



## БЮЛЛЕТЕНЬ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ

2007 г., Том 144, № 12 ДЕКАБРЬ, с.640-644.

биофизика и биохимия

### Ускорение фибриллообразования и температурная стабилизация фибрилл коллагена в присутствии таксифолина.

<sup>1</sup>Тараховский Ю.А., <sup>1</sup>Селезнева И.И., <sup>2</sup>Васильева Н.А., <sup>2</sup>Егорочкин М.А., <sup>3</sup>Ким Ю.А.

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино, Московской обл.
2. ООО "Биофлаворн", г. Обнинск
3. Институт биофизики клетки РАН, г. Пущино, Московской обл.

Исследовано влияние флавоноида таксифолина (дигидрохверцетина) на структуру и термостабильность фибрилл коллагена типа I. Показано, что таксифолин способствует ускорению фибриллообразования, при этом, реконструируется характерная для фибрилл этого белка периодическая поперечная полосатость. Данные дифференциальной сканирующей калориметрии свидетельствуют об увеличении температуры плавления фибрилл коллагена, образующихся в нейтральных, или слабо щелочных средах, но не отдельных молекул тропоколлагена, существующих в кислой среде. Предполагается, что способность таксифолина ускорять процессы образования фибрилл и способствовать стабилизации фибриллярной формы коллагена может объяснять некоторые аспекты биологической активности этого вещества и найдет применение в медицине.

#### Ключевые слова:

Коллаген, таксифолин, дигидрохверцетин, флавоноиды, полифенолы.

Флавоноиды, вещества растительного происхождения, принадлежащие к полифенолам, обладают положительным влиянием на здоровье человека и некоторые из них широко используются в медицине [6]. Более того, они являются существенным компонентом растительной пищи, принимаемой нами ежедневно в



количестве десятков и сот миллиграмм [8]. В целом, действие флавоноидов на организм человека можно определить, как способность защищать от разнообразных стрессовых факторов окружающей среды благодаря антиоксидантной активности, связыванию тяжелых металлов, влиянию на сигнальные системы клетки [14]. Необходимо признать, что наши знания о механизмах действия этих веществ на организм человека не достаточны [11]. Так, например, в последние годы стало известно, что кроме положительного влияния на здоровье, продукты метаболизма некоторых флавоноидов в организме человека могут быть токсичны, обладать мутагенным и, возможно, канцерогенным действием, как это было обнаружено в отношении кверцетина – наиболее хорошо изученного и широко используемого флавоноида [10]. Дигидрокверцетин (таксифолин) существенно менее токсичен, вероятно, вследствие отсутствия двойной связи в положении 2,3 углеродов [10]. Поэтому исследование свойств таксифолина представляется необходимым. Данная работа посвящена исследованию взаимодействия таксифолина с коллагеном и влиянию этого агента на процессы фибриллообразования коллагена и стабильность фибрилл.

#### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Дигидрокверцетин (таксифолин) 96% чистоты (торговая марка «Флавокон»), полученный из древесины лиственницы сибирской был предоставлен фирмой "Биофлавон" г. Обнинск (Россия). Для сравнения использовался также препарат фирмы "Sigma"

Стоковый раствор коллагена типа I был получен из сухожилий хвостов крыс путем экстракции 0.5M раствором уксусной кислоты, последующего двукратного переосаждения этанолом и растворения осадка в 0.1M уксусной кислоте. Концентрация коллагена в растворе была определена по сухому весу белка и составила 6 мг/мл.

Формирование фибрилл проводили следующим образом. Стоковый раствор коллагена разводили 0.01M фосфатным буфером (pH=7.4) на холоду ( $t=5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) до результирующей концентрации коллагена 0.1 мг/мл и добавляли рассчитанное количество 10% спиртового раствора таксифолина так, чтобы результирующая концентрации его в образцах составляла  $10^{-5}$  –  $10^{-1}$  весовых %. В качестве контроля



использовали растворы коллагена, в которые было добавлено соответствующее количество спирта (50 мкл на 10 мл). Доводили pH растворов до значения 7.4 при постоянном перемешивании на холоду путем добавления 0.1M NaOH после чего половину объема раствора оставляли при комнатной температуре (20°C), а вторую половину раствора помещали в термостат, установленный на 37°C. Исследование образцов проводили через сутки.

Термодинамические характеристики коллагена определяли с помощью метода сканирующей калориметрии на микрокалориметре ДАСМ-4 (НПО Биоприбор, Россия). Скорость прогрева составляла 1К/мин, точность записи температуры составляла 0.1°C. Сбор данных осуществляли автоматически на компьютере при помощи программы SCAL .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В фосфатном буфере молекулы коллагена спонтанно образуют фибриллы, при этом, визуальное наблюдение обнаруживает существенную разницу внешнего вида препарата коллагена в нейтральной среде (pH 7,4) в присутствии 0,1% таксифолина по сравнению с препаратом, в котором таксифолин отсутствовал. Как было видно, через 24 часа после приготовления, прозрачность контрольного препарата без таксифолина была существенно выше, чем препарата с таксифолином. Более того, в присутствии таксифолина наблюдалось образование крупных нитей коллагена, легко различимых при визуальном наблюдении (не показано). Динамику фибриллообразования можно было регистрировать по изменению светорассеяния [4]. На рисунке 1 представлены кривые изменения светорассеяния коллагена в присутствии таксифолина.

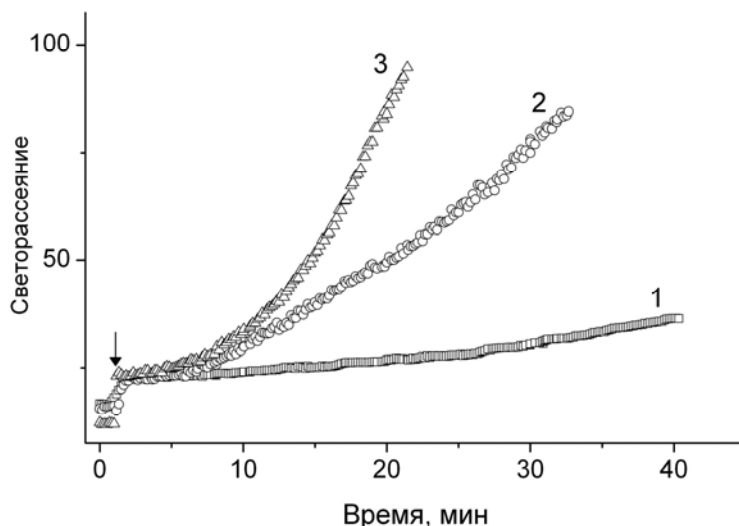


Рис. 1. Изменение интенсивности рассеяния света под прямым углом при длине волны 510 нм в суспензии коллагена (0,1 мг/мл). Среда инкубации – 10 мМ фосфатный буфер (pH 7,4), температура 25 °C. Стрелкой указан момент введения белка в ячейку. (1) – контрольный препарат коллагена (0,1 мг/мл); (2) – то же, в присутствии 0,001% таксифолина; (3) – 0,01% таксифолина

Как следует из рисунка, в контрольном образце, не содержащем таксифолина, процесс фибриллообразования при выбранных условиях начинался приблизительно через десять минут инкубации и развивался очень медленно. В присутствии таксифолина процесс образования фибрилл ускорялся и начинался ранее, чем в контроле. Это свидетельствует о способности таксифолина ускорять образование фибрилл.

Образование фибрилл коллагена можно было наблюдать также методами электронной микроскопии. На рис. 2 представлены фибриллы коллагена, сформированные в присутствии различных концентраций таксифолина.

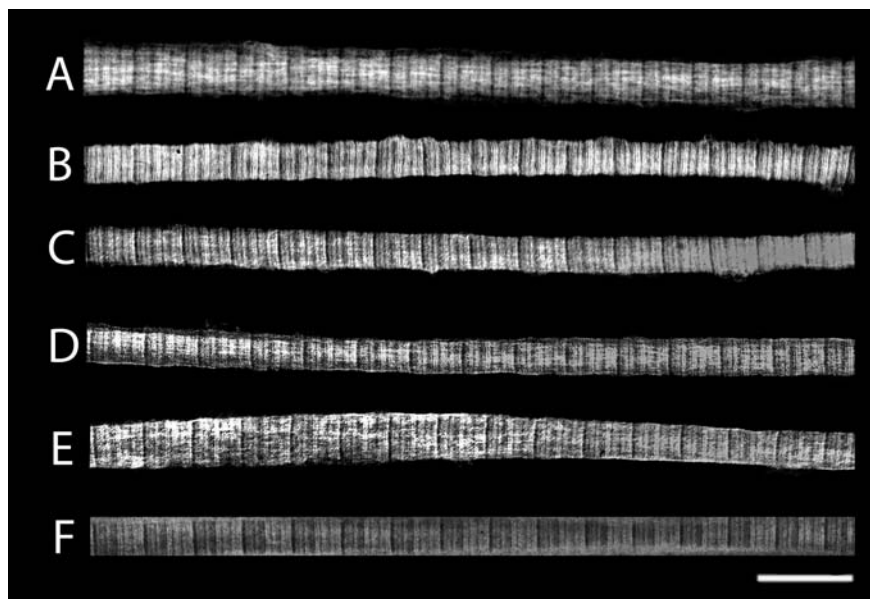


Рис. 2. Электронные микрофотографии фибрилл коллагена, сформированных в присутствии различных концентраций таксифолина. 10мМ фосфатный буфер (pH 7,4), 20°C. Процесс фибриллообразования происходил в течение 24 часов. Препарат был окрашен 1% фосфорновольфрамовой кислотой и 1% уранилацетатом. А – контрольный препарат; В –  $10^{-5}\%$ , С-  $10^{-4}\%$ , D –  $10^{-3}\%$ , E –  $10^{-2}\%$ , F -  $10^{-1}\%$  таксифолина. Масштабная черта 130 нм

На всех представленных микрофотографиях видна характерная для фибрилл коллагена поперечная полосатость с периодом около 64-67 нм. В присутствии таксифолина хорошо сохраняются характерные структурные особенности фибрилл, что свидетельствует о том, что таксифолин не вызывает нарушений в структуре фибрилл. Более того, при высоких концентрациях таксифолина периодичность была более выражена.

Как следует из термограмм препаратов коллагена, в кислой среде белок плавился при  $41,3 \pm 0,3$  °C (не показано), а в нейтральной среде – при  $50 \pm 2$  °C (Рис.3, таблица 2). Известно, что в кислой среде молекулы коллагена находятся в мономерной форме и имеют более низкую температуру плавления, тогда как при переходе в нейтральную среду этот белок способен спонтанно образовывать фибриллы, имеющие более высокую температуру плавления [12].

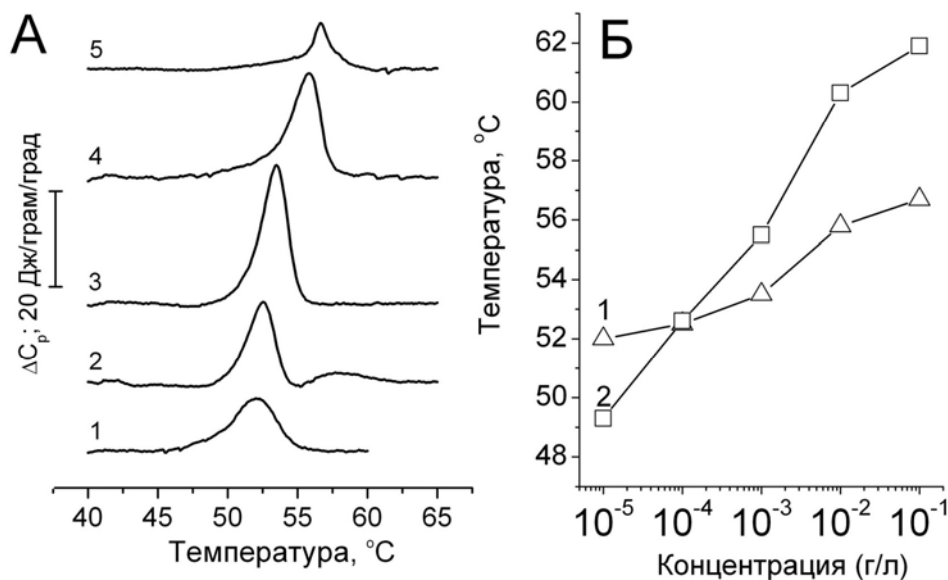


Рис. 3. Дифференциальная сканирующая калориметрия препарата коллагена в 0.01М фосфатном буфере (рН=7.4). А - кривые плавления коллагена (0.1 мг/мл) в присутствии различных концентраций таксифолина. Препарат приготовлен в 10 мМ фосфатном буфере (рН 7,4), после приготовления препарат хранился при 20°C в течение 12 час. (1) – контроль без таксифолина, (2) – 0,0001% таксифолина; (3) – 0,001%; (4) – 0,01%; (5) – 0,1% таксифолина; Б – зависимость температуры фазового перехода волокон коллагена от концентрации таксифолина (1) – препарат хранился при 20 °С в течение 12 час (данные взяты из кривых рис. 3А); (2) – условия, как в предыдущем эксперименте, но препарат хранился при 37 °С в течение 12 час.

Кривые плавления наших препаратов всегда имели один максимум, следовательно, в кислой среде весь белок находился в мономерной форме, а в нейтральной среде весь белок вовлекался в процесс формирования фибрилл.



**Таблица 1.** Термодинамические характеристики фибрилл коллагена, сформированных в 0.01M фосфатном буфере при pH=7.4. T<sub>m</sub> – температура максимума перехода; T<sub>1/2</sub> – полуширина перехода.

Таксифолин %	Инкубация при 20 °С *		Инкубация при 37 °С*	
	T <sub>m</sub>	T <sub>1/2</sub>	T <sub>m</sub>	T <sub>1/2</sub>
0	52.0	3.2	48.3	2.8
10 <sup>-5</sup>	52.0	3.2	49.3	1.8
10 <sup>-4</sup>	52.5	2.1	52.6	2.3
10 <sup>-3</sup>	53.5	2.2	55.5	2
10 <sup>-2</sup>	55.8	2.3	60.3	1.9
10 <sup>-1</sup>	56.7	1.0	61.9	1

\* указана температура, при которой препарат хранился в течение 12 час после приготовления и перед заправкой в калориметр.

В присутствии таксифолина в концентрациях 10<sup>-5</sup> – 10<sup>-1</sup>% температура плавления мономерной формы коллагена в кислой среде не изменялась (не показано), тогда как фибриллы коллагена, образованные в нейтральной среде, становились более термостабильными (Рис.2 и таблица 1). Как следует из рисунка 2Б, с увеличением концентрации таксифолина происходил экспоненциальный рост термостабильности фибрилл коллагена, о чем свидетельствует почти линейная зависимость роста термостабильности фибрилл коллагена от логарифма концентрации таксифолина. Следует отметить, что при низких концентрациях таксифолина, так же как и при его полном отсутствии в контрольном препарате коллагена, инкубация белка при 37 °С приводила к снижению термостабильности коллагена (Рис. 2Б). Однако эти различия полностью исчезали при концентрации таксифолина 10<sup>-4</sup>%, а при более высоких концентрациях наблюдается существенный рост термостабильности фибрилл коллагена при 37°С. Таким образом, стабилизирующее влияние таксифолина особенно выражено в нейтральных средах, в условиях, способствующих формированию фибрилл, тогда как отдельные молекулы коллагена, присутствующие в кислой среде, не чувствительны к таксифолину.



Известно, что тепловая денатурация коллагена сопровождается разрушением водородных связей между субъединицами белка и переходом спиральной структуры в неупорядоченный клубок. В стабилизации молекул коллагена большую роль играют как гидрофобные взаимодействия, определяемые, большей частью, остатками глицина, так и водородные связи, образованные между остатками гидроксипролина [9]. Молекулы полифенолов, к числу которых относится таксифолин, имеют большое количество гидроксильных групп, но при этом плохо растворимы в воде благодаря наличию гидрофобных ароматических колец. Мы предполагаем, что сочетание сравнительно высокой гидрофобности и способности образовывать водородные связи позволяет этим молекулам внедряться в определенные области фибрилл коллагена и способствовать стабилизации их структуры.

Способность некоторых флавоноидов взаимодействовать с коллагеном была обнаружена давно [3]. Было показано, что при этом могут образовываться межмолекулярные сшивки, стабилизирующие белок. В настоящее время, коллагеновые гели, обработанные определенными флавоноидами, предлагается использовать для заживления ран, создания биосовместимых материалов, косметических средств и микроконтейнеров для доставки лекарств [4,5,7]. Обнаруженная нами способность таксифолина (дигидрокверцетина) способствовать процессам фибриллообразования и стабилизировать фибриллы коллагена позволяет понять некоторые аспекты биологической активности этого вещества [1,2] и открывает новые перспективы для его использования в различных областях медицины, косметики и пищевой промышленности.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Колхир В.К., Тюкавкина Н.А., Быков В.А. и др. // Хим.-фарм. журнал. 1995. № 9. С. 61
2. Тюкавкина Н.А., Руленко И.А., Колесник Ю.С. // Вопросы питания. 1996. № 2, С. 33-38.
3. Bose S.M. et al. // J.Belge Rheumatol.Med.Phys. 1976. V. 31. P. 153-170.
4. Gomathi K., et al. // Biomaterials. 2003. V. 24. P. 2767-2772.
5. Han B., et al // J.Biomed.Mater.Res.A, 2003. V. 65, P. 118-124.
6. Lopez-Lazaro M. // Curr.Med.Chem. 2002. V. 2. P. 691-714.
7. Madhan B., et al. // Int.J.Biol.Macromol. 2005. V. 37, P. 47-53.
8. Manach C., Williamson G., Morand C., et al. // Am.J.Clin.Nutr. 2005. V. 81. P. 230S – 242S.
9. Miles C.A., Bailey A.J. // Micron. 2001. V. 32. P. 325-332.
10. Rietjens I.M.C.M., Boersma M.G., Woude van der H. et al.// Mutation Res. 2005. V. 574. P. 124-138.
11. Ross J.A., Kasum C.M.// Annu. Rev. Nutr. 2002. V. 22. P. 19-34.
12. Tiktolupo E.I., Kajava A.V. // Biochemistry. 1998.V.37. P. 8147-8152.
13. Voet D., Voet J.G. //Biochemistry. New York. 1995.
14. Williams R.J., Spencer J.P.E., Rice-Evans C. // Free Radical Biol. Med. 2004. V. 36. P. 838-849.