

ВЛИЯНИЕ КАТЕХИНОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ ФИБРИЛЛ КОЛЛАГЕНА *in vitro*

© 2024 г. Ю.С. Тараховский*, **, С.Г. Гайдин**, #, Ю.А. Ким**

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

**Институт биофизики клетки РАН — обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: ser-gajdin@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.05.2024 г.

После доработки 07.06.2024 г.

Принята к публикации 19.06.2024 г.

Некоторые аспекты терапевтического действия катехинов связаны с их влиянием на отложение фибрилл коллагена в тканях. Предполагается, что этот процесс находится под контролем сигнальной и регуляторной систем клеток, на которые воздействуют катехины, при этом нельзя исключать прямого взаимодействия полифенолов со структурными белками. В настоящей работе мы исследовали непосредственное влияние (+)-катехина и эпигаллокатехин галлата на формирование фибрилл коллагена *in vitro*. Используя турбидиметрию, дифференциальную сканирующую калориметрию и просвечивающую электронную микроскопию мы показали, что (+)-катехин ускоряет образование фибрилл коллагена I типа, при этом образующиеся фибриллы имеют специфическую для этого белка структуру и термическую стабильность, тогда как эпигаллокатехин галлат в концентрации 10 мкМ ингибирует фибрилlogenез. Полученные результаты расширяют наши представления о возможных механизмах терапевтического действия катехинов, демонстрируя возможность прямого взаимодействия (+)-катехина и эпигаллокатехин галлата с мономерами и фибриллами коллагена, и могут быть полезны при разработке новых препаратов, содержащих эти растительные полифенолы или их синтетические аналоги.

Ключевые слова: коллаген, фибриллы, полифенолы, флавоноиды, катехин, эпигаллокатехин галлат.

DOI: 10.31857/S0006302924040038, EDN: NIACQU

Растительные полифенолы, поступающие в организм человека с пищей, оказывают значительный терапевтический эффект благодаря антиоксидантной, антигипертензивной, противовоспалительной, иммуномодулирующей, противомикробной и противовирусной активности, а также обладают противораковым, нейропротекторным и кардиопротекторным действием [1, 2]. Растительные продукты, такие как чай, содержат множество полифенольных соединений, в том числе катехинов, принадлежащих к семейству флавоноидов и обладающих высоким терапевтическим потенциалом [3, 4]. Катехины оказывают антиканцерогенное действие на многие виды опухолей [5]. Они подавляют пролиферацию, рост раковых клеток и метастазирование, улуч-

шают иммунитет, проявляют синергизм с другими противораковыми препаратами [6]. Кроме того, известно, что катехины могут снижать уровень холестерина в крови [7], предотвращать развитие сердечно-сосудистых заболеваний, а также болезнью Паркинсона и Альцгеймера [8, 9].

Влияние катехинов на формирование фибрилл коллагена является одним из важных аспектов их воздействия на ткани. Этот эффект может быть обусловлен действием на клеточные сигнальные системы, вовлеченные в регуляцию образования или разрушения фибрилл коллагена в тканях [10]. Тем не менее ранее нами была показана возможность прямого влияния флавоноидов на формирование фибрилл коллагена из мономеров этого белка *in vitro* [11, 12]. Было обнаружено, что в зависимости от количества гидроксильных групп в молекуле, особенно в кольце В, флавоноиды могут ускорять или подавлять процесс фибрилlogenеза [11].

Сокращения: ЭПКГ — эпигаллокатехин галлат, t_{lag} — продолжительность лаг-фазы, $D_{мин}$ и $D_{макс}$ — минимальный и максимальный уровни оптической плотности, ΔD — разность значений оптической плотности ($\Delta D = D_{макс} - D_{мин}$).

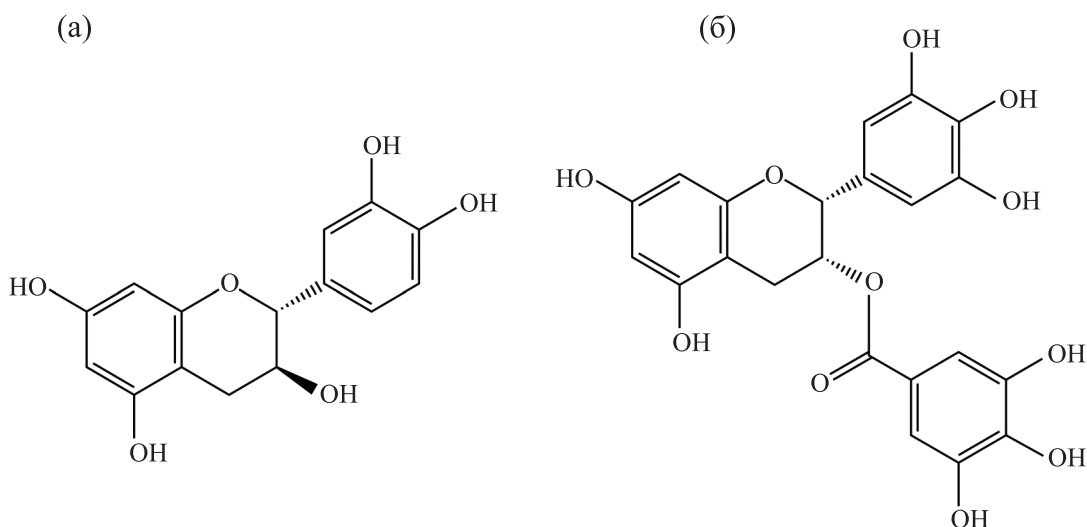


Рис. 1. Структурные формулы (+)-катехина (а) и эпигаллокатехин галлата (б).

В представленной работе мы исследовали влияние (+)-катехина (рис. 1) и его производного, эпигаллокатехин галлата (ЭГКГ), на формирование фибрилл коллагена I типа. Выбор указанных соединений обусловлен их присутствием в ежедневном рационе человека [13, 14], а также тем фактом, что ЭГКГ обладает высоким сродством к молекулам коллагена [14].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экстракция коллагена и образование фибрилл.

Коллаген выделяли из сухожилий хвостов молодых самцов крыс линии Вистар (массой 45 г) в соответствии с описанной ранее методикой [11, 12]. Сухожилия тщательно промывали дистиллированной водой, переносили в 0.2 М уксусную кислоту и инкубировали при 4°C в течение нескольких суток. Затем раствор нейтрализовали гидроксидом аммония до pH 7.0, после чего добавляли 96%-й холодный этиловый спирт при постоянном перемешивании. Все процедуры проводили при температуре 4°C. Через 2 ч раствор центрифугировали 30 мин при 5000 об/мин, осадок снова ресуспендировали в 0.2 М уксусной кислоте и оставляли на 12 ч при 4°C. Полученный раствор центрифугировали при 140000 g для удаления фрагментов клеток, а супернатант, содержащий мономеры коллагена, использовали в дальнейших экспериментах. Для инициации образования фибрилл аликвоту раствора мономеров коллагена переносили в раствор, содержащий 35 мМ Na_2HPO_4 и 145 мМ NaCl. Значение pH полученного после смешивания раствора составляло 7.4. Концентрация белка в рабочих растворах составляла 0.2 мг/мл.

Турбидиметрия. Как описано ранее [11, 12], изменения оптической плотности растворов коллагена, сопровождающие процесс фибрилlogenеза, регистрировали с помощью спектрофотометра Specord M-40 (Carl Zeiss Jena, Германия), используя кварцевую спектрофотометрическую кювету объемом 2 мл. Измерения осуществляли на длине волны 313 нм в фосфатно-солевом растворе следующего состава: Na_2HPO_4 — 35 мМ, NaCl — 145 мМ, pH 7.4. Запись значений оптической плотности осуществляли с шагом 15 с при помощи программного обеспечения спектрофотометра. Построение кривых и расчет параметров осуществляли с помощью программного обеспечения OriginLab Pro (OriginLab Corp., США).

Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия. Термограммы плавления образцов коллагена записывали с помощью дифференциального адиабатического сканирующего микрокалориметра ДАСМ-4 (ИБП РАН, Пушкино, Россия). Все измерения проводили в фосфатно-солевом растворе следующего состава: Na_2HPO_4 — 35 мМ, NaCl — 145 мМ, pH 7.4 при скорости нагрева 1°C/мин. Термограммы анализировали с помощью программного обеспечения OriginLab Pro.

Электронная микроскопия. Для визуализации структуры фибрилл коллагена I типа, спонтанно формирующихся при комнатной температуре в присутствии катехинов, использовали метод просвечивающей электронной микроскопии. Образцы коллагена в фосфатно-солевом растворе, состав которого указан выше, после суточной инкубации при комнатной температуре наносили на микроскопические сеточки, покрытые формваровой пленкой. Окраску проводили сначала 1%-м раствором уранилацетата, затем 1%-м раствором фосфовольфрамата натрия. Время воздействия

каждого реагента составляло 2–3 мин. Образцы визуализировали с помощью электронного микроскопа JEM-100B (JEOL, Япония) при увеличении 30000×.

РЕЗУЛЬТАТЫ

(+)-Катехин и ЭГКГ противоположным образом влияют на процесс фибрилlogenеза. Известно [11, 12], что при переносе кислого раствора мономеров коллагена (рН 3.0) в нейтральный буфер (рН 7.4) происходит образование фибрилл, которое может быть зафиксировано по увеличению оптической плотности растворов при длине волны 313 нм. Эти изменения позволяют исследовать динамику процесса фибрилlogenеза.

Было обнаружено, что кривая роста оптической плотности имеет форму сигмоиды (рис. 2а, кривые 1–4) и может быть разделена на три фазы: лаг-фазу, фазу роста и фазу насыщения, или плато (рис. 2в). Лаг-фаза сопровождается небольшим увеличением оптической плотности раствора; на этапе роста происходило значительное увеличение оптической плотности раствора; фаза насыщения (плато) — это время, когда достигается максимальная оптическая плотность раствора коллагена и формируются стабильные фибриллярные структуры [15].

Мы измеряли продолжительность лаг-фазы ($t_{\text{лаг}}$) и амплитуды изменения оптической плотности $\Delta D = D_{\text{макс}} - D_{\text{мин}}$. Сигмоидальная форма кривых сохраняется в присутствии (+)-катехина (рис. 2а, кривые 2–4). При этом увеличение концентрации данного агента сопровождается уменьшением обеих измеряемых величин (ΔD и $t_{\text{лаг}}$) (рис. 2б,г). В присутствии ЭГКГ изменения оптической плотности были значительно меньшими (рис. 2а, кривые 5–7). При этом оптическая плотность возрастала экспоненциально (рис. 2д) и не могла быть разделена на этапы, как это было сделано в случае сигмоидального роста. Экспоненциальную кривую мы характеризовали значением максимально достижимой оптической плотности ($D_{\text{макс}}$), которое мы рассчитывали путем аппроксимации экспериментальных данных уравнением асимптоты ($y = D_{\text{макс}} - bc^x$), где коэффициенты b и c определяют форму кривой (рис. 2д). Было установлено, что с увеличением концентрации ЭГКГ значения ΔD уменьшались (рис. 2е).

(+)-Катехин и ЭГКГ повышают термостабильность формирующихся в их присутствии агрегатов коллагена. Влияние флавоноидов на термостабильность предварительно сформированных фибрилл коллагена I типа изучали методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии. Известно [11, 16], что мономеры коллагена,

находящиеся в кислой среде (рН 3.0), плавятся при температуре около 40°C. Мы обнаружили, что фибриллы коллагена, спонтанно образующиеся из мономеров при переносе раствора в нейтральную среду (рН 7.4), имели более высокую температуру плавления — около 50°C (рис. 3, термограммы 1 и 2 соответственно). При формировании фибрилл в присутствии (+)-катехина или ЭГКГ температура плавления повышалась примерно до 55°C (рис. 3, термограммы 3 и 4).

ЭГКГ, в отличие от (+)-катехина, способствует формированию агрегатов коллагена с нерегулярной структурой. При использовании метода электронной микроскопии нами было установлено, что контрольные образцы коллагена в нейтральной среде (рис. 4а) содержали многочисленные пучки фибрилл с поперечной полосатостью с периодом порядка 65–67 нм, что соответствует литературным данным [11, 12, 17, 18]. Аналогичная полосатость, но с периодом примерно на 7% больше, присутствовала в фибриллах коллагена, образованных в присутствии (+)-катехина (рис. 4б). Добавление ЭГКГ предотвращало формирование фибрилл — большая часть белка представляла собой аморфную массу (рис. 4в). При этом наблюдаемые редкие фибриллы сохраняли поперечную полосатость с периодом примерно на 5% большим, чем в контроле.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что в кислой среде коллаген, полученный из тканей животных, диссоциирует на отдельные белковые молекулы. Когда раствор коллагена переносится в нейтральную или слабощелочную среду, мономерные молекулы образуют пучки поперечно-полосатых фибрилл, которые можно наблюдать с помощью электронного микроскопа [11, 12, 17–19]. Как отмечено выше, кривая, отражающая изменение оптической плотности растворов коллагена в процессе фибрилlogenеза, имеет сигмоидальную форму и разделена на лаг-фазу (резкое увеличение оптической плотности раствора), фазу роста, во время которой происходит значительное увеличение оптической плотности раствора, и фазу насыщения (достигается максимальная оптическая плотность раствора), в ходе которой завершается формирование структуры фибрилл. Турбидиметрические исследования показывают (рис. 2), что (+)-катехин ускоряет образование фибрилл, о чем свидетельствует сокращение продолжительности лаг-фазы (рис. 2е). Сокращение $t_{\text{лаг}}$ можно определить как ускорение формирования фибрилл коллагена [11]. Лаг-фаза соответствует стадии нуклеации, во время которой, в результате агрегации отдельных молекул, образуются димеры коллагена [15]. Предположительно, уменьшение продолжительности лаг-фазы объясняется тем,

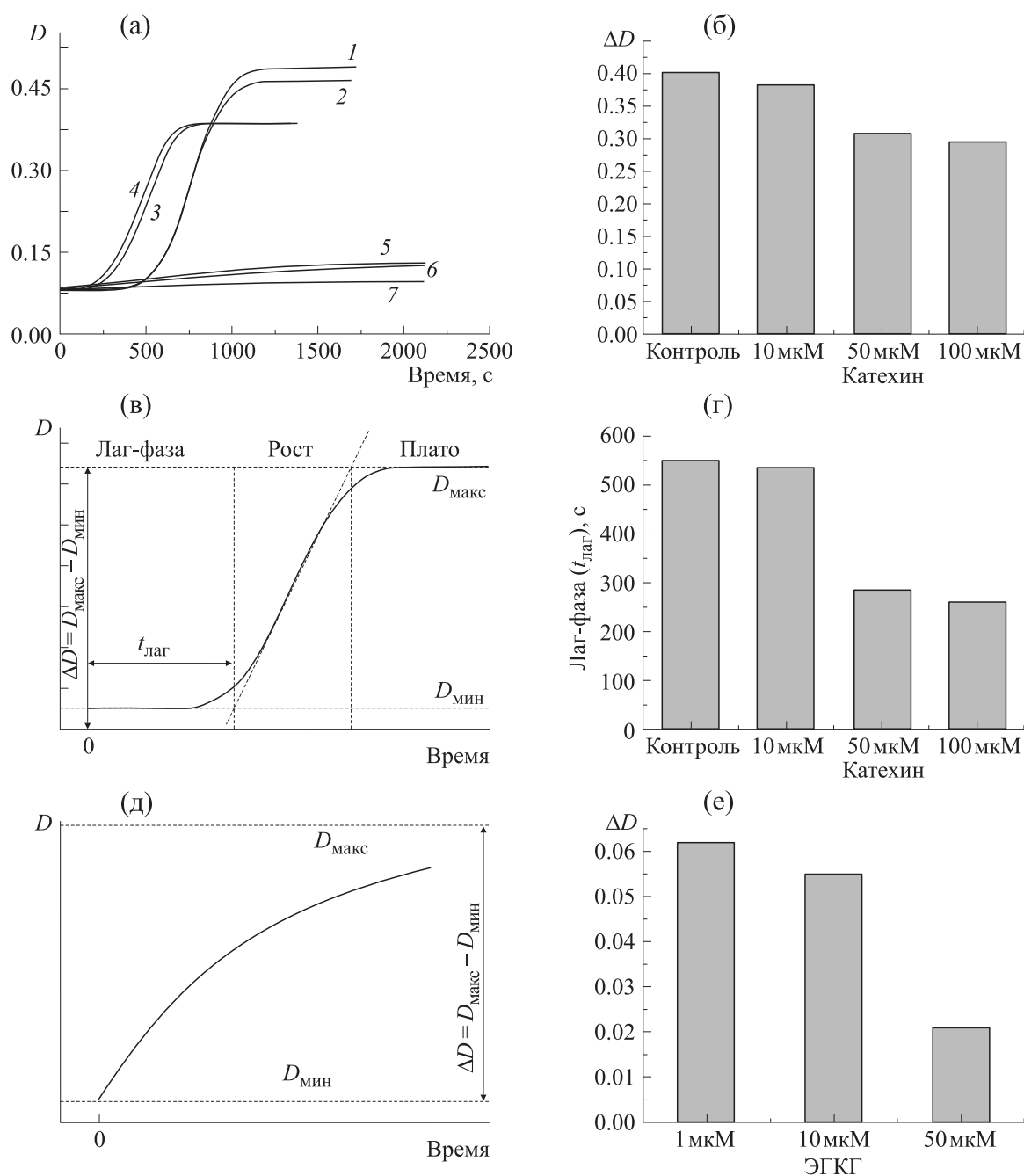


Рис. 2. Влияние катехинов на изменение оптической плотности раствора при формировании фибрилл коллагена. (а, в, д) — Кривые оптической плотности растворов коллагена и их анализ: (а) — кривая 1 — контрольный образец, кривая 2 — образец в присутствии 10 μM катехина, кривая 3 — образец в присутствии 50 μM катехина, кривая 4 — образец в присутствии 100 μM катехина, кривая 5 — образец в присутствии 1 μM ЭГКГ, кривая 6 — образец в присутствии 10 μM ЭГКГ и кривая 7 — образец в присутствии 50 μM ЭГКГ; (в) — анализ сигмоидальной кривой оптической плотности, кривая разделена на лаг-фазу (характеризуется временем $t_{\text{лаг}}$ и минимальной оптической плотностью $D_{\text{мин}}$), фазу роста и плато (характеризуется максимальной оптической плотностью $D_{\text{макс}}$); (д) — анализ экспоненциальной кривой оптической плотности, кривая характеризуется параметром ΔD . (б, г, е) — Результаты анализа кривых изменения оптической плотности: представлены значения ΔD (б) и $t_{\text{лаг}}$ (г) под действием (+)-катехина, а также изменения ΔD под действием ЭГКГ (е).

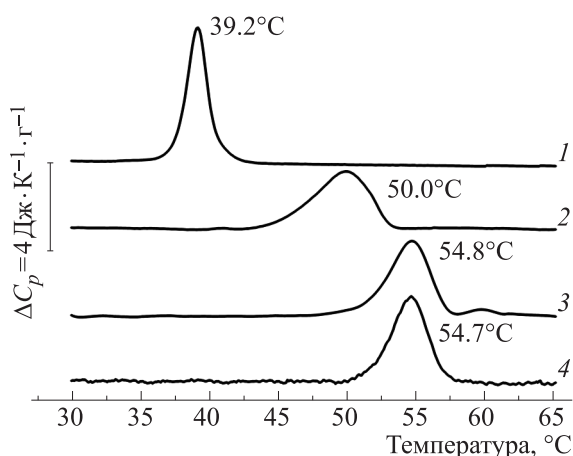


Рис. 3. Термограммы плавления коллагена, полученные методом дифференциальной сканирующей калориметрии: термограмма 1 – мономер коллагена, pH 3.0; термограмма 2 – фибриллярный коллаген, pH 7.4, инкубация 1 ч; термограмма 3 – фибриллы коллагена формировались в присутствии 10 мкМ (+)-катехина, инкубация 1 ч; термограмма 4 – фибриллы коллагена формировались в присутствии 10 мкМ ЭГКГ, инкубация 1 ч.

что молекулы (+)-катехина способны влиять преимущественно на начальный этап формирования фибрилл – этап нуклеации.

Молекулы ЭГКГ совершенно иначе влияют на процесс образования фибрилл коллагена, подавляя этот процесс в самом начале (рис. 1г, кривые 5, 6 и 7). В присутствии ЭГКГ кривая роста оптической плотности раствора коллагена не имела сигмоидальной формы. Напротив, этот процесс носил экспоненциальный характер. Это

предполагает возможность существования различных вариантов взаимодействия белковых молекул в этих условиях.

Дифференциальная сканирующая калориметрия показывает значительное, примерно на 10–11°C, увеличение термостабильности фибрилл коллагена по сравнению с раствором его мономеров в кислой среде (рис. 3), что коррелирует с данными предыдущих исследований [11, 16]. Дальнейшее повышение термостабильности фибрилл коллагена почти на 5°C наблюдалось в присутствии 10 мкМ (+)-катехина. Примечательно, что агрегаты коллагена с нерегулярной структурой, образующиеся в присутствии 10 мкМ ЭГКГ, имеют аналогичные термические свойства. Это указывает на то, что повышенная термостабильность коллагена в присутствии катехинов связана не только с фибриллярной структурой этого белка. Повышение термостабильности образующихся агрегатов коллагена, в том числе фибрилл, предположительно, можно объяснить образованием при участии катехинов прочных поперечных связей между белковыми молекулами.

Электронная микроскопия показывает, что в присутствии (+)-катехина образуются поперечно-полосатые фибриллы, аналогичные тем, что наблюдаются в контрольных образцах. На микрофотографии (рис. 4а,б) видны фибриллы с периодом около 64–67 нм, характерные для коллагена [20]. Это подтверждает предположение о том, что белковые агрегаты, формирование которых регистрировалось методом турбидиметрии, действительно являются фибриллами.

В отличие от (+)-катехина, ЭГКГ подавляет образование фибрилл в аналогичных или даже

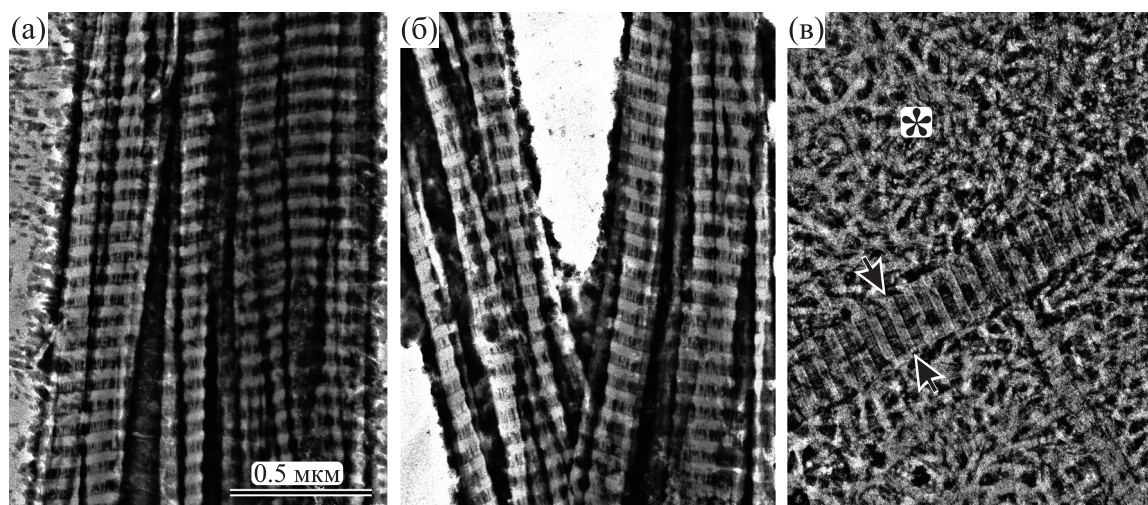


Рис. 4. Просвечивающая электронная микроскопия фибрилл коллагена. (а) – Пучки поперечно-полосатых фибрилл в контрольном препарате коллагена. (б) – Аналогичные фибриллы образовывались в присутствии 10 мкМ (+)-катехина. (в) – В присутствии 10 мкМ ЭГКГ большая часть материала была аморфной (отмечено звездочкой). Однако в этом препарате встречались и одиночные поперечно-полосатые фибриллы (отмечено стрелками).

более низких концентрациях. Об этом свидетельствуют не только небольшие значения ΔD , наблюдаемые в турбидиметрическом исследовании, но и данные электронной микроскопии, показывающие, что большая часть белка имеет аморфную структуру, тогда как фибриллярный коллаген встречается очень редко (рис. 4в). Турбидиметрический анализ также показывает, что в присутствии ЭГКГ кривые изменения оптической плотности растворов имеют форму экспонент и, следовательно, не имеют лаг-фазы, в течение которой, как известно, происходит линейная агрегация мономеров коллагена, предшествующая образованию фибрилл [15, 21].

Фибриллярный коллаген обеспечивает механическую прочность тканям человека и животных. Ингибирующее действие ЭГКГ на отложение коллагена может способствовать ремоделированию тканей во время заживления диабетических ран [22], терапии сердечно-сосудистой дисфункции [23], гиперплазии предстательной железы [24] и фиброза печени [25]. Он может значительно предотвратить повреждение легких, воспаление и окислительный стресс [26]. Было показано, что ЭГКГ может служить перспективным агентом при создании лекарственных средств для предотвращения развития гипертрофированных шрамов [27], способный ингибировать рост и вызывать уменьшение размеров келоидной ткани [28]. Терапевтический эффект ЭГКГ может обеспечиваться присутствием в молекуле катехоловой группы. Например, синтетические соединения, такие как полимерные гели, содержащие боковые группы катехолов, могут, подобно ЭГКГ, уменьшать отложение коллагена в тканях и оказывать противовоспалительное действие [29]. В настоящее время получены доказательства того, что обнаруженное действие ЭГКГ может быть опосредовано влиянием на клеточные сигнальные системы, например пути AKT/mTOR [26], ERK1/2 [30], TGF- β /Smad [31] или RunX2/Col IV [32]. Однако в представленной работе мы показали, что при концентрации ЭГКГ, равной 1 мкМ, наблюдается ингибирование образования коллагеновых фибрилл. Известно, что концентрация катехинов в крови человека, выпивающего одну чашку чая, составляет около 0.5 мкМ [33], что близко к уровню ЭГКГ, способного ингибировать образование коллагеновых фибрилл в наших экспериментах. Можно предположить, что ЭГКГ способен в том числе и напрямую, без участия клеточных регуляторных систем, влиять на образование фибрилл *in vivo*. Поэтому мы призываем к дальнейшему рассмотрению возможности прямого влияния ЭГКГ на отложение коллагена как одного из механизмов терапевтического действия этого препарата.

ВЫВОДЫ

Представленная работа посвящена изучению влияния катехинов чая на формирование фибрилл коллагена из мономеров этого белка. Обнаруженное нами ускорение образования фибрилл в присутствии (+)-катехина и ингибирование этого процесса ЭГКГ в концентрациях, близких к физиологическим, расширяют наши представления о механизмах терапевтического действия этих веществ в случае патологий, ассоциированных с изменением структуры, свойств и содержания фибриллярного коллагена в тканях. Мы полагаем, что в дополнение к главному тренду в исследованиях участия клеточных сигнальных систем во взаимодействии фибрилл коллагена с клетками тканей, следует уделить также внимание изучению прямого влияния различных агентов, включая ЭГКГ и других природных полифенольных соединений, на образование фибрилл коллагена в тканях. Полученные в этих исследованиях данные могут быть использованы для создания новых фармакологических средств для профилактики и лечения широкого спектра заболеваний.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Государственного задания ИБК РАН (№ 075-00609-24-01) и ИТЭБ РАН (№ 075-00224-24-01).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, сопряженные с выделением коллагена из тканей животных, соответствовали Директиве Европейского парламента ЕС 2010/63/EU.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rathod N. B., Elabed N., Punia S., Ozogul F., Kim S.-K., and Rocha J. M. Recent developments in polyphenol applications on human health: a review with current knowledge. *Plants*, **12** (6), 1217 (2023). DOI: 10.3390/plants12061217
2. Buljeta I., Pichler A., Šimunović J., and Kopjar M. Beneficial effects of red wine polyphenols on human health: comprehensive review. *Curr. Issues Mol. Biol.*, **45** (2), 782–798 (2023). DOI: 10.3390/cimb45020052
3. Bakun P., Młynarczyk D. T., Koczorowski T., Cerbin-Koczorowska M., Piwowarczyk L., Kolasiński E., Stawny M., Kuźmińska J., Jelińska A., and Goslinski T.

- Tea-break with epigallocatechin gallate derivatives – Powerful polyphenols of great potential for medicine. *Eur. J. Med. Chem.*, **261**, 115820 (2023). DOI: 10.1016/j.ejmech.2023.115820
4. Azami S. and Forouzanfar F. Therapeutic potentialities of green tea (*Camellia sinensis*) in ischemic stroke: biochemical and molecular evidence. *Metab. Brain Dis.*, **39** (2), 347–357 (2024). DOI: 10.1007/s11011-023-01294-4
 5. Li X. X., Liu C., Dong S. L., Ou C. S., Lu J. L., Ye J. H., Liang Y. R., and Zheng X. Q. Anticarcinogenic potentials of tea catechins. *Front Nutr.*, **9**, 1060783 (2022). DOI: 10.3389/fnut.2022.1060783
 6. Suganuma M., Saha A., and Fujiki H. New cancer treatment strategy using combination of green tea catechins and anticancer drugs. *Cancer Sci.*, **102** (2), 317–323 (2011). DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01805.x
 7. Kim A., Chiu A., Barone M. K., Avino D., Wang F., Coleman C. I., and Phung O. J. Green tea catechins decrease total and low-density lipoprotein cholesterol: a systematic review and meta-analysis. *J. Am. Diet. Assoc.*, **111** (11), 1720–1729 (2011). DOI: 10.1016/j.jada.2011.08.009
 8. Lange K. W. Tea in cardiovascular health and disease: a critical appraisal of the evidence. *Food Sci. Hum. Wellness*, **11** (3), 445–454 (2022).
 9. Mandel S. A., Amit T., Weinreb O., Reznichenko L., and Youdim M. B. Simultaneous manipulation of multiple brain targets by green tea catechins: a potential neuroprotective strategy for Alzheimer and Parkinson diseases. *CNS Neurosci. Ther.*, **14** (4), 352–365 (2008). DOI: 10.1111/j.1755-5949.2008.00060.x
 10. Prasanth M. I., Sivamaruthi B. S., Chaiyasut C., and Tencomnao T. A review of the role of green tea (*Camellia sinensis*) in anti-photoaging, stress resistance, neuroprotection, and autophagy. *Nutrients*, **11** (2), 474 (2019). DOI: 10.3390/nu11020474
 11. Kim Y. A., Tarahovsky Y. S., Gaidin S. G., Yagolnik E. A., and Muzafarov E. N. Flavonoids determine the rate of fibrillogenesis and structure of collagen type I fibrils *in vitro*. *Int. J. Biol. Macromol.*, **104**, 631–637 (2017). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.070
 12. Tarahovsky Y. S., Selezneva I. I., Vasilieva N. A., Egorochkin M. A., and Kim Y. A. (2007). Acceleration of fibril formation and thermal stabilization of collagen fibrils in the presence of taxifolin (dihydroquercetin). *Bull. Exp. Biol. Med.*, **144**, 791–794 (2007). DOI: 10.1007/s10517-007-0433-z
 13. Smith J. W. Molecular pattern in native collagen. *Nature*, **219**, 157–158 (1968). DOI: 10.1038/219157a0
 14. Açı Y. and Müller P. K. Rapid method for the isolation of the mature collagen cross-links, hydroxylsypyrinoline and lysylpyridinoline. *J. Chromatogr. A*, **664**, 183–188 (1994). DOI: 10.1016/0021-9673(94)87006-3
 15. Silver F. H. and Trelstad R. L. Linear aggregation and the turbidimetric lag phase: type I collagen fibrillogenesis *in vitro*. *J. Theor. Biol.*, **81**, 515–526 (1979). DOI: 10.1016/0022-5193(79)90049-3
 16. Tiktopulo E. I. and Kajava A. V. Denaturation of type I collagen fibrils is an endothermic process accompanied by a noticeable change in the partial heat capacity. *Biochemistry*, **37** (22), 8147–8152 (1998). DOI: 10.1021/bi980360n
 17. Williams B. R., Gelman R. A., Poppke D. C., and Piez K. A. Collagen fibril formation. Optimal *in vitro* conditions and preliminary kinetic results. *J. Biol. Chem.*, **253**, 6578–6585 (1978).
 18. Bozec L., van der Heijden G., and Horton M. Collagen fibrils: nanoscale ropes. *Biophys. J.*, **92** (1), 70–75 (2007). DOI: 10.1529/biophysj.106.085704
 19. Darvish D. M. Collagen fibril formation *in vitro*: From origin to opportunities. *Mater. Today Bio.*, **15**, 100322 (2022). DOI: 10.1016/j.mtbio.2022.100322
 20. Chapman J. A., Tzaphlidou M., Meek K. M., and Kadler K. E. The collagen fibril – a model system for studying the staining and fixation of a protein. *Electron Microsc. Rev.*, **3** (1), 143–182 (1990). DOI: 10.1016/0892-0354(90)90018-n
 21. Açı Y., Mobasser A. E., Warnke P. H., Terheyden H., Wiltfang J., and Springer I. Detection of mature collagen in human dental enamel. *Calcif. Tissue Int.*, **76** (2), 121–126 (2005). DOI: 10.1007/s00223-004-0122-0
 22. Chen F., Qin J., Wu P., Gao W., and Sun G. Glucose-responsive antioxidant hydrogel accelerates diabetic wound healing. *Adv. Healthc. Mater.*, **12** (21), e2300074 (2023). DOI: 10.1002/adhm.202300074
 23. Connolly K., Batacan R., Jackson D., and Fenning A. S. Effects of epicatechin on cardiovascular function in middle-aged diet-induced obese rat models of metabolic syndrome. *Br. J. Nutr.*, **131** (4), 593–605 (2024). DOI: 10.1017/S000711452300209X
 24. Zhou J., Lei Y., Chen J., and Zhou X. Potential ameliorative effects of epigallocatechin-3-gallate against testosterone-induced benign prostatic hyperplasia and fibrosis in rats. *Int. Immunopharmacol.*, **64**, 162–169 (2018). DOI: 10.1016/j.intimp.2018.08.038
 25. George J., Tsuchishima M., and Tsutsumi M. Epigallocatechin-3-gallate inhibits osteopontin expression and prevents experimentally induced hepatic fibrosis. *Biomed. Pharmacother.*, **151**, 113111 (2022). DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113111
 26. Zhongyin Z., Wei W., Juan X., and Guohua F. Epigallocatechin gallate relieved PM2.5-induced lung fibrosis by inhibiting oxidative damage and epithelial-mesenchymal transition through AKT/mTOR pathway. *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2022**, 7291774 (2022). DOI: 10.1155/2022/7291774
 27. Song Y., Wang T., Yang L., Wu J., Chen L., Fan X., Zhang Z., Yang Q., Yu Z., and Song B. EGCG inhibits hypertrophic scar formation in a rabbit ear model. *J. Cosmet. Dermatol.*, **22**, 1382–1391 (2023). DOI: 10.1111/jocd.15587
 28. Syed F., Bagabir R. A., Paus R., and Bayat A. *Ex vivo* evaluation of antifibrotic compounds in skin scarring: EGCG and silencing of PAI-1 independently inhibit

- growth and induce keloid shrinkage. *Lab. Invest.*, **93** (8), 946–960 (2013). DOI: 10.1038/labinvest.2013.82
29. Qiao Y., Zhang Q., Wang Q., Lin J., Wang J., Li Y., and Wang L. Synergistic anti-inflammatory coating “Zipped Up” on polypropylene hernia mesh. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **13** (30), 35456–35468 (2021). DOI: 10.1021/acsami.1c09089
 30. Zang G., Chen Y., Guo G., Wan A., Li B., and Wang Z. Protective effect of CD137 deficiency against postinfarction cardiac fibrosis and adverse cardiac remodeling by ERK1/2 signaling pathways. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **83** (5), 446–456 (2024). DOI: 10.1097/FJC.0000000000001549
 31. Guo H., Hu Z., Yang X., Yuan Z., Wang M., Chen C., Xie L., Gao Y., Li W., Bai Y., and Lin C. Smad4 regulates TGF- β 1-mediated hedgehog activation to promote epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells by suppressing Gli1 activity. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **23**, 1189–1200 (2024). DOI: 10.1016/j.csbj.2024.03.010
 32. Huang X., Zhang S., Fu W., Wang L., Liu Zh., Tang Y., Gao W., and Tang B. *In situ* imaging of GGT and HOBr-triggered atherosclerotic plaque rupture via activating the RunX2/Col IV signaling pathway. *Anal. Chem.*, **96** (10), 4138–4145 (2024). DOI: 10.1021/acs.analchem.3c05073
 33. Reddy V. C., Vidya Sagar G. V., Sreeramulu D., Venu L., and Raghunath M. Addition of milk does not alter the antioxidant activity of black tea. *Ann. Nutr. Metab.*, **49** (3), 189–195 (2005). DOI: 10.1159/000087071

Effects of Catechins on the Formation of Collagen Fibrils *in vitro*

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

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

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

Some aspects of therapeutic action of catechins are associated with their effects on the deposition of collagen fibrils in tissues. It is assumed that this process is controlled through signaling and regulatory pathways in cells that catechins affect, however, the direct interactions of polyphenols with structural proteins cannot be excluded. The present work investigates the direct effect of (+)-catechin and epigallocatechin gallate on the formation of collagen fibrils *in vitro*. Turbidimetry, differential scanning calorimetry and transmission electron microscope data showed that (+)-catechin accelerates the formation of type I collagen fibrils, and the resulting fibrils have a protein-specific structure and thermal stability, while epigallocatechin gallate at a concentration of 10 μ M inhibits fibrillogenesis. The results obtained expand our understanding of the potential mechanisms of therapeutic action of catechins demonstrating the possibility of a direct interaction of (+)-catechin and epigallocatechin gallate with collagen monomers and collagen fibrils and these findings may be useful in the development of new drugs containing these plant polyphenols or their synthetic analogues.

Keywords: collagen, fibrils, polyphenols, flavonoids, catechin, epigallocatechin gallate