

УДК 577.114.4

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ КВАТЕРНИЗИРОВАННОГО ХИТОЗАНА, МОДИФИЦИРОВАННОГО ОСТАТКОМ ГАЛЛОВОЙ КИСЛОТЫ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЕРОКСИДАЗЫ, ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА

© 2022 Д.Б. Киселевский^{1*}, А.В. Ильина², А.П. Луньков²,
В.П. Варламов², В.Д. Самуилов¹

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
кафедра иммунологии, 119234 Москва, Россия; электронная почта: dkiselevs@mail.ru

² Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
Институт биоинженерии имени К.Г. Скрябина, лаборатория инженерии биополимеров, 119071 Москва, Россия

Поступила в редакцию 10.11.2021

После доработки 15.12.2021

Принята к публикации 22.12.2021

Синтезирован хитозан, модифицированный (2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропильной группой и остатком галловой кислоты – кватернизированный хитозан с галловой кислотой (КХГ). Исследованы его антиоксидантные свойства. Пероксидаза в комбинации с NADH и салицилгидроксаматом (СГ) вызывала поглощение кислорода и образование H₂O₂ в водном растворе в результате восстановления O₂ в пероксидазно-оксидазных реакциях. КХГ снижал скорости поглощения O₂ и образования H₂O₂. Таким же действием обладали антиоксидант пропилагаллат (ПГ) и супероксиддисмутаза (СОД), но не кватернизированный хитозан (КХ) без галловой кислоты. Испытан эффект производных хитозана на образование активных форм кислорода (АФК) в клетках эпидермиса гороха и их гибель, которую регистрировали по разрушению клеточных ядер. КХГ, КХ и СОД не оказывали эффекта, а ПГ уменьшал скорость образования АФК в клетках эпидермиса, которое было вызвано NADH с СГ или менадионом. КХГ и КХ предотвращали разрушение ядер устьичных клеток в эпидермисе из листьев гороха, вызванное NADH с СГ или KCN. СОД не оказывала влияния на разрушение ядер, а действие ПГ зависело от индуктора гибели клеток. Подавление разрушения ядер производными хитозана связано не с их антиоксидантным действием, а с повреждением плазматической мембраны клеток. Полученные результаты свидетельствуют о том, что КХГ проявляет антиоксидантные свойства в растворах, но не препятствует образованию АФК в клетках растений. Механизм его антиоксидантного действия сходен с таковыми для ПГ и СОД.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хитозан, кватернизированный хитозан, пероксидаза, супероксиддисмутаза, активные формы кислорода, пропилагаллат.

DOI: 10.31857/S0320972522010080

ВВЕДЕНИЕ

Хитин – основной структурный полисахарид покровов членистоногих и один из важнейших компонентов клеточных стенок грибов. Он состоит из остатков N-ацетилглюкозамина, соединённых β-1,4-гликозидными связями. Дезацетилизацией хитина получают хитозан,

включающий остатки N-ацетилглюкозамина и глюкозамина. В отличие от хитина хитозан растворим в кислых водных растворах и обладает большей реакционной способностью благодаря свободным аминогруппам в составе полимера. Модификация хитозана различными химическими группами усиливает его реакционную способность. Хитозан и его производные проявляют антимикробное, антиоксидантное и иммуномодулирующее действия. Благодаря своим свойствам они могут использоваться в различных отраслях промышленности и в здравоохранении [1]. Из-за биоразлагаемости, антимикробных и антиоксидантных свойств, которые важны при хранении пищевых продуктов, перспективно применение хитозана и его

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; КХ – кватернизированный хитозан; КХГ – кватернизированный хитозан с галловой кислотой; ПГ – пропилагаллат; СГ – салицилгидроксамат; СОД – супероксиддисмутаза; Amplex Red – N-ацетил-3,7-дигидроксибензоксазин; DCF – 2',7'-дихлорфлуоресцеин; DCFH-DA – диацетат 2',7'-дихлорфлуоресцина; PI – йодид пропидия.

* Адресат для корреспонденции.

производных в качестве упаковочных материалов [2].

Противомикробные эффекты хитозана, предположительно, включают агглютинацию клеток микроорганизмов, повреждение их клеточной мембраны, угнетение роста микроорганизмов и продукции ими токсинов за счёт хелатирования металлов хитозаном, ингибирование транскрипции и трансляции, подавление активности H^+ -АТФазы и хемиосмотически регулируемого транспорта веществ [3]. Антимикробную активность хитозана определяют его молекулярная масса и катионный заряд [2].

Синтезировано производное хитозана, в котором к аминогруппе в остатке глюкозамина присоединена (2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропильная группа (реакция кватернизации). Коммерчески доступный алкилирующий агент (хлорид глицидилтриметиламмония), одностадийность и селективность реакции делают получение катионных производных хитозана данного типа наиболее привлекательным [4]. Кватернизированный хитозан обладал более широким интервалом растворимости (рН 3–11), чем исходный хитозан, а также эффективнее подавлял рост бактерий и грибов [5].

Хитозан и его производные взаимодействуют с активными формами кислорода (АФК). Низкомолекулярный хитозан обладал более сильным антиоксидантным действием, чем высокомолекулярный [6]. Кватернизация хитозана путём присоединения триметиламмонийной группы к атому азота усиливала его антиоксидантные свойства [7]. Для утилизации АФК перспективны производные хитозана, содержащие галловую кислоту [8] в качестве антиоксиданта [9, 10].

Антиоксидантные свойства галловой кислоты могут усиливаться в результате её связывания с полимером. Полисахарид ламинарин, модифицированный галловой кислотой, проявлял большую антиоксидантную активность, чем ламинарин и галловая кислота сами по себе [11]. Анализ свойств галловой кислоты и её конъюгата с хитозаном показал, что эффективность полимера как антиоксиданта в модели перекисного окисления линолевой кислоты была выше [12].

Немодифицированный хитозан обладает множеством эффектов на клетки растений: повышает их иммунную защиту, инициирует гибель клеток, усиливает образование АФК, вызывает приток Ca^{2+} в клетки, активирует MAP-киназы, ингибирует H^+ -АТФазу плазматической мембраны, стимулирует синтез фитогормонов и вызывает изменение хроматина [3, 13]. На поверх-

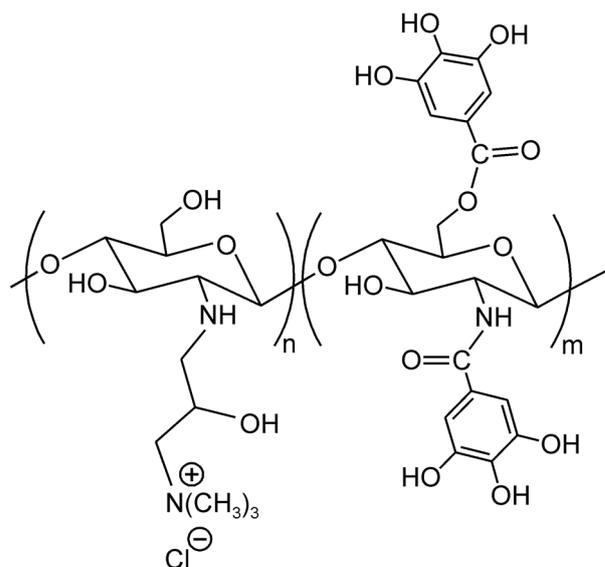


Рис. 1. Структура КХГ

ности клеток растений имеются рецепторы, распознающие хитиновые олигосахариды и инициирующие иммунный ответ к фитопатогенным грибам [14]. Однако полностью дезацетилированные хитозановые олигомеры не связываются с рецепторами для хитина [15]. Таким образом, хитозан до сих пор остаётся PAMP (pathogen-associated molecular pattern), для которого не найден специфичный рецептор PRR (pattern recognition receptor) [13].

Судя по данным литературы, присоединение галловой кислоты к полимеру на основе хитозана будет усиливать его антиоксидантное действие. Благодаря своим антиоксидантным и противомикробным свойствам, а также растворимости кватернизированный хитозан представляется хорошей платформой для такой модернизации. Кроме того, от этого производного можно ожидать меньшего вмешательства в процессы, протекающие внутри клеток, по сравнению с низкомолекулярными антиоксидантами и обычным хитозаном.

Получено производное низкомолекулярного хитозана, модифицированное (2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропильной группой и природным фенольным антиоксидантом – галловой кислотой (КХГ). Его структура представлена на рис. 1. В качестве контроля и исходного соединения для синтеза КХГ использован кватернизированный хитозан (КХ) без галловой кислоты. Цель работы – изучить антиоксидантные свойства КХГ в сравнении с КХ, а также испытать действие этих производных хитозана на образование АФК в клетках растений и их гибель.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

КХ (N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропил]хитозан хлорид) синтезирован на основе хитозана с молекулярной массой 20 кДа и степенью дезацетилирования 98% в результате взаимодействия с (2,3-эпоксипропил)триметиламмоний хлоридом в водной среде. Степень замещения по данным кондуктометрического титрования и ^1H ЯМР составила 58% [5].

КХГ получали в результате введения в КХ остатков галловой кислоты с использованием (N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид гидрохлорида и N-гидроксисукцинимид [16]. Содержание галловой кислоты было определено с использованием реактива Фолина–Чокалтеу и составило 163 мг/г полимера.

Содержание O_2 в растворе регистрировали в полярографической ячейке при помощи закрытого платинового электрода, подключенного к аналого-цифровому преобразователю Record4 (Пушино, Россия), с использованием сопутствующего программного обеспечения. Полярографическая ячейка объёмом 1,5 мл содержала среду инкубации: 50 мМ Tricin-KOH (pH 7,8), 35 мМ NaCl и 1 мМ MgCl_2 . В полярографическую ячейку последовательно вносили реагенты.

Содержание H_2O_2 в растворе измеряли методом флуориметрии с применением N-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазина, Amplex Red, («Molecular Probes», США). Реакция нефлуоресцирующего Amplex Red с H_2O_2 катализируется пероксидазой и ведёт к образованию флуоресцирующего резорурфина [17, 18]. В пластиковую кювету с 2 мл среды инкубации, содержащей 50 мМ Tricin-KOH (pH 7,8), 35 мМ NaCl и 1 мМ MgCl_2 , последовательно добавляли Amplex Red и другие реагенты. Флуоресценцию резорурфина детектировали с помощью флуориметра VersaFluor («Bio-Rad», США), возбуждая её светом 505–515 нм и регистрируя при 585–595 нм.

Проростки гороха (*Pisum sativum* L. сорт Альфа) выращивали 11–18 сут. при периодическом освещении (свет – 16 ч, темнота – 8 ч) металлогалогеновой лампой ДРиЗ, 250 Вт, с интенсивностью света $\sim 100 \text{ мкЕ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$. Интенсивность света измеряли сенсором Quantitherm PAR/Temp («Hansatech», Великобритания). Плёнки эпидермиса отделяли от нижней поверхности листьев пинцетом.

АФК в клетках гороха определяли по флуоресценции 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCF), образующегося из нефлуоресцирующего диацетата 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCFH-DA). Проникающая в клетки через плазматическую мембрану, DCFH-DA дезацетилируется внутриклеточными эстеразами и окисляется АФК, преимущественно

но H_2O_2 с участием пероксидаз, превращаясь во флуоресцирующий DCF. В образование DCF могут быть вовлечены ионы металлов переменной валентности и цитохром c, обладающий активностью, сходной с пероксидазной [19, 20]. Плёнку эпидермиса, закреплённую на пластиковой пластинке с помощью силиконового геля, помещали в кювету с 2 мл среды инкубации, содержащей 50 мМ Tricin-KOH (pH 7,8), 35 мМ NaCl и 1 мМ MgCl_2 . В кювету последовательно добавляли DCFH-DA и другие реагенты. Флуоресценцию DCF измеряли с помощью флуориметра VersaFluor, возбуждая её светом 485–495 нм и регистрируя при 515–525 нм.

Для определения действия реагентов на состояние клеток плёнки эпидермиса помещали в 2 мл бидистиллированной воды в полистирольных планшетах, добавляли реагенты и инкубировали. Контроль – без добавок реагентов. Условия инкубации представлены в подписях к рисункам.

Гибель клеток гороха регистрировали по разрушению клеточных ядер [21]. После инкубации эпидермис 5 мин обрабатывали фиксатором Батталья (смесь хлороформа, 96%-ного этанола, ледяной уксусной кислоты и 40%-ного формалина в соотношении 5/5/1/1), промывали в этиловом спирте и воде в течение 10 и 5 мин соответственно, затем окрашивали ядерным красителем гематоксилином Карацци в течение 1 ч. Окрашенные плёнки эпидермиса промывали водой и исследовали на световом микроскопе Primo Star («Carl Zeiss», Германия). Для каждого варианта опыта определяли долю клеток с разрушенными ядрами и лишёнными ядер.

Проницаемость плазматической мембраны клеток определяли с помощью флуоресцирующего красителя йодида пропидия (PI, («Fluka», США)), связывающегося с ДНК клеточных ядер и не проникающего через неповреждённую мембрану [22]. После инкубации плёнки эпидермиса окрашивали 2 мкМ PI в течение 20 мин и исследовали с использованием флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M («Carl Zeiss»). Флуоресценцию PI возбуждали светом 525–565 нм и регистрировали при 575–640 нм. Подсчитывали долю клеток, в ядрах которых флуоресцирует PI, т.е. с проницаемой для PI плазматической мембраной.

Для определения количества клеток с разрушенными ядрами или с проницаемой для PI клеточной мембраной в каждом варианте опыта исследовали 300–600 клеток в 2–3 плёнках эпидермиса. Эксперименты повторяли 2–3 раза. Приводятся результаты типичных экспериментов: средние значения $\pm 95\%$ -ные доверительные интервалы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

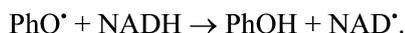
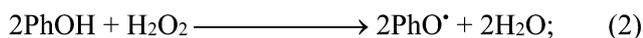
Испытано действие КХГ в системе, генерирующей супероксидный анион-радикал (O_2^-). Используя NADH как донор электронов, фермент пероксидаза хрена (КФ 1.11.1.7) катализирует реакции с образованием O_2^- , называемые пероксидазно-оксидазными [23]:

Пероксидаза



NADH восстанавливает пероксидазу и без H_2O_2 . H_2O_2 или O_2 впоследствии нужны для возвращения фермента в исходное состояние [23]. Ряд фенольных соединений (PhOH), включая использованный в работе салицилгидроксамат (СГ), – субстраты пероксидазы, которые ускоряют окисление NADH и образование O_2^- [24, 25]:

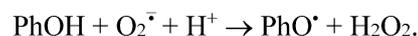
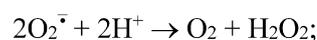
Пероксидаза



Оксиметрически регистрировали содержание O_2 в водном растворе. Пероксидаза, NADH и СГ инициировали поглощение O_2 в результате его восстановления до O_2^- (рис. 2). В этой реакции СГ можно заменить другим соединением

фенольной природы, например, фенолом или 2,4-дихлорфенолом, но не салициловой кислотой [26]. Реакция шла с высокой скоростью лишь после добавки всех трёх компонентов в любой последовательности. Антиоксидант пропилгаллат (ПГ) подавлял поглощение O_2 (рис. 2, а). КХГ (рис. 2, б и в), но не КХ (рис. 2, в), снижал скорость поглощения O_2 . Супероксиддисмутаза (СОД), катализирующая превращение O_2^- в O_2 и H_2O_2 , также уменьшала скорость поглощения O_2 (рис. 2, з).

В результате спонтанной дисмутации [27] и в реакциях O_2^- с NADH или фенольными соединениями (например, СГ) [23, 25] образуется H_2O_2 :



Таким образом, пероксидаза с NADH и СГ служит также и источником H_2O_2 , который детектировали флуориметрически с помощью Amplex Red. Добавка пероксидазы и H_2O_2 вызвала образование флуоресцирующего резорурфина (рис. 3, а). Величина квантового выхода флуоресценции зависела от концентрации H_2O_2 . Комбинация пероксидазы, NADH и СГ (независимо от последовательности их добавления) вела к росту выхода флуоресценции (рис. 3, б–д), который подавлялся каталазой, утилизирующей H_2O_2 , СОД (рис. 3, б) и ингибитором пероксида-

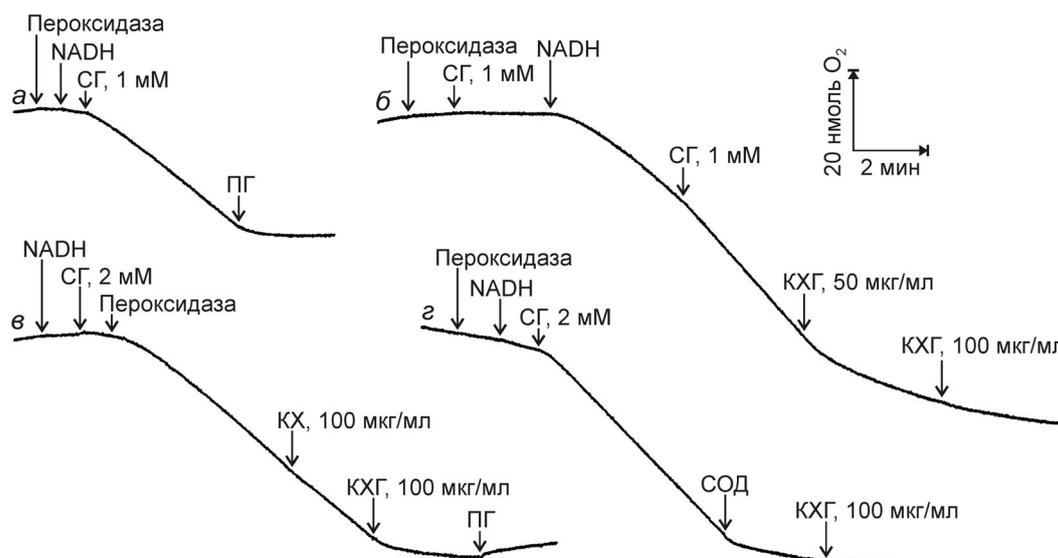


Рис. 2. Действие КХГ на поглощение O_2 в оксидазной реакции пероксидазы. Добавки: 40 ед. активности/мл пероксидазы хрена; 1 мМ NADH; СГ; 0,2 мМ ПГ; КХГ; КХ; 40 ед. активности/мл супероксиддисмутазы (СОД)

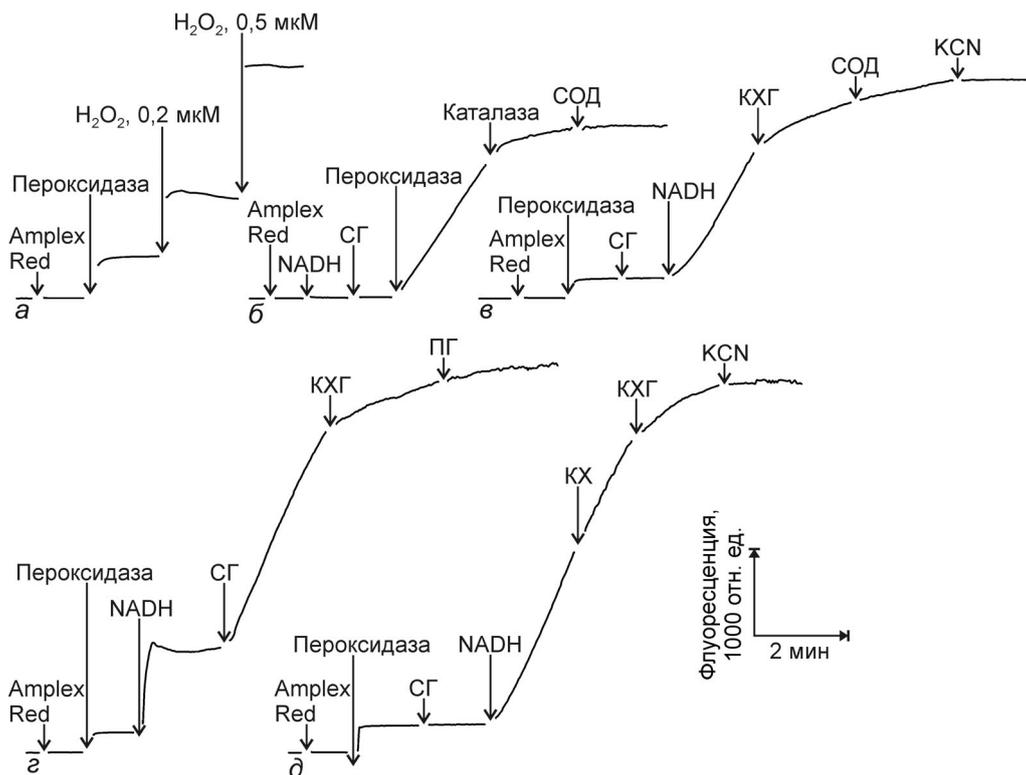


Рис. 3. Действие КХГ на H_2O_2 -зависимое образование флуоресцирующего резорфина в результате окисления нефлуоресцирующего Amplex Red пероксидазой. Добавки: 5 мкМ Amplex Red; 20 (а) или 5 (б–д) ед. активности/мл пероксидазы хрена; H_2O_2 ; 0,1 мМ NADH; 0,5 мМ СГ; 40 ед. активности/мл каталазы; 20 ед. активности/мл СОД; 100 мкг/мл КХГ; 2,5 мМ KCN; 0,2 мМ ПГ; 100 мкг/мл КХ

зы KCN (рис. 3, в и д). Скорость образования флуоресцирующего резорфина уменьшалась после добавки КХГ (рис. 3, в–д), но не КХ (рис. 3, д). Снижение скорости образования резорфина СОД и ПГ на фоне добавленного КХГ было небольшим (рис. 3, в и г). Данные рис. 2 и 3 демонстрируют антиоксидантные свойства КХГ и свидетельствуют о сходстве эффектов КХГ, СОД и ПГ на образование АФК: O_2^- и H_2O_2 .

Может ли КХГ действовать как антиоксидант применительно к живым клеткам и защищать их от окислительного повреждения и гибели? Испытано действие КХГ на генерацию АФК в клетках эпидермиса, изолированных из листьев гороха. АФК в клетках детектировали по флуоресценции DCF. Добавка к плёнкам эпидермиса гороха NADH в комбинации с СГ вызывала образование АФК в клетках, проявляющееся в росте выхода флуоресценции (рис. 4, а). Клеточные мембраны непроницаемы для NADH, однако снаружи клеток в апопласте есть оксидоредуктазы, составляющие третью по величине группу среди всех белков клеточной стенки у растений. Около половины апопластных оксидоредуктаз – это пероксидазы [28, 29]. Ни КХГ, ни СОД не снижали скорость образования флуо-

ресцирующего DCF, в отличие от ПГ и KCN (рис. 4, а).

Другой индуктор образования АФК – менадион (2-метил-1,4-нафтохинон, витамин K_3). Менадион в клетках подвергается окислению и восстанавливает O_2 [30, 31]. Менадион увеличивал скорость образования DCF, которая была нечувствительна к последующим добавкам КХ, КХГ и СОД, но снижалась ПГ и KCN (рис. 4, б).

Разрушение ядер клеток у растений – надёжный и удобный для микроскопии признак программируемой клеточной смерти (ПКС). Поскольку хлоропласты могут участвовать в ПКС у растений, инкубацию эпидермиса из листьев гороха с реагентами проводили в темноте или при освещении, т.е. в условиях, поддерживающих фотосинтез [21]. NADH вызывал разрушение ядер замыкающих клеток устьиц (устьичных клеток) в эпидермисе из листьев гороха (рис. 5). Эффект NADH не различался в темноте и на свету. СГ увеличивал NADH-зависимое разрушение ядер. КХ и КХГ в концентрации 20 мкг/мл, СОД и ПГ не влияли на разрушение ядер, вызванное NADH в комбинации с СГ. КХ и КХГ в концентрации 100 мкг/мл подавляли разрушение ядер, индуцированное NADH и СГ (рис. 5).

KCN, ингибирующий гем-содержащие ферменты, в том числе каталазу и пероксидазы, вызвал разрушение ядер устьичных клеток (рис. 6). Освещение усиливало эффект KCN, что соответствует данным, полученным ранее [21]. KCN воздействует на хлоропласты: выключает фотосинтетическое выделение O_2 , ингибируя рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазу. Это должно вести к уменьшению пула конечного акцептора электронов $NADP^+$ и восстановлению компонентов фотосинтетической электронтранспортной цепи [32]. Ингибиторы переноса электронов и акцепторы электронов, окисляющие компоненты электронтранспортной цепи хлоропластов, уменьшали разрушение ядер устьичных клеток, которое вызывала инкубация эпидермиса из листьев гороха с KCN на свету. Анализ разрушения ядер устьичных клеток, имеющих хлоропласты, и основных клеток эпидермиса (эпидермальных клеток), не содержащих хлоропластов, позволил сделать вывод о влиянии света и участии хлоропластов в гибели клеток растений. KCN-Индуктированное разрушение клеточных ядер на свету зависит от АФК и редокс-состояния пластохинона [21]. Однако свет не влиял на разрушение ядер, вызванное NADH или NADH в комбинации с СГ (рис. 5). Учитывая, что NADH не проникает в клетки, и его эффект, предположительно, связан с пероксидазной активностью в апопласте, неудивительно, что действие NADH не зависит от освещения, в отличие от KCN.

KX и KXГ в темноте и на свету не оказывали эффекта при 20 мкг/мл и уменьшали количество клеток с разрушенными ядрами в концентрации

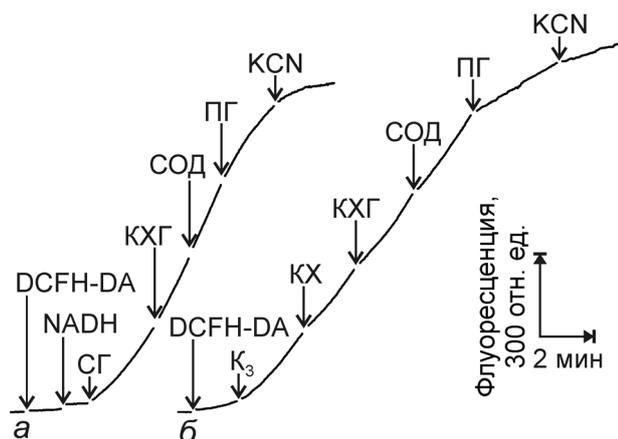


Рис. 4. Действие KXГ на H_2O_2 -зависимое образование флуоресцирующего DCF из нефлуоресцирующего DCFH-DA в клетках эпидермиса из листьев гороха. Добавки: 20 мкМ DCFH-DA; 1 мМ NADH; 2 мМ СГ; 100 мкг/мл KXГ; 20 ед. активности/мл СОД; 0,5 мМ ПГ; 2,5 мМ KCN; 0,1 мМ менадиона (K_3); 100 мкг/мл KX

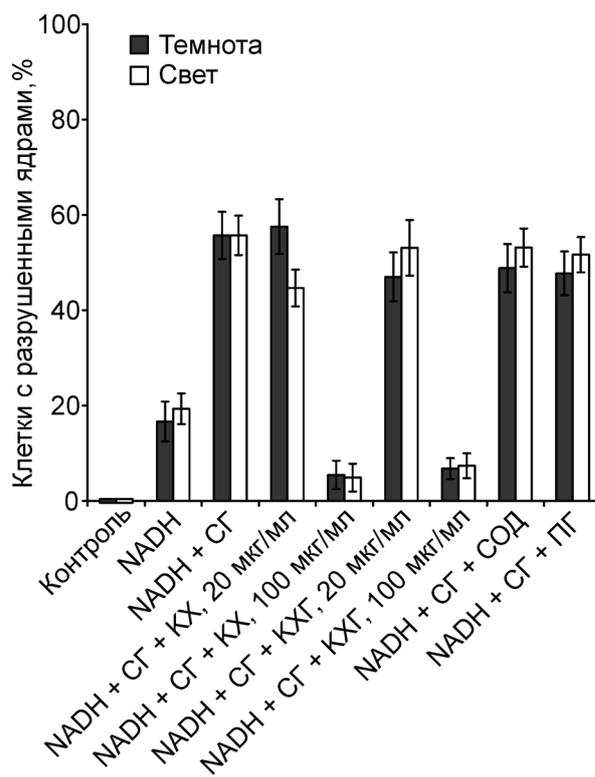


Рис. 5. Действие KX и KXГ на разрушение ядер устьичных клеток в плёнках эпидермиса из листьев гороха, вызванное NADH и СГ. К плёнкам эпидермиса добавляли 4 мМ NADH; 2 мМ СГ; КХ; КХГ; 40 ед. активности/мл СОД; 1 мМ ПГ и инкубировали 23 ч в темноте или на свету

100 мкг/мл. СОД не влияла на разрушение ядер, вызванное KCN, а ПГ ингибировал его (рис. 6).

ПГ не оказывал действия на разрушение ядер, зависимое от NADH и СГ (рис. 5), но предотвращал KCN-индуцированное разрушение ядер (рис. 6). ПГ эффективнее подавлял образование АФК, вызванное менадионом, а не NADH с СГ (рис. 4). По-видимому, эффект ПГ зависит от локализации источника АФК. Вероятно, также играет роль взаимодействие реагентов с компонентами митохондриальной электрон-транспортной цепи: KCN подавляет цитохром *c*-оксидазу, фермент основной ветви дыхательной цепи у растений, а СГ и ПГ – ингибиторы альтернативной оксидазы, нечувствительной к KCN [33]. Нарушение работы альтернативной оксидазы усиливает продукцию АФК митохондриями в клетках растений [34, 35].

Поликатионы хитозан, цитохром *c*, полилизин, полиэтиленмин и протамин, а также детергенты Triton X-100 и лаурилдиметиламин-N-оксид вызывали повреждение плазматической мембраны устьичных клеток, которое регистрировали по флуоресценции PI в клеточных ядрах. Этот краситель не проникает через интактную

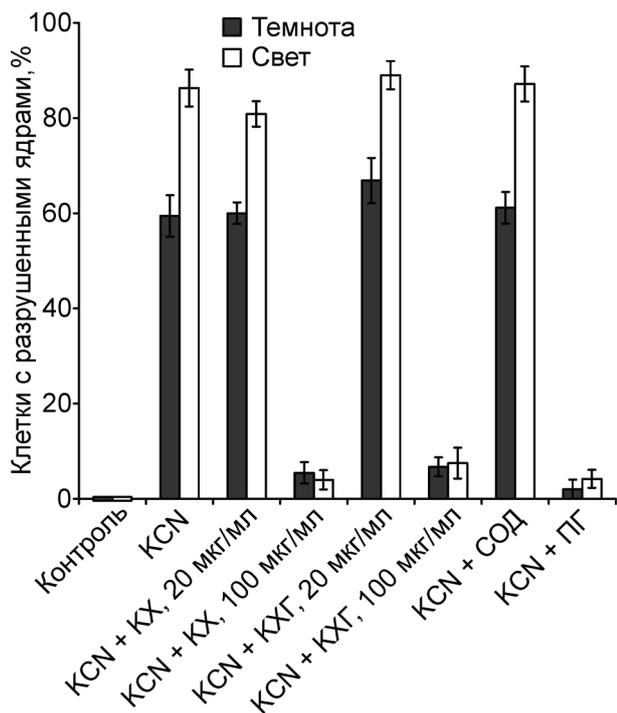


Рис. 6. Действие КХ и КХГ на KCN-индуцированное разрушение ядер устьичных клеток в плёнках эпидермиса из листьев гороха. К плёнкам эпидермиса добавляли 2,5 мМ KCN; КХ; КХГ; 20 ед. активности/мл СОД; 0,5 мМ ПГ и инкубировали 18 ч в темноте или на свету

клеточную мембрану. При этом детергенты и поликатионы предотвращали разрушение клеточных ядер, вызванное KCN [36, 37]. Повреждение плазматической мембраны – признак некроза, очевидно, может сопровождаться частичным высвобождением содержимого клетки, нарушением внутриклеточных процессов и препятствует разрушению ядер клеток.

Чем обусловлен эффект КХ и КХГ в концентрации 100 мкг/мл, который проявлялся в подавлении разрушения ядер, индуцированном NADH и СГ (рис. 5) или KCN (рис 6): антиоксидантными свойствами или повреждением клеточной мембраны? Испытано действие КХ и КХГ на проницаемость плазматической мембраны устьичных клеток для PI в сравнении с детергентом Triton X-100. Triton X-100 вызывал проникновение PI в клетки (рис. 7). КХ и КХГ в концентрации 20 мкг/мл не влияли на проницаемость плазматической мембраны клеток для PI, а в более высоких концентрациях (100 или 500 мкг/мл) способствовали проникновению PI в клетки (рис. 7). Данные показывают, что подавление разрушения ядер КХ и КХГ связано с повреждением клеточной мембраны.

Полученные результаты свидетельствуют об антиоксидантных свойствах КХГ. Они, очевид-

но, зависят от остатка галловой кислоты в составе полимера, поскольку КХ не обладал действием, подобным КХГ (рис. 2 и 3). На рис. 8 представлены возможные химические реакции O_2^- с остатком галловой кислоты в КХГ, аналогичные предполагаемому взаимодействию O_2^- и ПГ [38]. ПГ, вероятно, каталитически осуществляет дисмутацию O_2^- , имитируя СОД [39]. Происходит окисление остатка галловой кислоты с образованием феноксильного радикала и H_2O_2 (1). Далее возможно его восстановление с выделением O_2 (2). Возможно также повторное окисление феноксильного радикала в реакции с O_2^- (3), которое ведёт к образованию H_2O_2 и впоследствии гидрокси-*o*-хинона [38]. Однако при этом O_2^- будет эквимольно превращён в H_2O_2 , а это противоречит данным с Amplex Red (рис. 3), в которых добавка КХГ снижала образование H_2O_2 . Поэтому представляется более вероятной реакция (2) или происходящее вслед за окислением феноксильного радикала (3) O_2^- -зависимое восстановление гидрокси-*o*-хинона с образованием O_2 (4). Суммарно реакции (1) и (2) и реакции (3) и (4) представляют собой дисмутацию O_2^- .

Первые работы, в которых описано включение остатка галловой кислоты в состав хитозана, опубликованы в 2009 г. [40, 41]. Присоединение галловой кислоты к хитозану и его производным,

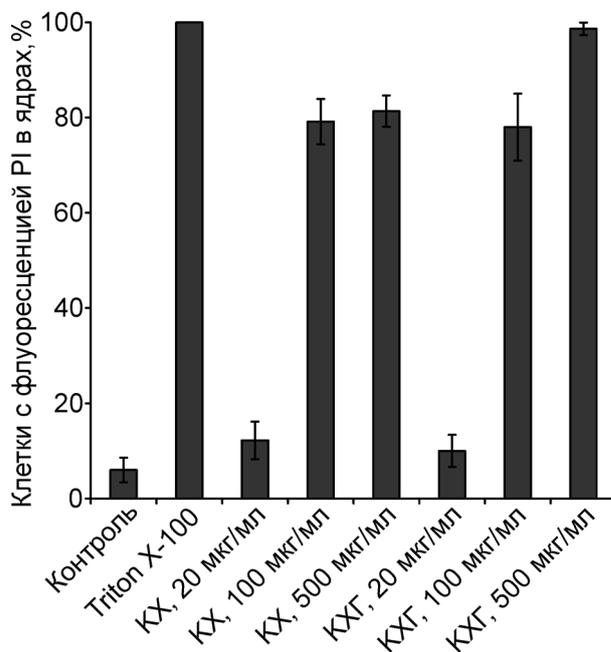


Рис. 7. Действие КХ и КХГ на проницаемость плазматической мембраны устьичных клеток в плёнках эпидермиса из листьев гороха для PI. К плёнкам эпидермиса добавляли 1 мМ Triton X-100, КХ, КХГ, инкубировали 30 мин при перемешивании на магнитной мешалке, а затем ещё 3 ч инкубировали в темноте без перемешивания

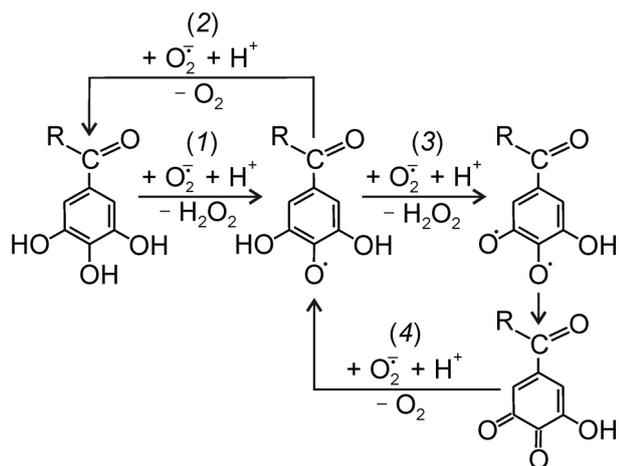


Рис. 8. Предполагаемые реакции остатка галловой кислоты в составе КХГ с O_2^- . R – остаток кватернизированного хитозана

в том числе кватернизированным, повышало антимикробный эффект и обеспечивало или в значительной степени усиливало антиоксидантную активность полимера, которую определяли различными методами *in vitro* и *in vivo* [42–45]. Таким образом, данные литературы соответствуют результатам настоящего исследования.

В целом, полученные результаты позволяют заключить, что КХГ, в отличие от КХ, проявля-

ет антиоксидантные свойства в растворах, но не препятствует образованию АФК внутри клеток растений, как показывают опыты с DCF. По механизму его антиоксидантное действие сходно с ПГ и особенно с СОД. СОД и КХГ – высокомолекулярные соединения, не проникают в клетки и не защищают их от гибели, вызванной NADH с СГ или KCN. Однако, обладая, в отличие от СОД, свойствами поликатиона, КХГ в концентрации от 100 мкг/мл и выше вызывает повреждение плазматической мембраны клеток.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121042600047-9, а также Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология». Работа по получению и анализу производных хитозана частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 20-016-00205).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящее исследование проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wang, W., Xue, C., and Mao, X. (2020) Chitosan: Structural modification, biological activity and application, *Int. J. Biol. Macromol.*, **164**, 4532-4546, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.042.
- Pal, K., Bharti, D., Sarkar, P., Anis, A., Kim, D., et al. (2021) Selected applications of chitosan composites, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 10968, doi: 10.3390/ijms222010968.
- Malerba, M., and Cerana, R. (2016) Chitosan effects on plant systems, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 996, doi: 10.3390/ijms17070996.
- Andreica, B. I., Cheng, X., and Marin, L. (2020) Quaternary ammonium salts of chitosan. A critical overview on the synthesis and properties generated by quaternization, *Eur. Polym. J.*, **139**, 110016, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2020.110016.
- Shagdarova, B., Lunkov, A., Il'ina, A., and Varlamov, V. (2019) Investigation of the properties of N-[(2-hydroxy-3-trimethylammonium) propyl] chloride chitosan derivatives, *Int. J. Biol. Macromol.*, **124**, 994-1001, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.209.
- Tomida, H., Fujii, T., Furutani, N., Michihara, A., Yasufuku, T., et al. (2009) Antioxidant properties of some different molecular weight chitosans, *Carbohydr. Res.*, **344**, 1690-1696, doi: 10.1016/j.carres.2009.05.006.
- Luan, F., Wei, L., Zhang, J., Tan, W., Chen, Y., et al. (2018) Preparation and characterization of quaternized chitosan derivatives and assessment of their antioxidant activity, *Molecules*, **23**, 516, doi: 10.3390/molecules23030516.
- Ильина А. В., Варламов В. П. (2016) Нейтрализация активных форм кислорода хитозаном и его производными *in vitro/in vivo*, *Прикладная биохимия и микробиология*, **52**, 5-20, doi: 10.7868/S0555109916010062.
- Yen, G.-C., Duh, P.-D., and Tsai, H.-L. (2002) Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid, *Food Chem.*, **79**, 307-313, doi: 10.1016/S0308-8146(02)00145-0.
- Yilmaz, Y., and Toledo, R. T. (2004) Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 255-260, doi: 10.1021/jf030117h.
- Fernandes-Negreiros, M. M., Batista, L. A. N. C., Viana, R. L. S., Sabry, D. A., Paiva, A. A. O., et al. (2020) Gallic acid-Laminarin conjugate is a better antioxidant than sulfated or carboxylated laminarin, *Antioxidants*, **9**, 1192, doi: 10.3390/antiox9121192.
- Xie, M., Hu, B., Wang, Y., and Zeng, X. (2014) Grafting of gallic acid onto chitosan enhances antioxidant activities and alters rheological properties of the copolymer, *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 9128-9136, doi: 10.1021/jf503207s.
- Hidangmayum, A., Dwivedi, P., Katiyar, D., and Hemantaranjan, A. (2019) Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress, *Physiol. Mol. Biol. Plants*, **25**, 313-326, doi: 10.1007/s12298-018-0633-1.
- Zipfel, C. (2014) Plant pattern-recognition receptors, *Trends Immunol.*, **35**, 345-351, doi: 10.1016/j.it.2014.05.004.

15. Ye, W., Munemasa, S., Shinya, T., Wu, W., Ma, T., et al. (2020) Stomatal immunity against fungal invasion comprises not only chitin-induced stomatal closure but also chitosan-induced guard cell death, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 20932-20942, doi: 10.1073/pnas.1922319117.
16. Pasanphan, W., and Chirachanchai, S. (2008) Conjugation of gallic acid onto chitosan: an approach for green and water-based antioxidant, *Carbohydr. Polym.*, **72**, 169-177, doi: 10.1016/j.carbpol.2007.08.002.
17. Gomes, A., Fernandes, E., and Lima, J. L. F. C. (2005) Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **65**, 45-80, doi: 10.1016/j.jbbm.2005.10.003.
18. Rhee, S. G., Chang, T. S., Jeong, W., and Kang, D. (2010) Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells, *Mol. Cells*, **29**, 539-549, doi: 10.1007/s10059-010-0082-3.
19. LeBel, C.P., Ischiropoulos, H., and Bondy, S. C. (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress, *Chem. Res. Toxicol.*, **5**, 227-231, doi: 10.1021/tx00026a012.
20. Karlsson, M., Kurz, T., Brunk, U. T., Nilsson, S. E., and Frennsson, C. I. (2010) What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? *Biochem. J.*, **428**, 183-190, doi: 10.1042/BJ20100208.
21. Samuilov, V. D., Lagunova, E. M., Kiselevsky, D. B., Dzyubinskaya, E. V., Makarova, Y. V., et al. (2003) Participation of chloroplasts in plant apoptosis, *Biosci. Rep.*, **23**, 103-117, doi: 10.1023/a:1025576307912.
22. Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M. A., et al. (1992) Features of apoptotic cells measured by flow cytometry, *Cytometry*, **13**, 795-808, doi: 10.1002/cyto.990130802.
23. Yamazaki, I., and Yokota, K. (1973) Oxidation states of peroxidase, *Mol. Cell. Biochem.*, **2**, 39-52, doi: 10.1007/BF01738677.
24. Brooks, J. L. (1983) Stimulation of peroxidase reactions by hydroxamates, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **116**, 916-921, doi: 10.1016/s0006-291x(83)80229-0.
25. Hauser, M. J. B., and Olsen, L. F. (1998) The role of naturally occurring phenols in inducing oscillations in the peroxidase-oxidase reaction, *Biochemistry*, **37**, 2458-2469, doi: 10.1021/bi972424k.
26. Самуилов В. Д., Киселевский Д. Б. (2016) Салицилгидроксамат усиливает НАДН-оксидазную активность пероксидазы в суспензиях митохондрий и хлоропластов гороха, *Вестник Московского университета, Серия 16, Биология*, **1**, 23-28, doi: 10.3103/S0096392516010089.
27. Lee-Ruff, E. (1977) The organic chemistry of superoxide, *Chem. Soc. Rev.*, **6**, 195-214, doi: 10.1039/CS9770600195.
28. Jamet, E., Canut, H., Boudart, G., and Pont-Lezica, R. F. (2006) Cell wall proteins: a new insight through proteomics, *Trends Plant Sci.*, **11**, 33-39, doi: 10.1016/j.tplants.2005.11.006.
29. Liu, Y., Ma, L., Cao, D., Gong, Z., Fan, J., et al. (2021) Investigation of cell wall proteins of *C. sinensis* leaves by combining cell wall proteomics and N-glycoproteomics, *BMC Plant Biol.*, **21**, 384, doi: 10.1186/s12870-021-03166-4.
30. Goldberg, B., and Stern, A. (1976) Production of superoxide anion during the oxidation of hemoglobin by menadione, *Biochim. Biophys. Acta*, **437**, 628-632, doi: 10.1016/0304-4165(76)90029-5.
31. Rosen, G. M., and Freeman, B. A. (1984) Detection of superoxide generated by endothelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7269-7273, doi: 10.1073/pnas.81.23.7269.
32. Samuilov, V. D., Kiselevsky, D. B., Sinitsyn, S. V., Shestak, A. A., Lagunova, E. M., et al. (2006) H₂O₂ intensifies CN⁻-induced apoptosis in pea leaves, *Biochemistry (Moscow)*, **71**, 384-394, doi: 10.1134/s0006297906040067.
33. Moore, A. L., and Siedow, J. N. (1991) The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **1059**, 121-140, doi: 10.1016/s0005-2728(05)80197-5.
34. Popov, V. N., Simonian, R. A., Skulachev, V. P., and Starkov, A. A. (1997) Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria, *FEBS Lett.*, **415**, 87-90, doi: 10.1016/s0014-5793(97)01099-5.
35. Maxwell, D. P., Wang, Y., and McIntosh, L. (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 8271-8276, doi: 10.1073/pnas.96.14.8271.
36. Киселевский Д. Б., Самуилов В. Д. (2019) Проницаемость плазматической мембраны для йодида пропидиа и разрушение ядер клеток в эпидермисе листьев гороха: действие полиэлектролитов и детергентов, *Вестник Московского университета, Серия 16, Биология*, **74**, 188-194, doi: 10.3103/S0096392519030052.
37. Киселевский Д. Б., Шагдарова Б. Ц., Варламов В. П., Самуилова О. В., Самуилов В. Д. (2021) Действие низкомолекулярного хитозана на клетки эпидермиса из листьев гороха, *Вестник Московского университета, Серия 16, Биология*, **76**, 18-23, doi: 10.3103/S0096392521010016.
38. Deeble, D. J., Parson, B. J., Phillips, G. O., Schuchmann, H.-P., and von Sonntag, C. (1988) Superoxide radical reactions in aqueous solutions of pyrogallol and n-propyl gallate: the involvement of phenoxyl radicals. A pulse radiolysis study, *Int. J. Radiat. Biol.*, **54**, 179-193.
39. Reddan, J. R., Giblin, F. J., Sevilla, M., Padgaonkar, V., Dziejczak, D. C., et al. (2003) Propyl gallate is a superoxide dismutase mimic and protects cultured lens epithelial cells from H₂O₂ insult, *Exp. Eye Res.*, **76**, 49-59, doi: 10.1016/s0014-4835(02)00256-7.
40. Curcio, M., Puoci, F., Lemma, F., Parisi, O. I., Cirillo, G., et al. (2009) Covalent insertion of antioxidant molecules on chitosan by a free radical grafting procedure, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 5933-5938, doi: 10.1021/jf900778u.
41. Pasanphan, W., Buettner, G. R., and Chirachanchai, S. (2010) Chitosan gallate as a novel potential polysaccharide antioxidant: an EPR study, *Carbohydr. Res.*, **345**, 132-140, doi: 10.1016/j.carres.2009.09.038.
42. Ren, J., Li, Q., Dong, F., Feng, Y., and Guo, Z. (2013) Phenolic antioxidants-functionalized quaternized chitosan: synthesis and antioxidant properties, *Int. J. Biol. Macromol.*, **53**, 77-81, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2012.11.011.
43. Hu, Q., Wang, T., Zhou, M., Xue, J., and Luo, Y. (2016) *In vitro* antioxidant-activity evaluation of gallic-acid-grafted chitosan conjugate synthesized by free-radical-induced grafting method, *J. Agric. Food Chem.*, **64**, 5893-5900, doi: 10.1021/acs.jafc.6b02255.
44. Wang, Y., Xie, M., Ma, G., Fang, Y., Yang, W., et al. (2019) The antioxidant and antimicrobial activities of different phenolic acids grafted onto chitosan, *Carbohydr. Polym.*, **225**, 115238, doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115238.
45. Bai, R., Yong, H., Zhang, X., Liu, J., and Liu, J. (2020) Structural characterization and protective effect of gallic acid grafted O-carboxymethyl chitosan against hydrogen peroxide-induced oxidative damage, *Int. J. Biol. Macromol.*, **143**, 49-59, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.037.

**INVESTIGATION OF THE ANTIOXIDANT PROPERTIES
OF THE QUATERNIZED CHITOSAN MODIFIED
WITH A GALLIC ACID RESIDUE USING A PEROXIDASE
THAT PRODUCES REACTIVE OXYGEN SPECIES**

D. B. Kiselevsky^{1*}, A. V. Il'ina², A. P. Lunkov², V. P. Varlamov², and V. D. Samuilov¹

¹ *Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia; E-mail: dkiselevs@mail.ru*

² *Laboratory of Biopolymer Engineering, Skryabin Institute of Bioengineering,
Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia*

Chitosan modified with a (2-hydroxy-3-trimethylammonium) propyl group and a gallic acid residue, or quaternized chitosan with gallic acid (QCG), was synthesized. Its antioxidant properties have been investigated. Peroxidase in combination with NADH and salicylhydroxamate (SHAM) caused the consumption of oxygen and the formation of H₂O₂ in an aqueous solution as a result of O₂ reduction in peroxidase-oxidase reactions. QCG reduced the rates of O₂ consumption and H₂O₂ generation. The antioxidant propyl gallate (PG) and superoxide dismutase (SOD) had the same effect, but not quaternized chitosan (QC) without gallic acid. The effect of chitosan derivatives on the production of reactive oxygen species (ROS) in cells of the epidermis from pea leaves and on their death, which was detected by the destruction of cell nuclei, was investigated. QCG, QC, and SOD had no effect, while PG reduced the rate of ROS generation in cells of the epidermis, which was caused by NADH with SHAM or by menadione. QCG and QC prevented the destruction of guard cell nuclei in the epidermis from pea leaves that was caused by NADH with SHAM or by KCN. SOD had no effect on the destruction of nuclei, while the effect of PG depended on the inducer of cell death. The suppression of destruction of the nuclei of guard cells by chitosan derivatives is associated not with their antioxidant effect, but with the disruption of the plasma membrane of the cells. The results obtained indicate that QCG exhibits antioxidant properties in solutions, but does not prevent the formation of ROS in plant cells. The mechanism of its antioxidant action is similar to that of PG and SOD.

Keywords: chitosan, quaternized chitosan, peroxidase, superoxide dismutase, reactive oxygen species, propyl gallate