

Original article

Evaluation *in vitro* of AGE-crosslinks breaking ability of rosmarinic acid

Daniel Jean ¹⁾, Maryse Pouligon ¹⁾, Claude Dalle ²⁾

1) Institut des Substances Végétales, Beaumont, France

2) World Society Interdisciplinary Anti-aging Medicine, Paris, France

Glycative Stress Research 2015; 2 (4): 204-207

(c) Society for Glycative Stress Research

Оригинальная статья

Оценка *in vitro* способности розмариновой кислоты к разрыву поперечных сшивок в конечных продуктах гликирования

Daniel Jean ¹⁾, Maryse Pouligon ¹⁾, Claude Dalle ²⁾

1) Институт растительных веществ, Бомон, Франция

2) Всемирное Общество Междисциплинарной Антивозрастной Медицины (WOSIAM), Париж, Франция

Реферат

Цель. Несмотря на многочисленные работы по оценке способности различных молекул разрушать Конечные Продукты Гликирования (КПГ – AGEs - Advanced Glycation Endproducts), ни одна из них, насколько нам известно, не оценивала способность к разрушению патологических сшивок внутри и между молекулами белка. Цель этой работы состояла в том, чтобы четко показать вызванную рибозой полимеризацию альбумина, а затем способность полифенольной кислоты, экстрагированной из розмарина (*Rosmarinus officinalis*), и розмариновой кислоты, разрушать предварительно сформированные полимеры альбумина.

Методы. Альбумин гликировали инкубацией с рибозой, а полученные полимеры белка оценивали методом гель-размерной эксклюзионной хроматографии (ГРХ) и флуориметрии. После элиминации рибозы методом диализа белки обрабатывали розмариновой кислотой, аминокванидином, карнозином и Алагебриумом (ALT-711; Alteon) в качестве положительного контроля. Степень дегликирования определяли по соотношению количеств полимеризованного и нативного альбумина - до и после обработки дегликирующими молекулами.

Результаты. Было показано, что розмариновая кислота разрушает образовавшиеся поперечные сшивки так же эффективно, как и Алагебриум. В противоположность этому, аминокванидин и карнозин, ингибиторы реакции гликирования, не продемонстрировали значимого обращения вспять произошедшей полимеризации альбумина.

Контакты авторов: Daniel Jean, PhD

Institut des Substances Végétales

19 rue Patrick Depailler

Parc technologique de la Pardieu

63000 Clermont-Ferrand, France

E-mail: daniel.jean@insuveg.com

Co-authors: Pouligon M, maryse.pouligon@gmail.com;

Dalle C, contacts@drclaudedalle.com

Glycative Stress Research 2015; 2 (4): 204-207

(c) Society for Glycative Stress Research

Обсуждение: Полимеризация альбумина, вызванная гликированием рибозой, может быть измерена методами размерно-эксклюзионной хроматографии и флуориметрии полученных полимеров. Исследование продемонстрировало, что розмариновая кислота способна обратить вспять эту полимеризацию в той же степени, что и Алагебриум.

Заключение: Розмариновая кислота, безопасность которой подтверждена многолетней практикой, представляется перспективной молекулой, поскольку продемонстрировала *in vitro* способность разрушать поперечные сшивки между молекулами белка, т.е., в конечных продуктах гликирования с такой же эффективностью, что и Алагебриум, считавшийся до сих пор эталонной дегликирующей молекулой. Открытый способ дегликирования выглядит перспективным методом лечения многих заболеваний, связанных с возрастным и патологическим изменением сосудов, включая нейропатию, нефропатию, ретинопатию, сахарный диабет и даже внешние признаки старения кожи.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: конечные продукты гликирования (КПГ/AGEs), розмариновая кислота, поперечные сшивки, дегликирование - разрушители КПГ (AGE-Breakers)

Введение

Белки, азотистые радикалы и восстанавливающие сахара участвуют в так называемой реакции Майяра – реакции сахароаминой конденсации, механизм которой был впервые описан в 1953 году Ходжем¹. Конечные продукты гликирования (КПГ/AGEs) представляют собой результат сложных химических неферментативных реакций, приводящих к образованию внутримолекулярных и межмолекулярных поперечных сшивок между соседними белками, ухудшающих их функциональные возможности и модифицирующих их физические свойства^{2,3}. Возникновение таких поперечных сшивок представляет собой особый патофизиологический механизм, признанный в качестве причинного при диабетических осложнениях и возрастзависимых заболеваниях⁴, таких как нефропатия, ретинопатия, нарушение сосудистой функции и потеря эластичности кожи. У здоровых людей возрастная утрата функциональности белков нарастает медленнее⁵. У больных сахарным диабетом возрастзависимое накопление КПГ и сшивки белков ускоряются из-за высокой концентрации глюкозы⁶.

Терапевтические решения включают предотвращение образования КПГ, что улучшит контроль уровня глюкозы в крови у людей с диабетом, и/или использование ингибиторов КПГ, а также КПГ-разрушителей, т.н. AGE-breakers, - молекул, способных разрушать поперечные сшивки внутри и между молекулами белков в КПГ. На сегодняшний день установлено, что многие молекулы способны ингибировать процесс гликирования *in vivo* и *in vitro*⁷ на той или иной стадии, приводя к медленному снижению концентрации гликированных белков, в основном белков со средним или коротким циклом обновления. Однако, для белков с длительным периодом обновления, таких как коллаген кожи и суставных тканей или эластин в стенке артерий, эффективность

ингибирования гораздо скромнее. Открытие безопасных молекул, способных разрушать поперечные сшивки внутри/между белками в КПГ, стало бы реальным прорывом в лечении заболеваний, сопутствующих старению и сахарному диабету.

Одна из главных проблем в поиске таких молекул заключается в том, что гликирующие поперечные сшивки могут соединять самые разнообразные молекулы белков, среди которых пентозидин, глюкозепан и димер метилглиоксаль-лизина (плесень) – являются наиболее известными представителями длинного списка⁸. Таким образом, найти универсальный разрушитель поперечных сшивок в КПГ, способный расщепить всегликирующие связи, маловероятно. В 1996 году производное тиазолия, Алагебриум, или ALT-711 (Alteon Inc., Монтвейл, Нью-Джерси, США) был объявлен в качестве высокоэффективного разрушителя поперечных сшивок в КПГ⁹, впрочем, без указания типа поперечных сшивок, разрушаемых молекулой. Позже, в 2013 году, было показано, что он способен разрушать лишь альфа дикарбонильные группы только в ранних продуктах гликирования - т.н. перегруппировку Амадори (изомеризацию N-гликозидов альдоз в 1-амино-1-дезоксикетозу), еще до образования поперечных сшивок¹⁰.

Межмолекулярные поперечные сшивки приводят к полимеризации белков¹¹. Степень полимеризации после реакции белков с восстанавливающими сахарами рассматривают как универсальный маркер образования КПГ- ассоциированных поперечных сшивок. В этой работе авторы представляют метод инвитровой оценки скорости формирования поперечных КПГ- сшивок в альбумине и показывают, что розмариновая кислота (*Рис. 1*) обладает способностью разрушать поперечные сшивки в гликированных белках.

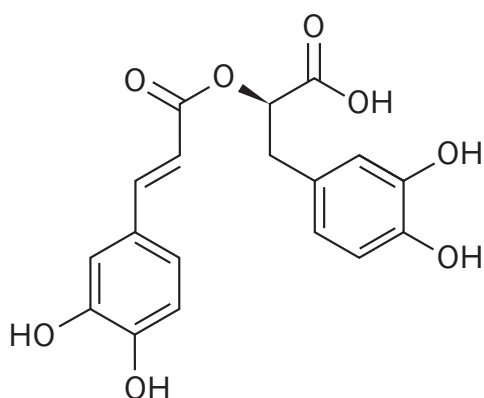


Рис.1. Структура розмариновой кислоты.

Молекулярная формула, C₁₈H₁₆O₈; молекулярная масса, 360.3.

Материалы и методы

Получение сшитого гликированного альбумина

На этом этапе использовали следующие реагенты и материалы: бычий сывороточный альбумин (БСА), фракцию V > 96 % (Sigma A9647. St. Louis, MO, USA); D (-) рибозу, мин. 99.0 % (Sigma R7500); уксусную кислоту, 99.8 % (Acros ref 222140010, Acros Organics, Geel, Belgium); гидроокись аммония (A.C.S. Sigma-Aldrich 22,122-8); бензоилированные диализные трубки, средние, плоские, шириной 32 мм (1.27 дюйма) (Sigma D7884); Sephadex G-50 (Sigma G-50-80).

Гликирование альбумина

Растворы готовили в следующих условиях; БСА, 24 % (w/w- массовая доля растворенного вещества) в ацетатном буферном растворе (с уксуснокислым аммонием), pH 7.4 и 30 % (w/w) водный раствор рибозы в ацетатном буферном растворе, pH 7.4. Затем смешивали 250 г раствора БСА с 50 г раствора рибозы, стерилизовали путем фильтрации через мембраны с размером ячейки 0.2 мкм и инкубировали при 37 °С в течение 6 дней. Раствор гликированного БСА подвергали диализу в воде в течение 4 дней при комнатной температуре для отмывания рибозы и остановки реакции гликирования.

Гель-размерная эксклюзионная хроматография (ГРХ)

Диализированный раствор БСА подвергали очистке с помощью ГРХ на приборе Sephadex G50 в ацетатном буферном растворе, pH 7,4; полученную оранжево-коричневую фракцию собирали для дальнейшего анализа.

Определение скорости сшивки альбумина

Использовали следующие реагенты и оборудование для проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ); воду Chromasolv

Plus для ВЭЖХ (Sigma-Aldrich 34877); ВЭЖХ - Waters Integrity System с ВЭ детектором флуоресценции (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA); низкотемпературный испарительный детектор светорассеяния (ELSD) (Sedex 55; SEDERE, Alfortville, France); колонку для ВЭЖХ (TSK Gel Super SW3000; Tosoh Bioscience, Tokyo, Japan). Использовали следующие параметры анализа: скорость потока 0.3 мл/мин; температуру колонки 25 °С; изократический режим 24 мин; ацетатный буфер, pH = 6.0; уксусную кислоту, 0.5 мл; воду по потребности/qs 100 мл; хлорид аммония, qs pH= 6.0; длину волны детектирования; флуоресценцию (возбуждение 335 нм; эмиссия 385 нм); образцы для анализа вводили в количестве 10 пл водного раствора 1/2.5 (V/V).

Расчет скорости сшивки молекул БСА и способности изучаемых молекул к разрыву поперечных сшивок

Гликирование альбумина рибозой вызывает полимеризацию альбумина. Полученные полимеры сепарируют и оценивают методом ВЭЖХ по площади индивидуальных пиков, каждый из которых соответствует пулу полимеров со схожими характеристиками гликирования. Относительную концентрацию полимеров БСА получают путем расчета соотношения площадей их хроматограмм.

Att, Ate = Общая площадь белков до и после обработки потенциальным разрушителем поперечных сшивок.

Agt, AGe = Общая площадь белковых полимеров (прошитых молекул БСА) до и после обработки потенциальным разрушителем поперечных сшивок.

Tg = коэффициент поперечных сшивок гликированного БСА перед обработкой потенциальным разрушителем поперечных сшивок (Tg = Agt/Att.).

Eg = коэффициент поперечных сшивок гликированного БСА после обработки потенциальным разрушителем поперечных сшивок (Eg = AGe/Ate).

Разрушающая способность исследуемой молекулы в отношении поперечных сшивок в % выражении определяется по конечной формуле:

$$Dg = ((Tg/Eg) \times 100).$$

Способность молекул к разрушению КПП

Были протестированы следующие молекулы: алагебриум (Alteon); L-карнозин (Sigma-Aldrich ref C9625); аминоксидин бикарбонат (Sigma-Aldrich ref 109266); розмариновая кислота (Sigma-Aldrich ref R4033).

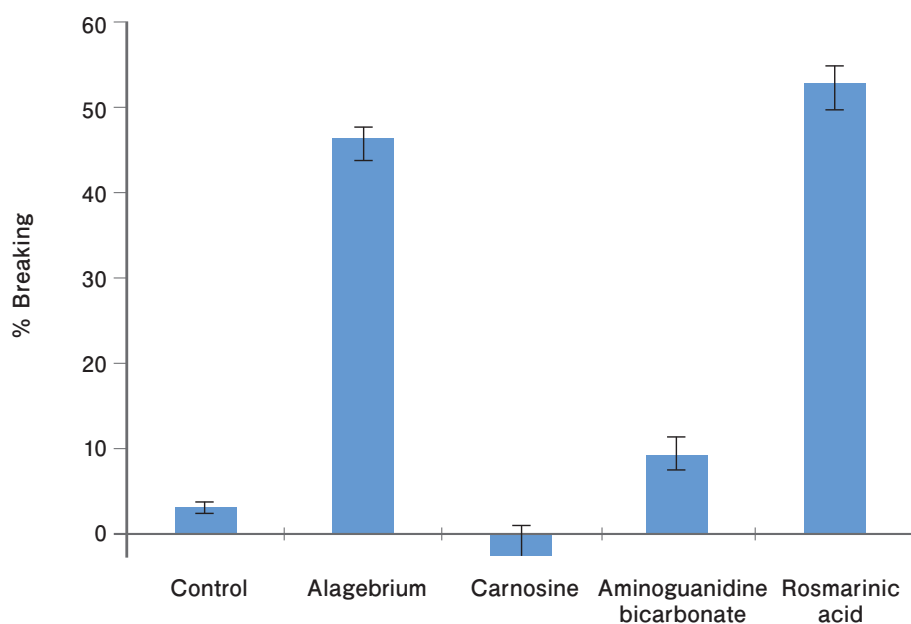
Результаты

Способность исследованных молекул к разрушению поперечных сшивок представлена в [Таблице 1](#) и на диаграмме, [Рис.2](#).

Таблица 1. Способность к разрыву поперечных сшивок.

Исследуемые молекулы	Способность к разрыву поперечных сшивок	Значения <i>P</i>
Контроль	3.18 %	
Алагебриум	46.38 %	< 0.001
Карнозин	-2.73 %	0.345
Аминогуанидин бикарбонат	9.12 %	0.072
Розмариновая кислота	52.66 %	< 0.001

Значения *P*, вероятностные значения по сравнению с контролем, по Т-критерию Стьюдента, *n* = 3.

**Рис. 2. Способность к разрыву поперечных сшивок.**

Столбики указывают на стандартное отклонение. Число измерений; *n* = 3.

Обсуждение

После реакции с рибозой альбумин полимеризуется, что подтверждается результатами ГРХ. Определенная пропорция (%) мономеров превращается в полимеры. Эта полимеризация стабильна во времени и может быть обращена вспять Алагебриумом и розмариновой кислотой, которые восстанавливают примерно 50% мономеров, ранее вовлеченных в полимеризацию. Розмариновую кислоту можно экстрагировать из розмарина (*Rosmarinus officinalis*) и очистить до требуемой степени. Представленные результаты свидетельствуют, что розмариновая кислота превосходит Алагебриум, поскольку помимо его способности разрушать альфа-дикарбонильные радикалы КПП, она дополнительно разрушает ранее сформированные в КПП поперечные сшивки молекул альбумина. В целом, розмариновая кислота дает схожие результаты, а это значит, что природная мо-

лекула с тщательно и длительно документируемой и подтвержденной безопасностью способна обратить вспять процессы гликирования, по крайней мере, *in vitro*, разрывая меж-и внутримолекулярные патологические поперечные сшивки в трехмерной структуре белков, ответственные за нарушения свойств и функций гликированных молекул.

Выводы

Розмариновая кислота - это натуральный продукт, с хорошо изученной и подтвержденной безопасностью. В исследовании продемонстрирована способность розмариновой кислоты к обращению вспять процесса гликирования белков за счет разрыва в КПП патологических внутри-и межмоле-

кулярных поперечных сшивок белков, что может стать перспективным методом лечения страдающих сахарным диабетом, а также методом профилактики старения всех тканей организма и обусловленных поражением сосудов возрастных заболеваний, отнюдь не ограничивающихся таким внушительным списком, как нефропатия, невропатия и ретинопатия.

Выражения признательности

Часть этого исследования была представлена на 13-м Всемирном конгрессе по антивозрастной медицине (AMWC) 28 марта 2015 года в Монако.

Заявление о конфликте интересов

Часть этой работы была поддержана лабораторией A2P Nacriderm Laboratories, Лион, Франция.

Список литературы

- 1) Hodge JE. Dehydrated foods: Chemistry of browning reactions in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1953; 1; 928-943.
- 2) Verzijl N, DeGroot J, Oldehinkel E, et al. Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochem J*. 2000; 350; 381-387
- 3) Guitton JD, Le Pape A, Sizaret PY, et al. Effects of *in vitro* glucosylation on type-I collagen fibrillogenesis. *Biosci Rep*. 1981; 1; 945-954.
- 4) Brownlee M. The pathological implications of protein glycation. *Clin Invest Med*. 1995; 18: 275-281.
- 5) Nowotny K, Jung T, Grune T, et al. Accumulation of modified proteins and aggregate formation in aging. *Exp Gerontol*. 2014; 57: 122-131.
- 6) Shah S, Baez EA, Felipe DL, et al. Advanced glycation endproducts in children with diabetes. *J Pediatr*. 2013; 163: 1427-1431.
- 7) Monnier VM. Intervention against the Maillard reaction *in vivo*. *Arch Biochem Biophys*. 2003; 419: 1-15.
- 8) Sell DR, Monnier VM. Molecular basis of arterial stiffening: Role of glycation - a mini-review. *Gerontology*. 2012; 58: 227-237.
- 9) Vasan S, Foiles P, Founds H. Therapeutic potential of breakers of advanced glycation end product-protein crosslinks. *Arch Biochem Biophys*. 2003; 419: 89-96.
- 10) Kim T, Spiegel DA. The unique reactivity of N-phenacyl-derived thiazolium salts toward α -dicarbonyl compounds. *Rejuvenation Res*. 2013; 16: 43-50.
- 11) Perera HK, Handuwalage CS. Analysis of glycation induced protein cross-linking inhibitory effects of some antidiabetic plants and spices. *BMC Complement Altern Med*. 2015; 15:175.