

ПРОНИКНОВЕНИЕ ПОЛИФЕНОЛОВ ЧЕРЕЗ КОЖУ, ПОВРЕЖДЕННУЮ УКСУСНОЙ КИСЛОТОЙ

© 2024 г. В.С. Шубина^{*,#}, Ю.В. Шаталин^{*}

^{*}Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Институтская ул., 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

[#]E-mail: shubinavictoria@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.03.2024 г.

После доработки 12.03.2024 г.

Принята к публикации 03.07.2024 г.

Ранее мы показали, что производные таксифолина — пентаглутарат таксифолина и конъюгат таксифолина с глиоксалевой кислотой — улучшают механические свойства материалов, полученных на основе коллагена. В процессе деградации таких материалов в окружающую среду высвобождаются биологически-активные полифенолы. Для оценки проникновения полифенолов через поврежденную кожу было использовано два подхода. В случае пентаглутарата таксифолина и таксифолина (использовали для сравнения) в структуру полифенола была введена флуоресцентная метка. В случае конъюгата получали флуоресцентный аналог. Было показано, что нанесение полифенольных соединений на поврежденный участок кожи приводит к формированию на его поверхности флуоресцирующего слоя. Было обнаружено, что флуоресцентные производные таксифолина и пентаглутарата таксифолина накапливаются в волосяных фолликулах. В случае таксифолина флуоресценция наблюдалась в более глубоких слоях дермы, чем в случае пентаглутарата таксифолина, свидетельствуя о лучшем проникновении таксифолина. Флуоресцентный аналог накапливался в придатках кожи в меньшей степени, чем другие соединения. Таким образом, полученные данные говорят о накоплении полифенолов в волосяных фолликулах, из которых они могут постепенно высвобождаться в окружающую ткань. В целом, полученные результаты свидетельствуют о том, что биологически активные полифенолы способны оказывать пролонгированное действие при местном применении. Это может иметь важное значение при лечении ожогов, в частности, при лечении ожогов II степени, при которых неповрежденными остаются многие деривативы кожи.

Ключевые слова: полифенолы, проникновение через кожу, флуоресценция, волосяные фолликулы.

DOI: 10.31857/S0006302924040217, EDN: NFBMVJ

По данным Всемирной организации здравоохранения, ожоги занимают четвертое место по частоте среди прочих травм [1]. Согласно данным Росстата, в России в 2022 г. зарегистрировано до 203900 случаев химических ожогов [2]. Около трети пациентов с ожоговыми травмами направляется на лечение в специализированные стационарные отделения, большая часть пациентов проходит лечение в амбулаторных условиях [3]. Материалы на основе биополимеров животного происхождения (фибрин, фибронин, гиалуроновая кислота, спидроин и др.) получили широкое распространение для лечения ран. Среди таких биополимеров наибольшее практическое применение в медицине нашел коллаген [3–6]. Коллаген является основным структурным белком соединительной ткани. Он продуцирует-

ся фибробластами и вовлечен во все фазы регенерации ткани. Коллаген биосовместим с тканями организма реципиента, биоразлагаем, нетоксичен, обладает низкой иммуногенностью [6, 7]. На его основе могут быть получены различные структуры (гели, губки, пленки). Тем не менее, проводятся постоянные исследования, направленные на получение новых материалов на основе данного биополимера. Многие из них нацелены на преодоление высокой скорости биодеградации материалов, полученных на основе коллагена, ведется постоянный поиск агентов, позволяющих стабилизировать структуру коллагеновых материалов [8–10]. Кроме того, коллагеновая матрица рассматривается как средство локальной доставки биологически активных веществ [11–13]. В частности, интерес представляет включение в состав коллагеновой матрицы антикоагулянтов, гликозаминогликанов, антисептиков, антибиотиков, стимуляторов регенерации

Сокращения: DfTf — конъюгат таксифолина с глиоксалевой кислотой, TfG5 — пентаглутарат таксифолина.

и пр. [6, 14–20]. Для улучшения механических свойств материалов на основе коллагена полипептидные цепи данного биополимера сшивают. Существует несколько способов сшивки коллагена: физический, химический и ферментативный. Достоинства и недостатки данных способов подробно рассмотрены в следующих работах [8, 10, 21]. Можно отметить следующее. Преимуществом физических и ферментативных способов сшивки является получение нетоксичных материалов с повышенной устойчивостью к деградации. Однако, по сравнению с химическим способом, сшивка биополимеров с помощью данных методов является наименее эффективной. Химический способ позволяет получать материалы с более высокой степенью сшивки и равномерным распределением сшивок внутри материала [8]. Важно отметить, что свойства получаемых материалов зависят от используемого кросс-сшивающего агента [8, 22]. В некоторых случаях природа кросс-сшивающего агента также определяет и негативные свойства материалов. В частности, введение кросс-сшивающего агента в структуру материала может приводить к формированию токсичных продуктов при деградации материала (в организме). Примером такого кросс-сшивающего агента является глутаральдегид, один из первых агентов, используемых для сшивки коллагеновых цепей [15, 23–25]. Помимо этого, кросс-сшивающий агент может приводить к формированию структуры материала, которая является неблагоприятной для прикрепления, распластывания и миграции клеток. В качестве примера можно привести 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид/N-гидроксисукцинимид (EDC/NHS). Данный агент сшивает полипептидные цепи коллагена непосредственно между собой. Сшивка формируется в результате реакции конденсации между карбоксильными группами глутаминовой/аспарагиновой кислот и амино-группами лизина (полипептидных цепей). Использование данного кросс-сшивающего агента позволяет получать биосовместимые и нетоксичные материалы с улучшенными механическими свойствами. Однако формирование сшивки за счет карбоксильных групп глутаминовой кислоты полипептида приводит к нарушению взаимодействие клеток с поверхностью материала, снижению их прикрепления и миграции [26]. Таким образом, на сегодняшний день продолжаются исследования, направленные на поиск новых кросс-сшивающих агентов, позволяющих получать материалы с новыми уникальными свойствами. Особый интерес представляют природные нетоксичные кросс-сшивающие агенты [8], в частности, полифенолы [27–31]. Данные, представленные в литературе, свидетельствуют о том, что полифенолы стабилизируют структуру коллагена и улучшают механические свойства материала-

лов, полученных на основе данного биополимера [27, 32, 33]. В основе такой стабилизации могут лежать как межмолекулярные взаимодействия [29, 34], так и ковалентные связи полипептид-полифенол [24, 29, 35–38]. В качестве перспективных полифенольных кросс-сшивающих агентов рассматривают процианидины [35, 39], теафлавины [40], дубильную кислоту [9, 30, 41] и др. [31]. Следует также отметить, что полифенолы сами по себе могут формировать различные материалы/структуры и представляют огромный интерес в качестве основы для создания новых биомедицинских материалов [29, 41, 42]. Кроме того, существуют данные, согласно которым флавоноиды [43–45] и их производные [46, 47], а также материалы, включающие в свой состав полифенольные соединения [18, 19, 48], способствуют лучшему заживлению ран, что также является весомым аргументом в пользу использования данных соединений для создания новых материалов для регенеративной медицины.

Ранее нами было показано, что включение в состав коллагеновых материалов производных таксифолина, конъюгата таксифолина с глиоксальной кислотой (DfTf) и пентаглютарата таксифолина (TfG5) (рис. 1) приводит к уменьшению скорости деградации материалов по сравнению с нативным коллагеном [49–51]. Полученные материалы являются нетоксичными [50]. Фибробласты NIH/3T3 прикрепляются к поверхности полученных материалов и распластываются на поверхности материала, содержащего TfG5. Была показана миграция клеток через полученные материалы. Интересно, что увеличение доли DfTf в материале приводит к ингибированию миграции клеток через материал, тогда как увеличение доли TfG5 в материале, напротив, приводит к значительному увеличению миграции клеток через него [50]. В целом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что материалы, полученные на основе коллагена и производных таксифолина, могут представлять интерес для регенеративной медицины, в том числе для разработки материалов, обеспечивающих направленную регенерацию тканей.

Важным также является то, что в процессе деградации материалов в окружающую среду высвобождается биологически-активный полифенол [49–55]. Ранее нами было показано, что производные таксифолина, в частности конъюгаты таксифолина с карбонильными соединениями, усиливают регенерационные процессы после химического ожога кожи, индуцированного уксусной кислотой [56, 57]. В связи с вышесказанным представлялось интересным оценить проникновение полифенолов в области повреждения. Так как для стабилизации коллагеновых материалов использовали биологически-активные DfTf и TfG5, целью настоящей работы являлась оценка

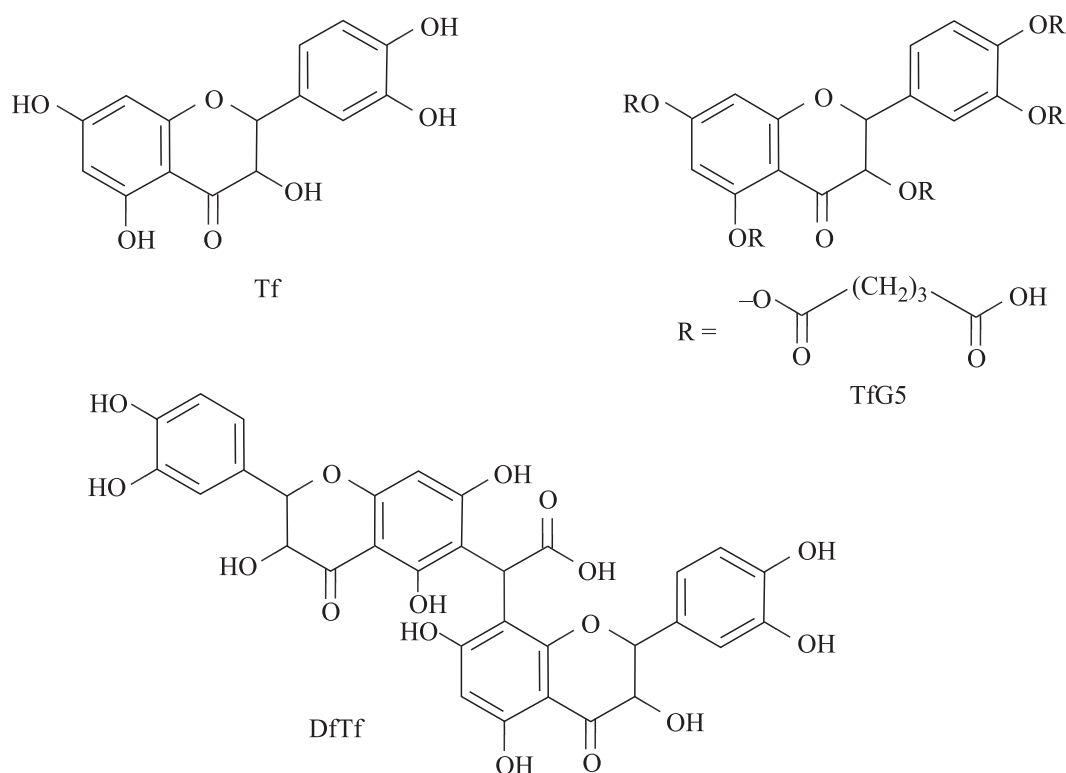


Рис. 1. Структуры полифенольных соединений: Tf — таксифолин, DfTf — конъюгат таксифолина с глиоксальной кислотой, TfG5 — пентаглутарат таксифолина.

проникновения данных полифенолов через кожу, поврежденную уксусной кислотой. Для сравнения также оценивали проникновение исходного флавоноида, таксифолина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение флуоресцентных аналогов полифенолов. Получение и характеристика конъюгата таксифолина с глиоксальной кислотой и пентаглутарата таксифолина подробно описаны в работах [52, 53, 54] и [49, 51] соответственно. Для оценки проникновения полифенолов в области повреждения было использовано два подхода. Первый подход основан на введении в структуру соединений флуоресцентной метки (для таксифолина и TfG5). Второй — на получении флуоресцентного аналога полифенола (для DfTf).

Введение флуоресцентной метки в структуру таксифолина. Для введения флуорофора в структуру полифенола использовали N-метилизатоевый ангидрид. Кратко, в 5 мл безводного тетрагидрофурана растворяли 304 мг (1 ммоль) таксифолина, 195 мг (1.1 ммоль) N-метилизатоевого ангидрида и 2 мг (0.05 ммоль) NaOH. Смесь перемешивали при нагревании в течение 5 ч. После охлаждения смесь вливали в 100 мл холодной ди-

стилизованной воды. Далее продукт N-метилантранилат таксифолина ($R_f = 0.741$, бензол : ацетон : этанол — 8 : 2 : 1) отфильтровывали и сушили под вакуумом. Флуоресцентные свойства продукта реакции: $\lambda_{\text{ex}} = 356$ нм; $\lambda_{\text{em}} = 438$ нм.

Введение флуоресцентной метки в структуру TfG5. TfG5 подвергали частичному гидролизу до тетраглутарата таксифолина [58] после чего получали смешанный глутарат/антранилат таксифолина. Кратко, 200 мг (0.23 ммоль) пентаглутарата таксифолина растворяли в 10 мл водного раствора серной кислоты (10%) и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Далее раствор нейтрализовали карбонатом натрия и экстрагировали продукт бензолом. Экстракт упаривали под вакуумом, осушали над P_2O_5 и перерастворяли в 5 мл ТГФ. Затем к смеси добавляли 44.5 мг (1.1 ммоль) N-метилизатоевого ангидрида и 2 мг (0.05 ммоль) NaOH. Смесь перемешивали при нагревании в течение 5 ч. После охлаждения смесь вливали в 100 мл холодной ди-

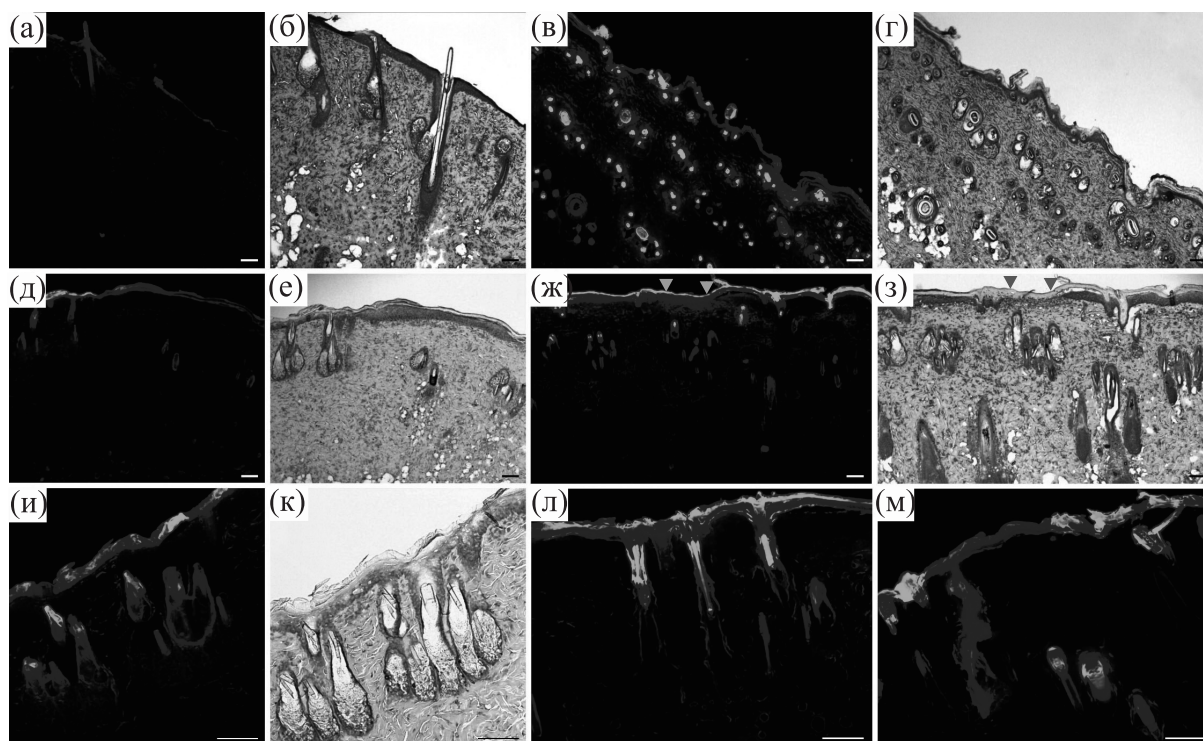


Рис. 2. Репрезентативные микрофотографии поперечных срезов поврежденных участков кожи крыс в контроле и после нанесения флуоресцентных производных полифенолов: (а, б) — контроль, обработка водно-спиртовым раствором; (в, г) — обработка флуоресцентным производным таксифолина; (д, е, и, к) — обработка флуоресцентным производным DfTf; (ж, з, л, м) — обработка флуоресцентным производным TfG5; (а, в, д, ж, и, л, м) — флуоресцентные микрофотографии срезов; (б, г, е, з, к) — микрофотографии срезов, окрашенных азуром и эозином. Маркером обозначена область повреждения с отсутствующим эпидермисом. Масштабный отрезок — 100 мкм.

Получение флуоресцентного аналога DfTf. Флуоресцентный аналог DfTf был получен в результате дегидратации полифенола с последующей циклизацией [59]. Кратко, 100 мг DfTf растворяли в 1 мл охлажденной концентрированной серной кислоты. Смесь перемешивали при нагревании (120°C) в течение одного часа. После охлаждения смесь вливали в 50 мл холодной дистиллированной воды. Выпавший продукт ($R_f = 0.750$, бензол : ацетон : этанол — 8 : 2 : 1) промывали холодным диэтиловым эфиром и сушили под вакуумом. Флуоресцентные свойства продукта реакции: $\lambda_{\text{ex}} = 344 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{em}} = 408 \text{ нм}$.

Оценка проникновения полифенолов через кожу, поврежденную уксусной кислотой. Исследование проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 250–300 г. За сутки до эксперимента у всех животных удаляли волосяной покров на участке спины размером 20 см^2 . Для получения химического ожога к коже спины, лишенной волосяного покрова, на 40 с прикладывали марлевый тампон, смоченный ледяной уксусной кислотой (площадь воздействия — 1 см^2). Все манипуляции над животными производили под эфирным наркозом.

Обработку раневой поверхности исследуемыми препаратами проводили дважды: первый раз — спустя 1 ч после нанесения ожога, второй раз — спустя 24 ч после нанесения ожога. Забор образцов проводили спустя один час после последней обработки. В качестве контрольных использовали крыс, раневую поверхность которых обрабатывали водно-спиртовым раствором, используемым для растворения флуоресцентных производных полифенольных соединений. Забор образцов проводили спустя один час после последней обработки. Образцы ткани заключали в среду для замораживания Tissue-Tek O.C.T. и помещали в жидкий азот на 2 мин. После чего образцы хранили при температуре -80°C . Блоки ткани резали на серийные срезы толщиной 10 мкм при -18°C . Срезы приклеивали к предметному стеклу и изучали с помощью флуоресцентной станции Eclipse Ti-E (Nikon, Япония). Для световой микроскопии срезы окрашивали смесью азура и эозина [56, 57].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что нанесение полифенольных соединений на поврежденный участок кожи при-

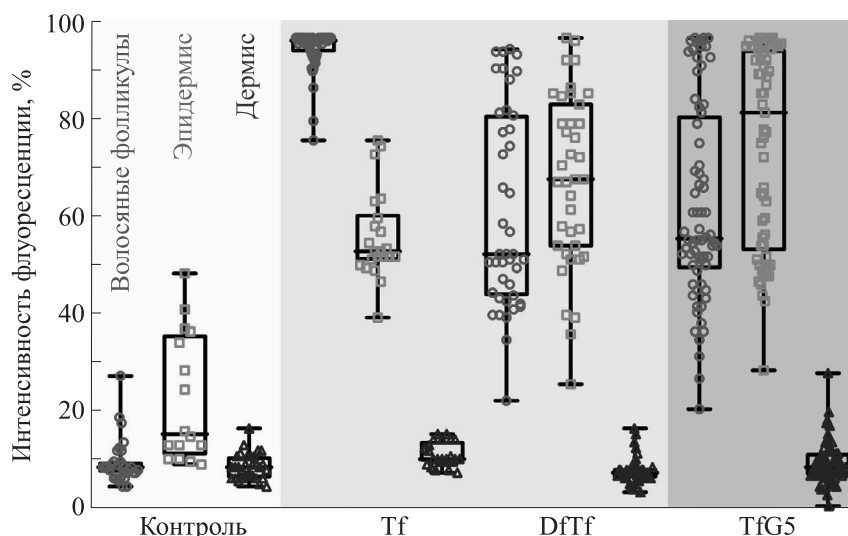


Рис. 3. Относительная интенсивность флуоресценции в различных участках поперечных срезов кожи крыс: Tf – таксифолин, DfTf – конъюгат таксифолина с глиоксалевой кислотой, TfG5 – пентаглутарат таксифолина.

водит к формированию на его поверхности флуоресцирующего слоя (рис. 2). Наибольшей интенсивностью флуоресценции обладает слой, образованный после обработки раны модифицированным TfG5 (рис. 2), что свидетельствует о высокой концентрации исследуемого полифенола в данной области. Слой, формирующийся после обработки модифицированным таксифолином, также обладает сильной флуоресценцией (рис. 2). Однако неравномерный характер распределения наводит на мысль о переходе полифенола из поверхностного слоя в более глубокие области дермы. Наименьшая интенсивность флуоресценции наблюдается для слоя, сформированного после обработки раны производным DfTf. При этом наиболее интенсивная флуоресценция слоя наблюдается в поврежденной области, где все еще обнаруживается эпидермис (рис. 2). На участках кожи, где эпидермис выявить не удастся, покрывающий рану слой практически не флуоресцирует (данные не представлены). Это может быть связано с тем, что в таких областях раны (с разрушенным эпидермисом) флуоресцирующее соединение легче проникает вглубь дермы, распределяясь в ее слоях, в результате чего уменьшается концентрация флуоресцирующего соединения и, как следствие, возможность его обнаружения без применения специальных методов анализа. Другой причиной могут служить различные взаимодействия и химические превращения флуоресцентного соединения, в результате которых образуются соединения, не обладающие флуоресценцией. Кроме того, наблюдается проникновение флуоресцентных производных полифенолов в волосные фолли-

кулы, что указывает на трансфолликулярный транспорт данных соединений (рис. 2). В случае таксифолина флуоресценция наблюдается в более глубоких слоях дермы по сравнению с TfG5 (рис. 2), свидетельствуя о его лучшем проникновении в кожу. Флуоресцентный аналог DfTf накапливался в придатках кожи в меньшей степени, чем другие соединения (рис. 2). На рис. 3 представлена относительная интенсивность флуоресценции в различных участках поперечных срезов кожи крыс.

Таким образом, данные свидетельствуют о том, что после обработки поврежденного участка кожи исследуемыми соединениями на поверхности раны формируется слой, из которого возможно дальнейшее проникновение полифенолов в глубокие слои дермы. Кроме того, выявлено проникновение полифенолов в волосные фолликулы, что указывает на трансфолликулярный транспорт данных соединений. Наиболее глубокое проникновение было отмечено для модифицированного таксифолина. Следует отметить, что ассоциация волосных фолликулов с сальными железами, стволовыми клетками, близость капилляров и пр. делает волосные фолликулы удобной мишенью для введения лекарственных препаратов [60, 61]. Кроме того, волосные фолликулы рассматриваются как резервуары, из которых соединение высвобождается постепенно, оказывая пролонгированное действие [60, 61]. В целом, полученные результаты свидетельствуют о том, что биологически-активные полифенолы способны оказывать пролонгированное действие при местном применении. Это может иметь важное значение при лечении ожогов, в частности,

при лечении ожогов II степени (по МКБ-10), при которых неповрежденными остаются многие деривативы кожи [3].

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием приборной базы ЦКП ИТЭБ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25-00149).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование на лабораторных животных проводили в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных, используемых в экспериментальных и других целях (Страсбург, 1986 г), и принципами Хельсинкской декларации (2000 г). Все протоколы выполнены в соответствии с Директивой ЕС 2010/63/ЕС для экспериментов на животных и одобрены Комитетом по этике Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (протокол № 22/2023 от 15 февраля 2023 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Peck M., Molnar J., and Swart D. A global plan for burn prevention and care. *Bull. World Health Organ.*, **87**, 802–803 (2009). DOI: 10.2471/BLT.08.059733
2. *Здравоохранение в России. Статистический сборник* (Росстат, М., 2019).
3. Будкевич Л. И., Мирзоян Г. В., Габитов Р. Б., Бразоль М. А., Салистый П. В., Чикинев Ю. В., Шмырин А. А. и Глуткин А. В. Биопластический коллагеновый материал «Коллост» при лечении ожоговой травмы. *Современные технологии в медицине*, **12** (1), 92 (2020). DOI: 10.17691/stm2020.12.1.12
4. Chattopadhyay S. and Raines R. T. Collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*, **101** (8), 821–833 (2014). DOI: 10.1002/bip.22486
5. Ермолов А. С., Смирнов С. В., Карасев Н. А., Курилин Б. Л., Кислухина Е. В., Киселевская-Бабинина И. В. и Васильев В. А. Анализ основных показателей работы московского городского ожогового центра после модернизации. *Журн. им. Н.В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь»*, № 1, 60–62 (2016).
6. Файзуллин А. Л., Шехтер А. Б., Истратов Л. П., Истратова Е. В., Руденко Т. Г., Гуллер А. Е., Аболянц Р. К., Тимашев П. С. и Бутнару Д. В. Биорезорбируемые коллагеновые материалы в хирургии: 50 лет успеха. *Сеченовский вестник*, **11** (1), 59 (2020).
7. Liu R., Dai L., Si C., and Zeng Z. Antibacterial and hemostatic hydrogel via nanocomposite from cellulose nanofibers. *Carbohydr. Polym.*, **195**, 63–70 (2018). DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.04.085
8. Gu L., Shan T., Ma Y., Tay F.R., and Niu L. Novel biomedical applications of crosslinked collagen. *Trends Biotechnol.* **37**, 464–491 (2019). DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.10.007
9. Нашекина Ю. А., Луконина О. А. и Михайлова Н. А. Химические сшивающие агенты для коллагена: механизмы взаимодействия и перспективность применения в регенеративной медицине. *Цитология*, **62** (7), 459 (2020).
10. Adamiak K. and Sionkowska A. Current methods of collagen cross-linking: review. *Int. J. Biol. Macromol.*, **161**, 550–560 (2020). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.075
11. Chak V., Kumar D., and Visht S. A review on collagen based drug delivery systems. *Int. J. Pharm. Teach. Pract.*, **4**, 811 (2013).
12. Hwang J., Sullivan M. O., and Kiick K. L. Targeted drug delivery via the use of ECM-mimetic materials. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **8**, 69 (2020). DOI: 10.3389/fbioe.2020.00069
13. Terzopoulou Z., Michopoulou A., Palamidi A., Koliakou E., and Bikiaris D. Preparation and evaluation of collagen-based patches as curcumin carriers. *Polymers*, **12**, 2393 (2020). DOI: 10.3390/polym12102393
14. Shekhter A. B., Rudenko T. G., Istranov L. P., Guller A. E., Borodulin R. R., and Vanin A. F. Dinitrosyl iron complexes with glutathione incorporated into a collagen matrix as a base for the design of drugs accelerating skin wound healing. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **78**, 8–18 (2015). DOI: 10.1016/j.ejps.2015.06.002
15. Adhirajan N., Shanmugasundaram N., Shanmuganthan S., and Babu M. Collagen-based wound dressing for doxycycline delivery: in-vivo evaluation in an infected excisional wound model in rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, **61**, 1617–1623 (2010). DOI: 10.1211/jpp.61.12.0005
16. Jana P., Mitra T., Selvaraj T. K. R., Gnanamani A., and Kundu P. P. Preparation of guar gum scaffold film grafted with ethylenediamine and fish scale collagen, cross-linked with ceftazidime for wound healing application. *Carbohydr. Polym.*, **153**, 573–581 (2016). DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.07.053
17. Simões D., Miguel S. P., Ribeiro M. P., Coutinho P., Mendonça A. G., and Correia I. J. Recent advances on antimicrobial wound dressing: a review. *Eur. J. Pharm.*

- Biopharm.*, **127**, 130–141 (2018). DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.02.022
18. Gomathi K., Gopinath D., Rafiuddin Ahmed M., and Jayakumar R. Quercetin incorporated collagen matrices for dermal wound healing processes in rat. *Biomaterials*, **24**, 2767–2772 (2003). DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00059-0
 19. Gopinath D., Ahmed M. R., Gomathi K., Chitra K., Sehgal P. K., and Jayakumar R. Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. *Biomaterials*, **25**, 1911–1917 (2004). DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00625-2
 20. Kim H., Kawazoe T., Han D.-W., Matsumura K., Suzuki S., Tsutsumi S., and Hyon S.-H. Enhanced wound healing by an epigallocatechin gallate-incorporated collagen sponge in diabetic mice: wound healing by EGCG-incorporated collagen sponge. *Wound Repair Regen.*, **16**, 714–720 (2008). DOI: 10.1111/j.1524-475X.2008.00422.x
 21. Oryan A., Kamali A., Moshiri A., Baharvand H., and Daemi H. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: current knowledge and future directions of cross-linked engineered bone scaffolds. *Int. J. Biol. Macromol.*, **107**, 678–688 (2018). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.184
 22. Huang G. P., Shanmugasundaram S., Masih P., Pandya D., Amara S., Collins G., and Arinze T. L. An investigation of common crosslinking agents on the stability of electrospun collagen scaffolds: an investigation of common crosslinking agents. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **103**, 762–771 (2015). DOI: 10.1002/jbm.a.35222
 23. Gough J. E., Scotchford C. A., and Downes S. Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen/poly(vinyl alcohol) films is by the mechanism of apoptosis. *J. Biomed. Mater. Res.*, **61**, 121–130 (2002). DOI: 10.1002/jbm.10145
 24. Reddy N., Reddy R., and Jiang Q. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends Biotechnol.*, **33**, 362–369 (2015). DOI: 10.1016/j.tibtech.2015.03.008
 25. Wang X., Ma B., and Chang J. Preparation of decellularized vascular matrix by co-crosslinking of procyanidins and glutaraldehyde. *Biomed. Mater. Eng.*, **26**, 19–30 (2015). DOI: 10.3233/BME-151548
 26. Bax D. V., Davidenko N., Gullberg D., Hamaia S. W., Farndale R. W., Best S. M., and Cameron R. E. Fundamental insight into the effect of carbodiimide crosslinking on cellular recognition of collagen-based scaffolds. *Acta Biomater.*, **49**, 218–234 (2017). DOI: 10.1016/j.actbio.2016.11.059
 27. Shavandi A., Bekhit A. E.-D. A., Saeedi P., Izadifar Z., Bekhit A. A., and Khademhosseini A. Polyphenol uses in biomaterials engineering. *Biomaterials*, **167**, 91–106 (2018). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.03.018
 28. Manjari M. S., Aaron K. P., Muralidharan C., and Rose C. Highly biocompatible novel polyphenol cross-linked collagen scaffold for potential tissue engineering applications. *React. Funct. Polym.*, **153**, 104630 (2020). DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104630
 29. Zhang X., Li Z., Yang P., Duan G., Liu X., Gu Z., and Li Y. Polyphenol scaffolds in tissue engineering. *Mater. Horiz.*, **8** (1), 145–167 (2021). DOI: 10.1039/D0MH01317J
 30. Kaczmarek B. Tannic acid with antiviral and antibacterial activity as a promising component of biomaterials – a minireview. *Materials*, **13** (14), 3224 (2020). DOI: 10.3390/ma13143224
 31. Kaczmarek B. and Mazur O. Collagen-based materials modified by phenolic acids – a review. *Materials*, **13** (16), 3641 (2020). DOI: 10.3390/ma13163641
 32. Schlebusch H. and Kern D. Stabilization of collagen by polyphenols. *J. Vasc. Res.*, **9** (3–6), 248–256 (1972). DOI: 10.1159/000157937
 33. Тараховский Ю. С., Селезнева И. И., Васильева Н. А., Егорочкин М. А. и Ким Ю. А. Ускорение фибриллообразования и температурная стабилизация фибрилл коллагена в присутствии таксифолина (дигидрокверцетина). *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **144** (12), 640–643 (2007). DOI: 10.1007/s10517-007-0433-z
 34. Madhan B., Subramanian V., Rao J. R., Nair B. U., and Ramasami T. Stabilization of collagen using plant polyphenol: role of catechin. *Int. J. Biol. Macromol.*, **37** (1–2), 47–53 (2005). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2005.08.005
 35. Han B., Jauregui J., Tang B. W., and Nimni M. E. Proanthocyanidin: a natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **65** (1), 118–124 (2003). DOI: 10.1002/jbm.a.10460
 36. Greco K. V., Francis L., Huang H., Ploeg R., Boccacini A. R., and Ansari T. Is Quercetin an alternative natural crosslinking agent to genipin for long-term dermal scaffolds implantation? *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **12** (3), e1716–e1724 (2018). DOI: 10.1002/term.2338
 37. He L., Mu C., Shi J., Zhang Q., Shi B., and Lin W. Modification of collagen with a natural cross-linker, procyanidin. *Int. J. Biol. Macromol.*, **48** (2), 354–359 (2011). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2010.12.012
 38. Pinheiro A., Cooley A., Liao J., Prabhu R., and Elder S. Comparison of natural crosslinking agents for the stabilization of xenogenic articular cartilage. *J. Orthop. Res.*, **34** (6), 1037–1046 (2016). DOI: 10.1002/jor.23121
 39. Liu Y. and Wang Y. Proanthocyanidins' efficacy in stabilizing dentin collagen against enzymatic degradation: MALDI-TOF and FTIR analyses. *J. Dent.*, **41** (6), 535–542 (2013). DOI: 10.1016/j.jdent.2013.03.007

40. Liu H., Guo J., Wang R., and Wang Y. Theaflavins as a novel cross-linker quickly stabilize demineralized dentin collagen against degradation. *Sci. Rep.*, **11** (1), 19699 (2021). DOI: 10.1038/s41598-021-99186-z
41. Chen C., Yang H., Yang X., and Ma Q. Tannic acid: a crosslinker leading to versatile functional polymeric networks: a review. *RSC Adv.*, **12** (13), 7689–7711 (2022). DOI: 10.1039/D1RA07657D
42. Li Z., Chen Z., Chen H., Chen K., Tao W., Ouyang X., Mei L., and Zeng X. Polyphenol-based hydrogels: pyramidal evolution from crosslinked structures to biomedical applications and the reverse design. *Bioact. Mater.*, **17**, 49–70 (2022). DOI: 10.1016/j.bioactmat.2022.01.038
43. Shevelev A. B., La Porta N., Isakova E. P., Martens S., Biryukova Y. K., Belous A. S., Sivokhin D. A., Trubnikova E. V., Zylkova M. V., Belyakova A. V., Smirnova M. S., and Deryabina Yu. I. *In vivo* antimicrobial and wound-healing activity of resveratrol, dihydroquercetin, and dihydromyricetin against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*. *Pathogens*, **9** (4), 296 (2020). DOI: 10.3390/pathogens9040296
44. Carvalho M. T. B., Araújo-Filho H. G., Barreto A. S., Quintans-Júnior L. J., Quintans J. S. S., and Barreto R. S. S. Wound healing properties of flavonoids: a systematic review highlighting the mechanisms of action. *Phytomedicine*, **90**, 153636 (2021). DOI: 10.1016/j.phymed.2021.153636
45. Nguyen V.-L., Truong C.-T., Nguyen B. C. Q., Vo T.-N. V., Dao T.-T., Nguyen V.-D., Trinh D.-T. T., Huynh H. K., and Bui C.-B. Anti-inflammatory and wound healing activities of calophyllolide isolated from *Calophyllum inophyllum* linn. *PLoS One*, **12** (10), e0185674 (2017). DOI: 10.1371/journal.pone.0185674
46. Bhaskar Rao A. and Ernala P., Deepthi Seelam S., Vennapusa H., Sistla R., Kuncha M., Surekha Mullapudi V., Rao Yerramilli S. Wound healing: a new perspective on glucosylated tetrahydrocurcumin. *Drug Des. Devel. Ther.*, **9**, 3579–3588 (2015). DOI: 10.2147/DDDT.S85041
47. Yeh C.-J., Chen C.-C., Leu Y.-L., Lin M.-W., Chiu M.-M., and Wang S.-H. The effects of artocarpin on wound healing: in vitro and in vivo studies. *Sci. Rep.*, **7** (1), 15599 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-15876-7
48. Ang L., Darwis Y., Koh R., Gah Leong K., Yew M., Por L., and Yam M. Wound healing property of curcuminoids as a microcapsule-incorporated cream. *Pharmaceutics*, **11** (5), 205 (2019). DOI: 10.3390/pharmaceutics11050205
49. Шаталин Ю. В. и Шубина В. С. Материал на основе коллагена и таксифолина. *Биофизика*, **60** (3), 583–588 (2015).
50. Shatalin Yu. V., Kobayakov M. I., and Shubina V. S. Modulation of adhesion and migration of NIH/3T3 cells in collagen materials by taxifolin derivatives. *Biochem. Mosc. Suppl. Ser. Membr. Cell Biol.*, **17**, S85–S93 (2023). DOI: 10.1134/S1990747823070048
51. Шаталин Ю. В. и Шубина В. С. Железосвязывающая и железовосстанавливающая способность материала, полученного на основе коллагена и таксифолина (дигидрокверцетина), в физиологических и патофизиологических условиях. *Хим.-фармацевтич. журн.*, **53** (2), 52–56 (2019). DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-2-52-56
52. Shubina V. S. and Shatalin Y. V. Antioxidant and iron-chelating properties of taxifolin and its condensation product with glyoxylic acid. *J. Food Sci. Technol.*, **54** (6), 1467–1475 (2017). DOI: 10.1007/s13197-017-2573-0
53. Shubina V. S., Kozina V. I., and Shatalin Y. V. Comparison of antioxidant properties of a conjugate of taxifolin with glyoxylic acid and selected flavonoids. *Antioxidants*, **10**, 1262 (2021). DOI: 10.3390/antiox10081262
54. Shubina V. S., Kozina V. I., and Shatalin Y. V. A comparative study of the inhibitory effect of some flavonoids and a conjugate of taxifolin with glyoxylic acid on the oxidative burst of neutrophils. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 15068 (2023). DOI: 10.3390/ijms242015068
55. Шубина В. С., Кобякова М. И. и Шаталин Ю. В. Влияние таксифолина, конъюгата таксифолина с глиоксальной кислотой и нарингенина на функциональную активность нейтрофилов. *Биофизика*, **68** (5), 941–948 (2023).
56. Шубина В. С. и Шаталин Ю. В. Влияние липосомных препаратов на основе комплексов таксифолина с металлами переменной валентности на регенерацию кожи при химическом ожоге. *Цитология*, **54** (3), 251–260 (2012).
57. Шубина В. С. и Шаталин Ю. В. Регенерация кожи после химического ожога в присутствии препаратов на основе производных таксифолина. *Клеточные технологии в биологии и медицине*, **3**, 160–166 (2012).
58. Kiehlmann E. Preparation and partial deacetylation of dihydroquercetin acetates. *Org. Prep. Proced. Int.*, **31** (1), 87–97 (1999). DOI: 10.1080/00304949909355676
59. Park M. K., Shim J. J., and Ra C. S. Efficient cyclization of substituted diphenols: application to the synthesis of sulforhodamine B. *Clean Technol.*, **21** (2), 102–107 (2015). DOI: 10.7464/KSCT.2015.21.2.102
60. Blume-Peytavi U., and Vogt A. Human Hair Follicle: Reservoir Function and Selective Targeting: Human Hair Follicle. *Br. J. Dermatol.*, **165**, 13–17 (2011). DOI: 10.1111/j.1365-2133.2011.10572.x
61. Patzelt A. and Lademann J. Drug delivery to hair follicles. *Expert Opin. Drug Deliv.*, **10** (6), 787–797 (2013). DOI: 10.1517/17425247.2013.776038

Penetration of Polyphenols through Acetic Acid-Damaged Skin

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

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

Our previous research has shown that derivatives of taxifolin, pentaglutarate of taxifolin and a conjugate of taxifolin with glyoxalic acid improve the mechanical properties of the collagen-based materials. During the degradation process of these materials, the biologically active polyphenols are released into the surrounding medium. To evaluate the penetration of polyphenols through burn-injured skin, two approaches were used. In case of pentaglutarate of taxifolin and taxifolin (they were used for comparison), polyphenols were labeled by fluorescent probe. In case of a conjugate, the fluorescent analogue was obtained. It was shown that the application of polyphenols on the damaged area of skin leads to the formation of fluorescent layer on its surface. It was found that hair follicles accumulate fluorescent derivatives of taxifolin and pentaglutarate of taxifolin. In regard to taxifolin, the fluorescence was observed in the deeper skin layers than that recorded for pentaglutarate of taxifolin, suggesting that taxifolin penetrate the skin more effectively. The fluorescent analogue accumulation in skin appendages showed lower values than that of other compounds. Thus, the data obtained demonstrate that polyphenols accumulate in hair follicles, from which they can be gradually released into the surrounding tissue. On the whole, our findings suggest that biologically active polyphenols are able to exert prolonged effects when they are used for topical application. This may be important while treating burns, especially second-degree burns, in which many skin appendages remain intact.

Keywords: polyphenols, skin penetration, fluorescence, hair follicles