Физиология и клеточная биология

Physiology and cell biology

УДК 577.33/.34, 577.355, 577.3.32/.36

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИДИСПЕРСНЫХ НАНОЧАСТИЦ ЗЕИНА, СОДЕРЖАЩИХ КВЕРЦЕТИН, И ОЦЕНКА ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

***А. И. ПОТАПОВИЧ*[1)], *Т. В. КОСТЮК*[1)], *Т. Г. ШУТОВА*[2)], *В. А. КОСТЮК*[1)]**

[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. На основе белка кукурузы зеина получены кверцетинсодержащие наночастицы. Показано, что кверцетин, включенный в матрицу зеина, сохраняет антирадикальную активность в реакции с катион-радикалами 2,2′-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты). Установлено, что как нативный кверцетин, так и структурированный в зеиновых наночастицах кверцетин уменьшают повреждение плазматических мембран

Образец цитирования:
Потапович АИ, Костюк ТВ, Шутова ТГ, Костюк ВА. Получение полидисперсных наночастиц зеина, содержащих кверцетин, и оценка их биологической активности. *Экспериментальная биология и биотехнология.* 2024;3:4–9.
EDN: MVDGTC

For citation:
Potapovich AI, Kostyuk TV, Shutava TG, Kostyuk VA. Obtaining and assessing the biological activity of quercetin included in polydisperse nanoparticles of zein. *Experimental Biology and Biotechnology.* 2024;3:4–9. Russian.
EDN: MVDGTC

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

и ядерной ДНК клеток, вызванное бактерицидным УФ-облучением. Таким образом, белок кукурузы зеин может быть использован для получения кверцетинсодержащих наночастиц, сохраняющих биологическую активность нативного кверцетина.

Ключевые слова: кератиноциты HaCaT; зеин; кверцетин; наноструктуры; окислительный стресс; повреждение ДНК.

OBTAINING AND ASSESSING THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF QUERCETIN INCLUDED IN POLYDISPERSE NANOPARTICLES OF ZEIN

***A. I. POTAPOVICH*[a], *T. V. KOSTYUK*[a], *T. G. SHUTAVA*[b], *V. A. KOSTYUK*[a]**

[a]*Belarusian State University, 4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus*
[b]*Institute 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 corn protein zein was used to obtain quercetin-containing nanoparticles. It has been shown that quercetin included in the zein matrix retains antiradical activity in the reaction with 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) radical cations. It was found that both native quercetin and structured quercetin in zein nanoparticles reduce damage to plasma membranes and nuclear DNA of cells caused by bactericidal UV irradiation. Thus, corn protein zein can be used to obtain quercetin-containing nanoparticles that retain the biological activity of native quercetin.

Keywords: HaCaT keratinocytes; zein; quercetin; nanostructures; oxidative stress; DNA damage.

Введение

В качестве средств фармакологической коррекции последствий воздействия окислительного стресса на структурно-функциональное состояние клеток большой интерес представляют растительные полифенольные соединения, в частности флавоноиды, обладающие широким спектром биологической активности [1; 2]. Для повышения биодоступности молекулы потенциальных лекарств могут быть включены в липосомы или полимерные нано- и микрочастицы. Благодаря высокой биосовместимости и биоразлагаемости основной проламиновый белок кукурузы зеин используется в качестве матрицы, обеспечивающей пролонгированное высвобождение ферментов, лекарств и эфирных масел [3]. Целью данной работы были получение и оценка антирадикальной активности полидисперсных наночастиц зеина, содержащих кверцетин, а также изучение их влияния на степень повреждения ядерной ДНК и плазматических мембран кератиноцитов человека после воздействия бактерицидного УФ-облучения (УФ-С-облучения).

Материалы и методы исследования

Реагенты. Модифицированная среда Игла (ДМЕМ), этидиум бромид (ЭБ), кверцетин, додецилсульфат натрия, трипсин 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).

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

Получение и характеристика полидисперсных наночастиц зеина, содержащих кверцетин. С этой целью применяли метод десольватации 25–30 мг/мл растворов белка в этаноле, содержащих капсулируемое соединение. Размеры наночастиц зеина определяли методами динамического светорассеяния и атомно-силовой микроскопии, содержание кверцетина – методом Фолина – Чокалтеу. В данной работе были использованы наночастицы, в основном имеющие диаметр (150 ± 35) нм и характеризующиеся достаточно высоким значением индекса полидисперсности (табл. 1).

Таблица 1

Параметры используемых в работе наночастиц зеина, содержащих кверцетин

Table 1

Parameters of quercetin-containing zein nanoparticles used in this work

Диаметр, нм	Процент от числа частиц	Индекс полидисперсности
150 ± 35	99	0,479 ± 0,119
150–1000	~1	

Общая схема проведения экспериментов. Клетки культивировали во флаконах T25 (*Sarstedt*, США) в среде ДМЕМ, содержащей 10 % ЭБС, при стандартных условиях (37 °C; 5 % CO_2). Для проведения экспериментов клетки растили в 24-луночных планшетах. Растворы препаратов нативного кверцетина и кверцетина, включенного в наночастицы зеина, добавляли к клеткам сразу после УФ-С-облучения в культуральной среде, не содержащей сыворотки. Целостность клеток оценивали через 20 ч после воздействия. Анализ повреждений ДНК проводили спустя 2 ч после облучения.

Определение антирадикальных свойств. Антирадикальные свойства нативного кверцетина, наночастиц зеина без кверцетина и наночастиц зеина, содержащих кверцетин, оценивали с использованием катион-радикалов 2,2′-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) (АБТС).

УФ-С-облучение. Применяли бактерицидную лампу Sylvania G 30W (Германия), 95 % излучения которой составляет УФ-С-излучение с длиной волны 253,7 нм. Перед облучением среду ДМЕМ заменяли на ИФБ. Сразу после облучения ИФБ заменяли на среду ДМЕМ без сыворотки, содержащую исследуемые соединения.

Количественный анализ целостности клеток. Критерием повреждения была степень выхода из клеток лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Активность ЛДГ измеряли прямым спектрофотометрическим методом в 1 мл ИФБ (pH 7,4), содержащего 30 мкмоль/л пирувата и 30 мкмоль/л НАДН, и оценивали по величине изменения оптической плотности при длине волны 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 культивирования и лизатах адгезированных клеток.

Анализ повреждений ДНК с помощью метода ДНК-комет. Щелочной комет-анализ проводили по методике, описанной в работах [4; 5]: клетки трипсинизировали, 50 мкл клеточной суспензии каждой экспериментальной серии добавляли к 300 мкл 0,7 % легкоплавкой агарозы и наносили 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 инкубировали в щелочном буфере для электрофореза (pH 13), содержащем 0,3 моль/л NaOH и 1 ммоль/л ЭДТА, в течение 20 мин 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 ЭБ. Кометы наблюдали при 200-кратном увеличении с использованием флуоресцентного микроскопа Axiovert-25 (*Carl Zeiss*, Германия) и документировали с помощью цифровой камеры. Процент ДНК в хвосте (поврежденная ДНК) рассчитывали для каждой кометы с применением инструмента «гистограмма» программы *Photoshop* (версия 7). Результаты трех независимых экспериментов усредняли для каждого экспериментального условия ($n \geq 50$ клеток).

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

Результаты и их обсуждение

Характеристика зеиновых наночастиц. На основании кривых взаимодействия наночастиц зеина с катион-радикалами АБТС можно сделать вывод о том, что эти наночастицы проявляют слабую активность в реакции с катион-радикалами АБТС. За 60 мин с наночастицами зеина, не содержащими кверцетин, реагирует только $(8,5 \pm 1,0) \cdot 10^{-8}$ моль/мг катион-радикалов АБТС. В то же время для нативного кверцетина на кинетических кривых обесцвечивания растворов катион-радикалов АБТС наблюдаются два последовательных периода, типичных для реакции полифенолов с катион-радикалами АБТС: быстрое уменьшение оптической плотности (A) и последующее медленное обесцвечивание раствора (рис. 1, *а*). С нативным кверцетином за 6 мин реагирует $(1,3 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$ моль/мг катион-радикалов АБТС, а за

60 мин эта величина достигает $(2{,}2 \pm 0{,}6) \cdot 10^{-5}$ моль/мг. На кривых взаимодействия наночастиц зеина, содержащих кверцетин, с катион-радикалами АБТС также выявлены участки быстрого обесцвечивания раствора, однако его длительность составляет 20 мин (рис. 1, *б*), что обусловлено медленным высвобождением кверцетина из наночастиц.

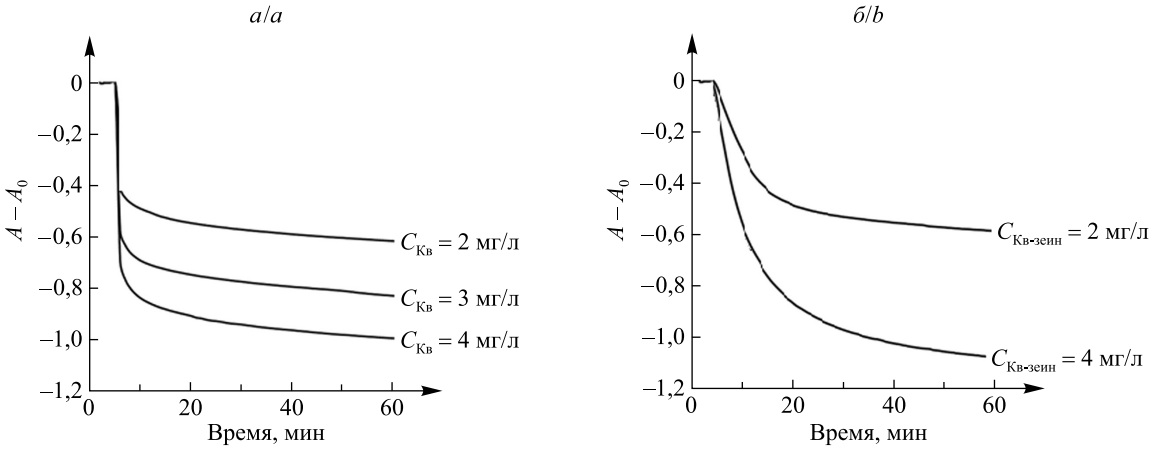


Рис. 1. Кинетические кривые обесцвечивания растворов катион-радикалов АБТС нативным кверцетином (*а*) и кверцетином, включенным в наночастицы зеина (*б*). Концентрации нативного ($C_{Кв}$) и наноструктурированного ($C_{Кв\text{-}зеин}$) кверцетина указаны на рисунке, концентрация катион-радикалов АБТС составляет $8{,}7 \cdot 10^{-5}$ моль/л, температура – 20 °С, длина волны – 734 нм

Fig. 1. Kinetic curves of decolorisation of ABTS radical cation solutions with native quercetin (*a*) and quercetin included in zein nanoparticles (*b*). The concentrations of native ($C_{Кв}$) and nanostructured ($C_{Кв\text{-}зеин}$) quercetin are indicated in the figure, the concentration of ABTS radical cations is $8.7 \cdot 10^{-5}$ mol/L, temperature – 20 °C, wavelength – 734 nm

Влияние кверцетина, включенного в полидисперсные наночастицы зеина, на нарушение структурной целостности кератиноцитов, вызванное УФ-С-облучением. Метод, основанный на определении выхода из клеток цитоплазматического фермента ЛДГ, позволяет оценить структурную целостность клеток и, в частности, целостность плазматической мембраны. Установлено, что воздействие на кератиноциты УФ-С-облучения в дозе 60 мДж/см^2 через 20 ч приводит к повреждению клеточной мембраны и потере клетками более 60 % ЛДГ (табл. 2). Добавление 50 мкмоль/л кверцетина, включенного в наночастицы зеина, непосредственно после УФ-С-экспозиции клеток снижало выход ЛДГ на 70 % по сравнению с ее выходом из облученных клеток без добавления препарата. Нативный кверцетин в этой концентрации практически полностью предотвращал нарушение целостности плазматической мембраны (см. табл. 2).

Таблица 2

Влияние нативного кверцетина и наноструктурированного кверцетина (50 мкмоль/л), внесенных в среду культивирования сразу по окончании УФ-С-облучения (60 мДж/см^2), на структурную целостность кератиноцитов через 20 ч после воздействия

Table 2

Effect of native quercetin and nanostructured quercetin (50 μmol/L), added to the culture medium immediately after UV-C irradiation (60 mJ/cm^2), on the structural integrity of keratinocytes 20 h after exposure

Экспериментальные условия	Выход ЛДГ, %
Контроль (без УФ-С-облучения)	12,4 ± 1,9
УФ-С-облучение	61,2 ± 3,8*
УФ-С-облучение и нативный кверцетин	14,0 ± 2,2**
УФ-С-облучение и наноструктурированный кверцетин	29,5 ± 3,3**

*$p < 0{,}000\,1$ по сравнению с контролем.
**$p < 0{,}000\,1$ по сравнению с УФ-С-облучением.

Влияние кверцетина, включенного в полидисперсные наночастицы зеина, на повреждения ДНК, вызванные УФ-С-облучением. В данной работе было исследовано влияние нативного кверцетина и включенного в зеиновые наночастицы кверцетина, добавленных к кератиноцитам человека сразу по окончании УФ-С-облучения в дозе 60 мДж/см^2, на повреждение ДНК через 2 ч после воздействия. Известно, что УФ-С-облучение инициирует в клетках и тканях быстрые фотохимические процессы. При этом, если мишенью УФ-излучения является ядерный хроматин, ДНК поглощает высокоэнергетическое коротковолновое излучение, в основном УФ-С, что приводит к образованию димеров пиримидина – циклобутановых димеров (CPD) и пиримидин-(6,4)-пиримидиновых фотопродуктов (6,4-фотопродуктов) [6–8]. Клеточная реакция на возникновение повреждения ДНК включает активацию механизмов репарации ДНК [6]. Ранее нами было показано, что нативные полифенолы и микроструктурированный кверцетин (покрытый оболочками на основе полиаллиламингидрохлорида и полистиролсульфоната натрия $(PAH/PPS)_4$ или хитозана и декстрансульфата $(CH/DS)_4$) способны активировать и ускорять репаративный синтез ДНК после воздействия УФ-С-облучения и уменьшать количества CPD и 6,4-фотопродуктов в поврежденной ДНК [9].

Одним из наиболее распространенных и точных методов, применяемых для оценки разнообразных эффектов генотоксических агентов и выявления генопротекторного действия потенциальных фармакологических препаратов, является комет-анализ. Впервые он был предложен О. Остлингом и К. Йохансоном в 1984 г. [10]. В данной работе использована щелочная версия комет-анализа, позволяющая выявить однонитевые повреждения ДНК [4; 5]. В результате УФ-С-облучения и последующей щелочной денатурации ДНК образующиеся фрагменты в ходе электрофореза двигаются с различной скоростью, что при окрашивании проявляется в виде так называемых комет. При этом чем больше было исходных повреждений ДНК, тем большим оказывался процент фрагментов ДНК в хвосте комет. Окрашенные ЭБ предметные стекла наблюдали с помощью флуоресцентного микроскопа и фотографировали цифровой камерой (рис. 2, *а*). Процент поврежденной ДНК в хвосте комет (среднее значение ± стандартное отклонение) рассчитывался по результатам трех независимых экспериментов ($n \geq 50$ клеток для каждого эксперимента) (рис. 2, *б*).

Согласно данным, представленным на рис. 2, процент ДНК в хвосте комет через 2 ч после УФ-С-облучения составлял почти 67 %. При инкубации облученных кератиноцитов с кверцетином, включенным в наночастицы зеина, было обнаружено частичное устранение повреждений ДНК, о чем свидетельствовало уменьшение процента ДНК в хвосте комет. Сравнение действия нативного кверцетина и кверцетина, содержащегося в наночастицах зеина, не выявило достоверной разницы в их способности устранять повреждения ДНК.

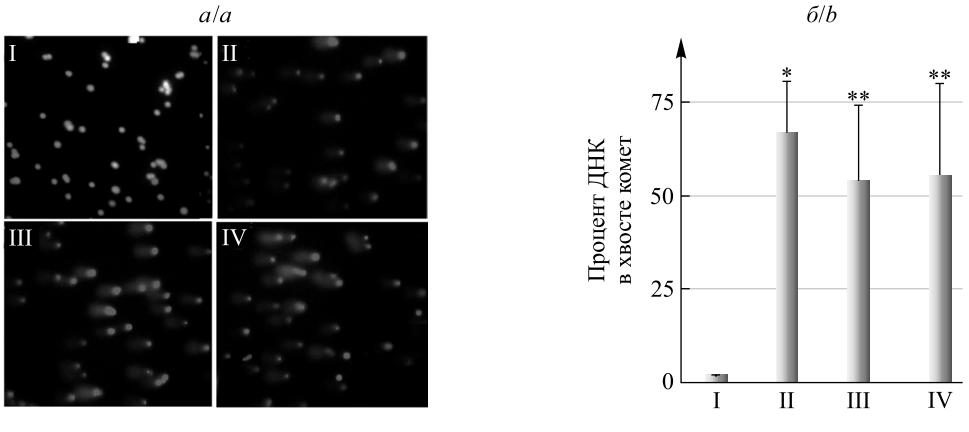


Рис. 2. Влияние нативного и наноструктурированного кверцетина (50 мкмоль/л) на повреждение ДНК культивируемых кератиноцитов через 2 ч после УФ-С-облучения в дозе 60 мДж/см^2: *а* – репрезентативные флуоресцентные микрофотографии ДНК-комет; *б* – процент ДНК в хвосте комет (I – контроль (без УФ-С-облучения), II – УФ-С-облучение, III – УФ-С-облучение и нативный кверцетин, IV – УФ-С-облучение и наноструктурированный кверцетин). Знаком * отмечены значения $p < 0{,}000\,1$ по сравнению с контролем, знаком ** – значения $p < 0{,}000\,1$ по сравнению с УФ-С-облучением

Fig. 2. Effect of native and nanostructured quercetin (50 μmol/L) on DNA damage of cultured keratinocytes 2 h after UV-C irradiation at a dose of 60 mJ/cm^2: *a* – representative fluorescent micrographs of DNA comets; *b* – percentage of DNA in the tail of comets (I – control (without UV-C irradiation), II – UV-C irradiation, III – UV-C irradiation and native quercetin, IV – UV-C irradiation and nanostructured quercetin). The sign * indicates values $p < 0.000\,1$ compared to control, the sign ** indicates values $p < 0.000\,1$ compared to UV-C irradiation

В настоящей работе для инициирования повреждения ДНК применялось УФ-С-излучение с длиной волны 254 нм. Преимущество такого подхода, по сравнению с использованием перекиси водорода и других окислителей, инициирующих в клетках окислительный стресс, заключается в том, что УФ-С-излучение способно напрямую модифицировать ДНК, благодаря чему можно не учитывать антиоксидантную активность тестируемых соединений при исследовании их влияния на степень повреждения ДНК и пути ее репарации.

Заключение

При воздействии на кератиноциты УФ-С-облучения в дозе 60 мДж/см^2 были обнаружены значительное повреждение и гибель клеток через 20 ч. В случае добавления в культуральную среду нативного или наноструктурированного кверцетина в дозе 50 мкмоль/л сразу после облучения повреждение и гибель клеток снижались. Поскольку выделение кверцетина из матрицы зеина носит пролонгированный характер, антирадикальная активность наноструктурированного кверцетина в реакции с катион-радикалами АБТС и его цитопротекторные свойства в условиях клеточного оксидативного стресса несколько ниже аналогичных параметров нативного кверцетина. Следует отметить, что цитопротекторный эффект при воздействии УФ-излучения на клетки кожи без защиты ДНК может обусловливать увеличение частоты возникновения опухолей кожи после облучения [11]. С использованием комет-анализа установлено, что добавление нативного или наноструктурированного кверцетина в дозе 50 мкмоль/л достоверно снижает количество поврежденной ДНК в хвосте комет через 2 ч после УФ-С-облучения (60 мДж/см^2).

Результаты исследования показывают, что как нативный кверцетин, так и наноструктурированный в зеиновых частицах кверцетин уменьшают повреждение плазматических мембран и ядерной ДНК клеток, вызванное УФ-С-облучением. Таким образом, белок кукурузы зеин может быть использован для получения кверцетинсодержащих наночастиц, сохраняющих биологическую активность нативного кверцетина.

Библиографические ссылки

1. Костюк ВА, Потапович АИ. *Биорадикалы и биоантиоксиданты*. Минск: БГУ; 2004. 174 с.

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: 10.2174/09298 6709789352312.

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. 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.

5. 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.

6. Farrell AW, Halliday GM, Lyons JG. Chromatin structure following UV-induced DNA damage – repair or death? *International Journal of Molecular Sciences.* 2011;12(11):8063–8085. DOI: 10.3390/ijms12118063.

7. Setlow RB. Cyclobutane-type pyrimidine dimers in polynucleotides. *Science.* 1966;153(3734):379–386. DOI: 10.1126/science. 153.3734.379.

8. Rolfsmeier ML, Laughery MF, Haseltine CA. Repair of DNA double-strand breaks following UV damage in three *Sulfolobus solfataricus* strains. *Journal of Bacteriology.* 2010;192(19):4954–4962. DOI: 10.1128/JB.00667-10.

9. Potapovich AI, Kostyuk TV, Ishutina OV, Shutava TG, Kostyuk VA. Effects of native and particulate polyphenols on DNA damage and cell viability after UV-C exposure. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* 2023;396(9):1923–1930. DOI: 10.1007/s00210-023-02443-3.

10. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1984;123(1):291–298. DOI: 10.1016/0006-291x(84)90411-x.

11. Dose M, Emmanuel AO, Chaumeil J, Zhang J, Sun T, Germar K, et al. β-Catenin induces T-cell transformation by promoting genomic instability. *PNAS.* 2014;111(1):391–396. DOI: 10.1073/pnas.1315752111.

Получена 30.05.2024 / исправлена 12.09.2024 / принята 12.09.2024.
Received 30.05.2024 / revised 12.09.2024 / accepted 12.09.2024.