative), the lower right quadrant – the fluorescence of early apoptotic cells (annexin V positive, PI negative), the upper right quadrant – the fluorescence of late apoptotic cells (annexin V positive, PI positive), the upper left quadrant – the fluorescence of necrotic cells (annexin V negative, PI positive)

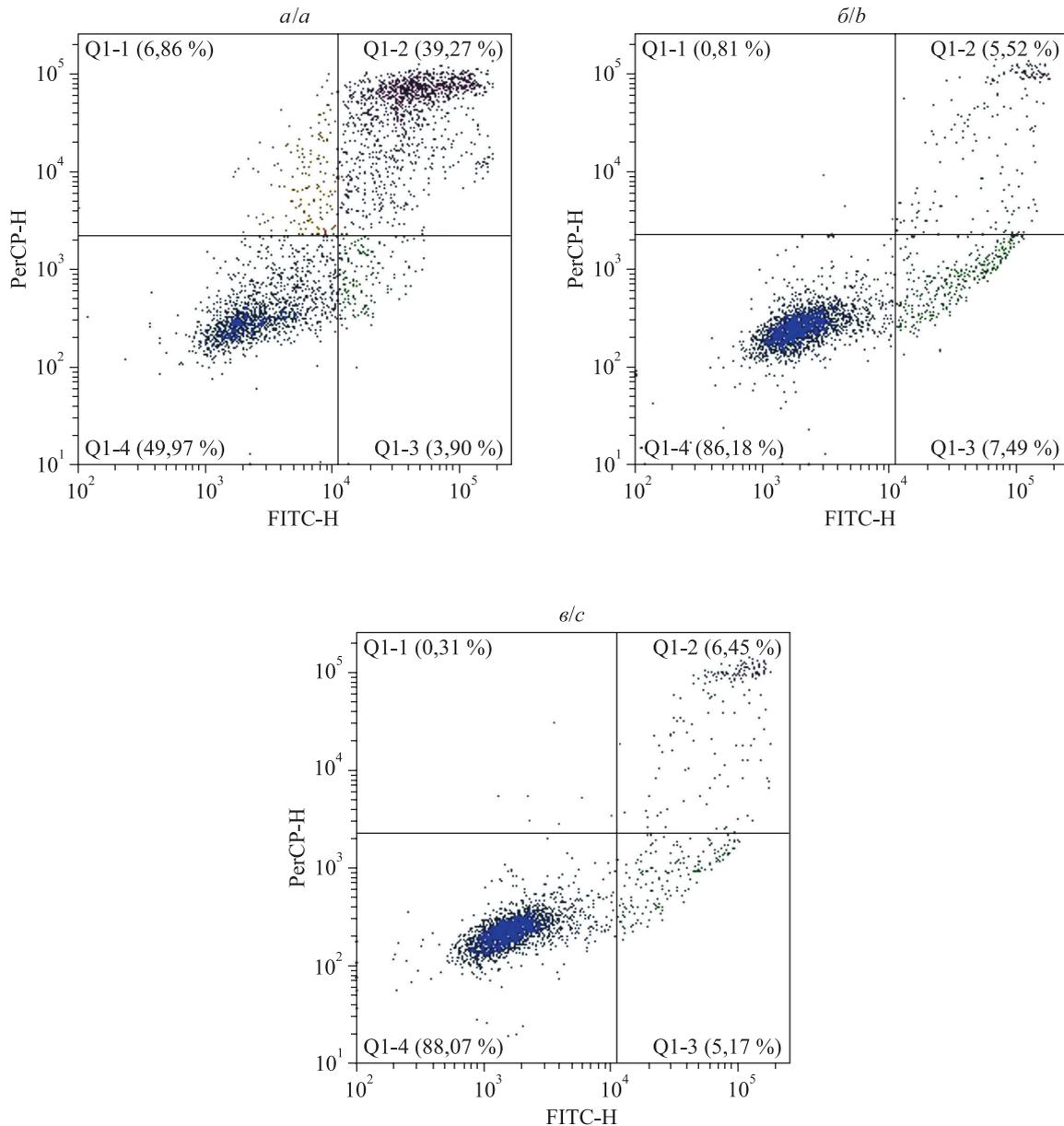


Рис. 2. Результаты оценки методом проточной цитофлуориметрии состояния клеток через 4 ч инкубации с *t*BHP в концентрации 0,75 ммоль/л без исследуемых препаратов (а), в присутствии 50 мкмоль/л свободного кверцетина (б) и 50 мкмоль/л наноструктурированного кверцетина (в). Приведена интенсивность флуоресцентного сигнала 10 000 клеток (окрашивание аннексином V-FITC и PI).

Нижний левый квадрант представляет флуоресценцию нормальных клеток (аннексин V отрицательный, PI отрицательный), нижний правый квадрант – флуоресценцию ранних апоптотических клеток (аннексин V положительный, PI отрицательный), верхний правый квадрант – флуоресценцию поздних апоптотических клеток (аннексин V положительный, PI положительный), верхний левый квадрант – флуоресценцию некротических клеток (аннексин V отрицательный, PI положительный)

Fig. 2. Results of flow cytometry analysis of cell state after 4 h of incubation with *t*BHP at a concentration of 0.75 mmol/L without the studied drugs (a), in the presence of 50 μ mol/L free quercetin (b) and 50 μ mol/L nanostructured quercetin (c). Fluorescent signal intensity of 10 000 cells is shown (annexin V-FITC and PI staining). The lower left quadrant represents the fluorescence of normal cells (annexin V negative, PI negative), the lower right quadrant – the fluorescence of early apoptotic cells (annexin V positive, PI negative), the upper right quadrant – the fluorescence of late apoptotic cells (annexin V positive, PI positive), the upper left quadrant – the fluorescence of necrotic cells (annexin V negative, PI positive)

Влияние свободного и наноструктурированного кверцетина, а также НЧ, не содержащих кверцетин, на *t*ВНР-индуцированное нарушение целостности клеток через 24 ч воздействия *t*ВНР оценивали по выходу из клеток цитоплазматического фермента ЛДГ (табл. 3).

Таблица 3

Количество неповрежденных кератиноцитов,
 оцениваемое по выходу из клеток фермента ЛДГ, через 24 ч инкубации с *t*ВНР
 в присутствии исследуемых препаратов и без них

Table 3

The number of intact keratinocytes,
 assessed by the release of the enzyme lactate dehydrogenase from the cells,
 after 24 h of incubation with *t*ВНР in the presence of the studied drugs and without them

Экспериментальные условия	Количество неповрежденных кератиноцитов, % к контролю
Инкубация с <i>t</i> ВНР (0,5 ммоль/л) без кверцетина	13,0 ± 2,1*
Инкубация с <i>t</i> ВНР (0,5 ммоль/л) и кверцетином (25 мкмоль/л)	91,6 ± 3,4**
Инкубация с <i>t</i> ВНР (0,5 ммоль/л) и кверцетином (50 мкмоль/л)	97,2 ± 0,6**
Инкубация с <i>t</i> ВНР (0,5 ммоль/л) без Кв-НЧ	13,0 ± 2,1*
Инкубация с <i>t</i> ВНР (0,5 ммоль/л) и Кв-НЧ (25 мкмоль/л)	81,4 ± 4,5**, ***
Инкубация с <i>t</i> ВНР (0,5 ммоль/л) и Кв-НЧ (50 мкмоль/л)	82,8 ± 1,8**, ***
Инкубация с <i>t</i> ВНР (0,5 ммоль/л) без НЧ	10,0 ± 4,1*
Инкубация с <i>t</i> ВНР (0,5 ммоль/л) и НЧ (25 мкмоль/л)	11,6 ± 4,1*
Инкубация с <i>t</i> ВНР (0,5 ммоль/л) и НЧ (50 мкмоль/л)	12,2 ± 3,1*

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

** $p < 0,000\ 1$ относительно инкубации с *t*ВНР без исследуемых препаратов.

*** $p < 0,01$ относительно инкубации с *t*ВНР и кверцетином.

Установлено, что *t*ВНР в концентрации 0,5 ммоль/л оказывает выраженное цитотоксическое действие на кератиноциты линии HaCaT: через 24 ч инкубации с *t*ВНР количество неповрежденных клеток снижается до 13 %. Однако внесение в культуральную среду совместно с *t*ВНР свободного кверцетина в концентрации 25 мкмоль/л способствовало тому, что количество неповрежденных клеток через 24 ч инкубации с *t*ВНР составляло более 90 %, а внесение в культуральную среду совместно с *t*ВНР свободного кверцетина в концентрации 50 мкмоль/л полностью устраняло цитотоксическое действие *t*ВНР. Выраженную цитопротекторную активность проявлял и наноструктурированный кверцетин в концентрации 25 и 50 мкмоль/л (см. табл. 3).

Сохранение структурной целостности клеток при инкубации с *t*ВНР в течение 24 ч в присутствии свободного и наноструктурированного кверцетина подтверждают результаты теста на живые и мертвые клетки. Тест основан на способности акридинового оранжевого проникать в живые клетки и окрашивать цитоплазму и ядро в зеленый цвет, тогда как этидиумбромид проникает только в клетки, потерявшие целостность мембраны, окрашивая их ядра в оранжевый или красный цвет. Как видно из представленных микрофотографий (рис. 3), клетки после инкубации с *t*ВНР демонстрируют интенсивную красную флуоресценцию за счет окрашивания ядер этидиумбромидом (см. рис. 3, б). В том случае, когда инкубация с *t*ВНР проводилась в присутствии свободного (см. рис. 3, в) или наноструктурированного (см. рис. 3, з) кверцетина, клетки окрашивались только акридиновым оранжевым, сохраняя зеленую флуоресценцию, характерную для неповрежденных клеток (см. рис. 3, а).

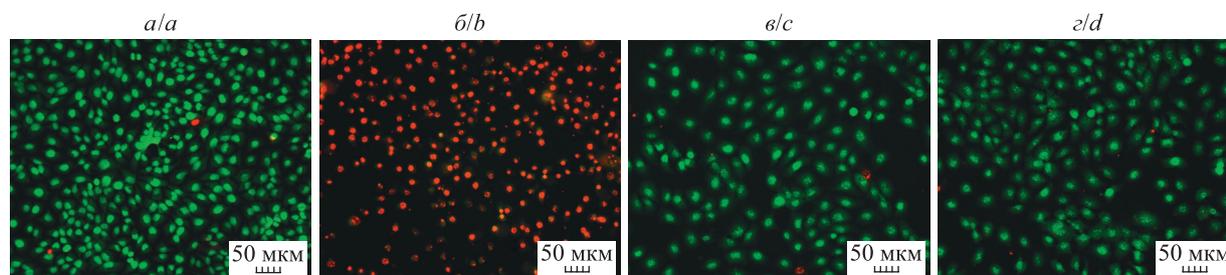


Рис. 3. Репрезентативные флуоресцентные микрофотографии кератиноцитов, окрашенных смесью акридинового оранжевого и этидиумбромидом: *a* – контрольные клетки; *b* – клетки через 24 ч инкубации с *t*ВНР (0,5 ммоль/л); *в* – клетки через 24 ч инкубации с *t*ВНР (0,5 ммоль/л) в присутствии 50 мкмоль/л свободного кверцетина; *г* – клетки через 24 ч инкубации с *t*ВНР (0,5 ммоль/л) в присутствии 50 мкмоль/л наноструктурированного кверцетина

Fig. 3. Representative fluorescent microphotographs of keratinocytes stained with the acridine orange and ethidium bromide system: *a* – control cells; *b* – cells after 24 h of incubation with *t*BHP (0.5 mmol/L); *c* – cells after 24 h of incubation with *t*BHP (0.5 mmol/L) in the presence of 50 μmol/L free quercetin; *d* – cells after 24 h of incubation with *t*BHP (0.5 mmol/L) in the presence of 50 μmol/L nanostructured quercetin

Полученные данные свидетельствуют о том, что добавление *t*ВНР в среду инкубации приводит к ингибированию клеточного метаболизма, повреждению кератиноцитов и снижению количества жизнеспособных клеток в результате апоптоза. При этом апоптотические клетки могут подвергаться вторичному некрозу, характеризующемуся повреждением плазматической мембраны и высвобождением внутриклеточных молекул во внеклеточное пространство. Показано, что как нативный кверцетин, так и кверцетин, инкапсулированный в желатиновые НЧ, эффективно защищают клетки от гибели, вызванной *t*ВНР. Учитывая выраженные антиоксидантные свойства кверцетина [2], можно предположить, что исследованные препараты предотвращают повреждение митохондрий, являющееся основным триггером апоптоза при окислительном стрессе [13].

Заключение

Целью данного исследования было оценить, как инкапсуляция в желатиновые НЧ влияет на антиоксидантную активность кверцетина. В работе использовалась клеточная модель *t*ВНР-индуцированного окислительного стресса, позволяющая изучать защитные свойства различных биологически активных веществ в условиях дисбаланса между свободными радикалами и антиоксидантами. Полученные результаты демонстрируют, что экзогенные антиоксиданты, в частности кверцетин, способны предотвращать оксидативное повреждение и гибель клеток, вызываемые *t*ВНР. Инкапсуляция в желатиновые НЧ позволяет использовать кверцетин в виде водных суспензий без снижения его антиоксидантного потенциала и цитопротекторной активности. Таким образом, покрытие кверцетина желатиновой оболочкой повышает биодоступность данного флавоноида и не препятствует реализации его биологической активности.

Библиографические ссылки

1. Wang X, Xu S, Liu Q, Ye X, He H, Zhang X, et al. Research progress on the application of nanomaterials in the diagnosis and treatment of venous thromboembolism. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2025;66:102820. DOI: 10.1016/j.nano.2025.102820.
2. Костюк ВА, Потапович АИ. *Биорадикалы и биоантиоксиданты*. Минск: БГУ; 2004. 174 с.
3. Kostyuk VA, Potapovich AI, Suhan TO, de Luca C, Korkina LG. Antioxidant and signal modulation properties of plant polyphenols in controlling vascular inflammation. *European Journal of Pharmacology*. 2011;658(2–3):248–256. DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.02.022.
4. Sharma S, Thukral R, Singla LD, Singla N, Choudhury D. Quercetin-loaded solid lipid nanoparticles for enhanced anti-helminthic activity. *International Journal of Pharmaceutics*. 2025;672:125308. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2025.125308.
5. Tomou E-M, Papakyriakopoulou P, Saitani E-M, Valsami G, Pippa N, Skaltsa H. Recent advances in nanoformulations for quercetin delivery. *Pharmaceutics*. 2023;15(6):1656. DOI: 10.3390/pharmaceutics15061656.
6. Shawky S, Makled S, Awaad A, Boraie N. Quercetin loaded cationic solid lipid nanoparticles in a mucoadhesive *in situ* gel – a novel intravesical therapy tackling bladder cancer. *Pharmaceutics*. 2022;14(11):2527. DOI: 10.3390/pharmaceutics14112527.
7. Sahu T, Ratre YK, Chauhan S, Bhaskar LVKS, Nair MP, Verma HK. Nanotechnology based drug delivery system: current strategies and emerging therapeutic potential for medical science. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2021;63:102487. DOI: 10.1016/j.jddst.2021.102487.

8. Потапович АИ, Сухан ТО, Шутова ТГ, Костюк ВА. Рецептор-опосредованный эндоцитоз – важный путь поступления желатиновых наночастиц в клетки. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020;1:3–10. DOI: 10.33581/2521-1722-2020-1-3-10.

9. Coester CJ, Langer K, Von Briesen H, Kreuter J. Gelatin nanoparticles by two step desolvation: a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *Journal of Microencapsulation*. 2000;17(2):187–193. DOI: 10.1080/026520400288427.

10. 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.

11. Zhao W, Feng H, Sun W, Liu K, Lu J-J, Chen X. *tert*-Butyl hydroperoxide (*t*-BHP) induced apoptosis and necroptosis in endothelial cells: roles of NOX4 and mitochondrion. *Redox Biology*. 2017;11:524–534. DOI: 10.1016/j.redox.2016.12.036.

12. Yang H-C, Yu H, Ma T-H, Tjong W-Y, Stern A, Chiu DTY. *tert*-Butyl hydroperoxide (*t*BHP)-induced lipid peroxidation and embryonic defects resemble glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in *C. elegans*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(22):8688. DOI: 10.3390/ijms21228688.

13. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*. 2015;4:180–183. DOI: 10.1016/j.redox.2015.01.002.

Получена 30.05.2025 / исправлена 05.06.2025 / принята 05.06.2025.

Received 30.05.2025 / revised 05.06.2025 / accepted 05.06.2025.