

DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-2-52-56
© Коллектив авторов, 2019

Ю. В. Шаталин^{1, 2, *}, В. С. Шубина^{1, 2}

ЖЕЛЕЗОСВЯЗЫВАЮЩАЯ И ЖЕЛЕЗОВОССТАНАВЛИВАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ МАТЕРИАЛА, ПОЛУЧЕННОГО НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА И ТАКСИФОЛИНА (ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА), В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Россия, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская д. 3, ИТЭБ РАН

² Пущинский государственный естественно-научный институт, Россия, 142290, Пущино Московской области, пр. Науки, 3

* e-mail: yury.shatalin@yandex.ru

Изучены свойства гелевых материалов, полученных на основе коллагена и природного полифенола — таксифолина. Показано, что увеличение доли функционализированного таксифолина в геле приводит к уменьшению скорости деградации материала. Гелевый материал, включающий в свой состав полифенол, проявляет железо(II)-связывающую и слабую железо(III)-восстанавливающую активность, а полифенол, высвобождающийся из материала, способен восстанавливать ионы железа(II), не проявляя существенной железосвязывающей активности. Окислительная модификация материала приводит к увеличению скорости высвобождения полифенола и снижению его металлсвязывающих свойств. В целом, полученные результаты говорят о возможности получения стабильных материалов на основе коллагена и таксифолина, которые способны проявлять антиоксидантное действие посредством связывания ионов железа.

Ключевые слова: таксифолин; коллаген; деградация; железосвязывающая активность; окислительный стресс.

Биоматериалы на основе природных полипептидов, таких как коллаген и желатин, находят широкое применение в медицине в качестве дерматопротекторных и гемостатических средств, к их числу относятся комбутек-2, метуракол, губка гемостатическая коллагеновая и др. [1 – 5]. Улучшение физико-химических и биологических свойств таких материалов осуществляется введением в их состав различных компонентов, в том числе стабилизирующих структуру и формирующих сшивки между фибрилами белка. Разработка новых материалов на основе природных полипептидов и изучение их свойств в настоящее время является перспективной задачей. Для формирования поперечных сшивок между полипептидными цепями полимеров используют так называемые кросс-сшивающие агенты, которые стабилизируют структуру материала и уменьшают скорость его биodeградации. В свою очередь, изменение степени сшивки позволяет получать материалы с различной структурой и свойствами (пористость, механическая прочность, набухание, устойчивость к биodeградации и др) [6]. Стоит однако отметить, что увеличение доли кросс-сшивающего агента в материале может приводить к цитотоксическому действию последнего [7 – 11]. В связи с этим проводятся исследования, посвященные поиску новых кросс-сшивающих агентов, а также разрабатываются подходы,

направленные на получение нетоксичных материалов с заданными свойствами [7, 9]. Согласно существующим данным, природные полифенолы способствуют стабилизации фибриллярной формы коллагена и структуры материалов на основе биополимеров [10, 11]. Данные соединения способны выступать в качестве кросс-сшивающих агентов полипептидных цепей, что позволяет получать нетоксичные материалы с повышенной устойчивостью к биodeградации [9, 12 – 14]. Кроме того, полифенолы являются эффективными антиоксидантами, способными как улавливать активные формы кислорода (АФК), так и предотвращать их образование посредством связывания ионов металлов переменной валентности и ингибирования реакции Фентона. Это может иметь первостепенное значение в условиях воспалительной реакции организма, важной составляющей которой является генерация АФК. Полагаем, что использование функционализированных полифенолов в качестве кросс-сшивающих агентов позволит получить нетоксичный материал, в процессе деградации которого в окружающую ткань будет высвобождаться биологически активное соединение. Такие материалы могут быть получены в форме губок и гелеобразных препаратов, и в перспективе могут служить основой для разработки различных дерматологических средств [15]. Ранее на основе коллаген-

на нами был получен гелевый материал, в котором полипептидные цепи были сшиты посредством пентаглутарата таксифолина, и изучены его антиоксидантные свойства в модельных и клеточных системах [16]. Целью данной работы являлось изучение деградации материала в зависимости от доли полифенола в его составе, а также оценка железо(II)-связывающих и железо(III)-восстанавливающих свойств материала и его компонентов в физиологических и патофизиологических условиях.

Экспериментальная часть

В работе использовали таксифолин (96 %, НПФ “Флавит”, Россия) и коллаген, выделенный из хрящевой ткани хвостов крыс [16]. Доля коллагена от общего количества белка составляла не менее 90 % по данным СДС-электрофореза.

Характеристика гелевого материала. Получение гелевого материала на основе таксифолина и коллагена подробно описано в предыдущей работе [16]. Кратко, модификацию структуры полифенола проводили следующим образом: 570,5 мг (5 ммоль) глутарового ангидрида и 10 мг (0,18 ммоль) КОН растворяли в 5 мл безводного тетрагидрофурана (ТГФ). Затем к полученной смеси в течение 1 ч при постоянном нагревании до 80 °С добавляли 304 мг (1 ммоль) таксифолина в 5 мл ТГФ. Далее смесь нагревали в течение 3 ч при постоянном перемешивании, после чего упаривали под вакуумом. Полученный в виде масла продукт реакции представлял собой пентаглутарат таксифолина ($R_f = 0,246$, бензол — ацетон — этанол, 8:2:1; ^1H ЯМР (600 МГц, D_2O), δ : 5,12 (1H, d, $J = 12$ Гц, H-2); 5,02 (1H, d, $J = 12$ Гц, H-3); 5,93 (1H, s, H-6); 6,00 (1H, s, H-8); 6,97 (1H, m, H-5'); 7,24/7,10 (1H, m, H-2'/6'); 1,97 (6H, m, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2$); 1,88 (12H, m, $-\text{CH}_2\text{COO}$); 2,66 (2H, m, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2$); 1,63 (4H, m, $-\text{CH}_2\text{COO}$); 2,20 (2H, m, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2$); 1,73 (4H, m, $-\text{CH}_2\text{COO}$); ^{13}C ЯМР (150 МГц, D_2O), δ : 181,61/181,06/179,61/179,54/178,26 (COOH), 162,8/162,77 (C3', C4'), 166,03 (C9), 170,62 (C5), 166,63 (C7), 183,51 (C4), 126,96 (C1'), 120,9 (C6'), 116,3 (C5'), 115,56 (C2'), 102 (C10), 97,1 (C6), 96,77 (C8), 83,07 (C2), 71,73 (C3), 20,36 – 21,06 (CH_2), 32,8 – 35,71 (CH_2) [16]. Полученный полифенол содержит в своей структуре карбоксильные группы, способные после активации взаимодействовать с терминальными аминокетильными группами полипептидных цепей, формируя поперечные сшивки.

Активацию карбоксильных групп пентаглутарата таксифолина осуществляли с помощью 4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилморфолина хлорида (DMTMM) [16]. Для этого в 1 мл фосфатно-солевого буфера растворяли полифенол и DMTMM в соотношении 1:3 (моль : моль). Масса навесок менялась в зависимости от требуемой концентрации полифенола в геле.

Гелевый материал получали следующим образом: 1 мл раствора пентаглутарата таксифолина смешивали с 9 мл 2,2 % раствора коллагена, смесь быстро переме-

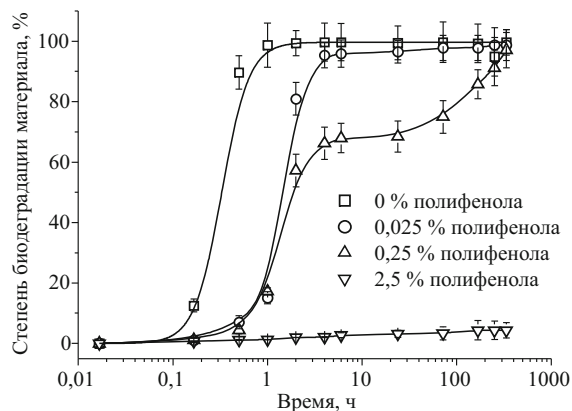


Рис. 1. Деградация гелевого материала.

шивали и заливали в подготовленные цилиндрические формы диаметром 1,5 см и объемом 1 мл. Концентрация полифенола в геле составляла 0; 0,025; 0,25; 1 и 2,5 %, а концентрация коллагена — 2 %. Концентрацию белка контролировали спектрофотометрическим методом, используя расчётный коэффициент экстинкции [17], и стандартный биуретовый метод [18].

Концентрация полифенола в анализируемых образцах. Для анализа доли полифенола в геле образец предварительно растворяли в 1 М HCl, доводили значение pH до 7,4 и далее регистрировали поглощение при длине волны 326 нм на спектрофотометре Cary Scan (Varian, Австралия). Для определения динамики высвобождения полифенола из геля фрагмент геля цилиндрической формы объемом 1 мл помещали в 10 мл фосфатно-солевого буфера. Далее определяли концентрацию полифенола в растворе спектрофотометрическим методом. Расчет концентрации полифенола в растворе проводили по среднему коэффициенту экстинкции ($\epsilon_{326} = 17556 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Долю аминокетильных групп, участвующих в формировании сшивки, определяли по изменению количества терминальных аминокетильных групп полипептида нингидриновым методом [19]. Кратко, 20 мг предварительно лиофилизированного образца геля помещали в 1 мл фосфатно-солевого буфера. К полученной суспензии добавляли 250 мкл 0,2 % раствора нингидрина в ацетоне. Приготовленный раствор инкубировали при 90 °С в течение 15 мин, охлаждали до комнатной температуры и регистрировали оптическую плотность супернатанта при 570 нм. Расчет доли аминокетильных групп, участвующих в формировании поперечных сшивок, проводили по формуле:

$$\text{Доля аминокетильных групп, \%} = 100 \% \cdot (A_m - A_{cp}) / (A_{np} - A_{cp}),$$

где A_m — оптическая плотность анализируемого материала; A_{np} — оптическая плотность нативного коллагена; A_{cp} — оптическая плотность коллагена, кросс-сшитого с использованием глиоксалевого буфера.

Анализ деградации материала. Деградацию гелевого материала оценивали по количеству полипептида, перешедшего в раствор в процессе инкубации в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4). Количество поли-

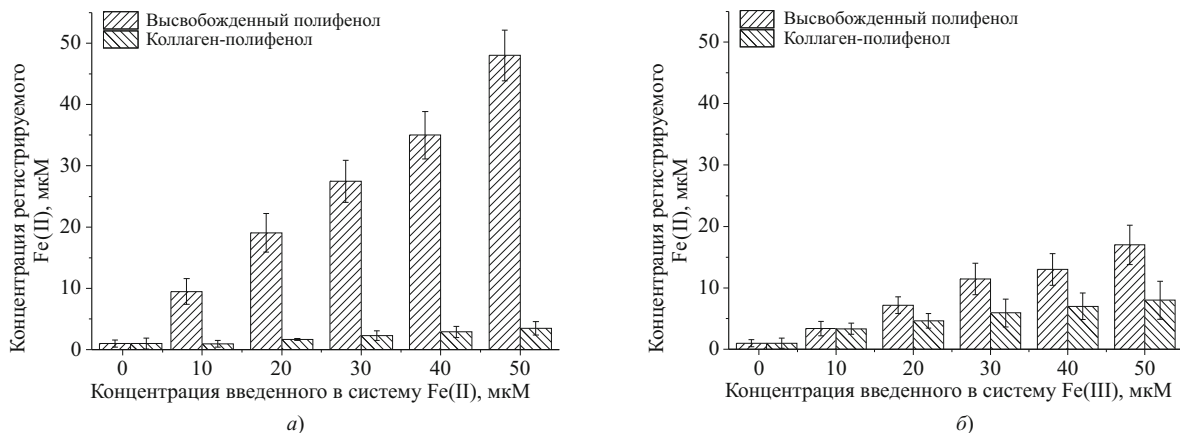


Рис. 2. Железосвязывающая (а) и железовосстанавливающая (б) способность материала и полифенола, высвобождаемого из него.

пептида считали эквивалентным количеству терминальных аминокислот, регистрируемых в растворе нингидриновым методом. К образцу гелевого материала объемом 1 мл добавляли 10 мл раствора фосфатно-солевого буфера (рН 7,4) и помещали в термостат (37 °С) с орбитальным перемешиванием (100 об/мин). Через определенные промежутки времени отбирали 100 мкл водной фазы, центрифугировали при 10000 об/мин для удаления нерастворимой фракции и далее определяли количество аминокислот в суспензии вышеописанным методом. Степень деградации определяли по формуле:

$$\text{Степень деградации, \%} = 100 \% \cdot (A_m - A_B) / (A_{np} - A_B),$$

где A_m — оптическая плотность анализируемого материала; A_{np} — оптическая плотность нативного коллагенового геля и A_B — оптическая плотность буферного раствора.

Железовосстанавливающие и железосвязывающие свойства. Способность высвобождаемого полифенола и гелевого материала связывать ионы железа(II) и восстанавливать ионы железа(III) была изучена модифицированным феррозиновым методом [20]. К 1 мл геля, содержащего 2 % коллагена и 1 % полифенола, добавляли 10 мл фосфатно-солевого буфера и инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Затем супернатант отделяли от геля и анализировали железосвязывающие и железовосстанавливающие свойства геля и супернатанта отдельно друг от друга. К 1 мл геля (или супернатанта) добавляли 1 мл раствора хлорида железа(III) или сульфата железа(II) в ацетатном буфере (для анализа железовосстанавливающей или железосвязывающей способности соответственно). Концентрация ионов железа, введенных в систему, составляла 10, 20, 30, 40 и 50 мкМ. Через 1 ч к раствору добавляли феррозин (1 мМ) и инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. Концентрацию ионов железа(II) в растворе определяли по поглощению их комплекса с феррозином при 562 нм, используя в качестве сравнения стандартные растворы (0,8 – 120 мкМ) сульфата железа(II).

Индукция окислительного повреждения гелевого материала. Окислительное повреждение материала индуцировали его инкубацией в растворе фосфатно-солевого буфера, содержащего 100 мМ пероксида водорода, в течение 24 ч. После инкубации гель отделяли от супернатанта и промывали раствором фосфатно-солевого буфера для удаления остатков пероксида водорода. Далее проводили анализ металловосстанавливающих и металловосвязывающих свойств материала по вышеописанной методике.

Статистический анализ проводили при помощи программы Microsoft Excel. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение 3 – 6 независимых экспериментов.

Результаты и их обсуждение

Формирование сшивок между полипептидными цепями осуществлялось с помощью пентаглутарата таксифолина. В его структуре присутствует 5 карбоксильных групп, способных после активации формировать ковалентную связь с аминокислотными группами белка. Показано, что доля аминокислот, участвующих в формировании поперечных сшивок, дозозависимо возрастает с увеличением количества полифенола, введенного в состав материала, и составляет (13,1 ± 10,7), (45,2 ± 6,3) и (78,6 ± 3,0) % при доле полифенола в материале 0,025, 0,25 и 2,5 % соответственно. Анализ деградации материалов, содержащих 0,25 и 0,025 % полифенола, показал быстрое высвобождение фрагментов полипептида в фосфатно-солевой буфер в течение первых 1,5 ч (рис. 1).

Полная деградация данных материалов наблюдалась спустя 4 и 252 ч соответственно. Тогда как материал, содержащий 2,5 %, проявлял наибольшую стабильность, сохранявшуюся на протяжении всего эксперимента (рис. 1). Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными, согласно которым наибольшая механическая прочность и наименьшая деградация материала наблюдается при его степени сшивки 69 – 81 % [21].

Так как в процессе деградации материала наблюдается постепенное высвобождение биологически ак-

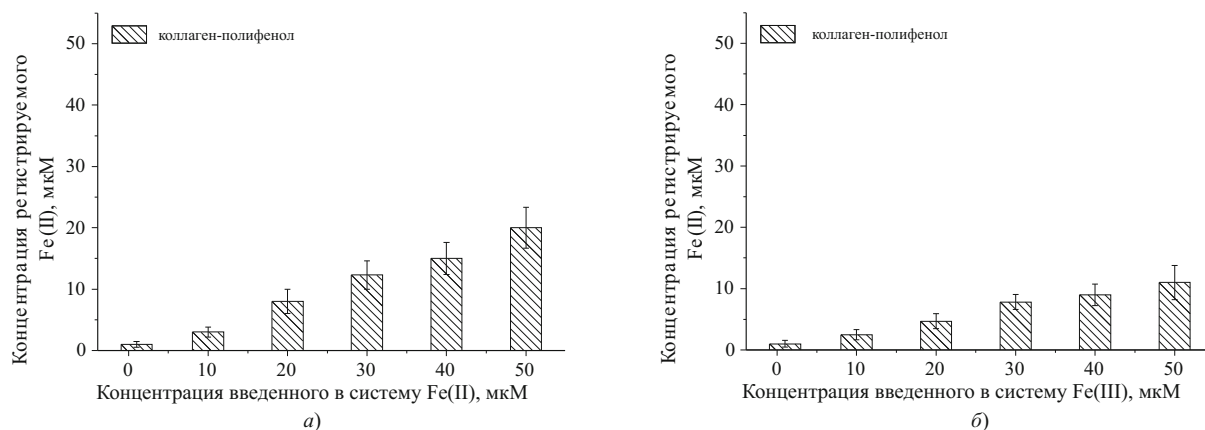


Рис. 3. Железосвязывающая (а) и железовосстанавливающая (б) способность материала после его окислительного повреждения.

тивного полифенола в окружающую среду, на следующем этапе исследований нами изучены металлсвязывающие свойства как гелевого материала, так и высвобождаемого соединения. Для этого были проведены следующие эксперименты: к гелевому материалу или к супернатанту, отобранному после инкубации материала в фосфатно-солевом буфере в течение 24 ч, добавляли раствор соли двухвалентного железа. Затем с помощью феррозинового метода определяли концентрацию железа, оставшегося не связанным полифенолом или материалом. Установлено, что практически все ионы железа, добавленные к супернатанту, содержащему высвободившийся полифенол, формируют комплекс с феррозином (рис. 2, а), позволяя говорить об отсутствии существенной железосвязывающей активности высвободившегося полифенола. С другой стороны, количество ионов железа(II), способных взаимодействовать с феррозином, существенно снижается в присутствии геля (рис. 2, а).

Добавление в систему 100 мМ аскорбата не влияет на регистрируемое снижение концентрации Fe(II) в присутствии гелевого материала, что указывает на отсутствие ферроксидазной активности геля в этих условиях и позволяет заключить, что исследуемый материал обладает железо(II)-связывающими свойствами.

Взаимодействие полифенолов с ионами металлов переменной валентности также может лежать в основе прооксидантного действия, которое проявляют данные соединения в определенных условиях. После связывания ионов железа(III) полифенолами возможно их последующее восстановление до ионов железа(II). Последние могут участвовать в реакции Фентона, способствуя развитию свободно-радикальных процессов. В связи с вышесказанным, нами были изучены железовосстанавливающие свойства высвободившегося полифенола и гелевого материала, включающего полифенол в свой состав. Установлено, что в обоих случаях наблюдается восстановление ионов железа(III). При этом регистрируемая концентрация ионов двухвалентного железа в присутствии высвободившегося полифенола (в концентрации 0,051 мг/мл) практически в 2 раза выше, чем в присутствии гелевого материала

(содержащего 9,49 мг/мл полифенола) (рис. 2, б), что также свидетельствует о высоком металлсвязывающем потенциале гелевого материала.

Таким образом, с одной стороны, полученные результаты наводят на мысль о том, что в определенных условиях исследуемые материалы способны усиливать образование АФК за счет восстановления ионов металлов переменной валентности и их последующего участия в реакции Фентона. С другой стороны, высокая железосвязывающая способность материала и ингибирующее действие на продукцию АФК нейтрофилами, которое проявляют как материал, так и высвобождаемый из него полифенол [16], указывают на высокие антиоксидантные свойства геля, в том числе в условиях окислительного стресса. Как известно, АФК способны окислять белковые молекулы, вызывая модификацию и последующее разрушение материалов, полученных на их основе [22]. Для изучения свойств материала в условиях окислительного стресса последний инкубировали в среде, содержащей 100 мМ пероксида водорода, в течение 24 ч. Установлено, что окислительное повреждение материала приводит к увеличению количества высвобождаемого полифенола с $(0,51 \pm 0,09)$ до $(7,82 \pm 0,71)$ мг по сравнению с контролем (инкубация в фосфатно-солевом буфере). Ожидается уменьшается Fe(II)-связывающая способность материала (рис. 3, а), что, однако, может быть связано как с уменьшением содержания полифенола в геле, так и с его частичным окислением. В свою очередь, о присутствии неокисленных форм полифенола в составе материала свидетельствуют его металлвосстанавливающие свойства (рис. 3, б). На основании полученных данных можно заключить, что присутствие полифенола в геле играет ключевую роль в связывании ионов железа(II) материалом.

В целом, в соответствии с полученными результатами можно говорить о том, что на основе коллагена и природного полифенола таксифолина могут быть получены дерматотропные препараты, способные оказывать антиоксидантное действие.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 15-04-02377 а с использованием приборов ЦКП ИТЭБ РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. S. Chattopadhyay, R. T. Raines, *Biopolymers*, **101**(8), 821 – 833 (2014).
2. Государственный реестр лекарственных средств, Рег. № P N003375 / 01 (2009); <http://www.grls.rosminzdrav.ru>.
3. Государственный реестр лекарственных средств, Рег. № P N002011 / 01 (2008); <http://www.grls.rosminzdrav.ru>.
4. Государственный реестр лекарственных средств, Рег. № P N001656 / 01 (2008); <http://www.grls.rosminzdrav.ru>.
5. Государственный реестр лекарственных средств, Рег. № P N003443 / 01 (2010); <http://www.grls.rosminzdrav.ru>.
6. C. N. Grover, R. E. Cameron, S. M. Best, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **10**, 62 – 74 (2012).
7. N. Reddy, R. Reddy, Q. Jiang, *Trends Biotechnol.*, **33**(6), 362 – 369 (2015).
8. J. E. Gough, C. A. Scotchford, S. Downes, *J. Biomed. Mater. Res.*, **61**(1), 121 – 130 (2002).
9. X. Wang, B. Ma, J. Chang, *Biomed. Mater. Eng.*, **26**(1–2), 19 – 30 (2015).
10. H. Schlebusch, D. Kern, *J. Vasc. Res.*, **9**(3–6), 248 – 256 (1972).
11. Ю. С. Тараховский, И. И. Селезнева, Н. А. Васильева и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **144**(12), 640 – 643 (2007).
12. K. V. Greco, L. Francis, H. Huang, et al., *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, (2016); doi: 10.1002 / term.2338.
13. B. Han, J. Jaurequi, B. W. Tang, et al., *J. Biomed. Mater. Res. A.*, **65**(1), 118 – 124 (2003).
14. A. Pinheiro, A. Cooley, J. Liao, et al., *J. Orthop. Res.*, **34**(6), 1037 – 1046 (2016).
15. *Государственная фармакопея Российской Федерации*, XIII изд., т. 2, МЗ РФ, Москва (2015), сс. 67 – 73.
16. Ю. В. Шаталин, В. С. Шубина, *Биофизика*, **60**(3), 583 – 588 (2015).
17. C. N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, et al., *Protein Sci.*, **4**(11), 2411 – 2423 (1995).
18. A. G. Gornall, C. J. Bardawill, M. M. David, *J. Biol. Chem.*, **177**(2), 751 – 766 (1949).
19. M. Friedman, *J. Agric. Food Chem.*, **52**(3), 385 – 406 (2004).
20. L. Mira, M. T. Fernandez, M. Santos, et al., *Free Radic. Res.*, **36**(11), 1199 – 1208 (2002).
21. N. Davidenko, C. F. Schuster, D. V. Bax, et al., *Acta Biomater.*, **25**, 131 – 142 (2015).
22. R. Komsa-Penkova, R. Koynova, G. Kostov, et al., *Biophys. Chem.*, **83**(3), 185 – 195 (2000).

Поступила 15.05.17

IRON-BINDING AND IRON-REDUCING PROPERTIES OF A MATERIAL BASED ON COLLAGEN AND TAXIFOLIN (DIHYDROQUERCETIN) UNDER PHYSIOLOGICAL AND PATHOPHYSIOLOGICAL CONDITIONS

Yu. V. Shatalin^{1,2*} and V. S. Shubina^{1,2}

¹ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

² Pushchino State Institute of Natural Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

* e-mail yury.shatalin@yandex.ru

The properties of jelly materials based on collagen and the natural polyphenol taxifolin were studied. It is established that increase in the proportion of the functionalized polyphenol in a gel leads to decrease in the rate of material degradation. The gel containing polyphenol exhibits the iron(II)-binding and weak iron(III)-reducing activities, while polyphenol released from the material is able to reduce iron(II) ions without showing any significant iron-binding activity. Oxidative modification of the material resulted in increased rate of polyphenol release and decreased metal-binding properties. In general, the obtained results indicate the possibility of obtaining stable materials based on collagen and taxifolin, which can produce antioxidant effect due to their iron-binding ability.

Keywords: taxifolin; collagen; degradation; iron-binding activity; oxidative stress.