

## Взаимодействие флавонола кверцетина с коллагеном \*

Е. А. Ягольник, Е. Н. Музафаров, Ю. А. Ким, Ю. С. Тараховский

*Аннотация.* Проведенное исследование показывает, что при взаимодействии флавонола кверцетина с фибриллярным белком коллагеном типа-1 в спектре поглощения флавонола (полосы 1) происходит сдвиг в коротковолновую область и уменьшается величина оптической плотности в данном диапазоне спектра. Коллаген также способствует уменьшению интенсивности флуоресценции кверцетина, что говорит о связи флавонола с белком. Методом фотоно-корреляционной спектроскопии было получено, что средний размер частиц в образце с коллагеном возрастает после добавления кверцетина, что предполагает возможность агрегации флавонола с белком.

*Ключевые слова:* кверцетин, коллаген, фибриллярный белок, фотоно-корреляционная спектроскопия, дифференциальной сканирующей калориметрии.

### Введение

В последние десятилетия пристальное внимание исследователей привлекают продукты вторичного метаболизма растений — флавоноиды, в связи с широким спектром их биологического действия. Флавоноиды — это вещества растительного происхождения, принадлежащие к полифенолам, обладают положительным влиянием на здоровье человека и некоторые из них широко используются в медицине [1]. На организм человека флавоноиды оказывают антибактериальное, противоопухолевое, антиоксидантное действие, обеспечивают защиту от УФ-излучения, которое является вредным фактором, действующим практически постоянно на кожу и вызывающим повреждение биологических молекул (белков, нуклеиновых кислот) [2]. Среди них кверцетин и его гликозид рутин являются одними из наиболее известных и хорошо изученных флавонолов, которые широко распространены в растительном мире. Считается, что кверцетин может оказывать положительное влияние на метаболизм, препятствуя развитию ожирения. Было показано

\* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 14-04-31308 и № 13-04-97526).

как на животных моделях, так и в экспериментах на человеке, что кверцетин может проявлять противовоспалительное действие и препятствовать развитию атеросклероза. Он может также препятствовать пролиферации клеток опухолей, снижает экспрессию факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний. Несмотря на многочисленные исследования действия кверцетина на животных и добровольцах, полномасштабных клинических испытаний, подтверждающих возможность использования кверцетина или его гликозидов в качестве лекарственных веществ, недостаточно.

В связи с этим значительный интерес представляет изучение возможности взаимодействия флавонолов с основным белком кожи, которым является коллаген. Коллаген — фибриллярный белок, составляющий основу соединительной ткани организма и обеспечивающий её прочность и эластичность. Функция коллагена заключается в создании высокопрочных компонентов тканей нашего тела, включая костную ткань, зубы, хрящи, сухожилия, связки, фибриллярные компоненты сосудов и кожи. Молекула коллагена, иногда называемая тропоколлагеном, состоит из трех спирально скрученных белковых нитей, субъединиц, каждая из которых имеет ровно 1050 аминокислотных остатков. Некоторые типы коллагенов, включая коллаген типа-I, образуют характерные поперечно-полосатые фибриллы. Фибриллы образованы множеством параллельно-ориентированных молекул тропоколлагена и представляют собой следующий более высокий уровень организации коллагена [3]. В данной работе был использован коллаген типа-I, который присутствует в коже, сухожилиях, костях, кровеносных сосудах, роговице глаза и т.д. В настоящей работе было проведено исследование взаимодействия кверцетина и коллагена на предмет образования функционального комплекса, под которым подразумевается процесс фибриллообразования.

## **1. Материалы и методы**

В работе использовали коллаген типа-I, выделенный из хвостов крыс по методу [4]. Использовали коммерческий препарат кверцетина фирмы Sigma, растворенный в этаноле. Запись спектров поглощения кверцетина и его комплекса с коллагеном проводили на спектрофотометре М-40, в кварцевой спектрофотометрической кювете (2 мл). Все измерения проводили в 10 мМ Трис – HCl буфере, pH 7,4. Запись спектров поглощения осуществляли с помощью программы M40.exe на компьютере, подключенном к прибору.

Спектры флуоресценции кверцетина и его комплекса с коллагеном измеряли на спектрофлуориметре Perkin-Elmer MPF-44B в кварцевой термостатируемой кювете объемом 2мл при температуре 20° С. Все измерения проведены в 20 мМ Трис – HCl, pH 7,4 буфере. Этим же методом определяли константу связывания кверцетина с коллагеном. Константа связывания флавонола с белком была определена из графика зависимости интенсивности флуоресценции кверцетина от концентрации коллагена. Запись спектров

флуоресценции осуществляли с помощью программы MPF44.exe на компьютере, подключенном к прибору.

Динамику рассеяния света под  $90^\circ$  в образцах с коллагеном в присутствии кверцетина снимали на спектрофлуориметре Perkin-Elmer MPF-44B в кварцевой термостатируемой кювете объёмом 2 мл на длине волны 400 нм при температуре  $20^\circ\text{C}$ . Все измерения проведены в 20 мМ Трис – HCl буфере. Запись кинетики рассеяния света осуществляли с помощью программы MPF44.exe на компьютере, подключенном к прибору.

Размер фибрилл и агрегатов коллагена определяли методом фотонокорреляционной спектроскопии (Dynamic Light Scattering), для чего использовали анализатор субмикронных частиц N5 Submicron Particle Size Analyzer (Beckman Coulter, США). Прибор работал в режиме процессорного анализа распределения по размерам (ППР), позволяющего исследовать полидисперсные образцы. Для измерения в кювету, содержащую 2 мл трис-HCl, 20 мМ (pH 7.4), добавляли 50 мкл коллагена концентрацией 0,12 мг/мл. В различных экспериментах в кювету могли быть добавлены также по 10 мкл растворов флавоноидов. Исходная концентрация каждого раствора была  $4 \cdot 10^{-5}$  М. Перед измерением раствор буфера пропускали через фильтр с размером пор 10 мкм для удаления возможных примесей пыли. Измерения проводились под углом  $90^\circ$ .

Температурную зависимость избыточного удельного теплопоглощения (далее термограммы) растворов коллагена регистрировали с помощью дифференциального адиабатного сканирующего микрокалориметра ДАСМ-4 (ИБП РАН, Россия). Объём ячейки 800 мкл. Измерения проведены в 20 мМ Трис – HCl буфере и 20 мМ натрий-фосфатном буфере, при скорости прогрева 1 К/мин. Запись термограмм осуществлялась с помощью программы Wscal на компьютере, подключенном к прибору. Анализ всех полученных результатов проводили с помощью Origin 8.0 и MS Excel.

## **2. Результаты и обсуждение**

Из литературных данных известно, что спектр поглощения большинства флавоноидов характеризуется наличием двух основных максимумов (полос) поглощения [5]. Характерный желтый цвет, присущий значительной части флавоноидов, обусловлен способностью их молекул поглощать свет в области 320–420 нм (полоса 1). Наличие или отсутствие в спектре поглощения полосы 1 определяется степенью окисленности кольца С. На положение максимума поглощения полосы 1 у флавонолов влияет наличие гидроксильной группы при С<sub>3</sub>, количество и положение гидроксильных групп в кольце В. Флавоноиды, благодаря своей полифенольной природе, имеют выраженные электронно-донорные свойства. Способность полифенолов термодинамически восстанавливать различные сильно окисленные продукты и, в первую очередь, свободные радикалы обусловлена их низким восстановительным потенциалом (E<sub>7</sub>). Для большинства флавоноидов E<sub>7</sub> лежит в диапазоне

0,25–0,75. Известно, что общим свойством флавоноидов, в частности и флавонолов, является их способность взаимодействовать с белками. При этом изменяются спектральные свойства флавонолов, являющиеся одним из признаков образования комплекса с молекулой белка.

**Спектры поглощения кверцетина и его комплекса с коллагеном.** На рис. 1 представлены спектры поглощения кверцетина и его комплекса с коллагеном. На рисунке видно, что при взаимодействии с коллагеном в течение определенного времени наблюдается незначительный сдвиг максимума полосы поглощения кверцетина 350 нм в коротковолновую сторону, что, возможно, объясняется образованием комплекса флавонола с белком. С течением времени также снижается интенсивность поглощения.

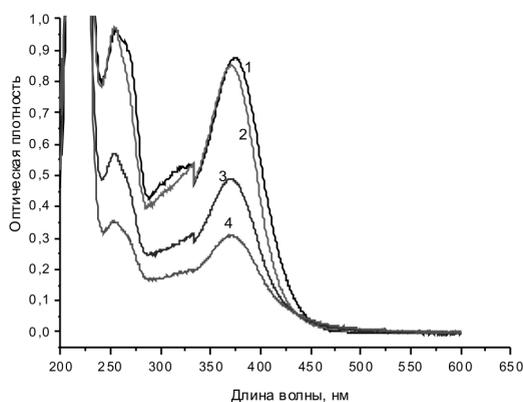


Рис. 1. Спектры поглощения кверцетина и его комплекса с коллагеном:  
1 — кверцетин,  $5 \cdot 10^{-5}$  М; 2 — кверцетин,  $5 \cdot 10^{-5}$  М + коллаген, 0,06 мг/мл; 3 — спектр поглощения комплекса через 30 мин;  
4 — спектр поглощения комплекса через 60 мин.  
Среда измерения — 20мМ Трис – HCl, pH 7,4, T=20° С

**Спектры флуоресценции кверцетина и его комплекса с коллагеном.** На рис.2 представлены спектры флуоресценции кверцетина и его комплекса с коллагеном. При облучении светом длиной волны 370 нм молекулы кверцетина флуоресцируют с максимумом в области 545 нм. Образование комплекса с коллагеном сопровождается уменьшением интенсивности флуоресценции флавонола при длине волны 545 нм, по-видимому, вследствие ее тушения молекулами коллагена.

**Динамика изменения оптической плотности кверцетина и его комплекса с коллагеном.** Известно, что окисление флавоноидов сопровождается характерными изменениями в их спектрах поглощения [6, 7]. В частности, у флавонолов в процессе окисления наблюдаются выцветание и исчезновение полос 1 и 2, при этом в спектре поглощения флавонолов

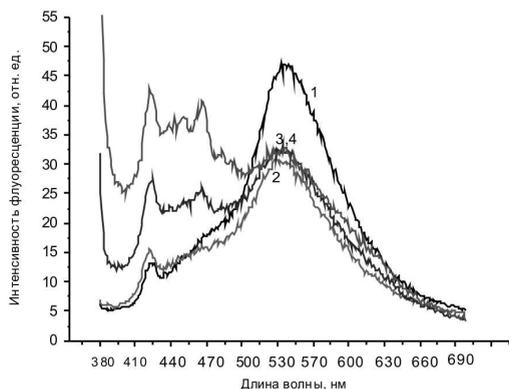


Рис. 2. Спектры флуоресценции кверцетина и комплекса с коллагеном: 1 — кверцетин,  $5 \cdot 10^{-5}$  М; 2 — кверцетин,  $5 \cdot 10^{-5}$  М + коллаген, 0,06 мг/мл; 3 — спектр флуоресценции комплекса через 30 мин.; 4 — спектр флуоресценции комплекса через 60 мин.  $\lambda_{возб} = 370$  нм. Среда измерения — 20мМ Трис – HCl, pH 7,4, T=20° С

появляется новый максимум при 325 нм (полоса 3), который при дальнейшем окислении сначала увеличивается, а затем уменьшается и исчезает.

Кроме спектральных изменений в области полос 1 и 2, окисление флавонолов сопровождается появлением полосы поглощения в красной области спектра (500–600 нм), однако величины спектральных изменений в этом случае на порядок ниже, чем спектральные изменения в УФ и желтой области спектра.

Как следует из представленного рис. 3, оптическая плотность в максимуме (375 нм) поглощения света кверцетином в растворе с 20 мМ Трис – HCl, pH 7,4 медленно падает, что, казалось бы, свидетельствует об автоокислении флавоноида. Однако в присутствии коллагена процесс ускоряется и, возможно, это связано не только с процессом автоокисления кверцетина, но и с процессом связывания флавонола с белком. Такое развитие событий показывают и кривые с увеличенной концентрацией коллагена.

**Определение константы связывания флавонолов с коллагеном по данным флуоресценции.** Для определения константы связывания флавонолов с коллагеном были сняты спектры флуоресценции кверцетина в присутствии различных концентраций коллагена. В этих экспериментах коллаген выступает в качестве молекул тушителя флуоресценции флавонола (см. рис. 2). Из графика зависимости интенсивности флуоресценции кверцетина (рис. 4) от концентрации коллагена были определены константы связывания флавонолов с белком. Из графика следует, что константа связывания кверцетина с коллагеном равна  $8,29 \cdot 10^{-8}$  М.

**Изучение динамики рассеяния света в образце с коллагеном в присутствии флавонолов.** Динамику фибриллообразования можно регистрировать также по изменению светорассеяния. На рис. 5 представлены

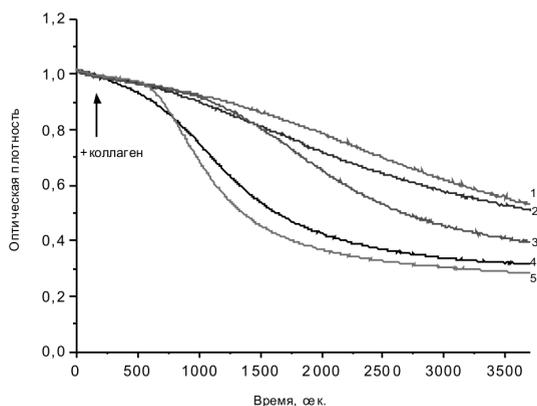


Рис. 3. Динамика изменения оптической плотности кверцетина ( $5 \cdot 10^{-5}$  М) при действии коллагена различной концентрации: 1 — кверцетин; 2 — 0,015 мг/мл; 3 — 0,03 мг/мл; 4 — 0,06 мг/мл; 5 — 0,12 мг/мл;  $\lambda = 375$  нм. Среда измерения — 10мМ Трис — HCl, pH 7,4,  $T=20^\circ \text{C}$

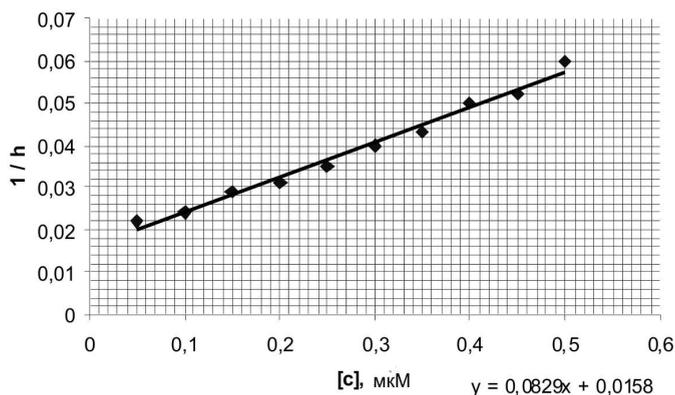


Рис. 4. Определение константы связывания кверцетина с коллагеном по данным его флуоресценции при взаимодействии с белком разной концентрации

кривые изменения светорассеяния в контроле и в образцах, содержащих различные концентрации коллагена. Как показали эксперименты, в контрольном образце, не содержащем флавонола, процесс фибриллообразования при выбранных условиях начинается приблизительно через десять минут инкубации и развивается очень медленно. В присутствии флавонола процесс образования фибрилл ускоряется и начинается ранее, чем в контроле. Это свидетельствует об ускорении фибриллообразования, индуцированного флавонолами [8]. Как видно из рис. 5, сам кверцетин в измеряемой среде без коллагена не дает заметного увеличения интенсивности рассеянного света. В других экспериментах (данные не приведены) присутствие глобулярного

белка — сывороточного альбумина человека — также не влияет на измеряемый параметр.

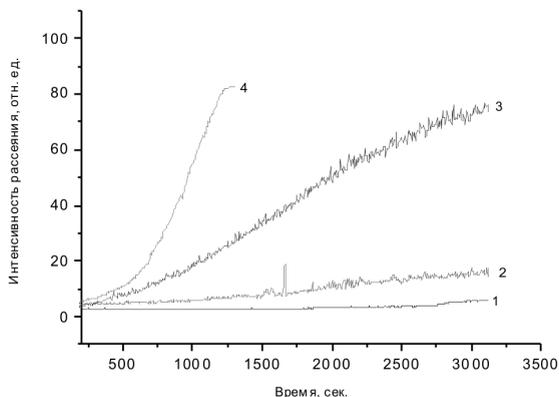


Рис. 5. Динамика рассеяния света под углом 900 на длине волны 400 нм в образце с кверцетином ( $5 \cdot 10^{-5}$  М) при действии различной концентрации коллагена: 1 — кверцетин; 2 — коллаген- 0,03 мг/мл; 3 — коллаген- 0,06 мг/мл; 4 — коллаген- 0,12 мг/мл;  $\lambda = 400$  нм. Среда измерения: 20 мМ Трис – HCl, pH 7,4, T = 20° C

Методом фотоно-корреляционной спектроскопии было получено, что средний размер частиц в образце с коллагеном несколько возрос после добавления кверцетина, что очевидно было причиной наблюдаемого выше роста светорассеяния.

ТАБЛИЦА 1

Размеры частиц в образце с коллагеном до и после добавления кверцетина

Образец	Средний размер, нм	Количество, %
Контроль	$7,4 \pm 0,9$	94,28
Коллаген+кверцетин, через 15 мин	$8,1 \pm 1,4$	99,01
Коллаген+кверцетин через 30 мин	$10,4 \pm 1,6$	100,00

Обнаруженные нами изменения размеров частиц в образце с коллагеном предполагают возможность агрегации молекул коллагена.

**Исследование влияния флавонолов на термоденатурацию коллагена методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК).** Термограммы плавления коллагена характеризуются наличием температурного пика, который приходится на 39° C. При данной температуре наступает денатурация белка. На рис. 6 представлены термограммы плавления коллагена (1) до и после дополнительной очистки коллагена (2) в фосфатном буфере. На термограмме (1) появляется ещё один пик

( $T = 45^{\circ}\text{C}$ ) или образуются фракции коллагена с температурой денатурации  $T = 45^{\circ}\text{C}$  в высокотемпературном плече термограммы, что может свидетельствовать о переходе белка из мономерной формы в димерную, т.е. об агрегации молекул белка. Для того чтобы избавиться от данного пика, была проведена дополнительная очистка коллагена. Как видно из рис. 6 на термограмме (2) после очистки коллагена образования ещё одного пика не происходит.

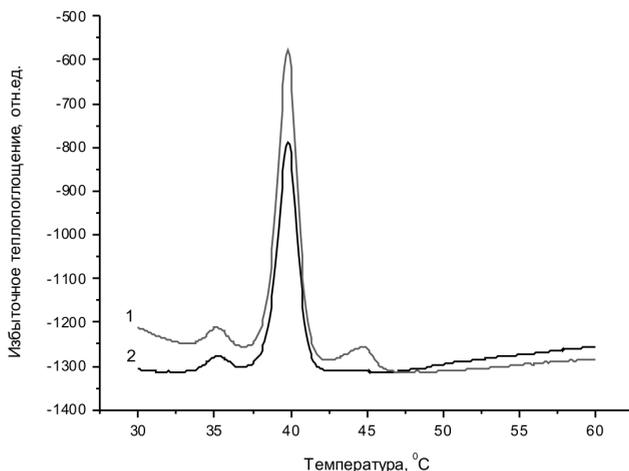


Рис. 6. Термограммы плавления коллагена в фосфатном буфере:  
1 — коллаген неочищенный, 0,3 мг/мл, 2 — коллаген очищенный,  
0,3 мг/мл. Среда измерения: 20 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 145 мМ  $\text{NaCl}$ , pH 7,4.  
Температура инкубации:  $T = 4^{\circ}\text{C}$

В кислой среде коллаген образует раствор из отдельных молекул тропоколлагена. При доведении pH до нейтральных значений молекулы тропоколлагена способны спонтанно собираться в фибриллы. При этом восстанавливается также характерная для фибрилл поперечная полосатость. Когда коллаген находится в кислой среде, фибриллы не образуются или образуются очень медленно в течение нескольких суток в зависимости от концентрации белка и температуры среды инкубации [9].

Для того, чтобы понять какую роль могут играть в описанных процессах количество гидроксильных групп в молекуле флавонола, мы использовали также кемпферол (ОН в положении 41) и мирицетин (ОН в положении 2<sup>1</sup>, 3<sup>1</sup>, 4<sup>1</sup>) (рис. 7). На рис. 8 представлены термограммы плавления коллагена при действии флавонолов: мирицетина, кверцетина и кемпферола в трис-буфере. Термограмма плавления коллагена характеризуется температурным пиком, который приходится на  $48^{\circ}\text{C}$ . В присутствии мирицетина температура плавления коллагена увеличивается, т. е. фибриллы коллагена становятся более термостабильными.



Рис. 7. Структурные формулы исследуемых веществ

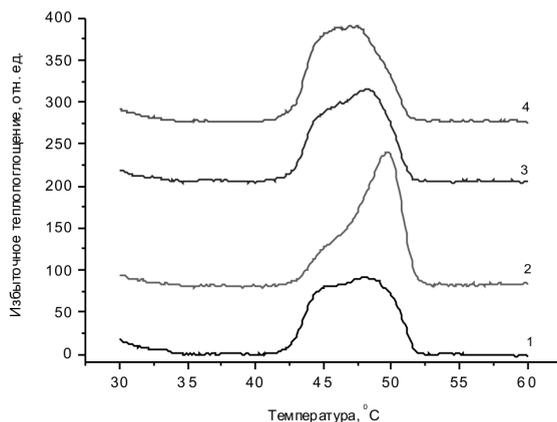


Рис. 8. Термограммы плавления коллагена (0,27 мг/мл) при действии флавонолов ( $1,25 \cdot 10^{-5}$  М) кверцетина, мирицетина и кемпферола:  
 1 — коллаген; 2 — коллаген + мирицетин; 3 — коллаген + кверцетин, 4 — коллаген + кемпферол. Среда измерения: 20 мМ Трис – HCl, pH 7,4. Время инкубации: 1 час; температура инкубации:  $T = 22^\circ C$

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 [10]. Молекулы полифенолов, к числу которых относится мирицетин, 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.

ТАБЛИЦА 2

Термодинамические параметры плавления коллагена

Образцы	Температура максимума плавления коллагена $T_m$ , °C	Полуширина фазового перехода, $T_{1/2}$
1. Контроль	48,0	2,6
2. Мирицетин	49,8	1,9
3. Кверцетин	48,1	2,4
4. Кемпферол	47,5	2,3

При действии кверцетина и кемпферола на коллаген температура денатурации белка практически не отличается от контроля, хотя также происходит незначительное сужение пика. Стоит отметить, что стабилизирующее воздействие мирицетина выше, чем кверцетина и кемпферола, что, по-видимому, свидетельствует о формировании большего количества водородных связей между гидроксигруппами мирицетина и гидроксильными аминокислотами, входящими в состав молекул коллагена.

Таким образом, проведенное исследование показывает, что при взаимодействии кверцетина с фибриллярным белком — коллагеном типа-1 происходит незначительный сдвиг максимума поглощения флавонола (полосы 1) в коротковолновую область и с течением времени уменьшается величина оптической плотности в данном диапазоне спектра. Коллаген также способствует уменьшению интенсивности флуоресценции кверцетина, что предполагает в большей степени связывание флавонола белком. По спектру флуоресценции была определена константа связывания кверцетина с коллагеном. Была показана динамика фибриллообразования зарегистрированная по изменению светорассеяния. Методом фотоно-корреляционной спектроскопии было получено, что средний размер частиц в образце с коллагеном несколько возрастал после добавления кверцетина, что очевидно было причиной наблюдаемого выше роста светорассеяния. При исследовании влияния флавонолов на термоденатурацию коллагена методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) показано, что температура максимума плавления коллагена и полуширина фазового перехода в определенной степени зависят от количества гидроксильных групп в молекуле флавонола. При их увеличении возрастает стабилизирующее действие полифенола на белок с образованием большего количества водородных связей, что предполагает активизацию фибриллообразования в белке.

## Список литературы

1. *Williams R.J., Spenger J.P.E., Rice-Evans C.* // *Free Radical Biology & Medicine*. 2004. V. 36. № 7. P. 838.
2. *Rice-Evans C.A., Packer L.* *Flavonoids in Health and Disease*. New York, 1997.
3. STEM/TEM studies of collagen fibril assembly / D.F. Holmes, H.K. Graham, J.A. Trotter, K.E. Kadler // *Micron*. 2001. V. 32. № 3. P. 273–285.
4. *Price P.J.* Preparation and use of rat-tail Collagen // *TCA Manual*. 1975. V. 1. P. 43–44.
5. *Markham K.R.* *Techniques of Flavonoid Identification*. London: Academ. Press, 1982. 113 p.
6. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions / M.A. Soobrattee [et al.] // *Mutat. Res*. 2005. V. 579. № 1/2. P. 200–213.
7. *Cermak R., Wolffram S.* The potential of flavonoids to influence drug metabolism and pharmacokinetics by local gastrointestinal mechanisms // *Curr. Drug Metab*. 2006. V. 7. P. 729–744.
8. Calcium-dependent aggregation and fusion of phosphatidylcholine liposomes induced by complexes of flavonoids with divalent iron / Y.S. Tarahovsky, E.A. Yagolnik, E.N. Muzafarov, B.S. Abdrasilov, Yu.A. Kim // *Biochim. Biophys. Acta*. 2012. V. 1818. № 3. P. 695–702.
9. *Музафаров Е.Н., Ягольник Е.А., Ким Ю.А.* Защитный эффект экстрактов растений при воздействии УФ-излучения на коллаген, липидные мембраны и кожу // *Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. статей*. Научный мир, 2010. С. 204–214.
10. *Яковлев Г.П., Блинова К.Ф.* *Растения для нас: справочное издание*. СПб.: Учебная книга, 1996. 652 с.

*Ягольник Елена Андреевна* (yea\_88@mail.ru), к.б.н., ассистент, кафедра биологии, Тульский государственный университет.

*Музафаров Евгений Назибович* (enmuzafarov@mail.ru), д.б.н., зав. кафедрой, кафедра биологии, Тульский государственный университет.

*Ким Юрий Алесксандрович* (yuk01@ Rambler.ru), д.ф.-м.н., в.н.с., Институт биофизики клетки РАН, Пущино.

*Тараховский Юрий Семенович* (tarahov@ Rambler.ru), д.б.н., в.н.с., Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино.

## The interaction of flavonol quercetin with collagen

E. A. Yagolnik, E. N. Muzafarov, Yu. A. Kim, Yu. S. Tarahovsky

*Abstract.* This research shows that there is a shift to shorter wavelengths and the magnitude of optical density in the spectrum is decreased in the reaction

flavonol quercetin with the fibrillar collagen protein type-1 in the absorption spectrum of flavonol (strip 1). Collagen also helps to reduce the intensity of fluorescence of quercetin, indicating that flavonol connect with protein. By photon correlation spectroscopy it was found that the average particle size in the sample with collagen increases after the addition of quercetin, suggesting the possibility of aggregation protein with flavonol.

*Keywords:* quercetin, collagen, fibrillar protein, fotona-correlational spectroscopy, differential scanning calorimetry.

*Yagolnik Elena* (yea\_88@mail.ru), candidate of biological sciences, assistant, department of biology, Tula State University.

*Muzafarov Eugeny* (enmuzafarov@mail.ru), doctor of biological sciences, head of department, department of biology, Tula State University.

*Kim Yuri* (yuk01@rambler.ru), doctor of physical and mathematical sciences, leading researcher, Institute of Cell Biophysics, Pushchino.

*Tarakhovsky Yury* (tarahov@rambler.ru), doctor of biological sciences, leading researcher, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino.

*Поступила 26.01.2015*