

МАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА И ТАКСИФОЛИНА: ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА

© 2015 г. Ю.В. Шаталин* **, В.С. Шубина* **

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3;

**Пуцинский государственный естественно-научный институт,
142290, Пушкино Московской области, просп. Науки, 3

E-mail: yury.shatalin@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.03.15 г.

Изучена возможность получения материала на основе коллагена и биологически активного полифенола – таксифолина и исследованы его свойства. Получены данные по динамике высвобождения полифенола, химически связанного с коллагеном, и определена его металл-восстанавливающая активность. Изучено действие таксифолина, глутарата таксифолина и геля, содержащего полифенол, на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами, стимулированными форбол-миристан-ацетатом. Показано наличие антиоксидантных и металл-восстанавливающих свойств полифенола, высвобождаемого из гелевого материала, что свидетельствует об эффективном включении неокисленной формы полифенола в состав коллагенового геля.

Ключевые слова: таксифолин, коллаген, динамика высвобождения полифенола, антиоксидантная активность, металлвосстанавливающая активность.

Регенерация тканей – это один из самых сложных процессов в организме, который протекает на протяжении всей жизни человека. Повреждение органов и тканей могут вызывать как внешние воздействия (результатом которых являются ранения, переломы, ожоговые травмы и др.), так и внутренние заболевания организма, число которых увеличивается с возрастом. На данный момент существуют многочисленные тканеинженерные материалы, каждый из которых обладает своими преимуществами и недостатками. Широкое распространение получили материалы на основе биodeградируемых полимеров, таких как коллаген и коллаген-подобные белки и пептиды. Препараты на основе данных полимеров, в том числе самого коллагена, применяются для гемостаза, регенерации мягких тканей, в качестве искусственной кожи при раневых и ожоговых травмах кожи, для регенерации костной ткани и доставки биологически активных веществ [1–3]. В связи с тем, что коллаген представляет собой основной белок соединительной ткани, в тканях присутствуют ферменты, способные расщеплять данный белок

и препараты, полученные на его основе. Для уменьшения скорости деградации таких препаратов их дополнительно модифицируют, формируя поперечные сшивки, используя так называемые кроссшивающие агенты, например токсичный глутаровый альдегид. Мы полагаем, что использование функционализированных природных полифенолов, в качестве кроссшивающих агентов, позволит получить нетоксичный материал, в процессе деградации которого в окружающую ткань будет высвобождаться биологически активное вещество – полифенол. Существуют многочисленные свидетельства того, что полифенолы являются эффективными антиоксидантами и демонстрируют разнообразные биологические эффекты, включая антибактериальное, противовирусное, противоопухолевое и противовоспалительное действие [4]. Полифенолы оказывают ранозаживляющее действие после термических [5] и химических ожогов [6,7], уменьшают фиброзное образование ткани [8], а также усиливают регенерационные процессы в патологических условиях, например при сахарном диабете I типа [9]. Кроме того, полифенолы способны формировать связи с гидроксильными, карбоксильными, карбонильными, амино- и тиольными группами белков, что свидетельствует о возможности получения новых материалов на основе только природных

Сокращения: ФМА – форбол-12-миристан-13-ацетат, ДМТММ – 4-(4,6-димитокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилморфолин хлорид, АФК – активные формы кислорода, ЛХЛ – люминолзависимая хемиллюминесценция.

компонентов. В частности, соединения полифенольной природы могут выступать в качестве кроссшивающих агентов и соединений, стабилизирующих структуру материала [10–12]. Целью данного исследования являлось изучение возможности получения материала на основе коллагена и биологически активного полифенола – таксифолина и изучение свойств полученного материала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы: таксифолин (НПФ «Фламена», Россия); сульфат железа (II), хлорид железа (III), ацетат натрия, уксусная кислота, натрия гидроксид, калия гидроксид, хлорид натрия, сульфат меди (II), тартрат натрия (Реахим, Россия); 3-(2-пиридил)-5,6-дифенил-1,2,4-триазин-4',4''-дисульфоновой кислоты натриевая соль (феррозин), 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетат, 4-(4,6-димитокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилморфолин хлорид (DMTMM), форбол-12-мирилат-13-ацетат (ФМА), глутаровый ангидрид (Sigma-Aldrich, США); фосфатно-солевой буферный раствор (ПанЭко, Россия). Буферные растворы с pH 5,4 (ацетат натрия/уксусная кислота) и pH 7,4 (фосфат натрия одно/двухзамещенный) были приготовлены на дистиллированной воде, дополнительно очищенной на установке Milli-Q (Millipore, США).

Получение и характеристика карбоксилированного производного таксифолина. Пентаглутарат таксифолина был получен в результате этерификации полифенола в присутствии глутарового ангидрида по модифицированному методу, описанному ранее [13]. Для этого 570,5 мг глутарового ангидрида в 5 мл безводного тетрагидрофурана смешивали с 10 мг КОН и затем при постоянном нагревании при 80°C в течение часа добавляли 304 мг таксифолина, растворенного в 5 мл тетрагидрофурана. Смесь нагревали в течение трех часов, после чего раствор упаривали под вакуумом. Продукт реакции, полученный в виде масла, представляет 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).

Выделение коллагена. Выделение коллагена проводили по ранее описанному методу [14]. Хрящевую ткань, полученную из хвостов крыс, стерилизовали в 70% этаноле и затем помещали в холодный раствор 0,5 М уксусной кислоты из расчета 250 мл кислоты на 1 г хрящевой ткани. Раствор оставляли при постоянном перемешивании при 4°C в течение 72 ч, после чего центрифугировали при 4°C и 7000 g в течение 30 мин для отделения нерастворившейся ткани. После этого к супернатанту добавляли охлажденный 10% раствор NaCl для преципитации коллагена и оставляли на ночь при 4°C. Коллаген отделяли повторным центрифугированием при 4°C и 7000 g в течение 30 мин и затем растворяли его в 0,25 М уксусной кислоте при 4°C из расчета 1 г начальной хрящевой ткани на 50 мл. Полученный раствор диализовали против 6 смен 0,1% раствора уксусной кислоты в течение трех суток, используя диализные мешки с порами для молекулярного веса 12–14 кДа. До эксперимента раствор коллагена хранили при 4°C в стерильной стеклянной таре не более семи суток. Концентрацию коллагена контролировали спектрофотометрическим методом, используя расчетный коэффициент экстинкции [15], и стандартным биуретовым методом [16].

Получение гидрогелей на основе коллагена и глутарата таксифолина. Гидрогель на основе коллагена был получен за счет формирования поперечных сшивок между фибриллами белка с использованием глутарата таксифолина, карбоксильные группы которого предварительно активировали 4-(4,6-димитокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилморфолин хлоридом (DMTMM) [17]. К раствору 175 мг глутарата таксифолина в 5 мл фосфатно-солевого буферного раствора добавляли 158,2 мг DMTMM в 5 мл фосфатно-солевого буферного раствора. Через один час раствор производного таксифолина добавляли к 10 мл 2% раствора коллагена, смесь быстро перемешивали и заливали в лунки 24-луночного планшета в объеме 1 мл до полного формирования геля при температуре 37°C и 100% влажности. Через 24 ч гели промывали тремя сменами холодного фосфатно-солевого буферного раствора и до анализа хранили при 4°C.

Анализ динамики высвобождения полифенола из геля. Для определения динамики высвобождения полифенола из коллагенового геля фрагмент геля цилиндрической формы объемом 1 мл, содержащий 8,75 мкг полифенола, поме-

шали в 10 мл фосфатно-солевого буферного раствора. Далее спектрофотометрическим методом определяли концентрацию полифенола в буфере спустя определенные промежутки времени (0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 8,0, 16, 24 и 48 ч). Регистрацию спектров проводили в стандартных 1-сантиметровых кварцевых кюветах на спектрофотометре Cary Scan (Varian, Австралия) при длине волны 326 нм. Расчет концентрации полифенола в растворе проводили по среднему коэффициенту экстинкции ($\epsilon_{326} = 17556 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). Определение доли высвобождаемого полифенола осуществляли по формуле: $C_{\text{TF}\%} = 100 \cdot C_{\text{TF}_S} / C_{\text{TF}_G}$, где C_{TF_G} – концентрация полифенола в геле, измеренная после растворения 1 мл геля в 10 мл 1М HCl, C_{TF_S} – концентрация полифенола в среде инкубации.

Оценка железовосстанавливающей активности полифенола. Определение железовосстанавливающей способности полифенолов проводили с помощью модифицированного феррозинного метода [18] на спектрофотометре Cary 100 Scan (Varian, Австралия). К 9 мл 1 мМ раствора феррозина в ацетатном буфере (pH 5,4) добавляли 1 мл супернатанта, полученного после инкубации геля. Затем к приготовленным растворам добавляли хлорид железа, конечная концентрация которого составляла 100 мкМ, и регистрировали изменение оптической плотности при 562 нм. Концентрацию восстановленного железа определяли по калибровочному графику, для построения которого использовали различные концентрации сульфата железа (II): 0,8, 1,5, 3,0, 6,0, 12,5, 25, 50, 100, 120 мкМ.

Выделение нейтрофилов. Выделение нейтрофилов осуществляли из цельной крови крыс линии Вистар по описанному ранее методу [19]. Для гипотонического лизиса эритроцитов гепаринизированную кровь смешивали с холодной дистиллированной водой в соотношении 1:2 и перемешивали в течение 20 с, после чего восстанавливали осмотическую концентрацию добавлением двукратного объема фосфатно-солевого буферного раствора. Полученную суспензию центрифугировали в течение 5 мин при 180 g и 4°C. Осадок, содержащий нейтрофилы, отмывали фосфатно-солевым буферным раствором и далее полученную клеточную фракцию (2 мл) наслаивали на градиент Фиколл-урографин 1,077/1,119 (3 мл) и центрифугировали в течение 15 мин при 180 g и 4°C. Клетки дважды отмывали фосфатно-солевым буферным раствором. Полученную фракцию суспендировали в среде Хенкса (pH 7,2). Содержание нейтрофилов в полученной фракции клеток составляло не менее 96%.

Влияние препаратов на продукцию активных форм кислорода (АФК) нейтрофилами. Продукцию АФК фагоцитами исследовали методом люминолзависимой хемилюминесценции (ЛХЛ) [19]. Измерения проводили на микропланшетном ридере Tecan Infinite (Австрия) в стандартных 96-луночных планшетах. Влияние полифенолов на продукцию АФК нейтрофилами оценивали следующим образом. Суспензию нейтрофилов (1 млн/мл) инкубировали в течение 5 мин при 37°C в среде Хенкса, далее в ячейки добавляли исследуемые препараты в различных концентрациях. После инкубации клеток с препаратами в течение 5 мин к суспензии клеток добавляли форбол-12-миристан-13-ацетат (0,28 мкМ) и регистрировали ЛХЛ до тех пор, пока хемилюминесцентный ответ не достигнет базового уровня. Интегральный хемилюминесцентный ответ ($\int_{\text{ЛХЛ}}$) рассчитывали как сумму значений ЛХЛ, полученных в процессе измерений. Изменения ЛХЛ в присутствии исследуемых препаратов оценивали по следующей формуле: $\int_{\text{ЛХЛ}} = (\int_{\text{препарат}} / \int_{\text{контроль}}) \cdot 100\%$, где $\int_{\text{ЛХЛ}}$ – интегральная ЛХЛ, %; $\int_{\text{препарат}}$ – интегральная ЛХЛ в присутствии препарата; $\int_{\text{контроль}}$ – интегральная ЛХЛ в контроле (добавка фосфатно-солевого буфера).

Статистический анализ. Статистический анализ проводили при помощи программы Microsoft Excel. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего трех–шести независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Конденсация полифенолов с биополимерами может протекать как в присутствии, так и в отсутствие ферментов [20]. Продукты подобных реакций представляют собой конъюгаты, состоящие из окисленной до хинона формы полифенола, связанной с пептидом посредством аминной, иминной, тионильной или, в редких случаях, углерод-углеродной связи. За счет высвобождения энергии формируемой связи ее расщепление при физиологических условиях довольно затруднительно. Включение в состав биополимера неокисленного полифенола может быть осуществлено посредством его предварительной функционализации, в частности, в результате формирования сложно-эфирных связей между гидроксильными группами полифенола и карбоксильными компонентами, способными в дальнейшем принимать непосредственное участие в формировании связи полифенол–белок. Стоит отметить, что гидролитическое расщепление сложно-эфирной связи, образованной между фенолом и карбоновой кислотой, протекает

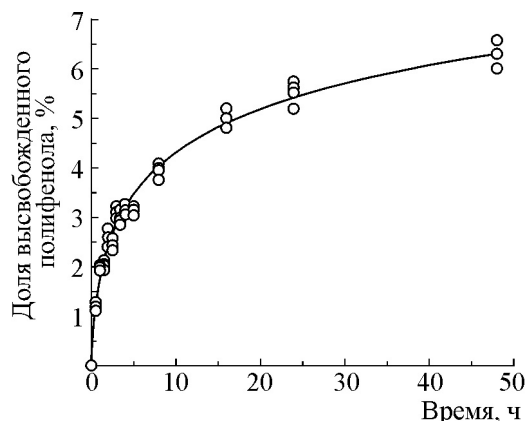


Рис. 1. Динамика высвобождения полифенола из геля, полученного на основе коллагена.

существенно быстрее, чем гидролиз сложноэфирной связи, образованной между алифатическими спиртом и кислотой, и, безусловно, быстрее, чем гидролиз амидной связи [21]. Принимая во внимание вышесказанное, можно заключить, что функционализированные полифенолы могут быть использованы для получения материалов, из которых в процессе гидролитического отщепления будет высвобождаться неокисленная форма полифенола, обладающая высокой антиоксидантной активностью. В рамках данного исследования функционализация полифенола осуществлялась с помощью ангидрида карбоновой кислоты. Как известно, реакция фенолов с ангидридами кислот приводит к образованию сложных эфиров. Для природных полифенолов взаимодействие с ангидридами кислот может приводить к формированию как полностью, так и частично замещенных продуктов. В качестве флавоноида нами был выбран таксифолин. Для данного полифенола реакция ацетилирования с использованием уксусного ангидрида, в присутствии каталитических количеств ацетата калия или пиридина, приводит преимущественно к формированию пентаацетата таксифолина, но, как было показано, в присутствии сульфита натрия данный продукт претерпевает частичное деацетилирование, приводя к формированию моноацетата таксифолина [13]. Это позволяет утверждать, что при включении в состав биополимера подобных продуктов может наблюдаться гидролитическое отщепление полифенола и высвобождение его из материала. В качестве ангидрида был использован глутаровый ангидрид, который в результате реакции с фенолами формирует замещенный глутарат, вторая карбоксильная группа которого позволяет легко включить полученный продукт в состав полипептидной цепи.

В результате реакции таксифолина с глутаровым ангидридом был получен пентаглутарат таксифолина, что подтверждают данные ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии. В дальнейшем данный продукт был включен в состав геля на основе коллагена, для чего использовали метод активации карбоксильных групп реактивом DMТММ [17]. В результате активации карбоксильные группы легко вступают в реакцию с первичными аминами, в том числе с аминогруппой лизина, входящего в состав коллагена. В процессе формирования новых амидных связей коллаген меняет свое агрегатное состояние до гелеобразного. После отмывки геля от низкомолекулярных соединений, была изучена динамика высвобождения полифенола из геля, железо-восстанавливающая и антиоксидантная активности полифенола, входящего в состав геля и высвобождаемого из него.

Согласно литературным данным, высвобождение из коллагенового геля низкомолекулярных веществ, не связанных с полипептидными цепями, ограничивается их диффузией и не превышает 10–20 мин [22,23]. В случае химически связанного с коллагеном полифенола динамика высвобождения имеет логарифмическую зависимость (рис. 1). За первые сутки высвобождается не более 10% связанного полифенола, при этом на вторые сутки высвобождение полифенола составляет не более 2%. По-видимому, на начальном этапе происходит высвобождение полифенола, имеющего минимальное количество связей с коллагеном. В пользу данного предположения также свидетельствуют литературные данные, согласно которым гидролиз пентаацетата таксифолина протекает по положениям 7, 3', 4' и 5 [13], при этом гидролитическое расщепление эфирной связи по положению 3, по-видимому, происходит в более жестких условиях. Можно предположить, что наличие остатков глутарового ангидрида по положениям 3' и 4' будет влиять на окислительно-восстановительные свойства высвободившегося полифенола, так как именно соседние гидроксильные группы В-кольца участвуют в делокализации электронной плотности и стабилизации радикала, формируемого в результате окислительно-восстановительных реакций. Согласно литературным данным, незамещенный таксифолин способен довольно эффективно восстанавливать ионы металлов переменной валентности, и в определенных условиях соотношение восстановленные ионы/полифенол может достигать значения 9:1 [18]. Столь эффективное восстановление ионов переходных металлов связывают с превращениями полифенолов, протекаю-

Железовосстанавливающая способность полифенола, высвобождаемого из коллагенового геля

	Время предварительной инкубации геля в фосфатно-солевом буфере, ч					
	0,5	1	2	3	4	24
[Полифенол], мкМ	43,5 ± 4,2	38,8 ± 4,0	27,8 ± 2,6	30,2 ± 2,7	32,3 ± 3,1	3,5 ± 3,2
[Fe ²⁺], мкМ	90,2 ± 8,5	79,6 ± 8,0	56,0 ± 5,5	59,8 ± 5,7	60,6 ± 6,1	6,6 ± 5,4
[Fe ²⁺]/[полифенол]	2,07	2,05	2,02	1,98	1,88	1,89

Примечание. После предварительной инкубации раствор заменяли на новый и инкубировали 24 ч, после чего анализировали восстанавливающую способность полифенола в супернатанте.

щими по двум различными механизмам. Согласно первому механизму реакции, происходит расщепление С-кольца и последующая деградация алкильного фрагмента циннамоильного остатка полифенола. Тогда как по второму механизму, происходит окислительная полимеризация полифенола с формированием олигомерных молекул [24,25]. Тем не менее полифенол, высвобождаемый из геля, проявляет существенно меньшую восстанавливающую способность на протяжении всего эксперимента. В перерасчете на высвобождаемое количество полифенола наблюдается восстановление двукратного количества ионов железа (III) (таблица). Данный эффект, по-видимому, связан с наличием заместителей в А- и С-кольцах полифенола, препятствующих как реакции олигомеризации, так и расщеплению С-кольца, за счет стерических препятствий. В свою очередь, восстановление двух эквивалентов железа свидетельствует в пользу отщепления глутаровых заместителей по положениям 3' и 4' В-кольца. По-видимому, структура полифенола, высвобождаемого в первые часы и в последующие сутки, не отличается, что косвенно подтверждается отсутствием изменений в металлвосстанавливающей способности полифенола (таблица).

Использование материалов подобного рода направлено на улучшение регенерационных процессов, сопровождающихся на определенных этапах воспалительной реакцией [6], и, следовательно, присутствием АФК. Нейтрофилы – клетки, которые играют ключевую роль во время воспалительной стадии регенерации и продуцируют АФК в зоне повреждения и в организме в целом [26]. Поэтому на следующем этапе работы было изучено действие препаратов (таксифолина, глутарата таксифолина и геля, содержащего полифенол) на продукцию АФК нейтрофилами. Продукцию АФК индуцировали ФМА. Для введения в систему фиксированного количества полифенола, гель, содержащий полифенол, гомогенизировали и инкубировали в течение 30 мин в фосфатно-солевым буферном растворе, после чего проводили добавки полученной суспензии наряду с другими препаратами. Было показано, что ингибирование ХЛ-ответа на 50% наблюдается в присутствии таксифолина и глутарата таксифолина в концентрации порядка 0,03 мкМ, тогда как соответствующая концентрация для гелеобразного препарата составила порядка 0,48 мкМ (рис. 2), что приблизительно в десять раз больше по сравнению с несвязанными с коллагеном

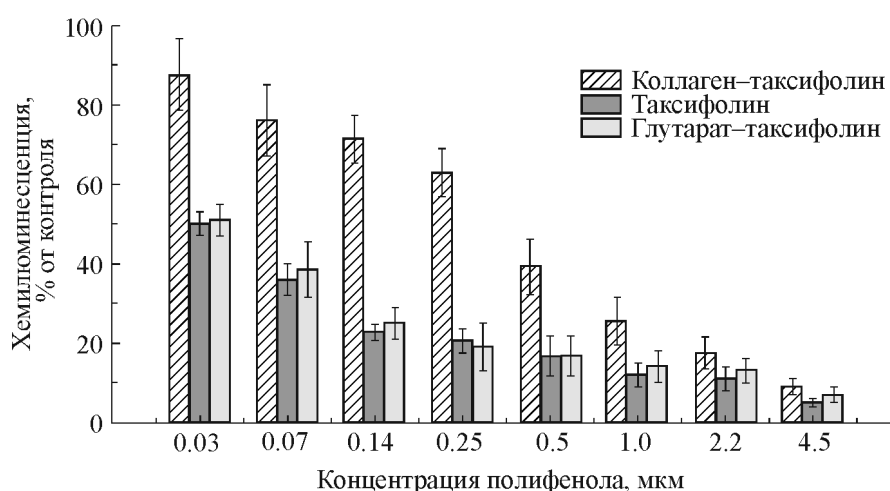


Рис. 2. Влияние препаратов на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами.

полифенолами. Хотя остается неясной столь высокая антиоксидантная активность глутарата таксифолина (которая, возможно, связана с гидролизом сложно-эфирных связей в условиях окислительного стресса), полученные результаты свидетельствуют о том, что гелеобразный препарат проявляет антиоксидантную активность.

В заключение следует отметить, что в рамках данного исследования был получен материал на основе биodeградебельного полимера – коллагена, включающий в свой состав полифенол, сохраняющий после высвобождения антиоксидантные и металл-восстанавливающие свойства. Результаты настоящего исследования могут быть полезны для дальнейшей разработки тканеинженерных материалов с заданной кинетикой высвобождения активного соединения и являющихся потенциальными материалами для регенеративной медицины.

Авторы выражают благодарность М.В. Молчанову за регистрацию спектров ЯМР.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 15-04-02377 а и 14-44-03622 р_центр_а) с использованием приборов ЦКП ИТЭБ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. S. Boateng, K. H. Matthews, H. N. Stevens, et al., *J. Pharm. Sci.* **97** (8), 2892 (2008).
2. K. G. Cornwell, A. Landsman, and K. S. James, *Clin. Podiatr. Med. Surg.* **26** (4), 507 (2009).
3. J. M. Pachence, *J. Biomed. Mater. Res.* **33** (1), 35 (1996).
4. A. N. Li, S. Li, Y. J. Zhang, et al., *Nutrients* **6** (12), 6020 (2014).
5. B. K. Park, S. Lee, J. N. Seo, et al., *BMB Rep.* **43** (1), 46 (2010).
6. В. С. Шубина и Ю. В. Шаталин, *Цитология* **54** (3), 251 (2012).
7. В. С. Шубина и Ю. В. Шаталин, *Клеточн. технологии в биол. и мед.*, № 3, 160 (2012).
8. J. A. Horton, F. Li, E. J. Chung, et al., *Radiat. Res.* **180** (2), 205 (2013).
9. R. Costa, R. Negro, I. Valente, et al., *J. Nat. Prod.* **76** (11), 2047 (2013).
10. B. Han, J. Jaurequi, B. W. Tang, et al., *J. Biomed. Mater. Res. A* **65** (1), 118 (2003).
11. S. Kim, M. E. Nimni, et al., *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **75** (2), 442 (2005).
12. X. Zhang, M. D. Do, P. Casey, et al., *Biomacromolecules* **11** (4), 1125 (2010).
13. E. Kiehlmann, *Organic Preparations and Procedures International* **31** (1), 87 (1999).
14. W. Friess, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **45** (2), 113 (1998).
15. C. N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, et al., *Protein Sci.* **4** (11), 2411 (1995).
16. A. G. Gornall, C. J. Bardawill, and M. M. David, *J. Biol. Chem.* **177** (2), 751 (1949).
17. M. D'Este, D. Eglin, and M. Alini, *Carbohydr. Polym.* **108**, 239 (2014).
18. L. Mira, M. T. Fernandez, M. Santos, et al., *Free Radic. Res.* **36** (11), 1199 (2002).
19. N. Beloborodova, I. Bairamov, A. Olenin, et al., *J. Biomed. Sci.* **19**, 89 (2012).
20. S. Kim and A. Cavaco-Paulo, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93** (2), 585 (2012).
21. W. Mabey and T. Mill, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **7** (2), 383 (1978).
22. R. Sutton, N. Yu, E. Luck, et al., *Sel. Cancer Ther.* **6**, 35 (1990).
23. D. G. Wallace, J. Rosenblatt, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55** (12), 1631 (2003).
24. H. Hotta, H. Sakamoto, S. Nagano, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1526** (2), 159 (2001).
25. A. Zhou and O. A. Sadik, *J. Agric. Food. Chem.* **56** (24), 12081 (2008).
26. G. C. Gurtner, S. Werner, Y. Barrandon, et al., *Nature* **453** (7193), 314 (2008).

Collagen and Taxifolin-based Material: Production and Properties

Yu.V. Shatalin* ** and V.S. Shubina* **

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Pushchino State Institute of Natural Sciences, prosp. Nauki 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The possibility of producing the material based on collagen and biologically active polyphenol – taxifolin was explored, and the properties of the material were studied. The data on the dynamics of the release of polyphenol chemically linked to collagen are represented, and the metal-reducing activity of polyphenol released from the gel is determined. The effect of taxifolin, taxifolin glutarate and gel containing polyphenol on the production of reactive oxygen species by neutrophils stimulated with phorbol myristate acetate was examined. It was shown that polyphenol released from the gel material exerts antioxidant and metal-reducing properties, suggesting that unoxidized polyphenol linked to collagen.

Key words: taxifolin, collagen, polyphenol release, antioxidant activity, metal-reducing activity