

ЛИТЕРАТУРА

1. Wiley, C. D. The metabolic roots of senescence: Mechanisms and opportunities for intervention / C. D. Wiley, J. Campisi // Nat. Metab. – 2021. – Vol. 3. – P. 1290-1301.
2. Finicelli, M. Cellular Senescence in Physiological and Pathological Processes / M. Finicelli, G. Peluso, T. Squillaro // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – Vol. 23. – P. 1-3.
3. Modeling of the Senescence-Associated Phenotype in Human Skin Fibroblasts / M. Gerasymchuk, G. I. Robinson, O. Kovalchuk, I. Kovalchuk // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – Vol. 23. – P. 1-30.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В РАЗРАБОТКЕ НАНОБИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ЖЕЛАТИНА

Потапович А. И.¹, Костюк Т. В.¹, Шутова Т. Г.², Костюк В. А.¹

¹Белорусский государственный университет

²Институт химии новых материалов НАН Беларуси
Минск, Беларусь

Введение. Окислительный стресс играет центральную роль в патогенезе многочисленных заболеваний, вызывая повреждение клеточных мембран, белков и ДНК. Он участвует в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, таких как атеросклероз и гипертония, нейродегенеративных расстройств, включая болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона. Усиливая воспалительные процессы, окислительный стресс усугубляет прогрессирование хронических заболеваний [1]. Перспективные терапевтические стратегии при этих состояниях включают использование антиоксидантов. Растения являются основным источником природных антиоксидантов благодаря высокому содержанию флавоноидов и других полифенолов. Хорошо известно антиоксидантное и противовоспалительное действие полифенолов зеленого чая, кверцетина и ресвератрола. Однако, несмотря на их биологический потенциал, клиническое применение полифенолов ограничено прежде всего их плохой растворимостью в воде, что приводит к низкой биодоступности при пероральном приеме. Для преодоления этих ограничений полифенольные молекулы могут быть включены в нанобиологические системы доставки, такие как липосомы или полимерные наночастицы – платформы, которые эффективно повышают биодоступность и стабильность биоактивных соединений. Среди различных биосовместимых наноносителей биоразлагаемые желатиновые наночастицы особенно перспективны для повышения клеточного поглощения и стабильности кверцетина.

Цель. Оценка перспективности наноструктур на основе желатина, как непокрытых, так и покрытых декстрансульфатом (DS) и сополимером хитозан-декстран (CH-DEX), как средств повышения биодоступности кверцетина.

Методы исследования. Кверцетин был инкапсулирован в наноконтейнеры на основе желатина, образуя наночастицы диаметром (140-180) нм. Были приготовлены две композиции: непокрытые желатиновые наночастицы (NP1) и желатиновые наночастицы, покрытые оболочкой DS и CH-DEX (NP2). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью реагента PrestoBlue™. Апоптотические и некротические популяции клеток идентифицировали с помощью проточной цитометрии, используя набор для окрашивания Annexin V-FITC/PI. Повреждение ДНК оценивали с помощью кометного анализа.

Результаты и их обсуждение. Трет-бутилгидропероксид (tBHP) широко используется в научных исследованиях благодаря своей способности генерировать активные формы кислорода внутри клеток, вызывая тем самым окислительное повреждение биомолекул. В данном исследовании воздействие 0,5 мМ tBHP на кератиноциты человека (клеточная линия HaCaT) привело к повреждению ДНК, обнаруживаемому через 1 ч, что подтверждено методом ДНК-кометного анализа. Флуоресцентные микрофотографии, иллюстрирующие электрофоретические картины ядер, подвергнутых воздействию tBHP, показывают типичные структуры ДНК-комет, характеризующиеся отчетливой головкой (интактная ДНК) и хвостом (поврежденная ДНК). Для количественной оценки генопротекторного действия нативного и наноструктурированного кверцетина мы провели анализ ДНК-комет на кератиноцитах после 1 ч инкубации с 0,5 мМ tBHP в присутствии или отсутствии 50 мкМ исследуемых соединений. Результаты показали, что как нативный кверцетин, так и нагруженные кверцетином желатиновые наночастицы существенно влияли на вид ДНК-комет в клетках, подвергнутых воздействию tBHP. В частности, ядра клеток, обработанных только tBHP, демонстрировали кометы с выраженными, диффузными хвостами, классифицированные как категории «3» или «4» на основе визуальной оценки. В отличие от этого, клетки, обработанные одновременно tBHP и нативным или наноструктурированным кверцетином, демонстрировали кометы с минимальным или полным отсутствием образования хвостов; они были классифицированы как категории «0» или «1». Количественный анализ флуоресцентных микрофотографий показал, что в клетках, подвергнутых воздействию только 0,5 мМ tBHP, почти 75% от общего количества ядерной ДНК локализовалось в хвостах комет. Совместное применение tBHP и нативного или наноструктурированного кверцетина снизило содержание ДНК в хвостах до 18%, что указывает на существенную защиту ДНК от окислительного повреждения.

Для выяснения типа клеточной смерти, вызванной tBHP-инициированным окислительным стрессом, и оценки защитных эффектов нативного и наноструктурированного кверцетина был использован метод двойного флуоресцентного окрашивания (аннексин V-FITC и PI). Аннексин V-FITC избирательно связывается с фосфатидилсерином (PS), который в жизнеспособных клетках обычно локализуется на внутренней стороне

плазматической мембраны и недоступен для красителя. На ранних стадиях апоптоза нарушается асимметрия мембраны, что приводит к экстернализации PS и позволяет связываться с аннексином V-FITC, вызывая зеленую флуоресценцию. В тоже время, некротические и поздние апоптотические клетки демонстрируют нарушение целостности мембраны, что позволяет PI интеркалировать в ядерную ДНК и вызывать красную флуоресценцию. Для оценки интенсивности флуоресценции и количественного определения пропорций жизнеспособных (нормальных), некротических, ранних и поздних апоптотических клеток использовали метод проточной цитометрии. Установлено, что после 4-часовой инкубации с 0,5 мМ tBHP 43% клеточной популяции демонстрировали ранний или поздний апоптоз, некротические клетки составляли около 7%. Добавление кверцетина как в свободной форме, так и в виде NP1 и NP2, полностью нивелировало цитотоксическое действие tBHP. В этом случае распределение клеточных популяций совпадало с их соотношением в контрольном образце: почти 90% нормальных клеток, около 10% ранних и поздних апоптотических клеток, а некротические клетки практически отсутствовали.

Цитопротекторное действие как свободного, так и наноструктурированного кверцетина в диапазоне концентраций 12,5-50 мкМ было также подтверждено после 24 ч инкубации с 0,5 мМ tBHP. Установлено, что в отсутствие исследуемых агентов количество метаболически активных клеток, оцениваемое по их способности восстанавливать резазурин до резорфуина, флуоресцентного индикатора жизнеспособности клеток, уменьшилось почти на 90%. Добавление кверцетина в культуральную среду в сочетании с tBHP существенно снижало развитие окислительного стресса: при концентрации кверцетина 25 мкМ количество жизнеспособных клеток через 24 ч превысило 90%. Цитопротекторная активность кверцетина в условиях tBHP-индуцируемого стресса полностью сохранялась при его использовании в виде непокрытых или модифицированных желатиновых наночастиц.

Выводы. В данном исследовании было показано, что инкапсуляция кверцетина в желатиновые наночастицы позволяет применять его в водных суспензиях без ущерба для антиоксидантной, генопротекторной и цитопротекторной активности. Как свободный, так и инкапсулированный в наночастицы кверцетин одинаково защищал кератиноциты от окислительного повреждения ДНК, некроза и апоптоза в условиях окислительного стресса, вызванного tBHP. Полученные результаты свидетельствуют об эффективном высвобождении кверцетина из желатиновых наночастиц, в том числе из наночастиц, покрытых слоями DS и CH-DEX. Следует отметить, что такая модификация поверхности желатиновых наночастиц может улучшить их устойчивость в желудочно-кишечном тракте и облегчить адресную доставку. В целом, желатиновые наночастицы представляют собой перспективную нанобиологическую систему для повышения биодоступности и терапевтического потенциала фитохимических веществ, способствуя развитию применения нанотехнологий в фармацевтической разработке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sies, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine / H. Sies // Redox Biol. – 2017. – Vol. 4. – P. 180-183.

**ПРИМЕНЕНИЕ ЛАЗЕРНО-ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ
ДЛЯ АНАЛИЗА ОТКЛОНЕНИЙ ПАРАМЕТРОВ МИКРОРЕОЛОГИИ
И МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ КРОВИ ПРИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЯХ**

Приезжев А. В.¹, Луговцов А. Е.¹, Зинчук В. В.², Муравьев А. В.³

¹*Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова,
Москва, Россия*

²*Гродненский государственный медицинский университет,
Гродно, Беларусь*

³*Ярославский государственный педагогический университет
имени К.Д.Ушинского
Ярославль, Россия*

Введение. Состав крови, а также параметры, характеризующие структуру и динамику крови и тканей, окружающих кровеносные микрососуды, являются факторами, определяющими текучесть крови и эффективность транспорта и доставки газов (кислорода и углекислого газа) и питательных веществ по всему объему человеческого организма.

Цель. Демонстрация возможности использования лазерно-оптических методов для диагностики микрореологии и микроциркуляции крови.

Методы исследования. В современных гемореологических исследованиях широко используются лазерные и оптические методы, позволяющие комплексно изучать отклонения от нормы различных параметров, связанных со структурой и динамикой крови, посредством визуализации и измерения. В частности, используются: диффузное рассеяние света, лазерная дифрактометрия, оптические пинцеты, видеокапилляроскопия, спекл-контрастная спектроскопия, двухфотонная томография и флуоресцентная визуализация.

Первые три метода используются для измерений *in vitro* с использованием свежих образцов крови, взятых у здоровых доноров или пациентов, страдающих различными заболеваниями, такими как диабет и гипертония. Последние четыре метода используются для измерений и визуализации *in vivo*. Кроме того, параметры, связанные с агрегацией эритроцитов, измеряются в модельных растворах определенных белков плазмы, известных как агонисты или ингибиторы агрегации, для изучения механизмов агрегации.