

КАЛОЇДНАЯ ХІМІЯ
COLLOIDAL CHEMISTRY

УДК 544.77:[577.112.826+547.814.5]:[541.515+615.27]
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2024-60-4-300-313>

Поступила в редакцию 22.11.2023
Received 22.11.2023

Т. Г. Шутова¹, А. И. Потапович², Т. В. Костюк², К. С. Ливонович¹, В. А. Костюк²

¹*Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь*
²*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

**ПОЛУЧЕНИЕ, МОРФОЛОГИЯ, АНТИРАДИКАЛЬНАЯ
И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КВЕРЦЕТИН-СОДЕРЖАЩИХ
НАНОЧАСТИЦ ЗЕИНА И ИХ СУБМИКРОННЫХ АГРЕГАТОВ**

Аннотация. Наночастицы проламинового белка кукурузы зеина (NPQ), содержащие 0,005–0,26 г/г кверцетина (Q), получены десольватацией 25–30 мг/мл растворов белка в этаноле, содержащих капсулируемое соединение, водным раствором полистиролсульфоната. Размеры наночастиц зеина и их агрегатов охарактеризованы методами динамического светорассеяния и атомно-силовой микроскопии, содержание кверцетина – методом Фолина–Чокальтеу. При отношении кверцетин/зеин в растворе менее 0,08 г/г полифенол количественно включается в наночастицы, а их гидродинамический диаметр равен 60–75 нм. С увеличением отношения кверцетин/зеин до 0,20 г/г средний диаметр частиц возрастает до 150 нм. В концентрированных дисперсиях образуются агрегаты диаметром порядка 500–600 нм. Изучена кинетика высвобождения кверцетина из NPQ с различной массовой долей Q в дистиллированной воде и растворах, имитирующих среду желудка и кишечника, при 37 °С. Наночастицы зеина проявляют слабую активность в реакции с катион-радикалами АБТС. Инкапсулированный в матрицу зеина Q в целом сохраняет антирадикальную активность, характерную для свободного флавоноида, однако скорость обесцвечивания катион-радикалов АБТС замедляется из-за пролонгированного высвобождения кверцетина из NPQ. Цитопротекторные свойства кверцетина в наночастицах зеина существенно снижаются и проявляются в частичном сохранении целостности клеточных мембран и уменьшении выхода лактатдегидрогеназы из УФ-С-облученных клеток HaCaT. В отличие от свободного кверцетина введение Q в наночастицах зеина или их субмикронных агрегатов увеличивает количество метаболически мертвых УФ-С-облученных клеток HaCaT, усиливая цитотоксическое действие УФ-излучения. Аналогичным эффектом обладают пустые зеиновые агрегаты субмикронных размеров.

Ключевые слова: зеин, кверцетин, наночастицы, антирадикальная активность, цитотоксичность, цитопротекторные свойства

Для цитирования. Получение, морфология, антирадикальная и биологическая активность кверцетин-содержащих наночастиц зеина и их субмикронных агрегатов / Т. Г. Шутова [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук. – 2024. – Т. 60, № 4. – С. 300–313. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2024-60-4-300-313>

T. G. Shutava¹, A. I. Potapovich², T. V. Kostyuk², K. S. Livanovich¹, V. A. Kostyuk²

¹*Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*
²*Belarusian State University, Minsk, Belarus*

**PREPARATION, MORPHOLOGY, ANTIRADICAL AND BIOLOGICAL ACTIVITY
OF QUERCETIN-CONTAINING NANOPARTICLES OF ZEIN
AND THEIR SUBMICRON AGGREGATES**

Abstract. Nanoparticles of corn prolamine protein zein (NPQ) containing 0.005–0.26 g/g quercetin (Q) were prepared by desolvation of a 25–30 mg/mL ethanol protein solution containing the encapsulated compound with an aqueous polystyrene sulfonate. The size of zein nanoparticles and their aggregates was characterized by dynamic light scattering and atomic force microscopy; the quercetin content – by the Folin-Ciocalteu assay. While the quercetin/zein ratio in solution is less than 0.08 g/g, the polyphenol is quantitatively included in the nanoparticles, and their hydrodynamic diameter is 60–75 nm. As the quercetin/zein ratio rises to 0.20 g/g, the average particle diameter increases to 150 nm. In concentrated dispersions, aggregates with a diameter of 500–600 nm are formed. The kinetics of quercetin release from NPQ with different mass fractions of Q in distilled water and solutions simulating the environment of the stomach and intestines at 37 °C were studied.

Zein nanoparticles exhibit weak activity in the reaction with ABTS cation-radicals. Quercetin encapsulated in the zein matrix generally retains the antiradical activity characteristic of the free flavonoid, however, the rate of decolorization of ABTS cation-radicals decreases due to the prolonged release of quercetin from NPQ. The cytoprotective properties of quercetin in zein nanoparticles are significantly reduced and manifest themselves only in partial preservation of the integrity of cell membranes and a decrease in the release of lactate dehydrogenase from UV-C irradiated HaCaT cells. In contrast to free quercetin, the introduction of Q in zein nanoparticles or their submicron aggregates increases the number of metabolically dead UV-C-irradiated HaCaT cells, enhancing the cytotoxic effect of UV radiation. Empty zein aggregates of submicron size have a similar effect.

Keywords: zein, quercetin, nanoparticles, antiradical activity, cytotoxicity, cytoprotective properties

For citation. Shutava T. G., Potapovich A. I., Kostyuk T. V., Livanovich K. S., Kostyuk V. A. Preparation, morphology, antiradical and biological activity of quercetin-containing nanoparticles of zein and their submicron aggregates. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2024, vol. 60, no. 4, pp. 300–313 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2024-60-4-300-313>

Введение. Флавоноидные и нефлавоноидные полифенолы обладают широким спектром биологической активности [1]. Большинство исследователей сходятся во мнении, что полифенолы растительного происхождения, проявляя низкую собственную цитотоксичность, способны уменьшать потерю жизнеспособности клеток в присутствии агентов, вызывающих оксидативные повреждения, например, доксорубин или перекиси водорода [2, 3]. Для ряда полифенолов (кверцетин (Q), акацетин, силибин, байкалеин, леонтоподиевая кислота, цианидин хлорид, таксифолин, феруловая кислота) также было показано наличие цитопротекторной активности при их добавлении сразу после воздействия ультрафиолетового излучения коротковолнового диапазона на кератиноциты линии HaCaT [4].

Эффективность действия полифенолов в значительной степени определяется их биодоступностью, которая существенно зависит от формы, в которой они вводятся в организм, например через сложную матрицу или в виде очищенных изолятов, и совокупности факторов, включающих структуру, заряд поверхности и размеры частиц, природу капсулирующей матрицы, ее чувствительность к среде и температуре и т. д. [1, 5]. Ранее в модели репарации УФ-С-повреждений кератиноцитов была показана высокая эффективность покрытых мультислойной полиэлектролитной оболочкой микрокристаллов кверцетина, свойства которых сравнимы со свободным кверцетином [6], однако влияние наночастиц, в которых Q заключен в полимерную матрицу, а также степень их агрегирования не исследовались.

Благодаря высокой биосовместимости и биоразлагаемости основной проламиновый белок кукурузы зеин используется в качестве матрицы, обеспечивающей пролонгированное высвобождение ферментов, лекарств и эфирных масел [7–9]. Гидрофобность входящих в структуру зеина аминокислот приводит к малой растворимости белка в воде; его легко преобразовать в сферические частицы. Несмотря на эффективность методов получения субмикронных частиц зеина, они обладают низкой коллоидной устойчивостью, образуя агрегаты и осадки в препаратах при pH выше 5 и в растворах солей [10]. Стабильность суспензий зеина улучшают добавлением эмульгаторов, чаще всего биополимеров, таких как казеин [11, 12], хитозан [11], пектин [13], декстран сульфат [14], низкомолекулярная гиалуроновая кислота [15]. В зеиновые наночастицы были инкапсулированы гидрофобные полифенольные соединения (куркумин [16], кверцетин [3, 11, 12, 17, 18], ресвератрол [15, 19]), гликозиды (гиперозид [13], рутин [20]), лекарственные соединения (паклитаксел [21], ловастатин [22], кетоконазол [23]), эфирные масла растений или индивидуальные компоненты масел (гераниол и R-цитронелаль [24]).

Цель работы – оптимизация методики получения наночастиц зеина, содержащих биологически активный ингредиент кверцетин, оценка их физико-химических свойств и антиоксидантной активности, кинетики высвобождения кверцетина в биологически релевантных средах, а также действия наночастиц и их агрегатов на жизнеспособность и целостность клеток в модельной системе УФ-С-облученных кератиноцитов человека линии HaCaT.

Экспериментальная часть. Материалы. В работе использованы кверцетин (Q, Sigma-Aldrich), полистиролсульфонат натрия (ПСС, 70 кДа, Sigma-Aldrich), полиэтиленимин (ПЭИ, 50 кДа, Fluka), диаммониевая соль 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) (АБТС, Sigma), персульфат калия (Sigma), додецилсульфат натрия (ДДС, «ч.», НП ООО «Беллесхимкомплект»),

этанол, фосфатный солевой буфер (ФБС, pH 7,4, Sigma-Aldrich), изотонический фосфатный буфер (ИФБ, pH 7,4, Lonza), соляная кислота («ч. д. а.», НТПК «Анализ-Х»), хлорид натрия («х. ч.», ОАО «Белреахим»).

Методика получения наночастиц зеина. Зеин получали по модифицированной методике [7] из размолта зерен кукурузы (100 г) двукратной экстракцией 70 % этанолом (150 мл) в течение 2 ч при температуре 23 °С. Нерастворимую в 50 % этаноле фракцию отделяли, а затем дважды растворяли в 95 % этаноле, отбрасывая нерастворимый осадок и испаряя растворитель при 60 °С.

Наночастицы зеина, стабилизированные ПСС (NP), получали методом десольватации, добавляя по каплям 9 мл водного раствора ПСС с концентрацией 2,5 мг/мл к 3 мл раствора белка с концентрацией 25 мг/мл в 95 % этаноле. Для получения наночастиц, содержащих кверцетин (NPQ), навеску Q растворяли в растворе зеина перед приготовлением частиц. Наночастицы отмывали от этилового спирта и избытка полиэлектролита центрифугированием. Массовую долю кверцетина в NPQ (ω_Q) рассчитывали как отношение концентрации Q, определенное методом Фолина–Чокальтеу [25], и концентрации NPQ в пересчете на сухой вес.

Спектры ИК с Фурье-преобразованием высушенных образцов записывали на приборе Tensor 27 (Bruker, США) в таблетках KBr. Исследование среднечислового гидродинамического диаметра (d_N) и индекса полидисперсности (PDI) наночастиц проводили с помощью анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания) в дистиллированной воде. Морфологию наночастиц NPQ, осажденных на поверхность кремния и полиэлектролитных пленок (ПЭИ/ПСС)₂/ПЭИ и (ПЭИ/ПСС)₃, после высушивания анализировали на сканирующем зондовом микроскопе MultiMode NANOSCOPE IIIa (Veeco, США). Измерение оптической плотности растворов при заданной длине волны в видимой области спектра проводили на спектрофлуориметре Solar 2203M (Беларусь).

Высвобождение кверцетина из наночастиц исследовали в дистиллированной воде, 0,1 н. растворе соляной кислоты в 0,2 % NaCl и фосфатном солевом буфере, pH 7,4 без добавок и с добавлением 2,5 мг/мл ДДС. Исследуемый образец NPQ с $\omega_Q = 0,21$ г/г разбавляли водой до концентрации 10,0 мг/мл, в 5 мл исследуемой среды добавляли 0,2 мл суспензии и выдерживали при 37 °С, отбирая 0,5 мл через заданные промежутки времени для анализа. Частицы отделяли центрифугированием, содержание кверцетина в супернатанте анализировали методом Фолина–Чокальтеу [25].

Методика оценки антирадикальных свойств наночастиц. Антирадикальные свойства наночастиц зеин/ПСС оценивали с использованием катион-радикалов 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) (АБТС⁺). Сток-раствор АБТС⁺ готовили согласно [26]. 88 мкл 0,14 М раствора K₂S₂O₈ добавляли к 5 мл $7 \cdot 10^{-3}$ М водного раствора АБТС и оставляли на ночь при комнатной температуре. Полученный раствор интенсивного зеленого цвета разбавляли дистиллированной водой (pH 6,5) непосредственно перед использованием таким образом, чтобы его оптическая плотность при 734 нм (A_0) была равна $1,32 \pm 0,02$ ($l = 1,0$ см). Концентрацию АБТС⁺ в растворе рассчитывали с использованием экспериментально полученного коэффициента экстинкции $\epsilon = 1,5 \cdot 10^4$ М⁻¹ см⁻¹. Разница A_0 в разных сериях не превышала $\pm 0,02$. Аликвоту исследуемой дисперсии NP или NPQ объемом 10–100 мкл добавляли к 2 мл раствора АБТС⁺ с оптической плотностью A_0 и тщательно перемешивали. Кинетику обесцвечивания АБТС⁺ изучали по изменению оптической плотности раствора при 734 нм (A_0) в течение 60 мин с интервалом 1 мин в автоматическом режиме.

Исследование влияния наночастиц на жизнеспособность и целостность клеток, подвергнутых воздействию УФ-С-излучения. Наночастицы зеина получали из раствора белка с концентрацией 30,5 мг/мл в 95 % этаноле, содержащем 2,5 мг/мл кверцетина, и отделяли последовательным центрифугированием дисперсии при 5 000 и 6 500 мин⁻¹ полученные фракции NPQ-1 и NPQ-2 соответственно. Аналогично были получены дисперсии частиц NP-1 и NP-2, не содержащие кверцетин.

В качестве объекта исследования использовали культивируемые кератиноциты человека линии HaCaT (Deutsches Krebsforschungszentrum, Гейдельберг, Германия), выращенные в ростовой

среде Игла (модификация Дульбекко (ДМЕМ) (Lonza, Бельгия)) с 10 % эмбриональной сывороткой (Gibco, США). Для УФ-С-облучения клеток использовали бактерицидную лампу G30W Sylvania (Feilo Sylvania, Германия), 95 % излучения которой является УФ-С с длиной волны 253,7 нм. Лампа располагалась на расстоянии 10 см от планшета с клетками, обеспечивая дозу облучения 0,015 Дж/см² при интенсивности облучения 1,0 мВт/см².

Изучение влияния наночастиц зеина, содержащих кверцетин, на жизнеспособность культивируемых клеток после УФ-С-облучения проводили в 96-луночных планшетах. Перед облучением среду ДМЕМ заменяли на ИФБ. Сразу после облучения ИФБ заменяли на ДМЕМ без сыворотки, содержащую исследуемые наночастицы NP и NPQ. Концентрацию NP рассчитывали таким образом, чтобы она совпадала с концентрацией NPQ в пересчете на сухой вес. Через 20 ч определяли жизнеспособность клеток с помощью реагента PrestoBlue™ (Introvigen, США) согласно инструкции. Величину флуоресценции измеряли после инкубации в течение 1,5–2,0 ч при 37 °С, используя фильтр Ex (560 ± 25) нм, Em (590 ± 10) нм (флуоресцентный спектрофотометр Cary Eclipse, Австралия). Усредненную интенсивность флуоресценции лунок, содержащих контрольные клетки, принимали за 100 %.

Целостность клеток оценивали по выходу в культуральную среду лактатдегидрогеназы (ЛДГ). В этих экспериментах клетки выращивали в 24-луночных планшетах. Активность ЛДГ измеряли прямым спектрофотометрическим методом в 1 мл фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 30 мкмоль/л пирувата и 30 мкмоль/л НАДН. Процент высвобождения ЛДГ рассчитывали путем деления активности ЛДГ в среде на активность ЛДГ в среде + активность ЛДГ в лизатах прикрепленных клеток.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 показаны типичные изображения наночастиц зеина, содержащих кверцетин, полученные методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). Диаметр наночастиц NPQ-2 на поверхности полиэлектролитных пленок (ПЭИ/ПСС)₂/ПЭИ и (ПЭИ/ПСС)₃ варьируется от 70 до 120 нм, на изображении хорошо визуализируются индивидуальные наночастицы (рис. 1, *a, b*). В то же время на гидрофильной поверхности кремния в результате слипания нескольких наночастиц при высушивании характерно образование крупных гидрофобных агрегатов. Латеральные размеры агрегатов могут достигать 500 нм (рис. 1, *c*).

В ИК-спектре зеина (рис. 2) присутствуют характеристические полосы белков с максимумами при 3 425 см⁻¹ (амид А, колебания N–H- и O–H-связей аминокислот), 1 641 см⁻¹ (амид I, растяжение карбонильной (C=O) группы амида), 1 551 см⁻¹ (амид II, колебания C–N-связи и деформационные колебания N–H). Слабая полоса при 1 250 см⁻¹ относится к изгибающим колебаниям связи N–H в плоскости в сочетании с растяжением C–N-связи, а также включает деформационные колебания C–H и N–H [9, 27]. Полоса при 1 450 см⁻¹ может быть отнесена к изгибающим колебаниям CH₃ групп [28].

Структура полос в ИК-спектрах наночастиц изменяется, что связано с адсорбцией ПСС на поверхности и включением полиэлектролита в материал частиц. В области 1 440–1 600

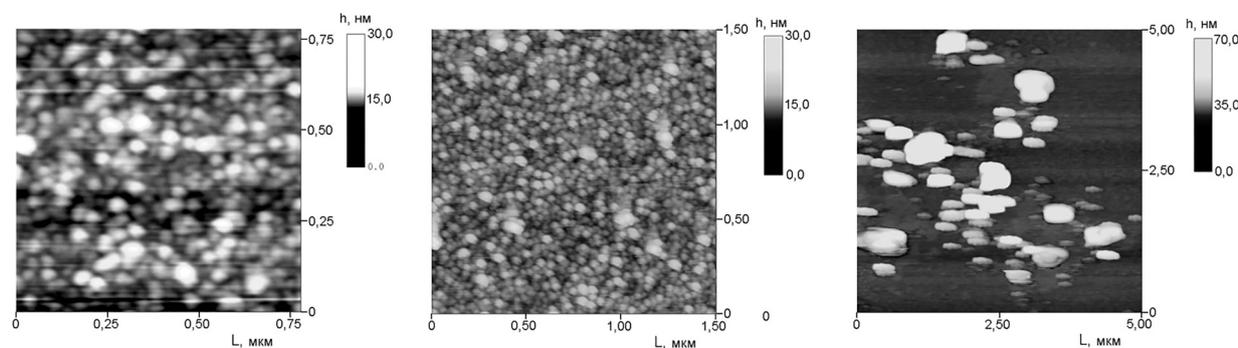


Рис. 1. АСМ-изображения наночастиц NPQ-2, содержащих 0,21 г/г кверцетина, на поверхности полиэлектролитных пленок (ПЭИ/ПСС)₂/ПЭИ (*a*), (ПЭИ/ПСС)₃ (*b*), агрегатов на поверхности кремния (*c*)

Fig. 1. AFM images of NPQ-2 nanoparticles containing 0.21 g/g of quercetin on the surface of polyelectrolyte films (PEI/PSS)₂/PEI (*a*), (PEI/PSS)₃ (*b*), aggregates on the silicon surface (*c*)

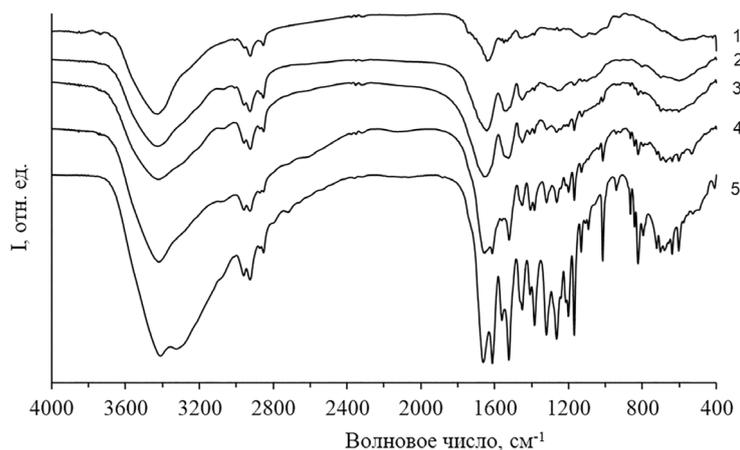


Рис. 2. ИК-спектры зеина (I) и наночастиц NPQ (ω_Q , г/г: 2 – 0; 3 – 0,06; 4 – 0,21; 5 – 0,42)
 Fig. 2. IR spectra of zein (I) and NPQ nanoparticles (ω_Q , g/g: 2 – 0; 3 – 0.06; 4 – 0.21; 5 – 0.42)

и $1\ 050\text{--}1\ 380\text{ см}^{-1}$ проявляются валентные колебания бензольного кольца и плоскостные деформационные колебаниями С–Н-связей кольца и сульфогрупп в ПСС соответственно [29]. В спектре NP возрастает интенсивность полосы амида II, максимум которой смещается к $1\ 547\text{ см}^{-1}$. Положение максимумов полос амида A ($3\ 425\text{ см}^{-1}$) и амида I ($1\ 643\text{ см}^{-1}$) в спектре наночастиц NP существенно не изменяется по сравнению с зеином, но полосы уширяются со стороны меньших и больших волновых чисел соответственно, что может быть вызвано связыванием части аминокетильных групп зеина с ПСС.

ИК-спектры наночастиц NPQ содержат характерные для кверцетина группы пиков [30]. Интенсивность полос увеличивается с ростом ω_Q . Полосы поглощения кверцетина в спектрах наночастиц с низкой массовой долей Q маскируются более интенсивными пиками зеина и ПСС, при этом небольшие сдвиги полос, ассоциируемых с колебаниями амидной группы ($3\ 425\text{ см}^{-1} \rightarrow 3\ 419\text{ см}^{-1}$, $1\ 643\text{ см}^{-1} \rightarrow 1\ 658\text{ см}^{-1}$), указывают на образование комплекса между кверцетином и зеином [17].

При постепенном добавлении водного раствора полиэлектролита к раствору зеина в этаноле обеспечиваются условия, в которых изменяются свойства растворителя и увеличивается концентрация полимерного стабилизатора, то есть одновременно происходит формирование наночастиц зеина в результате изменения свойств среды и их стабилизация адсорбированным слоем заряженного полимера. Средний диаметр частиц в разбавленных дисперсиях NP составляет около 142 нм, однако при их концентрировании до 10 мг/мл, несмотря на присутствие слоя ПСС, происходит частичная агрегация частиц, связанная с низкой массовой долей ПСС в материале. Добавление даже небольших количеств кверцетина в раствор зеина приводит к существенному уменьшению размеров наночастиц, формирующихся при десольватации комплексов зеин/кверцетин (рис. 3).

Наночастицы NPQ, полученные из растворов с массовым отношением кверцетина и зеина менее 0,08 г/г, имеют среднечисловой гидродинамический диаметр 60–75 нм и узкое распределение по размерам (индекс полидисперсности менее 0,4). При увеличении отношения кверцетин/зеин до 0,1 г/г среднечисловой диаметр наночастиц возрастает до 90–130 нм и появляется небольшая фракция субмикронных частиц с диаметром около 600 нм. Кверцетин характеризуется как неспецифический сшивающий агент, склонный в водных растворах к формированию аморфных агрегатов диаметром до 1 мкм [31], а в некоторых случаях кристаллизующийся в виде отдельной фазы (например, при соосаждении кверцетина с зеином при их соотношении более 0,04 г/г в водном растворе казеината натрия [18]).

Средний диаметр частиц зеина, полученных без добавок ПСС, достигает 2,5 мкм, причем добавление ПСС в реакционную смесь после получения частиц не влияет на их размер и не улучшает седиментативную устойчивость. Наночастицы зеин/кверцетин с оболочкой ПСС сохраняют агрегативную устойчивость до 30 дней.

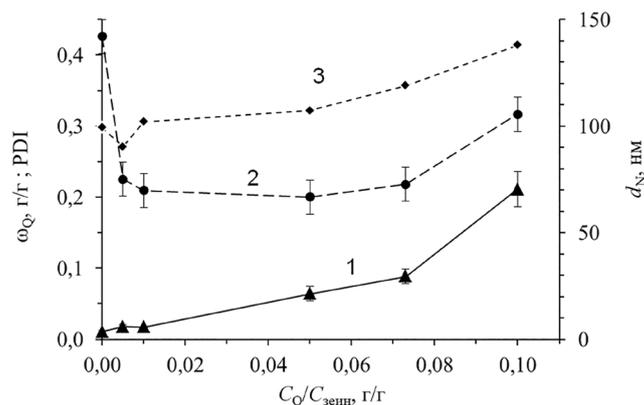


Рис. 3. Зависимость массовой доли кверцетина (1), гидродинамического диаметра (2) и индекса полидисперсности (3) наночастиц NPQ от соотношения концентраций кверцетина и зеина в спиртовом растворе. $C_{zein} = 25$ мг/мл, $C_{ПСС} = 2,5$ мг/мл

Fig. 3. Dependence of quercetin mass fraction (1), hydrodynamic diameter (2), and polydispersity index (3) of NPQ nanoparticles on the ratio of quercetin and zein concentrations in ethanol solution. $C_{zein} = 25$ mg/mL, $C_{PSS} = 2.5$ mg/mL

Содержание кверцетина в наночастицах NPQ контролируется путем изменения отношения кверцетин/зеин в спиртовом растворе. Определенная экспериментально массовая доля Q в наночастицах, полученных из растворов с отношением кверцетина и зеина менее 0,08 г/г, совпадает с рассчитанной (рис. 3), что соответствует эффективности включения кверцетина близкой к 100 %. В [11, 12] показано, что эффективность включения кверцетина в наночастицы зеина достигает 100 % в тех случаях, когда отношение кверцетин/зеин не превышает 0,05 г/г и снижается до 75 % при 0,10–0,15 г/г.

При увеличении концентрации кверцетина в растворе зеина до 2,5 мг/мл (отношение кверцетин/зеин 0,1 г/г), что близко к растворимости Q в этиловом спирте, ω_Q в материале наночастиц выше теоретической приблизительно в 2 раза. Это может быть связано с ассоциацией нескольких молекул кверцетина [31] и последующим связыванием ассоциатов Q_n с пролиновыми основаниями зеина аналогично [32]. Комплексы ассоциатов Q_n с зеином, по-видимому, более плотные и легче отделяются в процессе центрифугирования, в то время как менее плотные наночастицы с меньшей массовой долей кверцетина остаются в супернатанте и затем отбрасываются в процессе отмывки NPQ от спирта и неадсорбированного ПСС. Метод десольватации зеина с кверцетином водным раствором полиэлектролита, применяемый в данной работе для получения наночастиц, позволяет избежать потерь кверцетина и использовать минимальное количество ПСС в оболочке наночастиц, что выгодно отличает его от быстрой замены растворителя с последующей стабилизацией частиц избытком полимера [11, 12, 18].

Кривые высвобождения кверцетина из NPQ с $\omega_Q = 0,21$ г/г в дистиллированной воде и растворах, имитирующих среду желудка и кишечника, при 37 °C приведены на рис. 4. В воде и ФСБ в течение 10–30 мин наблюдается быстрое накопление кверцетина в растворе, а затем высвобождение Q из наночастиц в раствор замедляется, но не прекращается, по крайней мере, еще в течение 4,5 ч. Высвобождение кверцетина в воде и ФСБ не превышает 4,5 % за 5 ч и увеличивается в присутствии додецилсульфата натрия до 10 % в воде и до 15 % в ФБС, pH 7,4. Кажущееся уменьшение высвобождения кверцетина со временем в дистиллированной воде, по-видимому, связано с его окислением [33]. Снижение концентрации кверцетина с увеличением времени выражено сильнее для NPQ, в которых ω_Q меньше 0,08 г/г, и наблюдается во всех исследованных средах. При отсутствии и в присутствии ДДС за 30 мин достигается максимум в 25 % (45 % в ФБС) и 50 % (90 % в ФБС), а затем концентрация кверцетина быстро снижается. В 0,2 % NaCl в 0,1 н. HCl начальный период быстрого высвобождения кверцетина из NPQ с $\omega_Q = 0,21$ г/г достигает 2 ч, хотя процентное отношение высвобожденного за этот период Q к его общему содержанию в частицах мало отличается от других сред.

Из анализа кинетики высвобождения кверцетина в различных средах можно предположить, что на начальных этапах процесса происходит высвобождение молекул Q, захваченных зеиновой

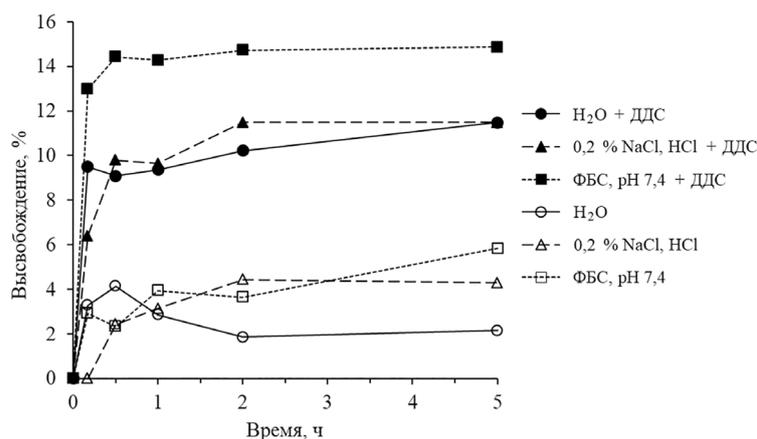


Рис. 4. Кривые высвобождения кверцетина из наночастиц NPQ. $\omega_Q = 0,21$ г/г, $C_{NPQ} = 0,40$ мг/мл, $T = 37$ °C

Fig. 4. Release curves of quercetin from NPQ nanoparticles. $\omega_Q = 0.21$ g/g, $C_{NPQ} = 0.40$ mg/mL, $T = 37$ °C

матрицей, но не связанных с ней водородными связями или ван-дер-ваальсовыми силами. Диффузия таких молекул кверцетина не ограничена; они быстро высвобождаются в нейтральной и слабощелочной средах из-за более высокой растворимости анионной формы ($pK_{3-OH} = 6,5-6,6$ [34]). Кроме того, при pH более 7 резко повышается растворимость зеина [35, 36], что способствует быстрому высвобождению кверцетина в результате деградации капсулирующей матрицы. В кислой среде молекулы кверцетина протонированы [34] и, по-видимому, связаны с матрицей зеина, а растворимость самого зеина невелика, поэтому высвобождение в раствор при кислых pH замедляется.

При добавлении наночастиц зеина в раствор АБТС⁺ оптическая плотность при 734 нм резко увеличивается (рис. 5, а), что связано с рассеянием света наночастицами в широком диапазоне длин волн. Для реакции катион-радикалов АБТС⁺ с наночастицами NP характерно отсутствие начального участка резкого уменьшения A и медленное обесцвечивание раствора в течение нескольких часов. В то же время для кверцетина на кинетических кривых обесцвечивания АБТС⁺ наблюдаются два последовательных периода, типичных для реакции полифенолов с АБТС⁺: быстрое уменьшение A в течение 1–2 мин и медленное обесцвечивание раствора (рис. 5, б). С кверцетином за 6 мин реагирует $(1,3 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$ моль АБТС⁺/мг, а за 60 мин эта величина достигает $(2,2 \pm 0,6) \cdot 10^{-5}$ моль/мг. За 60 мин с наночастицами зеина, не содержащими кверцетин, реагирует $(8,5 \pm 1,0) \cdot 10^{-8}$ моль АБТС⁺/мг, то есть NP проявляют слабую антиоксидантную активность.

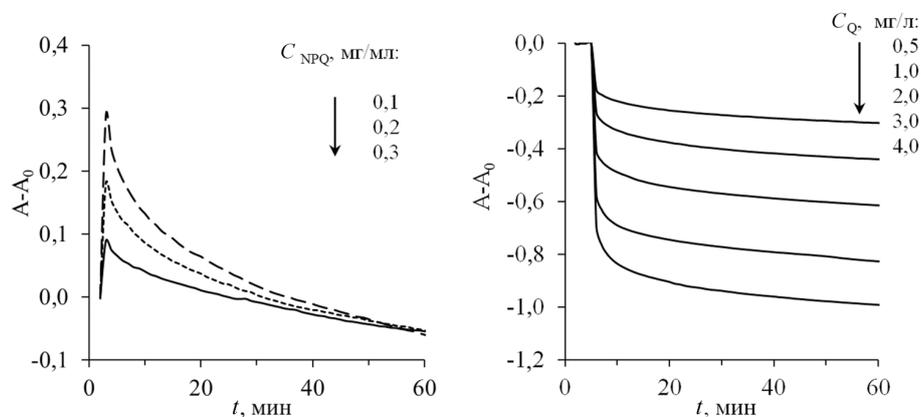


Рис. 5. Изменение A растворов АБТС⁺ в присутствии наночастиц зеина (а) и кверцетина (б).

$$C_{ABTS^+} = 8,7 \cdot 10^{-5} \text{ М}, T = 20 \text{ °C}, \lambda = 734 \text{ нм}$$

Fig. 5. Changes of A of ABTS⁺ solutions in the presence of zein nanoparticles (а) and quercetin (б).

$$C_{ABTS^+} = 8,7 \cdot 10^{-5} \text{ М}, T = 20 \text{ °C}, \lambda = 734 \text{ нм}$$

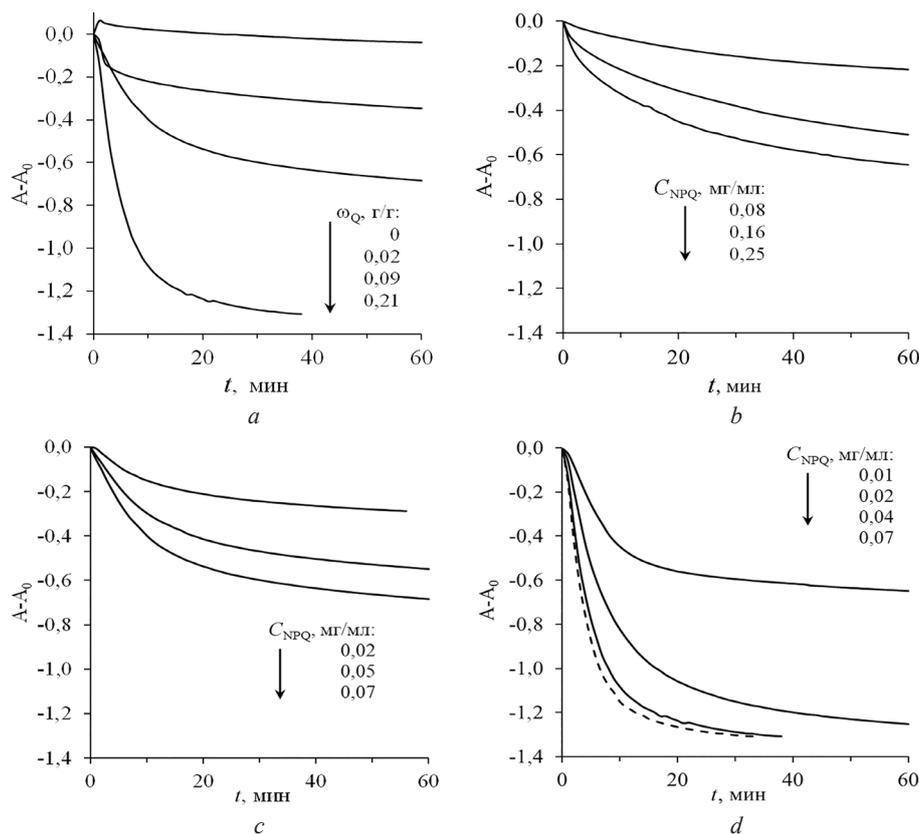


Рис. 6. Кинетические кривые обесцвечивания растворов АБТС⁺• наночастицами NPQ с различной массовой долей кверцетина ω_Q (a, C_{NPQ} = 0,07 мг/мл) и концентрацией C_{NPQ} (ω_Q, г/г: b – 0,02, c – 0,09, d – 0,21). C⁰_{АБТС⁺•} = 8,7 · 10⁻⁵ М, T = 20 °С

Fig. 6. Kinetic curves of discoloration of ABTS⁺• solutions by NPQ nanoparticles of different quercetin mass fraction ω_Q (a, C_{NPQ} = 0.07 mg/mL) and nanoparticle concentration C_{NPQ} (ω_Q, g/g: b – 0.02, c – 0.09, d – 0.21). C⁰_{ABTS⁺•} = 8.7 · 10⁻⁵ M, T = 20 °C

На кривых взаимодействия наночастиц NPQ с АБТС⁺• с увеличением ω_Q становится более заметным наличие участка быстрого обесцвечивания катион-радикала, однако его длительность достигает 20 мин, что связано с медленным высвобождением Q из наночастиц (рис. 6). В пересчете на кверцетин с наночастицами за 60 мин реагирует (1,0–1,5) · 10⁻⁵ моль АБТС⁺•/мг, что составляет 45–70 % активности свободного Q.

Наночастицы NP и NPQ, использованные в экспериментах с клетками *in vitro*, характеризуются высоким значением индекса полидисперсности (таблица), что связано с их агрегированием в концентрированных дисперсиях. Во всех дисперсиях, содержащих кверцетин, преобладает фракция с диаметром около 150 нм, при этом в NPQ-1 доля агрегатов составляет 30 % от общего числа частиц. В NP-1 степень агрегирования частиц максимальна.

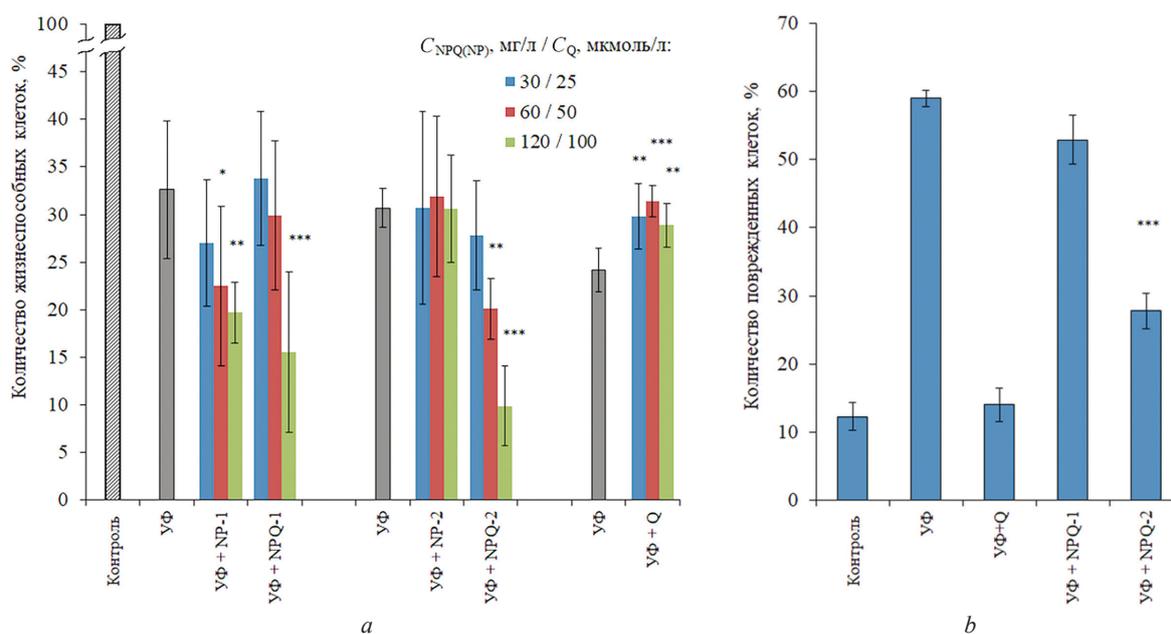
Характеристики частиц NP и NPQ, протестированных в модельной системе УФ-С-индуцированного повреждения кератиноцитов человека линии HaCaT

Characteristics of NP and NPQ particles tested in the model system of UV-C-induced damage to human keratinocytes of the HaCaT line

Наночастицы	d_N , нм (% от числа частиц)	PDI	ω _Q , г/г
NPQ-1	155 ± 44 (60 %) 576 ± 92 (30 %)	0,627 ± 0,146	0,26 ± 0,04
NPQ-2	150 ± 35 (99 %) 150-1000 (~ 1 %)	0,479 ± 0,119	0,21 ± 0,04
NP-1	639 ± 214 (100 %)	0,779 ± 0,138	–
NP-2	142 ± 8 (100 %)	0,298 ± 0,01	–

В модельной системе УФ-С-индуцированного повреждения кератиноцитов человека линии HaCaT только агрегированные не содержащие кверцетин частицы NP-1 дозозависимо усиливают цитотоксическое действие ультрафиолета (снижают количество жизнеспособных клеток через 24 ч после облучения) в диапазоне концентрации 30–120 мкг/мл (рис. 7, *a*). Влияния наночастиц NP-2, имеющих диаметр 140 нм, на цитотоксическое действие ультрафиолета в отношении клеток HaCaT не обнаружено вплоть до концентрации 120 мкг/мл, что хорошо согласуется с литературными данными о низкой цитотоксичности наноразмерного зеина. В работе [20] показано, что наночастицы зеина с диаметром 100–140 нм, стабилизированные дезоксихоловой кислотой или Poloxamer 188, цитотоксичны по отношению к клеткам хондроцитов и кератиноцитов человека C-28 и NCTC2544 в концентрации, превышающей 50 мкг/мл в пересчете на протеин, причем жизнеспособность клеток зависит от времени инкубации. Снижение выживаемости HaCaT клеток происходило при концентрации наночастиц зеин/лецитин (220 нм), превышающей 100 мкг/мл [23]. На двух разных клеточных линиях (NIH-3T3 (мышинные фибробласты) и V79-4 (клетки фибробластов, полученные из легочной ткани мыши)) показано, что выживаемость клеток остается на уровне 90 и 60 % соответственно, при инкубации с наночастицами зеина с диаметром 205–210 нм во всем исследованном диапазоне концентраций (50–1 800 мкг/мл) [24]. Цитотоксичность крупных частиц NP-1 по отношению к УФ-поврежденным клеткам HaCaT может быть связана с нерегулярной формой агрегатов, индуцирующих разрыв лизосомальной мембраны, и активацией дальнейших превращений, приводящих к апоптозу клеток [37–39].

При исследовании в модельной системе УФ-С-индуцированного повреждения кератиноцитов эффектов зеиновых наночастиц, содержащих кверцетин, установлено, что включение кверцетина в наибольшей степени повлияло на свойства частиц со средним диаметром 140 нм. Нано-



* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,005$; *** – $p < 0,0001$ versus УФ-облучение
* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,005$; *** – $p < 0,0001$ versus UV-irradiation

Рис. 7. Биологическая активность наночастиц: *a* – количество жизнеспособных клеток (PrestoBlueTM Reagent) через 24 ч после УФ-С (0,015 Дж/см²) без и при инкубации с наночастицами NP и NPQ, добавленными сразу после облучения (концентрации NPQ (NP) в пересчете на сухой вес и кверцетин указаны на рисунке); *b* – степень повреждения клеток в процентах (по выходу ЛДГ) через 24 ч после УФ-С-облучения без и при совместной инкубации с наночастицами NPQ (50 мкмоль/л по кверцетину)

Fig. 7. Biological activity of nanoparticles: *a* – percentage of viable cells (PrestoBlueTM Reagent) 24 h after UV-C irradiation (0.015 J/cm²) without and with incubation with NP and NPQ nanoparticles added immediately after the irradiation (the concentrations of NPQ (NP) in terms of dry matter and quercetin are shown); *b* – percentage of damaged cells (by LDH release) 24 h after UV-C irradiation without and with incubation with NPQ nanoparticles (50 µmol/L on quercetin)

частицы NPQ-2 в концентрации 60 и 120 мкг/мл (по кверцетину 50 и 100 мкмоль/л соответственно) в отличие от «пустых» наночастиц NP-2 достоверно усиливали цитотоксическое действие ультрафиолета. Включение кверцетина приводит к существенному уменьшению размеров крупных частиц NPQ-1 по сравнению с NP-1 (см. таблицу), при этом наличие кверцетина в этих частицах практически не влияло на цитотоксическое действие ультрафиолета. Статистически достоверное усиление цитотоксического действия ультрафиолета наблюдается только при концентрации NPQ-1 120 мкг/мл (100 мкмоль/л по кверцетину), однако аналогичное воздействие оказывали и «пустые» частицы NP-1.

В отличие от инкапсулированного в NPQ свободный кверцетин, добавленный непосредственно после УФ-С-облучения, незначительно, но достоверно увеличивал количество жизнеспособных HaCaT клеток после 24 ч инкубации (рис. 7, *a*). Ранее для кверцетина и микрочастиц кверцетина с оболочками (ПАГ/ПСС)₄ и (Хит/ДекС)₄ также был показан зависящий от концентрации рост жизнеспособности предварительно облученных HaCaT клеток, достигающий 30 %. Кверцетин уменьшает УФ-С-повреждения ДНК, ускоряя репарацию одноцепочечных разрывов [6]. Известно, что поверхностно-модифицированные наночастицы зеина повышают цитотоксичность паклитаксела, ловастатина, куркумина, ресвератрола по отношению к различным линиям раковых клеток [15, 16, 21, 22]. Принимая во внимание эти результаты, можно предположить, что при совместном воздействии с УФ-С и NPQ-2 усиление цитотоксичности обусловлено действием на клетку кверцетина в составе наночастиц, а не высвобожденным свободным кверцетином.

В отличие от метода определения жизнеспособности клеток с помощью реагента PrestoBlue™ метод, основанный на определении выхода из клеток цитоплазматического фермента ЛДГ, позволяет оценить структурную целостность клеток и целостность плазматической мембраны в частности. Следует отметить, что в случае гибели культивируемых клеток в результате апоптоза метаболически мертвые клетки (не способные преобразовывать PrestoBlue™ в флуоресцирующий компонент) еще могут сохранять свою структурную целостность. Установлено, что облучение кератиноцитов УФ-С в дозе 0,015 Дж/см² приводит через 24 ч к повреждению клеточной мембраны и потере клетками почти 60 % ЛДГ. Добавление 50 мкмоль/л кверцетина в культуральную среду непосредственно после экспозиции клеток УФ-С полностью предотвращало нарушение целостности плазматической мембраны (рис. 7, *b*). В аналогичных экспериментах с использованием 50 мкмоль/л кверцетина, включенного в наночастицах NPQ-1 и NPQ-2, выход ЛДГ по сравнению с облученным образцом снижается на 12 и 70 % соответственно. Поскольку известно, что нарушение целостности клеточных мембран при воздействии УФ-С-излучения связано с иницированием процессов перекисного окисления липидов [40], можно предположить, что мембранопротекторное действие кверцетина в этих условиях обусловлено его антиоксидантным действием. Менее выраженный эффект кверцетина, инкапсулированного в наночастицы и их агрегаты, на выход ЛДГ, по-видимому, объясняется медленным и неполным высвобождением Q из наночастиц (см. рис. 6).

Заключение. Метод десольватации спиртового раствора, содержащего растворенную высокомолекулярную матрицу и капсулируемое соединение, водным раствором полиэлектролита позволяет получить на основе проламинового белка зерна кукурузы зеина наночастицы, содержащие 0,005–0,26 г/г кверцетина. При отношении кверцетин/зеин в спиртовом растворе менее 0,08 г/г полифенол количественно включается в наночастицы, а их среднечисловой диаметр равен 60–75 нм. С увеличением отношения кверцетин/зеин до 0,10 и 0,20 г/г средний диаметр частиц возрастает до 110 и 150 нм соответственно. Для концентрированных дисперсий характерно слияние наночастиц с образованием агрегатов с диаметром 500–600 нм, что позволяет выделить эффекты, связанные с размерами частиц.

Несмотря на сохранение кверцетином, инкапсулированным в матрицу зеина, антирадикальной активности, сравнимой с активностью свободного флавоноида, в реакции с катион-радикалами АБТС его цитопротекторные свойства существенно снижаются. Они реализуются при высвобождении кверцетина из наночастиц и проявляются в частичном сохранении целостности клеточных мембран и уменьшении выхода ЛДГ. В то же время кверцетин в составе наноразмер-

ных частиц усиливает цитотоксическое действие УФ-излучения, увеличивая количество метаболически мертвых клеток. Аналогичным эффектом обладали пустые зеиновые агрегаты субмикронных размеров. Таким образом, в отличие от свободного кверцетина и его микрокристаллов, покрытых полиэлектролитными оболочками, введение кверцетина в наночастицах зеина или их субмикронных агрегатов снижает выживаемость УФ-С-облученных клеток HaCaT.

Список использованных источников

1. Polyphenols and their nanoformulations: protective effects against human diseases / S. Anand [et al.] // *Life*. – 2022. – Vol. 12, № 10. – P. 1639. <https://doi.org/10.3390/life12101639>
2. Цитопротекторный потенциал полифенольных экстрактов плодов рода *Vaccinium*, произрастающих на территории Югры, в условиях *in vitro* / Е. А. Белова [и др.] // *Вестн. СурГУ. Медицина*. – 2020. – Т. 43, № 1. – С. 86–93. <https://doi.org/10.34822/2304-9448-2020-1-86-93>
3. Encapsulation of quercetin in biopolymer-coated zein nanoparticles: formation, stability, antioxidant capacity, and bioaccessibility / Y. Zou [et al.] // *Food Hydrocoll.* – 2021. – Vol. 120, № 2. – P. 106980. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106980>
4. Natural substances for prevention of skin photoaging: screening systems in the development of sunscreen and rejuvenation cosmetics / V. Kostyuk [et al.] // *Rejuvenation Res.* – 2018. – Vol. 21, №2. – P. 91–101. <https://doi.org/10.1089/rej.2017.1931>
5. Role of the encapsulation in bioavailability of phenolic compounds / J. Grgić [et al.] // *Antioxidants*. – 2020. – Vol. 9, № 10. – P. 923. <https://doi.org/10.3390/antiox9100923>
6. Effects of native and particulate polyphenols on DNA damage and cell viability after UV-C exposure / A. I. Potapovich [et al.] // *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* – 2023. – Vol. 396, №. 9. – P. 1923–1930. <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02443-3>
7. Parris, N. Extraction and solubility characteristics of zein proteins from dry-milled corn / N. Parris, L. C. Dickey // *J. Agric. Food Chem.* – 2001. – Vol. 49, № 8. – P. 3757–3760. <https://doi.org/10.1021/jf0011790>
8. Lawton, J. W. Zein: a history of processing and use / J. W. Lawton // *Cereal Chem.* – 2002. – Vol. 79, № 1. – P. 1–18. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2002.79.1.1>
9. Recent advances in food-packing, pharmaceutical and biomedical applications of zein and zein-based materials / E. Corradini [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – Vol. 15, № 12. – P. 22438–22470. <https://doi.org/10.3390/ijms151222438>
10. Pascoli, M. Zein nanoparticles and strategies to improve colloidal stability: a mini-review / M. Pascoli, R. de Lima, L.F. Fraceto // *Front. Chem.* – 2018. – Vol. 6. – P. 6. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00006>
11. Physicochemical properties and bioavailability comparison of two quercetin loading zein nanoparticles with outer shell of caseinate and chitosan / J.-F. Zhou [et al.] // *Food Hydrocoll.* – 2021. – Vol. 120. – P. 106959. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106959>
12. Encapsulation of quercetin in biopolymer-coated zein nanoparticles: Formation, stability, antioxidant capacity, and bioaccessibility / Y. Zou [et al.] // *Food Hydrocoll.* – 2021. – Vol. 120. – P. 106980. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106980>
13. Zein-pectin composite nanoparticles as an efficient hyperoside delivery system: fabrication, characterization, and *in vitro* release property / X. Wang [et al.] // *LWT – Food Sci. Technol.* – 2020. – Vol. 133. – P. 109869. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109869>
14. Carriers based on zein-dextran sulfate sodium binary complex for the sustained delivery of quercetin / T. Wang [et al.] // *Front. Chem.* – 2020. – Vol. 8. – P. 662. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00662>
15. *In vitro* antioxidant and antitumor study of zein/SHA nanoparticles loaded with resveratrol / Q. Shi [et al.] // *Food Sci. Nutr.* – 2021. – Vol. 9, № 7. – P. 3530–3537. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2302>
16. Synthesis of novel biodegradable methoxy poly(ethylene glycol)-zein micelles for effective delivery of curcumin / S. Podaralla [et al.] // *Mol. Pharm.* – 2012. – Vol. 9, № 9. – P. 2778–2786. <https://doi.org/10.1021/mp2006455>
17. Preparation and characterization of quercetin-loaded zein nanoparticles by electrospraying and study of *in vitro* bioavailability / F. Rodríguez-Félix [et al.] // *J. Food Sci.* – 2019. – Vol. 84, № 10. – P. 2883–2897. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14803>
18. Quercetin loaded biopolymeric colloidal particles prepared by simultaneous precipitation of quercetin with hydrophobic protein in aqueous medium / A. R. Patel [et al.] // *Food Chem.* – 2012. – Vol. 133, № 2. – P. 423–429. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.054>
19. Zein nanoparticles as low-cost, safe, and effective carriers to improve the oral bioavailability of resveratrol / R. Nunes [et al.] // *Drug Deliv. Transl. Res.* – 2020. – Vol. 10, № 3. – P. 826–837. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00738-z>
20. Zein- vs PLGA-based nanoparticles containing rutin: a comparative investigation / A. Gagliardi [et al.] // *Mater. Sci. Eng. C.* – 2021. – Vol. 118. – P. 111538. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111538>
21. Paclitaxel-loaded sodium deoxycholate-stabilized zein nanoparticles: characterization and *in vitro* cytotoxicity / A. Gagliardi [et al.] // *Heliyon*. – 2019. – Vol. 5. – P. e02422. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02422>
22. Encapsulation of lovastatin in zein nanoparticles exhibits enhanced apoptotic activity in HepG2 cells / N. A. Alhakamy [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20. – P. 5788. <https://doi.org/10.3390/ijms20225788>
23. Lecithins-zein nanoparticles for antifungal treatment: enhancement and prolongation of drug retention in skin with reduced toxicity / S. Zhang [et al.] // *Int. J. Pharm.* – 2020. – Vol. 590. – P. 119894. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119894>

24. Zein nanoparticles as eco-friendly carrier systems for botanical repellents aiming sustainable agriculture / J. L. de Oliveira [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2018. – Vol. 66, № 6. – P. 1330–1340. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05552>
25. Nakamura, Y. Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: application to tannic acid metabolism in the rat / Y. Nakamura, S. Tsuji, Y. Tonogai // *J. Agric. Food Chem.* – 2003. – Vol. 51, № 1. – P. 331–334. <https://doi.org/10.1021/jf020847+>
26. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay / R. Re [et al.] // *Free Radical Biol. Med.* – 1999. – Vol. 26, № 9–10. – P. 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
27. Singh, B. R. Basic aspects of the technique and applications of infrared spectroscopy of peptides and proteins in infrared analysis of peptides and proteins / B. R. Singh // *ACS Sym. Ser.* – 2000. – Vol. 750. – P. 2–37. <https://doi.org/10.1021/bk-2000-0750.ch001>
28. Zein nanoparticle as a novel BMP6 derived peptide carrier for enhanced osteogenic differentiation of C2C12 cells / M. Hadavi [et al.] // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* – 2018. – Vol. 46, № 1. – P. 559–567. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.143164>
29. Colorful polyelectrolytes: an atom transfer radical polymerization route to fluorescent polystyrene sulfonate / W. Huberty [et al.] // *J. Fluoresc.* – 2016. – Vol. 26. – P. 609–615. <https://doi.org/10.1007/s10895-015-1747-2>
30. Infrared spectrum analysis of some flavonoids / M. Heneczowski [et al.] // *Acta Pol. Pharm.* – 2001. – Vol. 58, № 6. – P. 415–420. PMID: 12197612
31. Pohjala, L. Aggregating behavior of phenolic compounds – a source of false bioassay results / L. Pohjala, P. Tammela // *Molecules.* – 2012. – Vol. 17, № 9. – P. 10774–10790. <https://doi.org/10.3390/molecules170910774>
32. Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation / N. J. Baxter [et al.] // *Biochem.* – 1997. – Vol. 36, № 18. – P. 5566–5577. <https://doi.org/10.1021/bi9700328>
33. Identification of the products of oxidation of quercetin by air oxygen at ambient temperature / I. G. Zenkevich [et al.] // *Molecules.* – 2007. – Vol. 12, № 3. – P. 654–72. <https://doi.org/10.3390/12030654>
34. Chebotarev, A. N. Study of the AcidBase Properties of Quercetin in Aqueous Solutions by Color Measurements / A. N. Chebotarev, D. V. Snigur // *J. Anal. Chem.* – 2015. – Vol. 70, № 1. – P. 55–59. <https://doi.org/10.1134/S1061934815010062>
35. Relation between Droplet Size Distributions and Physical Stability for Zein Microfluidized Emulsions / J. Santos [et al.] // *Polymers.* – 2022. – Vol. 14, № 11. – P. 2195. <https://doi.org/10.3390/polym14112195>
36. The effect of pH and cocrystal quercetin-isonicotinamide on quercetin solubility and its thermodynamic / B. Wisudyanyingsih [et al.] // *Res. J. Pharm. Technol.* – 2021. – Vol. 14, № 9. – P. 4657–4661. <https://doi.org/10.52711/0974-360X.2021.00809>
37. Shape dependent cytotoxicity of PLGA-PEG nanoparticles on human cells / B. Zhang [et al.] // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 7315. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07588-9>
38. Effect of secondary particle size of nickel oxide on nanoparticles on cytotoxicity in A549 cells / T. Kawakami [et al.] // *J. Toxicol. Sci.* – 2022. – Vol. 47, № 4. – P. 151–157. <https://doi.org/10.2131/jts.47.151>
39. Soto, K. Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials / K. Soto, K. M. Garza, L. E. Murr // *Acta Biomater.* – 2007. – Vol. 3, № 3. – P. 351–358. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2006.11.004>
40. Plant polyphenols against UV-C-induced cellular death / V. Kostyuk [et al.] // *Planta Med.* – 2008. – Vol. 74, № 5. – P. 509–517. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1074499>

References

1. Anand S., Sowbhagya R., Ansari M. A., Alzohairy M. A., Alomary M. N., Almalik A. I., Ahmad W., Tripathi T., Elderderly A. Y. Polyphenols and their nanoformulations: protective effects against human diseases. *Life*, 2022, vol. 12, no. 10, p. 1639. <https://doi.org/10.3390/life12101639>
2. Belova E. A., Kriviykh E. A., Kavushevskaya N. S., Bystrevskaya L. K., Zhautikova S. B. Cytoprotective potential in polyphenolic extracts of vaccinium fruits in the Ugra territory *in vitro*. *Vestnik SurGU. Meditsina = Bulletin of Surgut State University. Medicine*, 2020, vol. 43, no. 1, pp. 86–93 (in Russian). <https://doi.org/10.34822/2304-9448-2020-1-86-93>
3. Zou Y., Qian Y., Rong X., Cao K., McClements D. J., Hu K. Encapsulation of quercetin in biopolymer-coated zein nanoparticles: formation, stability, antioxidant capacity, and bioaccessibility. *Food Hydrocolloids*, 2021, vol. 120, no. 2, pp. 106980. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106980>
4. Kostyuk V., Potapovich A., Albuhaydar A. R., Mayer W., De Luca C., Korkina L. Natural substances for prevention of skin photoaging: screening systems in the development of sunscreen and rejuvenation cosmetics. *Rejuvenation Research*, 2018, vol. 21, no. 2, pp. 91–101. <https://doi.org/10.1089/rej.2017.1931>
5. Grgić J., Šelo G., Planinić M., Tišma M., Bucić-Kojić A. Role of the encapsulation in bioavailability of phenolic compounds. *Antioxidants*, 2020, vol. 9, no. 10, pp. 923. <https://doi.org/10.3390/antiox9100923>
6. Potapovich A. I., Kostyuk T. V., Ishutina O. V., Shutava T. G., Kostyuk V. A. Effects of native and particulate polyphenols on DNA damage and cell viability after UV-C exposure. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 2023, vol. 396, no. 9, pp. 1923–1930. <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02443-3>
7. Parris N., Dickey L. C. Extraction and solubility characteristics of zein proteins from dry-milled corn. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2001, vol. 49, no. 8, pp. 3757–3760. <https://doi.org/10.1021/jf0011790>
8. Lawton J. W. Zein: a history of processing and use. *Cereal Chemistry*, 2002, vol. 79, no. 1, pp. 1–18. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2002.79.1.1>
9. Corradini E., Curti P. S., Meniqueti A. B., Martins A. F., Rubira A. F., Muniz E. C. Recent advances in food-packing, pharmaceutical and biomedical applications of zein and zein-based materials. *International journal of molecular science*, 2014, vol. 15, no. 12, pp. 22438–22470. <https://doi.org/10.3390/ijms15122438>

10. Pascoli M., de Lima R., Fraceto L. F. Zein nanoparticles and strategies to improve colloidal stability: f mini-review. *Frontiers in Chemistry*, 2018, vol. 6, pp. 6. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00006>
11. Zhou J.-F., Zheng G.-D., Wang W.-J., Yin Z.-P., Chen J.-G., Li J.-E., Zhang Q.-F. Physicochemical properties and bioavailability comparison of two quercetin loading zein nanoparticles with outer shell of caseinate and chitosan. *Food Hydrocolloids*, 2021, vol. 120, pp. 106959. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106959>
12. Zou Y., Qian Y., Rong X., Cao K., McClements D. J., Hu K. Encapsulation of quercetin in biopolymer-coated zein nanoparticles: formation, stability, antioxidant capacity, and bioaccessibility. *Food Hydrocolloids*, 2021, vol. 120, pp. 106980. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106980>
13. Wang X., Peng F., Liu F., Xiao Y., Li F., Lei H., Wang J., Li M., Xu H. Zein-pectin composite nanoparticles as an efficient hyperoside delivery system: fabrication, characterization, and *in vitro* release property. *LWT – Food Science and Technology*, 2020, vol. 133, pp. 109869. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109869>
14. Wang T., Li X., Chen L., Li L., Janaswamy S. Carriers based on zein-dextran sulfate sodium binary complex for the sustained delivery of quercetin. *Frontiers in Chemistry*, 2020, vol. 8, pp. 662. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00662>
15. Shi Q., Wang X., Tang X., Zhen N., Wang Y., Lu Z., Zhang H., Liu J., Zhou D., Huang K. *In vitro* antioxidant and antitumor study of zein/SHA nanoparticles loaded with resveratrol. *Food Science & Nutrition*, 2021, vol. 9, no. 7, pp. 3530–3537. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2302>
16. Podaralla S., Averineni R., Alqahtani M., Perumal O. Synthesis of novel biodegradable methoxy poly(ethylene glycol)–zein micelles for effective delivery of curcumin. *Molecular Pharmaceutics*, 2012, vol. 9, no. 9, pp. 2778–2786. <https://doi.org/10.1021/mp2006455>
17. Rodríguez-Félix F., Del-Toro-Sánchez C. L., Cinco-Moroyoqui F. J., Juárez J., Ruiz-Cruz S., López-Ahumada G. A., Carvajal-Millan E., Castro-Enríquez D. D., Barreras-Urbina C. G., Tapia-Hernández J. A. Preparation and characterization of quercetin-loaded zein nanoparticles by electrospraying and study of *in vitro* bioavailability. *Journal of Food Science*, 2019, vol. 84, no. 10, pp. 2883–2897. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14803>
18. Patel A. R., Heussen P. C. M., Hazekamp J., Drost E., Velikov, K. P. Quercetin loaded biopolymeric colloidal particles prepared by simultaneous precipitation of quercetin with hydrophobic protein in aqueous medium. *Food Chemistry*, 2012, vol. 133, no. 2, pp. 423–429. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.054>
19. Nunes R., Baião A., Monteiro D., das Neves J., Sarmiento B. Zein nanoparticles as low-cost, safe, and effective carriers to improve the oral bioavailability of resveratrol. *Drug delivery and translational research*, 2020, vol. 10, no. 3, pp. 826–837. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00738-z>
20. Gagliardi A., Paolino D., Costa N., Fresta M., Cosco D. Zein- vs PLGA-based nanoparticles containing rutin: A comparative investigation. *Materials Science & Engineering C*, 2021, vol. 118, pp. 111538. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111538>
21. Gagliardi A., Bonacci S., Paolino D., Celia C., Procopio A., Fresta M., Cosco D. Paclitaxel-loaded sodium deoxycholate-stabilized zein nanoparticles: characterization and *in vitro* cytotoxicity. *Heliyon*, 2019, vol. 5, pp. e02422. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02422>
22. Alhakamy N. A., Ahmed O. A. A., Aldawsari H. M., Alfaihi M. Y., Eid B. G., Abdel-Naim A. B., Fahmy U. A. Encapsulation of Lovastatin in Zein Nanoparticles Exhibits Enhanced Apoptotic Activity in HepG2 Cells. *International journal of molecular science*, 2019, vol. 20, pp. 5788. <https://doi.org/10.3390/ijms20225788>
23. Zhang S., Song W., Wu H., Wang J., Wang Y., Zhang Z., Lv H. Lecithins-Zein nanoparticles for antifungal treatment: Enhancement and prolongation of drug retention in skin with reduced toxicity. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020, vol. 590, pp. 119894. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119894>
24. de Oliveira J. L., Campos E. V. R., Pereira A. E. S., Pasquoto T., Lima R., Grillo R., de Andrade D. J., dos Santos F. A., Fraceto L. F. Zein Nanoparticles as Eco-Friendly Carrier Systems for Botanical Repellents Aiming Sustainable Agriculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, vol. 66, no. 6, pp. 1330–1340. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05552>
25. Nakamura Y., Tsuji S., Tonogai Y. Method for Analysis of Tannic Acid and Its Metabolites in Biological Samples: Application to Tannic Acid Metabolism in the Rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, vol. 51, no. 1, pp. 331–334. <https://doi.org/10.1021/jf020847+>
26. Re R., Pellegrini A., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, vol. 26, no. 9–10, pp. 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
27. Singh B. R. Basic Aspects of the Technique and Applications of Infrared Spectroscopy of Peptides and Proteins in Infrared Analysis of Peptides and Proteins. *ACS Symposium Series*, 2000, vol. 750, pp. 2–37. <https://doi.org/10.1021/bk-2000-0750.ch001>
28. Hadavi M., Hasannia S., Faghihi S., Mashayekhi F., Homazadeh H., Mostofi S. B. Zein nanoparticle as a novel BMP6 derived peptide carrier for enhanced osteogenic differentiation of C2C12 cells. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2018, vol. 46, no. 1, pp. 559–567. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.143164>
29. Huberty W., Tong X., Balamurugan S., Deville K., Russo P. S., Zhang D. Colorful polyelectrolytes: an atom transfer radical polymerization route to fluorescent polystyrene sulfonate. *Journal of Fluorescence*, 2016, vol. 26, pp. 609–615. <https://doi.org/10.1007/s10895-015-1747-2>
30. Heneczowski M., Kopacz M., Nowak D., Kuzniar A. Infrared spectrum analysis of some flavonoids. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2001, vol. 58, no. 6, pp. 415–420. PMID: 12197612
31. Pohjala L., Tammela P. Aggregating behavior of phenolic compounds — a source of false bioassay results. *Molecules*, 2012, vol. 17, no. 9, pp. 10774–10790. <https://doi.org/10.3390/molecules170910774>

32. Baxter N. J., Lilley T. H., Haslam E., Williamson M. P. Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry*, 1997, vol. 36, no. 18, pp. 5566–5577. <https://doi.org/10.1021/bi9700328>
33. Zenkevich I. G., Eshchenko A. Y., Makarova S. V., Vitenberg A. G., Dobryakov Y. G., Utsal V. A. Identification of the products of oxidation of quercetin by air oxygen at ambient temperature. *Molecules*, 2007, vol. 12, no. 3, pp. 654–72. <https://doi.org/10.3390/12030654>
34. Chebotarev A. N., Snigur D. V. Study of the AcidBase Properties of Quercetin in Aqueous Solutions by Color Measurements. *Journal Analytical Chemistry*, 2015, vol. 70, no. 1, pp. 55–59. <https://doi.org/10.1134/S1061934815010062>
35. Santos J., Trujillo-Cayado L. A.; Carrillo F., López-Castejón M. L., Alfaro-Rodríguez M. C. Relation between Droplet Size Distributions and Physical Stability for Zein Microfluidized Emulsions. *Polymers*, 2022, vol. 14, no. 11, pp. 2195. <https://doi.org/10.3390/polym14112195>
36. Wisudyaningsih B., Sallama S., Siswodihardjo S., Setyawan D. The Effect of pH and Cocrystal Quercetin-Isonicotinamide on Quercetin Solubility and its Thermodynamic. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 2021, vol. 14, no. 9, pp. 4657–4661. <https://doi.org/10.52711/0974-360X.2021.00809>
37. Zhang B., Lung P. S., Zhao S., Chu Z., Chrzanowski W., Li Q. Shape dependent cytotoxicity of PLGA-PEG nanoparticles on human cells. *Scientific Reports*, 2017, vol. 7, pp. 7315. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07588-9>
38. Kawakami T., Miyajima A., Komoriya K., Kato R., Isama K. Effect of secondary particle size of nickel oxide on nanoparticles on cytotoxicity in A549 cells. *Journal of Toxicological Sciences*, 2022, vol. 47, no. 4, pp. 151–157. <https://doi.org/10.2131/jts.47.151>
39. Soto K., Garza K. M., Murr L. E. Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials. *Acta Biomaterialia*, 2007, vol. 3, no. 3, pp. 351–358. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2006.11.004>
40. Kostyuk V., Potapovich A., Suhan T., De Luca C., Pressi G., Dal Toso R., Korkina L. Plant polyphenols against UV-C-induced cellular death. *Planta medica*. 2008, vol. 74, no. 5, pp. 509–514. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1074499>

Информация об авторах

Шутова Татьяна Геннадьевна – кандидат химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: shutova@ichnm.by, <https://orcid.org/0000-0001-6601-2707>

Потапович Алла Ивановна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник. Белорусский государственный университет (пр-т Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: pot-alla@rambler.ru

Костюк Татьяна Владимировна – младший научный сотрудник. Белорусский государственный университет (пр-т Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: 1011@tut.by

Ливонович Константин Сергеевич – кандидат химических наук, старший научный сотрудник. Институт химии новых материалов НАН Беларуси, (ул. Ф. Скорины, 36, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kslivonovich@ichnm.by, <https://orcid.org/0000-0003-3083-3962>

Костюк Владимир Андреевич – доктор химических наук, доцент; заведующий лабораторией. Белорусский государственный университет, (пр-т Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kostyuk@bsu.by, <https://orcid.org/0000-0002-1246-4131>

Information about the authors

Shutava Tatsiana G. – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Leading Researcher. Institute of Chemistry of New Materials, National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skaryna Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shutova@ichnm.by, <https://orcid.org/0000-0001-6601-2707>

Potapovich Alla I. – Ph. D. (Biology), Leading Researcher. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pot-alla@rambler.ru

Kostyuk Tatyana V. – Junior Researcher. Belarusian State University, (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: 1011@tut.by

Livanovich Kanstantsin S. – Ph. D. (Chemistry), Senior Researcher. Institute of Chemistry of New Materials, National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skaryna Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kslivonovich@ichnm.by, <https://orcid.org/0000-0003-3083-3962>

Kostyuk Vladimir A. – D. Sc. (Chemistry), Associate Professor, Head of the Laboratory. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kostyuk@bsu.by, <https://orcid.org/0000-0002-1246-4131>