

ВЛИЯНИЕ ПРОСТЫХ ФЕНОЛОВ НА ПРОЦЕСС ФИБРИЛЛОГЕНЕЗА КОЛЛАГЕНА I ТИПА *in vitro*

© 2018 г. Ю.А. Ким, С.Г. Гайдин, Ю.С. Тараховский*

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

**Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3*

E-mail: yuk01@rambler.ru

Поступила в редакцию 27.11.17 г.

Исследовано влияние ряда различных фенольных соединений, содержащих различное количество гидроксильных групп в молекуле (фенол, пирокатехин, резорцин, пирогаллол), на кинетику процесса фибриллогенеза коллагена и структуру образующихся фибрилл *in vitro*. Установлено, что данные фенолы ускоряют процесс формирования фибрилл, при этом в наибольшей степени сокращая длительность лаг-фазы, предположительно облегчая процесс формирования димеров коллагена и их последующего объединения в линейные агрегаты. Ускоряющая способность фенолов по отношению к процессу фибриллогенеза усиливалась в ряду фенол < резорцин < пирогаллол и была пропорциональна количеству гидроксильных групп в молекуле. Таким образом, данный феномен ускорения процесса фибриллогенеза коллагена может, предположительно, объясняться способностью фенолов формировать водородные связи с аминокислотными остатками полипептидных цепей коллагена и тем самым стабилизировать структуру промежуточных агрегатов в процессе фибриллогенеза, облегчая их взаимодействие между собой.

Ключевые слова: коллаген I типа, фибриллогенез, фенол, пирокатехин, пирогаллол, резорцин.

К фенолам принято относить ароматические соединения, которые в своей молекуле содержат бензольное кольцо с одной или несколькими гидроксильными группами [1]. Их разделяют на собственно фенолы и полифенолы. Данная классификация основана на количестве фенильных групп, входящих в состав молекулы [2]. Количество гидроксильных групп в молекулах фенолов может быть различным, что может оказывать влияние на физико-химические свойства и определять биологическую активность соединения [3,4]. В настоящее время особый интерес представляют растительные полифенольные соединения. Одним из самых многочисленных классов растительных полифенолов принято считать флавоноиды [5,6], молекулы которых состоят из определенного количества структурных единиц, напоминающих по строению молекулы фенолов [6,7]. Природные фенолы часто проявляют высокую биологическую активность [8,9]. В наибольшей степени отмечают их антиоксидантную и противоопухолевую активность, кардио- и нейропротективное действие [10–12].

Фенольные соединения способны взаимодействовать с молекулами белков путем формирования водородных связей между гидрок-

сильными группами ароматического кольца и карбоксильными группами полипептидных цепей молекул белков [5]. Особый интерес представляет собой взаимодействие фенольных соединений с фибриллярными белками, в частности коллагеном. В данном случае молекулы фенолов могут выступать как связывающие элементы, образуя поперечные шивки (кросс-линки), влияя тем самым на механическую и термическую стабильность фибрилл [13,14]. Ранее было показано, что кроме того, что фенольные соединения могут влиять на уже сформированные фибриллы, полифенольные соединения класса флавоноидов могут влиять на процесс спонтанной самосборки фибрилл коллагена I типа, ускоряя или полностью подавляя его [15, 16]. Эти различия были обусловлены характером взаимодействия данных соединений с молекулами белка и определялись числом и расположением гидроксильных групп в кольце В, которые оказывают влияние на липофильность молекулы полифенола и возможность образования водородных связей с остатками аминокислот. Для детализации механизма влияния растительных полифенолов на процесс самосборки фибрилл мы использовали фенолы, состоящие из одного ароматического кольца с

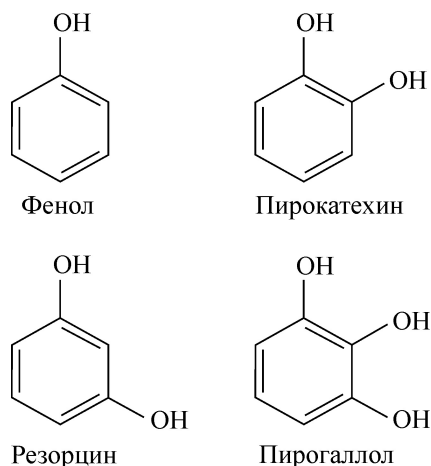


Рис. 1. Структурные формулы фенолов, использованных в исследовании.

различным количеством и положением гидроксильных групп. Данный подход поможет избежать влияния других колец (как известно, в молекулах флавоноидов их три [6]) и выявить роль лишь гидроксильных групп.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследованиях были использованы фенол, пирокатехин, резорцин и пирогаллол (рис. 1). Соединения содержат различное количество гидроксильных групп: фенол – одну; пирокатехин – две (в *орто*-положении); резорцин – две (в *мета*-положении); пирогаллол – три.

Расчет коэффициентов липофильности. Для представленных соединений нами был произведен расчет коэффициентов распределения в системе *n*-октанол/вода с целью оценки общей липофильности молекулы. Данный параметр был выбран на основании ранее полученных данных [16], которые указывают на наличие корреляции между липофильностью, количеством гидроксильных групп в кольце В молекул флавоноидов (растительных полифенольных соединений) и эффектом, оказываемым молекулами этих полифенолов на процесс фибрилlogenеза. Для расчета применяли два пакета программ: ChemBioOffice 2015 и ACDlab 10.0

Выделение коллагена. Коллаген I типа выделяли из сухожилий хвостов молодых крыс (45 г). Тщательно промытые дистиллированной водой сухожилия помещали в 280 мл 0,2 М раствора уксусной кислоты и инкубировали при температуре 4°C в течение нескольких суток. Затем раствор нейтрализовали нашатырным спиртом до pH 7,0 и добавляли 70 мл 96%-го холодного этилового спирта при постоянном

перемешивании. Все процедуры проводили при температуре 4°C. Через 2 ч раствор центрифугировали в два этапа на центрифуге К-24 (5000 об/мин, 30 мин). Тщательно удаляли супернатант, все полученные осадки снова ресуспендировали в 280 мл 0,2 М уксусной кислоты и оставляли на 12 ч в холодильнике. После центрифугирования осадок ресуспендировали в 100 мл 0,2 М уксусной кислоты и оставляли на ночь в холодильнике. Полученный раствор центрифугировали на ультрацентрифуге при 140000 g, отбирали супернатант и проверяли отсутствие примесей (остатков клеток и тканей, посторонних белков и т.д.) методом микрокалориметрии по наличию дополнительных пиков на термограммах плавления. Концентрацию белка определяли по сухому весу.

Изучение динамики изменения оптической плотности растворов коллагена (турбидиметрия). Регистрацию динамики изменения оптической плотности образцов коллагена проводили на спектрофотометре Specord M-40 (ГДР) при длине волны 313 нм в кварцевой спектрофотометрической кювете (2 мл) [17].

Все измерения проведены в растворе, содержащем 30 мМ Na_2HPO_4 и 135 мМ NaCl . Конечное значение pH составляло 7,4. Запись кинетических кривых осуществляли с помощью программы спектрофотометра Specord M40 на компьютере, подключенном к прибору. Обсчет и оформление полученных кривых производили с помощью программы OriginPro 9.1. Значение длины волны 313 нм взято из работы [18], в которой изучался процесс образования фибрилл коллагена I типа *in vitro*.

Адиабатная дифференциальная сканирующая микрокалориметрия. Температурную зависимость избыточного удельного теплопоглощения (термограммы) растворов коллагена и сформированных фибрилл регистрировали с помощью дифференциального адиабатного сканирующего микрокалориметра ДАСМ-4 (ИБП РАН, Россия). Все измерения проведены при скорости прогрева 1 К/мин в растворе, содержащем 30 мМ Na_2HPO_4 и 135 мМ NaCl . Конечное значение pH составляло 7,4. Запись термограмм осуществляли с помощью программы Wscal, анализ термограмм проводили с помощью программы OriginPro 9.1.

Определение размера частиц фотонно-корреляционным методом. Размер фибрилл и агрегатов коллагена определяли методом фотонно-корреляционной спектроскопии (dynamic light scattering) на анализаторе субмикронных частиц Zeta Sizer nano ZC (Malvern, Великобритания). В кювету с 2 мл раствора, содержащего 30 мМ Na_2HPO_4 и 135 мМ NaCl ($T = 30^\circ\text{C}$), добавляли

50 мкл коллагена до конечной концентрации 0,12 мг/мл. Кроме того, в кювету добавляли раствор фенола, конечная концентрация которого в кювете составляла 10 мкМ. Значение рН раствора после смешивания компонентов составляло 7,4. Перед измерением раствор буфера пропускали через фильтр с размером пор 10 мкм для удаления возможных примесей пыли.

Электронная микроскопия. Для визуализации структуры спонтанно образующихся при комнатной температуре фибрилл использовали метод просвечивающей электронной микроскопии. Образцы коллагена в растворе, содержащем 30 мМ Na_2HPO_4 и 135 мМ NaCl , через сутки после инкубации при комнатной температуре наносили на специальные микроскопические сеточки, покрытые пленкой из формвара. Окрашивание проводили сначала 1%-м раствором уранилацетата, затем 1%-м раствором фосфоровольфрамовокислого натрия (рН 7,4). Время действия каждого из реагентов составляло 2–3 мин. Препараты просматривали на электронном микроскопе JEM-100B (JEOL, Япония) при увеличении $\times 30000$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Турбидиметрия. Процесс спонтанного образования фибрилл коллагена регистрировали по изменению оптической плотности раствора на длине волны 313 нм [18] с течением времени. Известно, что формирование фибрилл коллагена *in vitro* является многостадийным процессом, условно разделенным на три фазы (рис. 2): лаг-фаза, сопровождающаяся незначительным повышением оптической плотности раствора; фаза роста (экспоненциальная фаза) – фаза, в течение которой наблюдается значительное увеличение оптической плотности раствора, имеющее сигмоидальный характер, и происходит формирование фибрилл [18]; фаза терминации, представляющая собой участок плато на кривой динамики образования фибрилл, отражающий завершение процесса фибриллогенеза [19]. Из экспериментальных кривых динамики изменения оптической плотности растворов коллагена были определены следующие параметры: длительность лаг-фазы (t_{lag}), соответствующей стадии нуклеации, на которой происходит объединение мономеров в димеры с последующей линейной агрегацией образовавшихся димеров; время достижения половины максимального роста ($t_{1/2}$); время достижения плато на кривой светорассеяния (t_p); величина максимальной скорости роста светорассеяния (V_{max}).

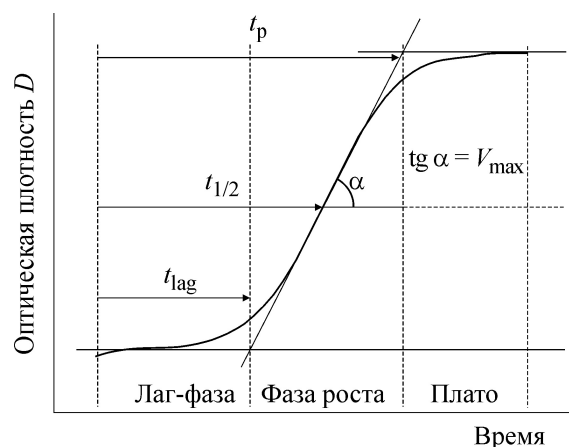


Рис. 2. Схема измерения параметров кривых светорассеяния, представленных на рис. 3. Показано измерение длительности лаг-фазы (t_{lag}), времени достижения половины максимального роста ($t_{1/2}$), времени достижения плато на кривой светорассеяния (t_p), а также определение величины максимальной скорости роста светорассеяния (V_{max}).

На рис. 3а представлены кривые изменения оптической плотности растворов коллагена в присутствии фенола, резорцина и пирогаллола, а на рис. 3б – численные данные параметров кинетических кривых, приведенных на рис. 3а.

Из данных, представленных на рис. 3б, следует, что при увеличении количества гидроксильных групп в молекулах фенолов значительно сокращается длительность лаг-фазы, что может свидетельствовать об ускорении процесса формирования димеров коллагена и их последующей агрегации. Кроме того, можно наблюдать увеличение максимальной скорости латерального роста, т.е. фенолы с большим количеством гидроксильных групп предположительно могут значительно облегчать и процесс объединения узких фибрилл в настоящие фибриллы.

Для проверки гипотезы о влиянии расположения гидроксильных групп в молекуле фенолов на их способность ускорять процесс образования фибрилл, мы провели сравнение действия пирокатехина и резорцина на процесс фибриллогенеза. Молекулы пирокатехина и резорцина содержат в своем составе две гидроксильные группы, которые отличаются положением в молекуле: в пирокатехине вторая гидроксильная группа находится в *орто*-положении относительно первой, а в резорцине – в *мета*-положении. Резорцин в большей степени ускоряет процесс формирования фибрилл по сравнению с пирокатехином (данные не приведены). Следовательно, расположение гидроксильных групп в кольце, так же как и количество этих групп, определяет способность кон-

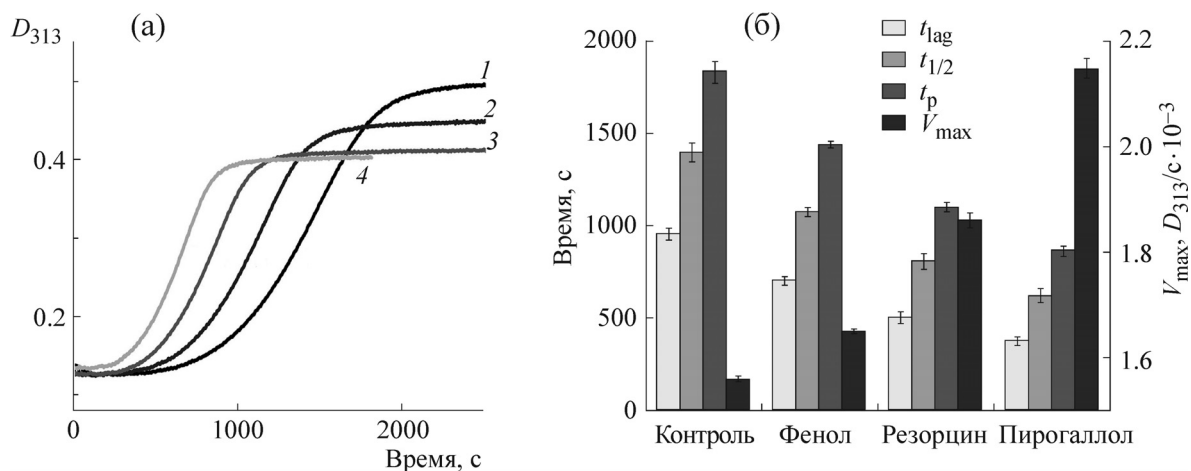


Рис. 3. Влияние различных фенолов на кинетику процесса фибрилlogenеза. (а) – Кинетические кривые изменения оптической плотности растворов коллагена (концентрация 0,2 мг/мл) в присутствии фенолов (концентрация 10 мкМ): 1 – контроль (коллаген); 2 – в присутствии фенола; 3 – в присутствии резорцина; 4 – в присутствии пирогаллола; (б) – параметры кривых изменения оптической плотности, определенные в соответствии со схемой на рис. 2.

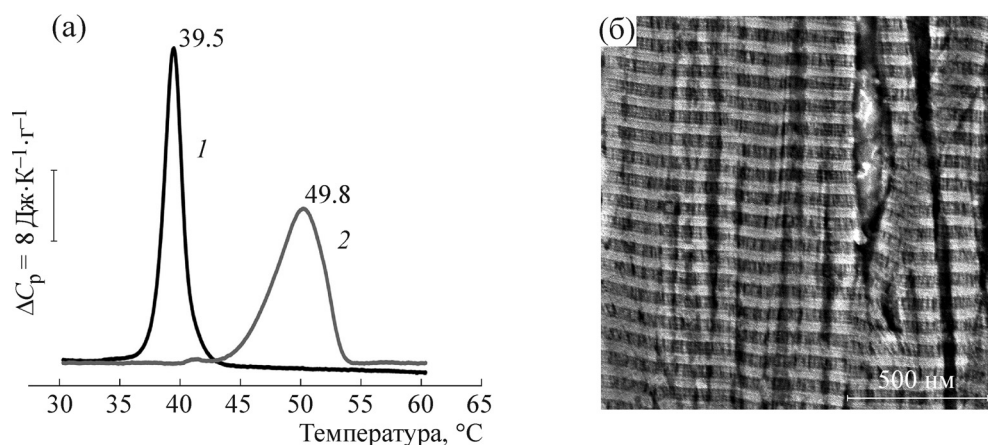


Рис. 4. Характеристика формирующихся фибрилл. (а) – Термограммы плавления: 1 – мономерная форма коллагена в 0,2 М уксусной кислоте; 2 – фибриллярная форма коллагена в фосфатно-солевом буфере; (б) – микрофотография образца коллагена (фибриллярная форма).

кретного фенола ускорять процесс образования фибрилл. Расположение второй гидроксильной группы в молекуле резорцина в *мета*-положении облегчает процесс формирования фибрилл, что, возможно, связано с меньшими стерическими затруднениями, возникающими при формировании водородных связей между гидроксильными группами молекул фенолов и остатками, например, гидроксипролина в цепях молекул коллагена.

Липофильность фенолов. Нами были рассчитаны теоретические коэффициенты распределения в системе октанол/вода: фенол = $1,48 \pm 0,19/1,5$; пирокатехин = $0,88 \pm 0,2/0,87$; пирогаллол = $0,29 \pm 0,22/0,21$ (первое значение рас-

считано в ChemOffice 2015, второе – в ACDlab 10.0). Интересен тот факт, что способность ускорять протекание процесса формирования фибрилл усиливается с уменьшением гидрофобности молекул исследуемых фенолов, которое связано с увеличением количества гидроксильных групп. Здесь наблюдается явное различие в механизме действия простых фенолов и растительных полифенолов, исследованных нами ранее [16].

Микрокалориметрическое исследование. Микрокалориметрический метод позволяет получить качественную информацию о том, в каком состоянии (мономер или фибриллы) находится белок в растворе (рис. 4), и определить термодинамические параметры плавления объекта.

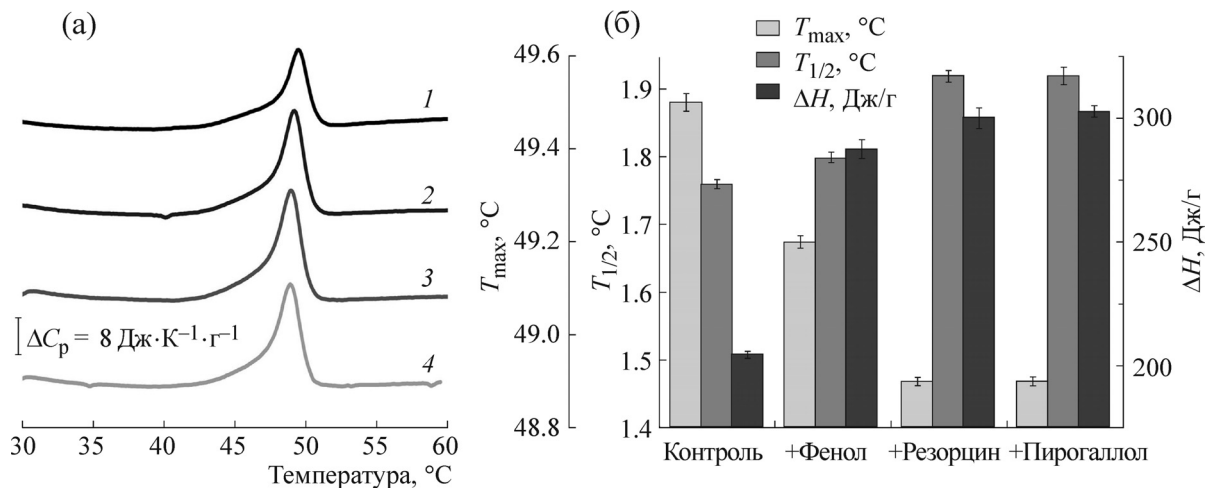


Рис. 5. Влияние фенолов на термические характеристики формирующихся фибрилл. (а) – Термограммы плавления фибрилл коллагена: 1 – коллаген, 0,2 мг/мл; 2 – в присутствии фенола; 3 – в присутствии резорцина; 4 – в присутствии пирогаллола. Концентрация фенолов во всех экспериментах составляла 10 мкМ. (б) – Параметры термограмм, представленных на рис. 5а.

На рис. 4а представлены термограммы плавления мономерной формы белка в кислой среде с максимумом температуры плавления около 39,5°C (кривая 1). В нейтральной среде этот белок способен спонтанно образовывать фибриллы, имеющие температуру плавления около 50°C (кривая 2) [20]. Кривые плавления препаратов в кислой среде всегда имели один максимум, т.е. весь белок находился в мономерной форме. В нейтральной среде некоторая малая часть белков оставалась в мономерной форме (рис. 4а, небольшой пик на термограмме 2), а большая часть коллагена была представлена фибриллярной формой (пик при температуре 49,8°C на термограмме 2).

Для подтверждения того, что образующиеся агрегаты, имеющие температуру плавления 50°C, являются действительно фибриллами, был использован метод электронной микроскопии. Коллаген I типа – это белок, обладающий спиральной структурой и способный к самосборке в *D*-периодичные поперечно-полосатые фибриллы (где *D* = 67 нм, является характеристикой аксиальной периодичности коллагена), видимые в электронный микроскоп [21].

На микрофотографии (рис. 4б) видна характерная для фибрилл коллагена поперечная полосатость с периодом около 64–67 нм. Это подтверждает тот факт, что формирующиеся в наших экспериментах агрегаты действительно являются фибриллами.

На рис. 5а приведены термограммы плавления образцов коллагена, инкубированных в течение суток при комнатной температуре в

присутствии исследуемых веществ, а на рис. 5б – рассчитанные параметры термограмм.

Максимум теплопоглощения контрольного образца находится в точке с температурой 49,5°C, которая соответствует температуре плавления фибриллярной формы белка. Присутствие фенолов в концентрации 10 мкМ в образце с коллагеном приводило к незначительному снижению температуры плавления образующихся фибрилл. На рис. 5б можно видеть, что при увеличении количества гидроксильных групп в молекуле фенолов наблюдается увеличение полуширины пиков плавления образующихся фибрилл. Кроме того, наблюдается увеличение энтальпии плавления образующихся фибрилл.

Фотонно-корреляционная спектроскопия. Для определения влияния молекул фенола на размер формирующихся агрегатов был использован метод фотонно-корреляционной спектроскопии. На рис. 6 представлена диаграмма, отражающая размер агрегатов в начале эксперимента (до образования фибрилл) и спустя 30 мин в контрольном образце и в образце с добавлением 10 мкМ фенола. Данного времени было достаточно для того, чтобы процесс фибрилlogenеза завершился.

Из полученных экспериментальных данных следует, что размер формирующихся в присутствии фенола агрегатов превышает размер агрегатов в контрольном образце. При этом добавление фенола перед началом эксперимента практически не влияет на размер агрегатов в растворе, соответственно основное взаимодей-

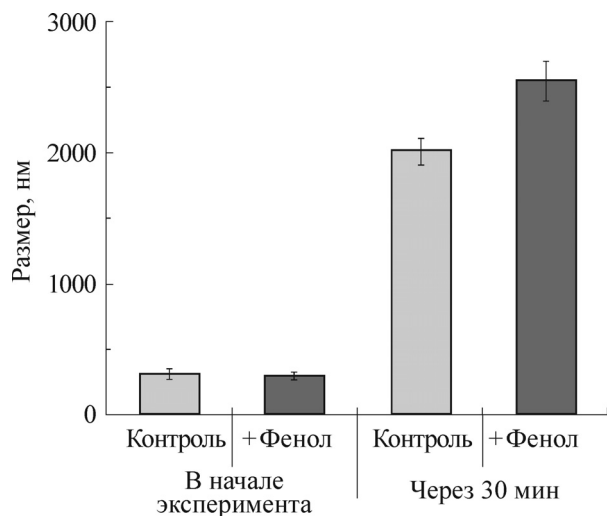


Рис. 6. Измерение размера фибрилл в контроле и в присутствии 10 мкМ фенола.

ствие между фенолами и коллагеном происходит уже в течение формирования димеров или линейных агрегатов в течение лаг-фазы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В соответствии с полученными ранее данными [16], способность растительных фенолов класса флавоноидов ускорять процесс фибрилlogenеза коррелировала с высокой липофильностью (гидрофобностью) молекул и наличием малого количества гидроксильных групп в кольце В. По данным расчетов теоретических коэффициентов распределения в системе октанол/вода и согласно полученным в настоящей работе экспериментальным данным, способность исследуемых фенолов ускорять процесс фибрилlogenеза, наоборот, возрастает с уменьшением гидрофобности молекул. Подобное различие может объясняться структурой молекул флавоноидов, в частности, большим количеством плоских ароматических колец в составе молекул флавоноидов и превалирующим влиянием другого рода взаимодействий (например, стэкинговых [22]) по сравнению с молекулами простых фенолов.

Для коллагена характерно наличие внутренних водородных связей между отдельными полипептидными цепями. Есть данные, что в образовании данных связей участвуют остатки пролина и глицина, тогда как остатки уникальной аминокислоты, гидроксипролина, остаются при этом незадействованными [23]. Тем не менее показано, что остатки гидроксипролина все же участвуют в стабилизации тройной спирали коллагена [24]. Также для коллагена характерно

наличие водородных связей между аминокислотными остатками двух молекул тропоколлагена. Данные связи участвуют в стабилизации структуры фибрилл, и тенденция к их образованию может рассматриваться как один из факторов фибрилlogenеза [25]. Фенольные кольца имеют благоприятное расположение гидроксильных групп для создания нековалентных связей с белками. Отмечено, что молекулы фенолов способны, в частности, образовывать связи и с молекулами коллагена. Например, эпигаллокатехин галлат обладает высокой аффинностью к коллагену [26], что, предположительно, объясняется большим количеством гидроксильных групп в молекуле данного полифенола. Взаимодействие фенолов происходит посредством ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий с аминокислотными остатками [27], в частности с остатками пролина. Так, на примере галловой кислоты показано, что она способна связываться предпочтительно с остатками пролина и гидроксипролина [28].

Наличием гидроксипролина объясняется термическая стабильность фибрилл коллагена [23]. Поскольку калориметрический анализ не выявляет существенного изменения термостабильности коллагена, можно выдвинуть предположение, что исследуемые фенолы, скорее всего, не взаимодействуют с остатками данной кислоты, но образуют связи с другими аминокислотными остатками. Наличием дополнительных связей может, предположительно, объясняться увеличение полуширины пиков и энтальпии перехода [13], а также увеличение размера агрегатов, показанное при использовании метода фотонно-корреляционной спектроскопии. Аналогичное увеличение размера агрегатов показано для олеуропеина, являющегося растительным фенольным соединением [29].

В формировании водородных связей между цепями коллагена и молекулами полифенолов могут участвовать не только остатки гидроксипролина, но и остатки глицина, аланина и пролина, причем вклад остатков гидроксипролина минимален (из восьми потенциальных сайтов связывания, определенных методом молекулярного моделирования, четыре представлены остатками глицина, два – остатками пролина, один – остатком аланина и лишь один – остатком гидроксипролина) [30].

Движущей силой объединения молекул коллагена являются нековалентные взаимодействия, в частности электростатические [31]. Гидрофобные взаимодействия также играют роль при фибрилlogenезе [32,33]. Возможно, фенольные соединения, образуя водородные связи с остатками аминокислот цепей коллагена, кон-

куруют с молекулами воды за сайты связывания [34], тем самым способствуя удалению растворителя с поверхности молекул белка, сокращая таким образом свободную энергию и способствуя самопроизвольному протеканию процесса фибриллогенеза. Данное предположение вполне объясняет пропорциональную зависимость между количеством гидроксильных групп в молекуле исследуемых фенолов и их способностью ускорять процесс фибриллогенеза. Процесс сборки фибрилл характеризуется снижением энтропии системы. Данное снижение энтропии как раз компенсируется сокращением свободной поверхности в результате потери молекул растворителя [35], что свидетельствует в пользу предложенной гипотезы.

В случае фенолов с одинаковым количеством гидроксильных групп в молекуле способность ускорять фибриллогенез зависит от положения групп в молекуле. Так, например, в молекуле резорцина гидроксильные группы находятся в *meta*-положении относительно друг друга. В присутствии данного фенола значения t_{lag} и t_p были меньше, а V_{max} – несколько больше по сравнению с образцом, инкубированным в присутствии пирокатехина, у которого гидроксильные группы находятся в *ortho*-положении. Этот феномен может быть объяснен возникновением стерических затруднений для формирования водородных связей с аминокислотными остатками коллагена. Подобные затруднения могут быть вызваны либо взаимным отталкиванием гидроксильных групп [1], либо формированием внутримолекулярных водородных связей при расположении гидроксильных групп в *ortho*-положении [36]. Наличие внутримолекулярной водородной связи может препятствовать формированию межмолекулярных связей (с коллагеном) [37].

Исследуемые фенолы оказывают наибольшее влияние в период лаг-фазы фибриллогенеза, значительно сокращая длительность данного этапа (в случае пирогаллола – в три раза). Как было описано выше, лаг-фаза соответствует процессу нуклеации. Исследования кинетики этого процесса показывают, что стадия нуклеации, на которой растворенные мономеры коллагена соединяются, образуя ядро (активный центр), преобладает над процессом роста, поэтому размер фибрилл определяется в течение лаг-периода [18]. Изменение размера агрегатов коллагена, продемонстрированное методом фотонно-корреляционной спектроскопии, вполне может объясняться влиянием фенолов именно на стадию нуклеации. Считается, что фаза нуклеации начинается с образования димеров. Далее происходит линейное соединение димеров,

после которого линейные димеры вступают в процесс латеральной агрегации, в результате которого формируются так называемые узкие фибриллы, которые затем соединяются, обворачивая друг друга [18]. Следовательно, исследуемые фенолы, предположительно, облегчают процесс формирования димеров или их последующую агрегацию.

ВЫВОДЫ

1. Простые фенолы способны ускорять процесс самопроизвольной сборки фибрилл коллагена I типа.

2. Среди исследованных веществ способность ускорять формирование фибрилл увеличивалась пропорционально количеству гидроксильных групп в молекуле фенола в ряду: фенол < пирокатехин < пирогаллол, тогда как значения коэффициента липофильности этих молекул располагаются в обратной последовательности.

3. Для молекул с одинаковым количеством гидроксильных групп (пирокатехин и резорцин) было показано, что большая скорость процесса фибриллогенеза наблюдается в присутствии фенола с расположением второй гидроксильной группы в *meta*-положении. Это может объясняться меньшими стерическими затруднениями при формировании водородных связей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. Л. Белобородов, С. Э. Зурабян, А. П. Лузин и Н. А. Тюкавкина, *Органическая химия* (Дрофа, Москва, 2003).
2. R. Nicholson and W. Vermerris, *Phenolic Compound Biochemistry* (Springer, Dordrecht, Netherlands, 2006).
3. A.-N. Li, S. Li, Y.-J. Zhang, et al., *Nutrients* **6**, 6020 (2014).
4. E. G. Yordi, E. M. Pérez, M. J. Matos, and E. U. Villares, In: *Nutrition, Well-Being and Health*, Ed. by J. Bouayed (InTech, 2012).
5. T. Ozdal, E. Capanoglu, and F. Altay, *Food Res Int*, **51** (2), 954 (2013).
6. Ю. С. Тараховский, Ю. А. Ким, Б. С. Абдрасилов и Е. Н. Музафаров, *Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина* (Synchrobook, Пушкино, 2013).
7. A. Khoddami, M. A. Wilkes, and T. H. Roberts, *Molecules* **18**, 2328 (2013).
8. K. R. Landis-Piwowar and Q. P. Dou, *Curr. Mol. Pharmacol.* **1**, 233 (2008).
9. S. Quideau, D. Deffieux, C. Douat-Casassus, et al., *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* **50**, 586 (2011).
10. K. B. Pandey and S. I. Rizvi, *Oxid Med. Cell Longev.* **2**, 270 (2009).
11. R. Tsao, *Nutrients* **2**, 1231 (2010).

12. В. М. Мисин, Н. Н. Сажина и Е. И. Короткова, *Химия растительного сырья*, № 2, 137 (2011).
13. B. Madhan, V. Subramanian, J. R. Rao, et al., *Int. J. Biol. Macromol.* **37**, 47 (2005).
14. H. Schlebusch and D. Kern, *Angiologica* **9**, 248 (1972).
15. Ю. А. Тараховский, И. И. Селезнева, Н. А. Васильева и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **144** (12), 640 (2007).
16. Y. A. Kim, Y. S. Tarahovsky, S. G. Gaidin, et al., *Int. J. Biol. Macromol.* **104**, 631 (2017).
17. S. Han, D. J. McBride, W. Losert, et al., *J. Mol. Biol.* **383**, 122 (2008).
18. F. H. Silver and R. L. Trelstad, *J. Theor. Biol.* **81**, 515 (1979).
19. Y. Azil, A. E. Mobasser, P. H. Warnke, et al., *Calcif. Tissue Int.* **76**, 121 (2005).
20. E. I. Tiktopulo and A. V. Kajava, *Biochemistry* **37**, 8147 (1998).
21. J. A. Chapman, M. Tzaphlidou, K. M. Meek, et al., *Electron Microsc. Rev.* **3**, 143 (1990).
22. N. J. Baxter, T. H. Lilley, E. Haslam, et al., *Biochemistry* **36**, 5566 (1997).
23. M. D. Shoulders and R. T. Raines, *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 929 (2009).
24. R. A. Berg and D. J. Prockop, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52**, 115 (1973).
25. I. Streeter and N. H. de Leeuw, *Soft Matter* **7**, 3373 (2011).
26. R. R. Reddy, B. V. N. Ph. Kumar, G. Shanmugam, et al., *J. Phys. Chem. B* **119**, 14076 (2015).
27. Ø. M. Andersen and K. R. Markham, *Flavonoids* (CRC, Boca Raton, FL, 2006).
28. S. Bronco, C. Cappelli, and S. Monti, *J. Phys. Chem. B* **108** (28), 10101 (2004).
29. H. Bharathy and N. N. Fathima, *Int. J. Biol. Macromol.* **101**, 179 (2017).
30. M. E. Plonska-Brzezinska, D. M. Bobrowska, A. Sharma, et al., *RSC Adv.* **5** (116), 95443 (2015).
31. K. E. Kadler, D. J. Hulmes, Y. Hojima, et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **580**, 214 (1990).
32. G. Suarez, M. Veliz, and R. L. Nagel, *Arch. Biochem. Biophys.* **205**, 422 (1980).
33. S. N. Ayrapetyan and M. S. Markov, *Bioelectromagnetics Current Concepts: The Mechanisms of the Biological Effect of Extremely High Power Pulses* (Springer Netherlands, 2006).
34. N. Kuznetsova, S. L. Chi, and S. Leikin, *Biochemistry* **37**, 11888 (1998).
35. K. E. Kadler, D. F. Holmes, J. A. Trotter, et al., *Biochem. J.* **316**, 1 (1996).
36. N. T. Hunt, A. R. Turner, and K. Wynne, *J. Phys. Chem. B* **109**, 19008 (2005).
37. P. I. Nagy, *Int. J. Mol. Sci.* **15** (11), 19562 (2014).

Influence of Simple Phenolic Compounds on Collagen Type I Fibrillogenesis *in vitro*

Yu.A. Kim*, S.G. Gaidin*, and Yu.S. Tarahovsky**

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

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

The influence of phenolic compounds containing different number of hydroxyl groups (phenol, pyrocatechol, resorcinol, pyrogallol) on the kinetics of the process of *in vitro* fibrillogenesis of collagen and fibril structure was studied. It has been shown that these phenolic compounds accelerate the process of fibril formation by shortening the lag phase, presumably facilitating the process of the formation of collagen dimers and their subsequent association to linear aggregates. The accelerating activity of phenols was proportional to the number of hydroxyl groups in the molecule and increased in the range: phenol < resorcinol < pyrogallol. Therefore, the ability of phenolic compounds to accelerate fibril formation can be presumably explained by the formation of hydrogen bonds with the residues of collagen chains. The hydrogen bonds may stabilize the structure of the intermediates facilitating their interaction during fibrillogenesis.

Keywords: collagen type I, fibrillogenesis, phenol, pyrocatechol, pyrogallol, resorcinol