

## ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ НАТИВНОГО И МИКРОСТРУКТУРИРОВАННОГО КВЕРЦЕТИНА ПРИ ИНИЦИИРОВАНИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В КЕРАТИНОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

*Ишутина О. В.<sup>1</sup>, Шутова Т. Г.<sup>2</sup>, Костюк В. А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, Беларусь

**Введение.** Флавоноиды обладают широким спектром биологической активности [1, 2]. Тем не менее, их клиническое применение ограничено низкой растворимостью в воде, что обуславливает слабое поглощение клетками и плохую проницаемость флавоноидов через кожу. Чтобы преодолеть эти ограничения, молекулы потенциальных лекарств могут быть включены в липосомы или в полимерные наночастицы, обладающие большим потенциалом в качестве носителя лекарств [3].

**Цель** – оценка цитопротекторного действия нативного и микроструктурированного кверцетина в условиях окислительного стресса, инициируемого гидропероксидом трет-бутила (ГТБ).

**Методы исследования.** В работе были использованы коммерческие реактивы, модифицированная среда Игла (DMEM), антибиотики, эмбриональная бычья сыворотка ведущих мировых производителей. Иммуортилизованная клеточная линия кератиноцитов человека HaCaT получена из онкологического исследовательского центра (Гейдельберг, Германия). Микрокристаллы кверцетина (Кв), покрытые оболочками полиаллиламина гидрохлорид/полистиролсульфоната натрия (РАН/PPS)<sub>4</sub> или хитозан/декстрансульфата (СН/DS)<sub>4</sub>, были приготовлены методом послойной сборки. Культивируемые кератиноциты, выращенные в 24-луночных планшетах, подвергали воздействию ГТБ в присутствии нативного или микроструктурированного кверцетина или без такового. Через 24 ч оценивали целостность клеток по выходу лактатдегидрогеназы (ЛДГ).

**Результаты и их обсуждение.** Для инициирования окислительного стресса в кератиноцитах человека непосредственно перед началом эксперимента полную среду в экспериментальных лунках заменяли на среду без сыворотки, содержащую ГТБ в диапазоне концентраций 0,25-2 мМ. В контрольные лунки вносили только среду без сыворотки. Через 24 ч оценивали цитотоксическое действие ГТБ по выходу цитоплазматического фермента лактатдегидрогеназы. Активность ЛДГ измеряли прямым спектрофотометрическим методом в 1 мл фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 30 мкМ пирувата и 30 мкМ НАДН, характеризовали величиной изменения оптической плотности при 340 нм за 1 минуту. Степень повреждения

клеток рассчитывали как процент активности ЛДГ в среде культивирования к сумме активностей ЛДГ в среде и лизатах, полученных путем добавления к адгезированным клеткам 1% раствора тритона X-100.

Установлено, что ГТБ уже в концентрации 0,25 мМ оказывал существенное цитотоксическое действие на кератиноциты, о чем свидетельствует выход более 50% ЛДГ в культуральную среду. При увеличении ГТБ до концентрации 0,5 мМ степень повреждения клеток составляла почти 95% и не увеличивалась при дальнейшем увеличении концентрации ГТБ. В последующих экспериментах исследовались особенности цитопротекторного действия нативного и микроструктурированного кверцетина в условиях окислительного стресса, инициируемого 0,5 мМ ГТБ. Эффективность защитного действия (ЭЗД) оценивали по формуле:

$$\text{ЭЗД} = (\% \text{ ГТБ} - \% \text{ контр}) - (\% \text{ «ГТБ+преп»} - \% \text{ контр}) / (\% \text{ ГТБ} - \% \text{ контр}) * 100\%,$$

где % ГТБ – % повреждения клеток ГТБ;

% контр – % повреждения контрольных клеток;

% «ГТБ+преп» – % повреждения клеток ГТБ в присутствии препаратов.

Установлено, что при совместном добавлении к клеткам ГТБ и исследуемых препаратов ЭЗД микроструктурированных форм кверцетина почти в 2 раза превышала ЭЗД нативного кверцетина и практически не зависела от используемой концентрации. Так, для препаратов в концентрации 50 мкМ ЭЗД была равна: для Кв (РАН/PPS) 4 – 94,3%, для Кв (СН/DS)4 – 82,2%, для Кв – 45,7% (таблицы 1-3).

Таблица 1. – Влияние Кв(РАН/PPS)4 на степень повреждения кератиноцитов через 24 ч инкубации с ГТБ

Условия эксперимента	Выход ЛДГ, %	Значения ЭЗД, %
Контроль	24,2±12,5	-
ГТБ 0,5 мМ	94,6±2,4	-
ГТБ + Кв(РАН/PPS)4, 50 мкМ	28,2±2,2	94,3±5,2
ГТБ + Кв (РАН/PPS)4, 100 мкМ	35,8±13,3	83,5±7,3

Таблица 2. – Влияние Кв(СН/DS)4 на степень повреждения кератиноцитов через 24 ч инкубации с ГТБ

Условия эксперимента	Выход ЛДГ, в %	Значения ЭЗД, в %
Контроль	19,4±1,5	-
ГТБ 0,5 мМ	94,7±4,7	-
ГТБ + Кв(СН/DS)4, 50 мкМ	32,8±4,8	82,2±6,8
ГТБ + Кв(СН/DS)4, 100 мкМ	33,0 ±3,1	81,9±5,6

Таблица 3. – Влияние нативного кверцетина на степень повреждения кератиноцитов через 24 ч инкубации с ГТБ

Условия эксперимента	Выход ЛДГ, %	Значения ЭЗД, %
Контроль	15,3±3,7	-
ГТБ 0,5 мМ	93,7±1,6	-
ГТБ + Кв, 50 мкМ	57,9±2,6	45,7±3,6
ГТБ + Кв, 100 мкМ	53,7±4,1	51,0±4,5

Показано, что преинкубация нативного кверцетина в течение 30 минут, в ходе которой, очевидно, происходит возрастание его внутриклеточной концентрации, увеличивает эффективность его цитопротекторного действия при ГТБ-индуцируемом повреждении клеток почти в два раза: для кверцетина в концентрации 50 мкМ ЭЗД была равна 85% (табл. 4). То есть эффективность защитного действия нативного кверцетина в случае его 30-минутной преинкубации с клетками была такая же, как у микроструктурированных форм кверцетина, добавленных одновременно с ГТБ (0,5 мМ).

Таблица 4. – Влияние преинкубации кверцетина на эффективность его защитного действия при повреждении кератиноцитов ГТБ

Условия эксперимента	Выход ЛДГ через 24 ч инкубации, %	Значения ЭЗД, %
Контроль	25,9±11,3	-
ГТБ 0,5 мМ	86,6±9,3	-
ГТБ + Кв, 50 мкМ	35,0±6,6	85,0±5,6
ГТБ + Кв, 100 мкМ	35,5±8,5	84,2±6,5

**Выводы.** Показано, что микроструктурированный кверцетин более эффективно защищает клетки в условиях окислительного стресса, инициируемого гидропероксидом трет-бутила, чем нативный кверцетин. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что микроструктурированный кверцетин существенно повышает скорость его поступления в клетки.

### Литература

1. Kostyuk V.A., Potapovich A.I., Suhan T.O. et al. Antioxidant and signal modulation properties of plant polyphenols in controlling vascular inflammation // Eur j pharmacol. – 2011. – Vol. 658, № 2-3. – P. 248–256.
2. Potapovich A.I., Kostyuk V.A., Kostyuk T.V., de Luca C., Korkina L.G. Effects of pre- and post-treatment with plant polyphenols on human keratinocyte responses to solar UV // Inflamm Res. – 2013. – Vol. 62. – P. 773–780.
3. Sahu T., Ratre Y.K., Chauhan S., Bhaskar L., Nair M.P., Verma H.K. // J Drug Deliv Sci Technol. – 2021. – Vol. 63. – P. 102487.