

14.10

Биологические и реологические свойства коллагена, сшитого глутаровым альдегидом

© Ю.А. Нащекина,^{1,2} О.А. Луконина,¹ Д.М. Дарвиш,¹ А.В. Нащекин,² В.Ю. Елоховский,³ В.Е. Юдин,³ Н.А. Михайлова¹

¹ Институт цитологии РАН,
194064 Санкт-Петербург, Россия

² Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН,
194021 Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
195251 Санкт-Петербург, Россия
e-mail: nashchekina.yu@mail.ru

Поступило в Редакцию 29 января 2020 г.

В окончательной редакции 29 января 2020 г.

Принято к публикации 17 февраля 2020 г.

Изучено влияние концентрации глутарового альдегида, обладающего способностью сшивать молекулы коллагена I типа, на его стабильность, механическую прочность и цитотоксичность. Показано, что в физиологических условиях наибольшей стабильностью обладает коллаген, содержащий 10 и 18% глутарового альдегида. Результаты реологического анализа продемонстрировали, что при минимальной концентрации глутарового альдегида (1%) механические характеристики коллагеновых гидрогелей существенно улучшаются. Однако концентрация глутарового альдегида выше 10% снижает жизнеспособность клеток на 50%.

Ключевые слова: коллаген I типа, глутаровый альдегид, химическая сшивка, деградация.

DOI: 10.21883/JTF.2020.09.49697.33-20

Введение

Коллаген является самым распространенным белком в тканях человека. К настоящему времени известно 28 типов коллагенов [1], различия между которыми обусловлены структурной сборкой основной полипептидной цепи, их локализацией в тканях, выполняемыми функциями и т.д. Самым распространенным белком в организме является коллаген I типа, который образует более 90% органической массы кости и является основным компонентом сухожилий, кожи, связок, роговицы и многих межсуставных соединительных тканей, за исключением гиалинового хряща, мозга и стекловидного тела глаза. Основная функция коллагена в организме — поддержание структурной целостности тканей и органов.

Для эффективного лечения патологий и восстановления поврежденных тканей и органов используют современные технологии, среди которых важное место занимают клеточные, основанные на трансплантации клеток человека на разнообразных носителях (скаффолдах) [2]. Формирование таких носителей на базе основного структурного элемента соединительной ткани, а именно коллагена I типа, представляется перспективным. В процессе биосинтеза коллагена *in vivo* между молекулами образуются поперечные связи, придающие фибриллам коллагена стабильную структуру, механическую прочность и устойчивость к действию ферментов. Однако в процессе выделения коллагена из нативных тканей эти связи разрушаются, и он теряет свою прочность. Разрубка механически прочного геля методом сшивания

коллагена, предназначенного для создания скаффолдов, культивирования и трансплантации клеток, является одной из актуальных задач современной регенеративной медицины.

В настоящее время для сшивания коллагена используют физические и химические агенты. Одним из химических агентов, формирующих прочные межмолекулярные сшивки, является глутаровый альдегид (ГА), являющийся линейным 5-углеродным диальдегидом. ГА широко применяется в качестве сшивающего агента для биомедицинских материалов на основе коллагена [3,4]. Механизм сшивания молекул коллагена с помощью ГА (рис. 1) заключается в реакции первичных остатков аминокислот (гидроксил)-лизина в молекуле коллагена

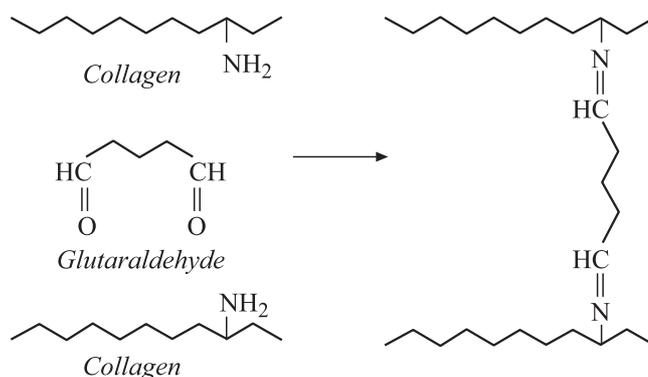


Рис. 1. Механизм реакции сшивания молекул коллагена с помощью ГА [6].

с образованием промежуточных оснований Шиффа, которые затем превращаются в стабильные и сложные поперечные связи. Обычно 6–8 молекул ГА участвуют в одной сшивке „лизин-лизин“ [5].

Несмотря на широкое использование ГА в медицинских продуктах, публикуются данные о его цитотоксичности [3,6–8] и способности инициировать неспецифическую кальцификацию тканей [7,8].

1. Экспериментальная часть

1.1. Материалы

1.1.1. Выделение коллагена I типа

Коллаген I типа был выделен по модифицированный методике [11] из сухожилий крысиных хвостов, предварительно промытых физиологическим раствором (0.9% раствор NaCl). Коллаген I типа экстрагировали 0.5 М уксусной кислотой, после растворения его осаждали сухой солью NaCl (0.9 М раствор). Для отделения коллагена от соли раствор диализовали сначала в растворе уксусной кислоты, увеличивая последовательно концентрацию кислоты от 0.1 до 0.5 М. После растворения коллаген осаждали в фосфатном буфере. На последнем этапе проводили диализ против раствора уксусной кислоты (с добавлением хлороформа для стерилизации), постепенно уменьшая ее концентрацию до 1 : 1000.

1.1.2. Химическая сшивка раствора коллагена I типа с помощью ГА

Образцы коллагена с концентрациями 1, 2 и 3 mg/ml были получены путем разбавления коллагена с концентрацией 5.9 mg/ml 0.1 М раствором уксусной кислоты (НеваРеактив, РФ). Сшивание осуществляли добавлением к раствору коллагена раствор сшивающего агента с конечной концентрации ГА 1, 5, 10 и 18 mass.% (концентрацию ГА рассчитывали по отношению к массе сухого белка). После взаимодействия с ГА раствор коллагена переходил в гелеобразное состояние. Полученный субстрат несколько раз промывали фосфатным буфером.

Для оценки механических свойств были сформированы гели с концентрацией коллагена 2 mg/ml. Для этого в состав раствора коллагена I типа для подведения физиологической ионной силы была введена среда 199 (10 кратная) (Gibco, США), а для подведения pH — раствор NaOH в соответствующих пропорциях. Разбавление раствора до конечной концентрации осуществляли добавлением фосфатного буфера. Полученные гели выдерживали в растворе ГА с концентрацией 1, 5, 10 и 18 %. По истечении 1 суток гели промывали в фосфатном буфере и проводили механические испытания.

1.2. Методы исследования

1.2.1. Оценка деградации коллагена

Для оценки деградации коллагена в физиологических условиях использовали модифицированный метод Лоури [12]. Метод основан на реакции белков с солями меди (II) в щелочном растворе и восстановлении фосфорно-молибдено-вольфрамового реактива (реактив Фолина) с образованием окрашенных в голубой цвет продуктов.

Для изучения процесса деградации к сшитому коллагену добавляли раствор фосфатного буфера (PBS) и оставляли эту смесь в термостате при температуре 37°C. Оценку деградации проводили по истечении 1.4 и 7 суток, анализируя содержание белка в растворе PBS методом Лоури. По оптической плотности растворов, измеренной при длине волны 650 nm, определяли количество белка, вышедшего в раствор PBS. Процент деградации вычисляли по формуле

$$\frac{A}{B} \cdot 100\% = C,$$

где A — количество белка, вышедшего в раствор PBS, [mg]; B — общее количество белка в растворе коллагена, [mg]; C — процент деградации, [%].

1.2.2. Реологические испытания

Реологические испытания проводили в реометре MCR301 (Anton Paar, Австрия) в измерительном узле плоскость–плоскость PP20 (диаметр 25 mm, зазор 1 mm, DIN 53018-1) при температуре 25°C в динамическом (частотном) режиме со снижением частоты от 20 до 0.02 Hz (5 точек на логарифмическую декаду). Время тестирования на каждой точке определялось реометром.

1.2.3. Культивирование мезенхимных стволовых клеток человека

В настоящей работе использовали нетрансформированную клеточную линию FetMSC из Коллекции культур клеток позвоночных (Институт цитологии РАН). Культивирование клеточной линии осуществляли в асептических условиях при постоянных значениях температуры 37°C, влажности 98%, содержания CO_2 5%.

Для культивирования FetMSC использовали DMEM/F12 (Росмедбио, РФ) с добавлением 10% сыворотки эмбрионов коров (СЭК) (HyClone, США), 1% антибиотика Penicillin-Streptomycin (Gibco, США) и 1% глутамина (Lonza, Швейцария).

Для снятия клеток с поверхности культурального сосуда проводили их обработку протеолитическими ферментами — Трипсин (0.25%) ЭДТА (Sigma-Aldrich, США). Ферменты дезактивировали путем добавления среды с сывороткой, перемешивания и центрифугирования при скорости вращения 1000 rpm в течение 3 min. Затем супернатант сливали, к клеткам добавляли

питательную среду DMEM F12 с добавлением 10% бычьей сыворотки, 1% глутамина и 1% антибиотика, хорошо перемешивали и считали количество клеток в камере Горяева.

1.2.4. Оптическая микроскопия

В процессе культивирования клеток проводили наблюдение с фотофиксацией с помощью инвертированного микроскопа EclipseTS100 (Nikon, Япония), оснащенного фотокамерой.

1.2.5. Оценка жизнеспособности FetMSC с помощью МТТ-теста

Метод основан на способности живых клеток восстанавливать желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) (Sigma-Aldrich, США) с образованием пурпурно-синих кристаллов формазана, растворимых в ДМСО (Биолот, РФ). После 4 суток культивирования к клеткам добавляли стоковый раствор МТТ с концентрацией 5 mg/ml в среде α -MEM и выдерживали в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 3 h до появления пурпурно-синих кристаллов формазана. Аккуратно отбирали среду, добавляли 50 μ l ДМСО. Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре АИФР-01/УНИПЛАН (Пикон, РФ) при длине волны 570 nm.

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Оценка скорости деградации коллагена I типа разной концентрации

Первоначально необходимо было оценить влияние различных концентраций коллагена (1,2,3 mg/ml) в присутствии 1% ГА на скорость деградации. В качестве контролей были выбраны растворы коллагена I типа соответствующих концентраций без сшивающего агента.

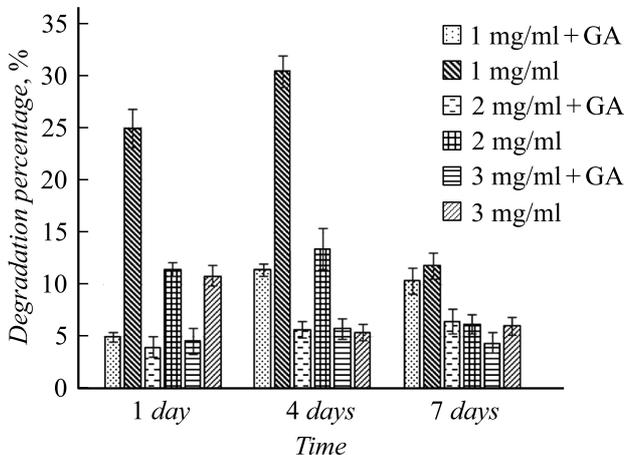


Рис. 2. Влияние концентрации коллагена и ГА на скорость деградации.

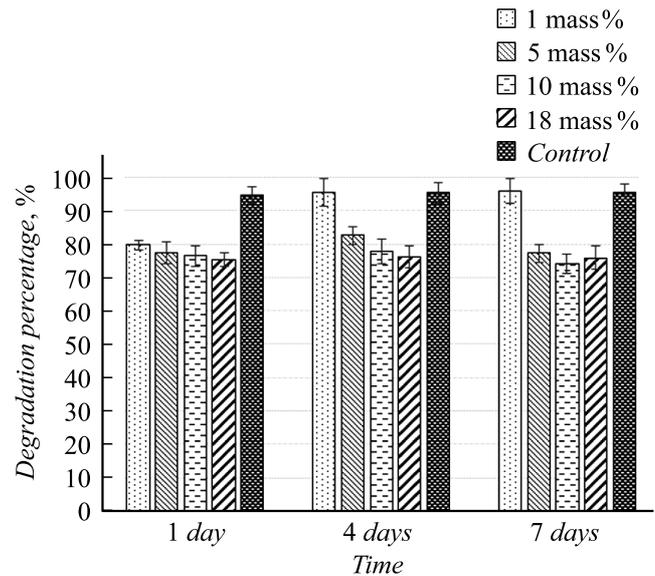


Рис. 3. Влияние концентрации ГА на скорость деградации раствора коллагена I типа.

Деградация раствора коллагена со сшивающим агентом происходит в 2–2.5 раза медленнее по сравнению с контролем (рис. 2). Показано, что в течение первых суток эксперимента количество коллагена, вышедшего в раствор PBS в присутствии ГА, не зависит от концентрации коллагена. Однако на 4 и 7 сутки процент деградации становится ниже в 2 раза для раствора коллагена с концентрациями 2 и 3 mg/ml. На 7 сутки наблюдали резкое снижение скорости деградации.

Скорость деградации коллагена без добавления сшивающего агента уменьшается с увеличением концентрации белка. Коллаген с концентрацией 3 mg/ml сшивается хуже по сравнению с коллагеновыми образцами с концентрацией 1 и 2 mg/ml, о чем свидетельствует разница в процентах деградации, а коллаген с концентрацией 1 mg/ml при сшивании деградирует сильнее, в дальнейшем все исследования проводили на основе коллагена с концентрацией 2 mg/ml.

2.2. Оценка скорости деградации коллагена I типа с добавлением разного количества ГА

На рис. 3 показано влияние различных массовых концентраций ГА на скорость деградации раствора коллагена с концентрацией 2 mg/ml. Контрольный образец сравнения — аналогичный коллаген без добавления сшивающего агента.

Минимальная скорость деградации раствора коллагена достигается при добавлении сшивающего агента в количестве 10 и 18% (рис. 3). По сравнению с контролем в первые сутки наблюдали уменьшение деградации уже при добавлении ГА в количестве 1%. Степень деградации для коллагена с концентрацией ГА 5, 10 и 18% остается

постоянной на протяжении всего времени деградации, тогда как коллаген с добавлением 1% ГА со временем деградирует быстрее и приближается по значению к контрольному образцу.

2.2.1. Реологический анализ

На рис. 4 и 5 представлены зависимости модулей сдвига (G') и потерь (G'') при сдвиге исходного и сшитого коллагенового геля в зависимости от концентрации ГА. Для каждого образца гидрогеля коллагена G'' является почти постоянной величиной, в то время как G' незначительно изменяется в пределах измеренных частот, что указывает на механическую стабильность исследуемых гидрогелей в диапазоне частот от 0.01 до 10 Hz. Значения G' и G'' увеличиваются с увеличением концентрации ГА, что свидетельствует о том, что сшитые гидрогели коллагена более устойчивы к

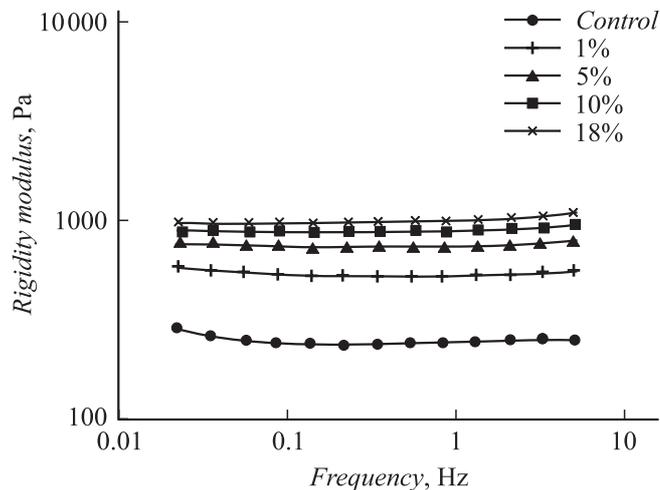


Рис. 4. Зависимость G' сшитого коллагенового геля от концентрации ГА.

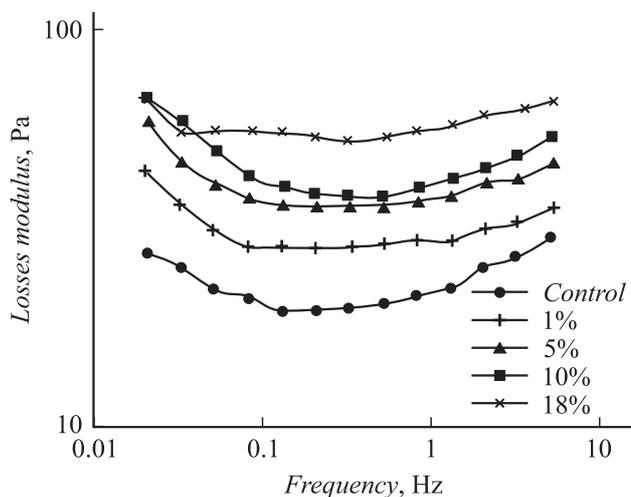


Рис. 5. Зависимость G'' сшитого коллагенового геля от концентрации ГА.

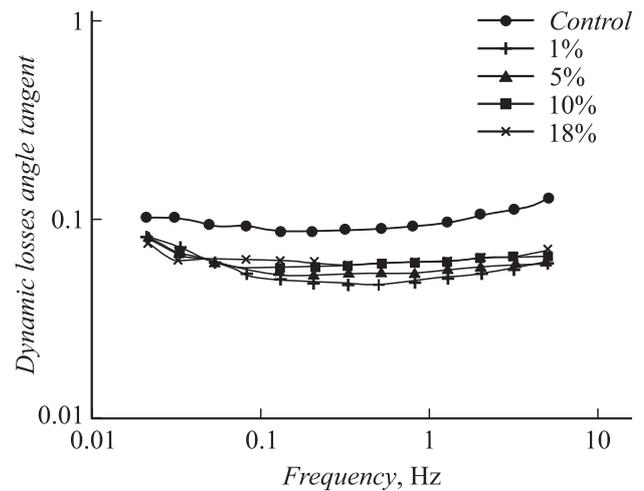


Рис. 6. Зависимость $\text{tg } \delta$ сшитого коллагенового геля от концентрации ГА.

деформации текучести, чем нативный коллагеновый гидрогель. А именно чем выше степень сшивки, тем лучше устойчивость к внешним силам. Полученные результаты демонстрируют, что модули сдвига и потерь в несколько раз больше, чем у природного гидрогеля коллагена.

Тангенс угла динамических потерь ($\text{tg } \delta$) определяется как отношение G'' к G' , и поэтому значение $\text{tg } \delta > 1$ свидетельствует о том, что для исследуемого образца доминирующим в данном диапазоне температур и частот является вязкое поведение, подобное жидкости. При значениях $\text{tg } \delta < 1$ для материала образца характерно в большей степени упругое или „твердоподобное“ поведение [13]. На рис. 6 показаны кривые $\text{tg } \delta$ нативного и сшитых гидрогелей на основе коллагена. Значения $\text{tg } \delta \leq 0.14$ означают, что все гидрогели обладают значимой упругостью и, более того, значение $\text{tg } \delta$ гидрогеля коллагена уменьшается от 0.14 до 0.07 с увеличением дозы ГА, подтверждая, что сшитые гидрогели коллагена демонстрируют в большей степени упругое поведение.

2.3. Морфологический анализ FetMSC при инкубировании на коллагене, сшитом ГА

В качестве контроля для всех образцов использовались FetMSC, культивируемые на лабораторном пластике.

Изучение морфологии клеточной линии FetMSC, культивируемых на коллагене (рис. 7) в присутствии ГА, с помощью световой микроскопии показало явное цитотоксическое влияние альдегида на клетки. Морфология и степень расплывчатости клеток отличались от клеток, культивируемых на пластике и на коллагене без ГА. В случае присутствия ГА в больших концентрациях клетки принимали округлую форму, при низкой концентрации ГА форма клеток и степень их расплывчатости не отличалась от контрольного образца.

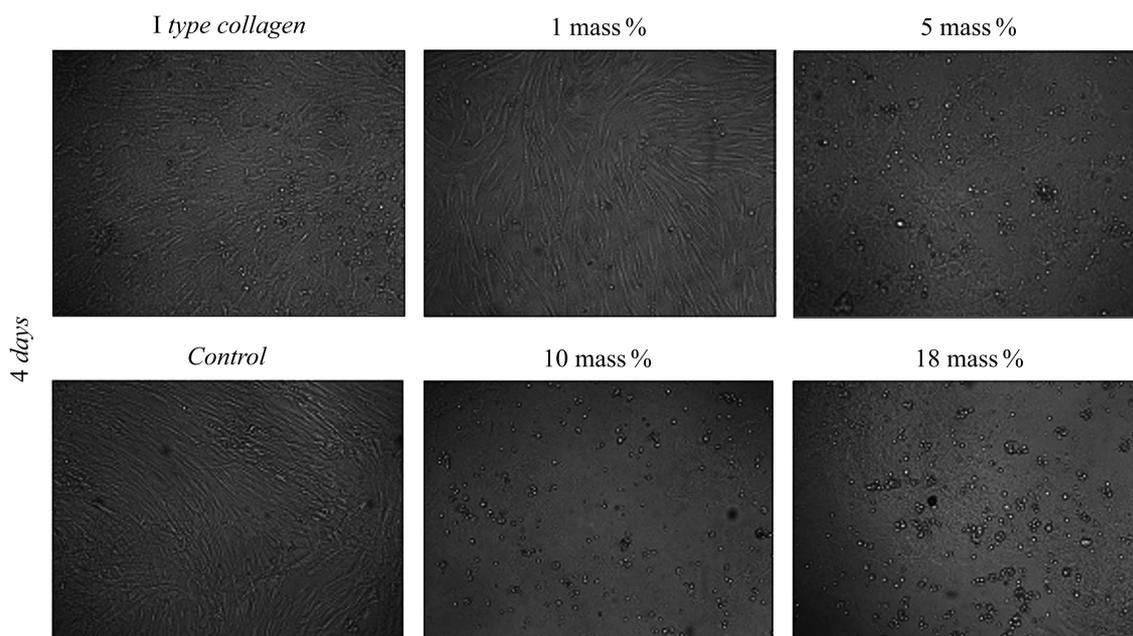


Рис. 7. Оптическая микроскопия FetMSC человека на растворе коллагена I типа в присутствии ГА (увеличение 10×).

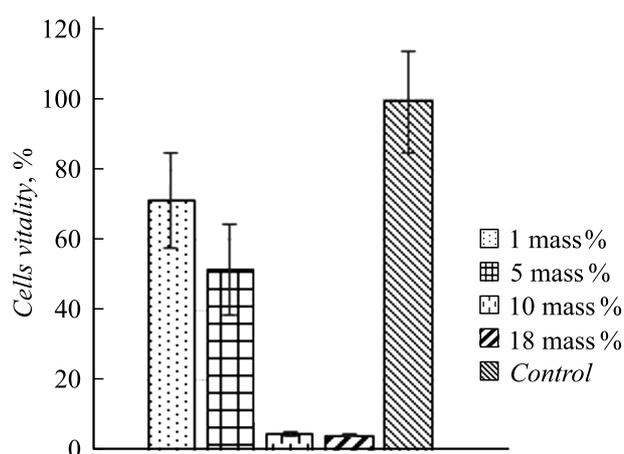


Рис. 8. Жизнеспособность FetMSC после инкубирования на коллагене в присутствии ГА после 4 суток культивирования.

2.4. Определение жизнеспособности FetMSC при росте на коллагене, сшитом ГА

В качестве контроля для оценки жизнеспособности FetMSC использовали раствор коллагена I типа с конечной концентрацией белка 2 mg/ml. На рис. 8 представлена гистограмма, отражающая влияние различных концентраций ГА на жизнеспособность FetMSC. Данные МТТ анализа подтверждают результаты оптической микроскопии. Жизнеспособность клеток в присутствии ГА ниже, чем в контроле, и увеличение концентрации ГА уменьшает жизнеспособность FetMSC.

Результаты свидетельствуют о цитотоксичности ГА, что согласуется с литературными данными [3,6–8].

Заключение

В результате проведенных исследований было показано, что присутствие ГА в растворе коллагена, выделенного методом кислотной экстракции, способствует уменьшению скорости деградации белка в физиологических условиях. Следует отметить, что чем выше концентрация ГА, тем меньше скорость его деградации и выше стабильность при динамических нагрузках. Однако увеличение концентрации ГА в коллагене существенно снижает жизнеспособность клеток. Оптимальной концентрацией ГА для стабилизации коллагена являются значения в пределах от 1 до 5% ГА.

Финансирование работы

Работа по приготовлению коллагеновых образцов и биологические испытания выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-03-00400_a). Работа по механическим испытаниям выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект 19-73-30003).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Sandhu S.V., Gupta S., Bansal H., Singla K. // J. Orol. Res. 2012. Vol. 2. N 3. P. 153–159.
- [2] Нащекина Ю.А., Юдинцева Н.М., Никонов П.О., Иванова Е.А., Смагина Л.В., Воронкина И.В. // Кл. техн. биол. мед. 2017. № 1. С 12–18.

- [3] Scheffel D.L.S., Soares D.G., Basso F.G., de Souza Costa C.A., Pashley D., Hebling J. // *J. Dent.* 2015. Vol. 43. N 8. P. 997–1006. DOI: 10.1016/j.jdent.2015.05.004
- [4] Peng Y.Y., Glattauer V., Ramshaw J.A.M. // *Int. J. Biom.* 2017. N 1. P. 1–6. DOI: 10.1155/2017/8947823
- [5] Chandran P.L., Paik D.C., Holmes J.W. // *Conn. Tiss. Res.* 2012. Vol. 53. N 4. P. 285–297. DOI: 10.3109/03008207.2011.640760
- [6] Lee C., Grodzinsky A., Spector M. // *Biom.* 2001. Vol. 22. N 23. P. 3145–3154.
- [7] Umashankar P., Kumari T., Mohanan P. // *Tox. Int.* 2012. Vol. 19. N 1. P. 51–58. DOI: 10.4103/0971-6580.94513.
- [8] Gough J.E., Scotchford C.A., Downes S. // *J. Biom. Mat. Res.* 2002. Vol. 61. N 1. P. 121–130. DOI: 10.1002/jbm.10145
- [9] Sheu M.T., Huang J.C., Yeh G.C., Ho H.O. // *Biom.* 2001. Vol. 22. N 13. P. 1713–1719. DOI: 10.1016/s0142-9612(00)00315-x
- [10] Lai J.Y., Ma H.K. // *Int. J. Nan.* 2013. N 8. P. 4157–4168. DOI: 10.2147/IJN.S52731
- [11] Chandrakasan G., Torchia D.A., Piez K.A.J. // *Biol. Chem.* 1967. Vol. 251. P. 6062–6067.
- [12] Дарбре А. Практическая химия белка. М.: Мир, 1989. 623 с.
- [13] Tian Z., Liu W., Li G. // *Pol. Degr. Stab.* 2016. Vol. 130. P. 264–270. [http:// dx.doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.06.015](http://dx.doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.06.015)