

Влияние поверхности коллагеновых пленок, сформированных при разных значениях pH, на адгезию и пролиферацию мезенхимных стромальных клеток

© Ю.А. Нащечкина,^{1,2} А.С. Чабина,² Д. Чавис,² О.В. Темников,¹ А.В. Нащечкин¹

¹ Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН,
194021 Санкт-Петербург, Россия

² Институт цитологии РАН,
194064 Санкт-Петербург, Россия
e-mail: nashchekina.yu@mail.ru

Поступило в Редакцию 6 июля 2026 г.

В окончательной редакции 6 июля 2026 г.

Принято к публикации 6 июля 2026 г.

Методом растровой электронной микроскопии продемонстрирована способность коллагена формировать фибриллы различного диаметра в широком диапазоне pH от 5 до 10. Показано, что за первые сутки культивирования наибольшее количество мезенхимных стромальных клеток адгезирует на пленках, приготовленных из раствора с pH в нейтральной и щелочной области. Все пленки продемонстрировали высокую биосовместимость, что подтверждает перспективу их использования в качестве носителей для задач клеточной терапии.

Ключевые слова: коллаген I типа, фибриллообразование, pH, адгезия, пролиферация, мезенхимные стромальные клетки.

DOI: 10.61011/JTF.2026.11.63784.236-26

Введение

Коллаген представляет собой наиболее распространенный структурный белок, встречающийся у всех млекопитающих, в том числе и у человека. Коллаген I типа в составе внеклеточного матрикса является основным структурным и строительным элементом соединительных тканей. Благодаря особенностям строения его молекул и множеству выполняемых в организме функций, данный тип коллагена давно привлекает внимание исследователей как основной материал для изготовления тканеподобных структур, способных быстро и эффективно восстанавливать повреждения различного рода [1]. В тканях организма коллаген I типа находится в виде организованных фибриллярных структур, диаметр которых зависит от типа ткани, возраста и типа патологии [2]. Поэтому, учитывая гетерогенный и динамический характер образования коллагеновых фибрилл *in vivo*, систематический подход к исследованию условий фибриллообразования позволяет более рационально проектировать и контролировать структуру и морфологические особенности биоматериалов на основе коллагена на молекулярном уровне, что может помочь получить стабильные продукты фибриллогенеза коллагена для применения в тканевой инженерии [3–5]. В настоящее время основным источником коллагена для задач регенеративной медицины служат ткани животных. Выделенный путем кислотной и ферментативной экстракций коллаген представляет собой раствор коллагена в виде отдельных молекул, требующих различного рода воздействий для

формирования их в фибриллы *in vitro*. Фибриллогенез коллагена зависит от электростатических и гидрофобных взаимодействий между молекулами [6,7]. Ионизация и электростатические взаимодействия между аминокислотными остатками регулируются такими факторами, как pH и ионная сила. Образование суммарных зарядов между молекулами коллагена соседних фибрилл может определять электростатические притяжения, которые могут стабилизировать матрицу, а также влиять на размер фибрилл и, следовательно, на структуру матрицы [8–10]. Известно, что молекулы коллагена могут самоорганизовываться в упорядоченные агрегаты или супрамолекулярные структуры *in vitro* путем надлежащего регулирования внешней среды и, в конечном итоге, образовывать волокна [11–13]. Формирование этой структуры основано на молекулярном распознавании молекул коллагена или фрагментов молекул коллагена посредством синергетического эффекта многих нековалентных связей слабых взаимодействий, включая водородные связи, гидрофобные силы, электростатические силы, силы Ван дер Ваальса и т.д. [14,15]. Этот процесс также тесно связан с присущей коллагену трехцепочечной спиральной структурой, уникальным липким концевым участком и молекулярной хиральностью [3,16].

Полипептидные цепи, составляющие молекулы коллагена, имеют разные заряды, и pH влияет на состояние заряда различных пептидных цепей, тем самым влияя на электростатическое взаимодействие и поведение самосборки между молекулами коллагена [17]. Поэтому, изменяя содержание протонов в исследуемом

растворе белка, можно изменить состояние заряда молекул коллагена и регулировать конкуренцию между молекулами коллагена, ионами и молекулами воды, тем самым влияя на итоговую структуру сформированных фибрилл [18,19]. Авторы показали, что при pH 3.0 в течение нескольких дней не происходило заметной самосборки коллагена. Самосборка коллагена происходила при pH 5.0, 7.0 и 9.0, и скорость образования фибрилл из молекул коллагена при pH 5.0 была значительно ниже, чем при pH 7.0 и 9.0. Таким образом, различные условия pH влияют как на процесс самосборки коллагена *in vitro*, так и на физико-химические свойства получаемых скаффолдов и свойства поверхности. Именно с поверхностью получаемых при различных условиях скаффолдов взаимодействуют клетки как при исследованиях *in vitro*, так и *in vivo* после трансплантации полученных скаффолдов при миграции клеток из окружающих тканей. Несмотря на то, что интерес к исследованиям процессов фибриллообразования коллагена *in vitro* существует уже несколько десятилетий, результатов, относящихся к анализу влияния полученных поверхностей на поведение культивируемых в данных условиях клеток, все еще недостаточно. Целью настоящей работы является оценка влияния коллагеновых пленок, сформированных при разных значениях pH, на способность мезенхимных стромальных клеток адгезировать и пролиферировать на таких пленках.

1. Экспериментальная часть

1.1. Формирование коллагеновых пленок при разных значениях pH

Для формирования пленок использовали коллаген I типа, выделенный путем кислотной экстракции из сухожилий крысиных хвостов [20]. Коллаген растворяли в 0.1%-ном растворе уксусной кислоты до конечной концентрации белка 0.1 mg/ml. Для регулирования pH-раствора коллагена использовали 2 М раствор соляной кислоты (Реахим, Россия) и 4 М раствор гидроксида натрия (Реахим, Россия). После добавления кислоты или щелочи раствор коллагена тщательно перемешивали, и pH измеряли с помощью pH-метра (OAHUS Starter 3100 pH meter, США). После приготовления растворы коллагена со значением pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11 инкубировали при температуре $T = 4^\circ\text{C}$ для остановки процесса фибриллообразования. Для приготовления пленок 50 μl исследуемого раствора коллагена наносили на покровное стекло диаметром 11 mm (Биовитрум, Россия). Для предотвращения преждевременного высыхания и формирования фибрилл образцы помещали в герметичный контейнер и выдерживали в термостате при температуре $T = 37^\circ\text{C}$ в течение 30 min. Для полного удаления влаги образцы пленок сушили в термостате при температуре $T = 37^\circ\text{C}$ в течение одних суток. Для оценки взаимодействия клеток с коллагеновыми пленками раствор коллагена наносили

на 96-луночный (для МТТ-теста) и 48-луночный (для флуоресцентного окрашивания) культуральные планшеты. В лунки планшетов добавляли соответственно 50 и 250 μl раствора коллагена. Для исследований *in vitro* коллагеновые пленки стерилизовали под УФ-облучением в течение 30 min.

1.2. Растровая электронная микроскопия

Изображения поверхности пленок получали в режиме регистрации вторичных электронов с помощью растрового электронного микроскопа JSM-7001F (Jeol, Япония). Предварительно проводили напыление пленки золота толщиной около 20 nm.

1.3. ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье

С помощью ИК-фурье спектроскопии оценивали структурные особенности коллагеновых пленок. Спектры были получены с помощью спектрометра IRPresige-21 (Shimadzu, Япония) и проанализированы с помощью программного обеспечения IRsolution и AimView32.

1.4. Исследования *in vitro*

1.4.1. Культивирование клеток

В настоящей работе использовали фетальные мезенхимные стромальные клетки (МСК), полученные из Коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки в среде DMEM/F-12 (Biolot, Россия) с 10%-ным содержанием FBS (HyClone, США) и гентамицином (Capricorn Scientific, Германия) в стандартной концентрации. В экспериментах использовали клетки 5–7 пассажей.

1.4.2. МТТ-тест

Для оценки жизнеспособности клетки вносили в 96-луночный планшет в количестве 3000 на лунку. Культивирование проводили в течение двух часов, одних суток и трех суток. В качестве положительного контроля использовали культуральный пластик. После истечение определенного периода культивирования культуральную среду удаляли, и в каждую лунку добавляли 50 μl среды с 10%-ным раствором МТТ. Клетки выдерживали в CO_2 -инкубаторе в течение двух часов. Затем смесь среды с МТТ удаляли, и краситель экстрагировали из клеток, добавляя в каждую лунку 50 μl ДМСО. Количество клеток, прикрепившихся и размножившихся в процессе культивирования, определяли по оптической плотности раствора с помощью спектрофотометра (Экрос, Россия). Измерения проводили при длине волны 570 nm.

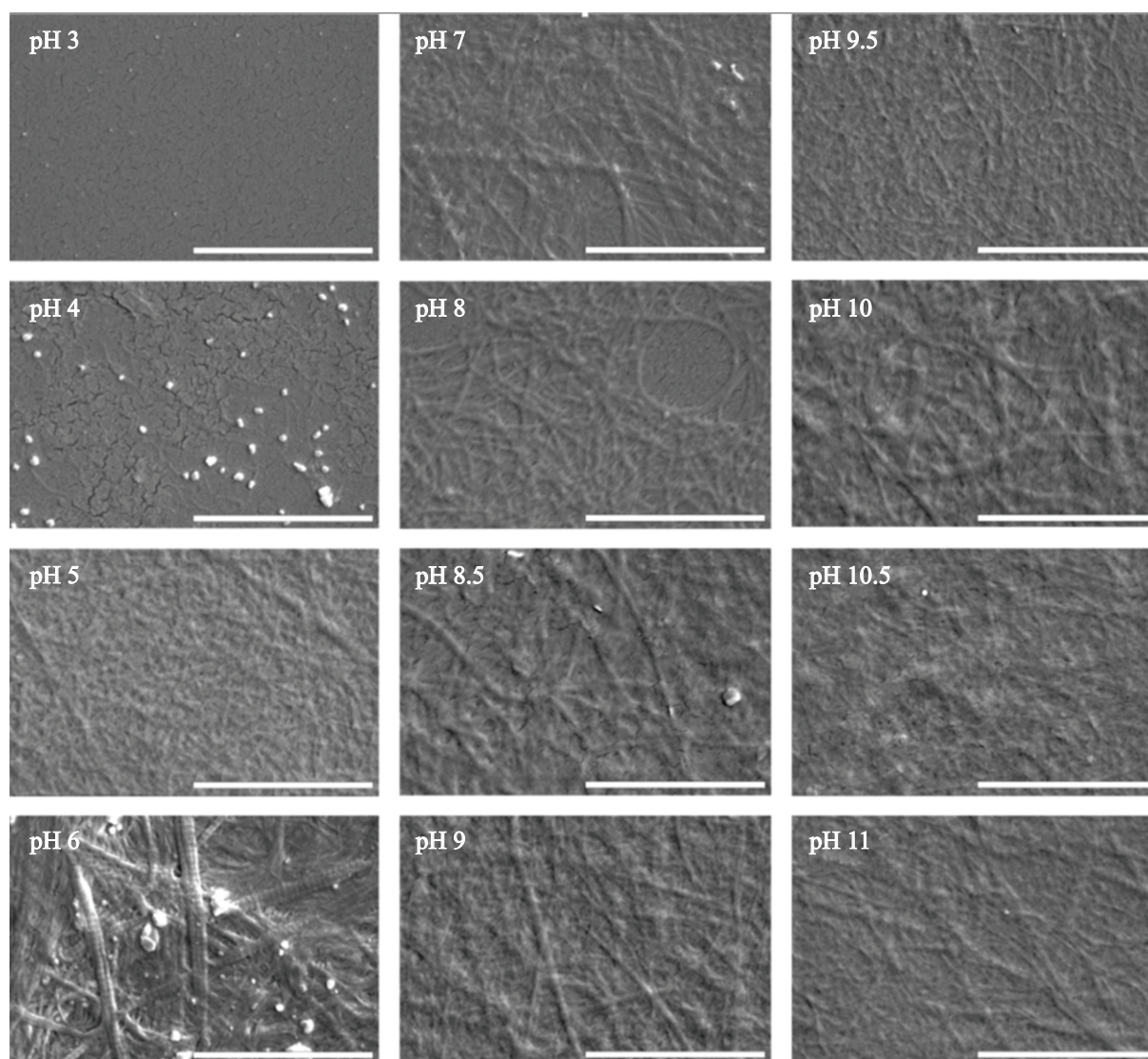


Рис. 1. Изображения РЭМ коллагеновых фибрилл, сформированных при разных значениях pH-раствора (шкала 100 μm).

1.4.3. Флуоресцентная микроскопия

Для оценки влияния поверхности коллагеновых пленок на адгезию МСК использовали прижизненный флуоресцентный краситель Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, США). Краситель вместе со средой наносили на монослой МСК и оставляли инкубироваться на 30 min при температуре $T = 37^\circ\text{C}$ в атмосфере 5% CO_2 . В качестве положительного контроля использовали культуральный пластик. По истечении этого времени среду сливали, а клетки промывали фосфатно-солевым буфером (PBS). Для флуоресцентной микроскопии 5000 клеток наносили на коллагеновые пленки. Анализ образцов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа ZOE (США) через 6 и 12 h культивирования. Количество прикрепившихся клеток оценивали по количеству окрашенных ядер на фотографиях разных полей каждой матрицы в программе ImageJ.

2. Результаты и их обсуждение

2.1. РЭМ коллагеновых пленок, сформированных при разных pH

Структура и содержание коллагеновых фибрилл в составе тканей имеют важное значение для жизнедеятельности всего организма *in vivo*, поэтому изучение механизмов самосборки коллагена с целью формирования пленок с определенным содержанием фибрилл на поверхности позволит имитировать нативные структурные особенности пленок *in vitro*. При исследовании влияния pH-раствора коллагена была выявлена определенная зависимость способности коллагена формировать фибриллы от низкого (3–5) до высокого (9–11) pH.

По данным результатов РЭМ (рис. 1) следует отметить, что при низких значениях pH (3–4) молекулы коллагена не способны формировать фибриллы,

поскольку в данной области pH молекулы заряжаются избыточными протонами, что приводит к отталкиванию молекул в растворе.

По мере уменьшения содержания положительного заряда в растворе молекулы коллагена начинают собираться в фибриллы. Из рис. 1 видно, что при pH 5 микрофибриллы коллагена равномерно распределены по всей поверхности. При достижении pH 6 формируются нативные фибриллы с характерной поперечной исчерченностью. Диаметр фибрилл имеет гетерогенное распределение по размеру и у некоторых фибрилл достигает $10\text{ }\mu\text{m}$. Дальнейшее увеличение pH-раствора коллагена с 7 до 9, т.е. при достижении значения изоэлектрической точки нативного коллагена (pH 7.2) [21] и ее последующего перехода в область отрицательного заряда раствора, также обеспечивает формирование фибрилл, которые равномерно распределены по всей поверхности. Не смотря на то, что значение изоэлектрической точки коллагена, т.е. условий полного нейтрального заряда молекулы, больше 7, формирование структур с нативной поперечной исчерченностью фибрилл наблюдали уже при pH 6. Также следует отметить, что в отличие от образца с pH 6, при увеличении pH с 7 до 9 формируются фибриллы с гомогенным распределением диаметра. Несмотря на то, что при pH выше 9 молекулы коллагена имеют отрицательный средний заряд благодаря большой концентрации гидроксид-ионов в растворе, на поверхности пленок визуализировали микрофибриллы. Очевидно, происхождение таких микрофибрилл носит спонтанный характер, поскольку для достижения высокого pH к раствору коллагена с высоким содержанием протонов добавляют гидроксид-ионы, и молекулы коллагена, проходя через изоэлектрическую точку, успевают провзаимодействовать друг с другом, формируя микрофибриллы. Поскольку процесс перезарядки молекулы происходит достаточно быстро, латерального роста фибрилл не происходит, и диаметр фибрилл сохраняется на уровне $1\text{--}2\text{ }\mu\text{m}$. Полученные результаты не противоречат полученным данным других исследователей [22,23].

2.2. ИК-фурье спектроскопия

Значение pH-раствора играет ключевую роль в сборке коллагена, что напрямую отражается на его FTIR-спектрах [24,25]. Данные, полученные при разных значениях pH, представлены на рис. 2.

Типичный спектр коллагена I типа характеризуется пятью главными полосами поглощения (амидными полосами). Амид А, расположенный около 3300 cm^{-1} , связан с валентными колебаниями связи N—H, которые участвуют в водородных связях, амид В, расположенный в области 2930 cm^{-1} , отвечает за асимметричные валентные колебания групп CH_2 , амид I, занимающий положение в области $1600\text{--}1660\text{ cm}^{-1}$, является маркером валентных колебаний карбонильных групп C=O, которые связаны с вторичной структурой белка. Данный

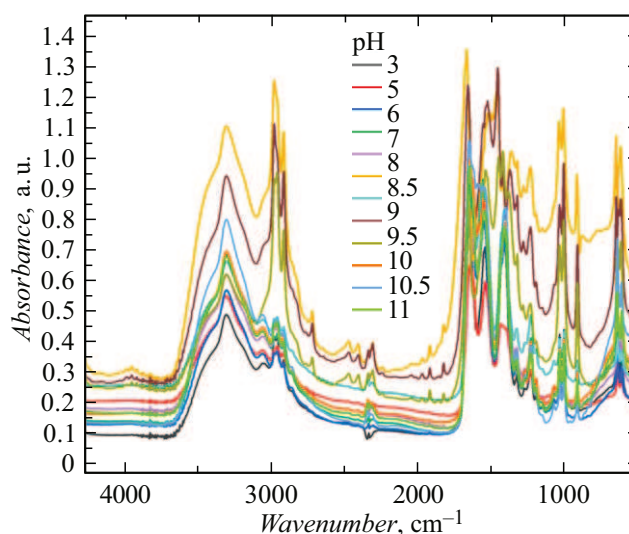


Рис. 2. ИК-фурье спектр коллагеновых пленок, полученных при значениях pH от 3 до 11.

амид отвечает за наличие и качество тройной спирали. Амид II ($1530\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$) является индикатором изгибных колебаний N—H и валентных колебаний C—N. И последний амид III ($1200\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$) является признаком колебания связи C—N и деформации N—H [26].

Оптимальный уровень pH для поддержания нативной тройной спирали коллагена находится в диапазоне 4.5–7.0. В особенно кислой среде (pH < 3) или особенно щелочной (pH > 10) коллаген переходит из жесткой спиральной формы в клубок, что впоследствии может привести к его денатурации. Такие структурные изменения в молекуле отражаются в сдвиге пика амид I на несколько единиц волновых чисел.

У образцов с pH 8, 9, 9.5 растет интенсивность пиков при 2980 , 2920 и 1460 cm^{-1} , соответствующих колебаниям связей CH_2 и CH_3 , при этом уменьшается интенсивность пика при 1410 cm^{-1} , соответствующих карбоксилатной группе COO, что соответствует блокировке этих групп в среде с повышенным значением pH. Также у них сдвинута полоса поглощения Амид II в сторону больших длин волн.

2.3. Флуоресцентная микроскопия

Способность клеток адгезировать к исследуемому субстрату является первичным признаком биосовместимости субстрата по отношению к данной клеточной культуре. Для более детального изучения процесса адгезии клетки окрашивали флуоресцентным красителем Hoechst с длительным временем жизни флуоресценции и подсчитывали через 6 и 12 h культивирования. Контрольным образцом также служили клетки, культивированные на культуральном пластике, которые мы принимали за 100% для сравнения с клетками на коллагеновых матрицах. Количество клеток после 6 h культивирования

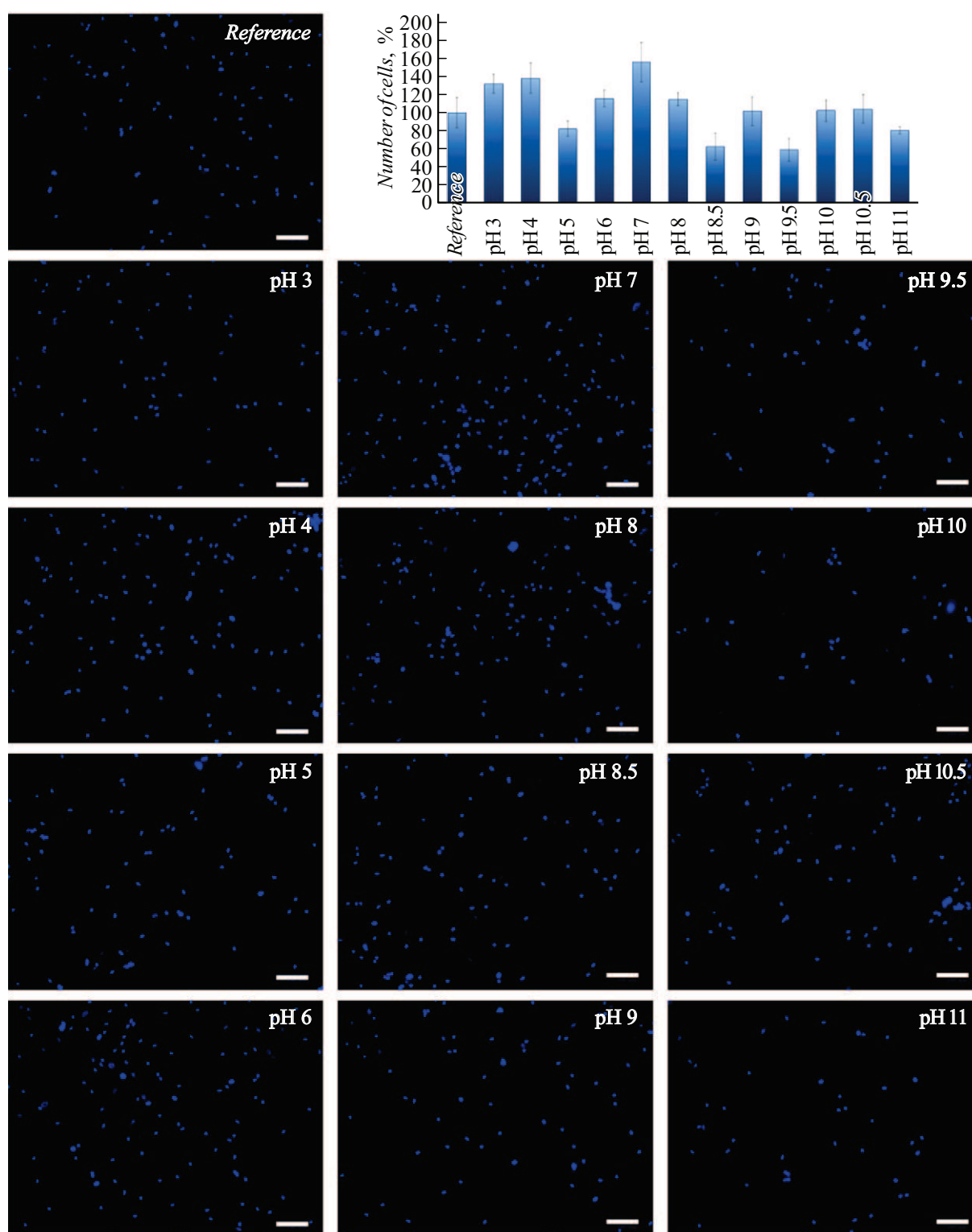


Рис. 3. Адгезия МСК на коллагеновых пленках, сформированных при значениях pH 3–11, через 6 h после посева (флуоресцентная микроскопия; шкала соответствует $100\mu\text{m}$).

представлено на рис. 3. Процесс адгезии в первые шесть часов после посева лучше протекал на пленках, сформированных при кислом и нейтральном pH, но при щелочном pH он был либо близок к контрольному

образцу (pH 8, 9, 10 и 10.5), либо снижался (pH 8.5, 9.5 и 11). Коллаген, благодаря наличию специфических для клеточных рецепторов сайтов связывания в своей структуре, а также положительному заряду, использу-

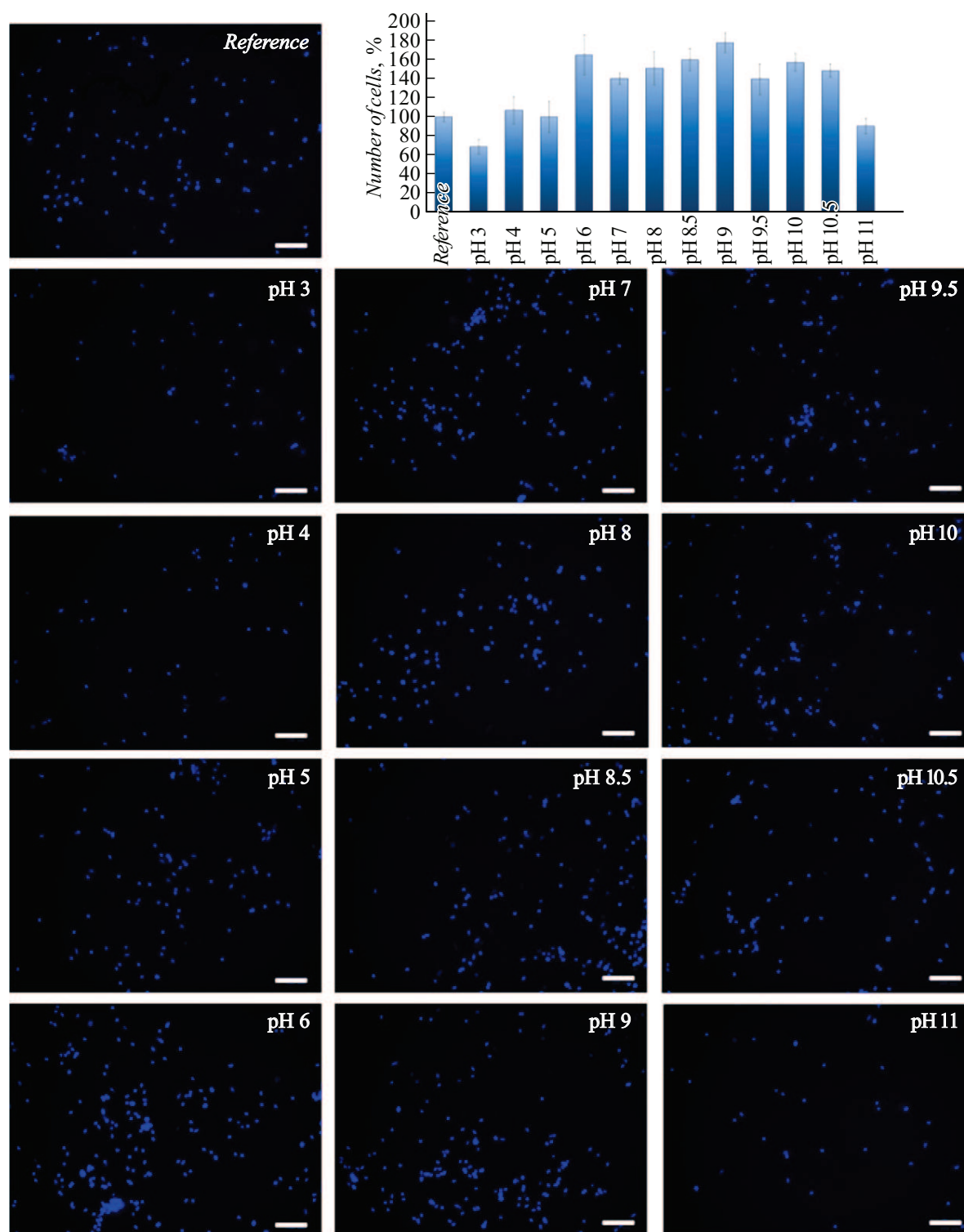


Рис. 4. Адгезия МСК на коллагеновых пленках, сформированных при значениях pH 3–11, через 12 h после посева (флуоресцентная микроскопия; шкала соответствует 100 μm).

ется для модификации различных поверхностей, чтобы увеличить адгезию клеток к таким поверхностям [27]. Действительно, на положительно заряженном коллагене на пленках, полученных при pH до 7, адгезирует больше всего клеток (рис. 3).

Через 12 h культивирования характер адгезии клеток от pH-раствора коллагена значительно меняется (рис. 4). Количество клеток на матрицах, сформированных при сильно кислом pH и при pH 11, близко к контрольному образцу. Однако, начиная с pH 6 и до 10.5, количество

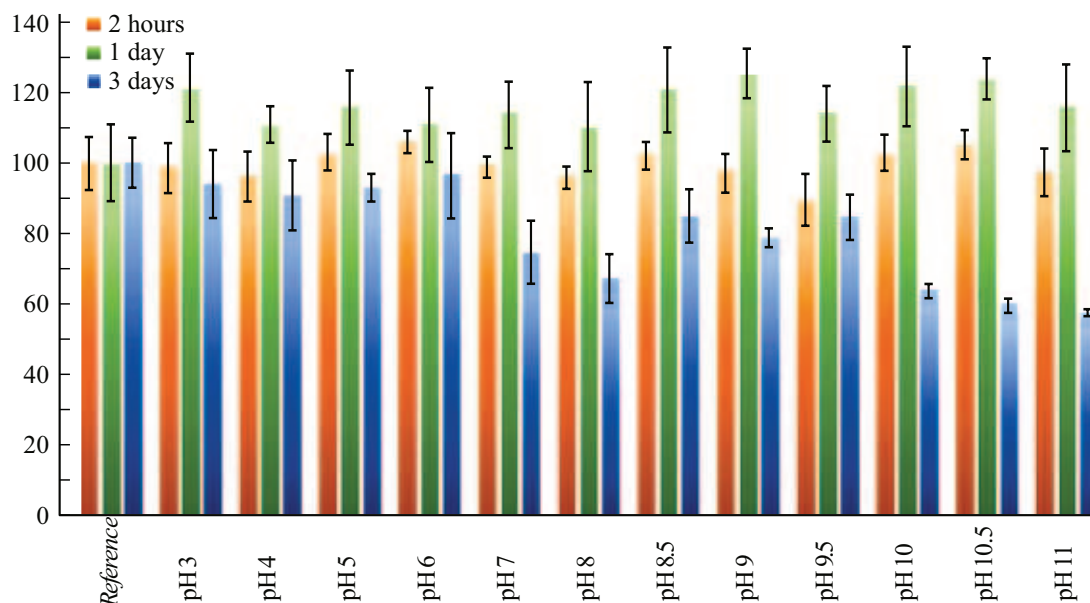


Рис. 5. Данные МТТ-теста МСК, культивируемых на коллагеновых пленках, полученных при значениях pH 3–11 после двух часов, одних и трех суток после посева.

клеток на матрицах значительно увеличивается. Максимальное количество было обнаружено на матрицах с наибольшим количеством нативных фибрилл (pH 6 и pH 9). Значительное количество клеток на коллагеновой пленке, полученной при pH 6 по сравнению с контролем (культуральный пластик), вполне ожидаемо и объяснимо. Нативные фибриллы с характерной поперечной исчерченностью, визуализированные с помощью РЭМ (рис. 1), являются прекрасным субстратом для адгезии клеток. Именно такая нативная структура, как было показано в ряде исследований, а также в наших работах, способствует прикреплению клеток к коллагеновому субстрату [13,28]. Значимое увеличение адгезировавших клеток по сравнению с контрольным образцом также наблюдали на образцах, сформированных при pH от 7 до 10.5. Несмотря на отрицательный заряд коллагенового субстрата, сформированного в щелочной области pH, количество клеток после двенадцати часов культивирования значительно увеличивается, особенно по отношению к количеству клеток, анализируемых на этих же субстратах после шести часов культивирования. Такой значительный рост в адгезии клеток на этих пленках может быть обусловлен сорбцией белков сыворотки из питательной среды. Действительно, отрицательный заряд поверхности пленок, сформированных в щелочном растворе, может способствовать сорбции положительно заряженных белков сыворотки, что было продемонстрировано в ряде работ [29,30].

2.4. МТТ-тест

Для оценки степени жизнеспособности клеток, культивируемых на коллагеновых пленках, использовали МТТ-тест (рис. 5).

После двух часов культивирования методом МТТ-теста не выявлено достоверных отличий в количестве жизнеспособных клеток на всех образцах. Количество живых клеток после двух часов сопоставимо с контрольным образцом. Разницу в количестве жизнеспособных клеток наблюдали после одних суток культивирования. На всех коллагеновых пленках клеток было больше, чем в контрольном образце, что еще раз подтверждает биосовместимость коллагеновой поверхности по отношению к МСК по сравнению с культуральным пластиком. Разницу в степени жизнеспособности клеток, культивируемых на коллагеновых пленках, обнаружили после трех суток культивирования. Было показано, что количество жизнеспособных клеток на коллагеновых пленках, сформированных при pH 7–11, уступает количеству жизнеспособных клеток, культивируемых на пленках, сформированных при более низких pH, а также в контрольном образце. Причиной подобного эффекта, несмотря на высокую адгезионную способность клеток к коллагеновым пленкам, полученным при высоких значениях pH при небольших сроках культивирования, является то, что к третьим суткам клетки успевают сформировать плотный слой, в отличие от образцов, сформированных при низком значении pH, что привело к ограничению их пролиферации, а, следовательно, и снижению жизнеспособности [31]. Данное предположение требует дополнительных исследований.

Заключение

Несмотря на то, что физико-химические превращения коллагена уже достаточно давно изучаются, интерес к данному белку не угасает. Причиной такого интереса

является высокий потенциал данного белка для создания тканеподобных структур, способных активно участвовать в регенерации поврежденных органов и тканей. Разработка условий формирования коллагеновых носителей с контролируемыми свойствами, имитирующими структуру и функцию нативной ткани, позволит существенно повысить регенеративный потенциал разрабатываемых конструкций. В результате проведенных исследований была продемонстрирована зависимость способности молекул коллагена формировать фибриллы разного диаметра при различных значениях pH. Все поверхности пленок способствовали адгезии и пролиферации мезенхимных стромальных клеток.

Финансирование работы

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (Соглашение № 21-74-20120-П, <https://rscf.ru/project/21-74-20120/>).

Благодарность

Электронно-микроскопические и спектроскопические исследования выполнены с использованием оборудования федерального ЦКП „Материаловедение и диагностика в передовых технологиях“.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] I.N. Amirrah, Y. Lokanathan, I. Zulkiflee, M.F.M.R. Wee, A. Motta, M.B. Fauzi. *Biomedicines*, **10** (9), 2307 (2022). DOI: 10.3390/biomedicines10092307
- [2] M.Y. Sirotkina, Y.A. Nashchekina. *Cell Tissue Biol.*, **16**, 513 (2022). DOI: 10.1134/S1990519X22060104
- [3] S. Zhu, Q. Yuan, T. Yin, J. You, Z. Gu, S. Xiong, Y. Hu. *J. Mater. Chem. B*, **6**, 2650 (2018). DOI: 10.1039/c7tb02999c
- [4] Y. Nashchekina, A. Nashchekin. *Biomimetics*, **10** (10), 644 (2025). DOI: 10.3390/biomimetics10100644
- [5] X. Gong, Z. Wen, Z. Liang, H. Xiao, S. Lee, A.R. Martinez, Q. Xing, T. Wright, R.Y. Nguyen, M. Mak. *Nat. Mater.*, **24**, 1307 (2025). DOI: 10.1038/s41563-025-02241-7
- [6] F.H. Silver, J.W. Freeman, G.P. Seehra. *J. Biomech.*, **36**, 1529 (2003). DOI: 10.1016/S0021-9290(03)00135-0
- [7] Y. Nashchekina, M. Sirotkina, A. Inozemtseva, D. Kriger, O. Temnikov, N. Prasolov, A. Nashchekin, N. Mikhailova. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **265**, 115756 (2026). DOI: 10.1016/j.colsurfb.2026.115756
- [8] J. Rosenblatt, B. Devereux, D.G. Wallace. *Biomaterials*, **15**, 985 (1994). DOI: 10.1016/0142-9612(94)90079-5
- [9] B.A. Roeder, K. Kokini, J.E. Sturgis, J.P. Robinson, S.L. Voytik-Harbin. *J. Biomech. Eng.*, **124**, 214 (2002). DOI: 10.1115/1.1449904
- [10] F. Gobeaux, G. Mosser, A. Anglo, P. Panine, P. Davidson, M.M. Giraud-Guille, E. Belamie. *J. Mol. Biol.*, **376**, 1509 (2008). DOI: 10.1016/j.jmb.2007.12.047
- [11] F. Elmi, M.M. Elmi, F.N. Amiri. *Food Biophysics*, **12**, 365 (2017). DOI: 10.1007/s11483-017-9492-5
- [12] Y. Nashchekina, P. Nikonov, N. Prasolov, M. Sulatsky, A. Chabina, A. Nashchekin. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 12577 (2022). DOI: 10.3390/ijms232012577
- [13] Y. Nashchekina, A. Chabina, V. Konson, A. Nashchekin, N. Mikhailova. *Int. J. Biol. Macromol.*, **319**, 145418 (2025). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2025.145418
- [14] K. McGuinness, I.J. Khan, V. Nanda. *ACS Nano*, **8** (12), 12514 (2014). DOI: 10.1021/nn505369d
- [15] T.L.N. Jarvinen, P. Kannus. *J. Orthop. Res.*, **22** (6), 1303 (2004). DOI: 10.1016/j.orthres.2004.04.003
- [16] W.J. Znidarsic, I.-W. Chen, V.P. Shastri. *J. Mater. Sci.*, **44**, 1374 (2009). DOI: 10.1007/s10853-008-2998-y
- [17] M. Yan, B. Li, X. Zhao, S. Qin. *Food Hydrocoll.*, **29**, 199 (2012). DOI: 10.1016/j.foodhyd.2012.02.014
- [18] X. Song, Z. Wang, S. Tao, G. Li, J. Zhu. *J. Food Quality*, **2017**, 9257060 (2017). DOI: 10.1155/2017/9257060
- [19] V.K. Yadavalli, D.V. Svintradze, R.M. Pidaparti. *Int. J. Biol. Macromol.*, **46**, 458 (2010). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2010.02.012
- [20] Y. Nashchekina, P. Nikonov, N. Mikhailova, A. Nashchekin. *Polymers (Basel)*, **13**, 1 (2021). DOI: 10.3390/polym13234134
- [21] S. Morozova, M. Muthukumar. *J. Chem. Phys.*, **149**, 163333 (2018). DOI: 10.1063/1.5036526
- [22] B. Brodsky, J.A.M. Ramshaw. *Matrix Biol.*, **15**, 545 (1997). DOI: 10.1016/S0945-053X(97)90030-5
- [23] Y. Li, A. Asadi, M.R. Monroe, E.P. Douglas. *Mater. Sci. Eng. C*, **29**, 1643 (2009). DOI: 10.1016/j.msec.2009.01.001
- [24] A.M. Cortizas, O.L. Costas. *Sci. Rep.*, **10**, 17888 (2020). DOI: 10.1038/s41598-020-74993-y
- [25] Y.A. Nashchekina, A.A. Starostina, N.A. Trusova, M.Y. Sirotkina, A.I. Lihachev, A.V. Nashchekin. *J. Phys. Conf. Ser.*, **1697**, 012053 (2020). DOI: 10.1088/1742-6596/1697/1/012053
- [26] C. Stani, L. Vaccari, E. Mitri, G. Birarda. *Spectrochim. Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **229**, 118006 (2020). DOI: 10.1016/j.saa.2019.118006
- [27] C. Emonts, B. Bauer, Ch. Büchter, Th. Pufe, Th. Gries, M. Tohidnezhad. *Int. J. Mol. Sci.*, **26** (4), 1735 (2025). DOI: 10.3390/ijms26041735
- [28] A.A. Solbu, D. Caballero, S. Damigos, S.C. Kundu, R.L. Reis, Ø. Halaas, A.S. Chahal, B.L. Strand. *Mater. Today Bio*, **18**, 100537 (2023). DOI: 10.1016/j.mtbio.2022.100537
- [29] R.A. Hartvig, M. Van De Weert, J. Østergaard, L. Jorgensen, H. Jensen. *Langmuir*, **27** (6), 2634 (2011). DOI: 10.1021/la104720n
- [30] T. Bewersdorff, J. Vonnemann, A. Kanik, R. Haag, A. Haase. *Int. J. Nanomedicine*, **14** (12), 2001 (2017). DOI: 10.2147/IJN.S124295
- [31] M. Ghasemi, T. Turnbull, S. Sebastian, I. Kempson. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (23), 12827 (2021). DOI: 10.3390/ijms222312827