

Структура и стабильность композитных гелей на основе коллагена и карбоксиметилцеллюлозы

© Ю.А. Нащекина,^{1,2} В.А. Консон,¹ М.Ю. Сироткина,¹ А.В. Нащекин²

¹ Институт цитологии РАН,
194064 Санкт-Петербург, Россия

² Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе,
194021 Санкт-Петербург, Россия
e-mail: nashchekina.yu@mail.ru

Поступило в Редакцию 31 августа 2022 г.

В окончательной редакции 5 октября 2022 г.

Принято к публикации 6 октября 2022 г.

Исследованы структурные свойства и стабильность биосовместимых гелей на основе коллагена I типа. Для улучшения механических свойств в коллагеновый гель добавляли 10–30% карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ). Показано, что с увеличением содержания КМЦ до 30% увеличивается стабильность композитных гелей. Методом сканирующей электронной микроскопии установлено, что способность коллагена формировать нативные фибриллы при добавлении КМЦ снижается. Методом электрофореза показано, что присутствие КМЦ увеличивает скорость ферментативной деградации композитного коллагенового геля.

Ключевые слова: коллаген I типа, карбоксиметилцеллюлоза, композитные коллагеновые гели, деградация.

DOI: 10.21883/JTF.2022.12.53764.221-22

Введение

Внеклеточный матрикс (ВКМ) формирует микроокружение клеток и участвует в регуляции их жизнедеятельности [1]. В зависимости от типа ткани (органа), ВКМ придает тканям определенные механические и биохимические свойства, оказывает влияние на физиологию клеток [2]. Поведение и развитие клеток определяются рядом свойств ВКМ, описанных ниже.

При культивировании клеток в геле, они распределяются по его объему, изменяя его механические свойства, при этом происходит гидролиз, растворение и ферментативная деградация всего материала [3]. Скорость последней зависит от количества доступных сайтов расщепления в полимере и от степени ферментативной нагрузки [4]. Понимание темпов деградации необходимо, когда требуется своевременное и контролируемое высвобождение биологически активных молекул из матрицы, например, для адресной доставки лекарственных препаратов. Важность деградации обусловлена использованием матриц в качестве носителя для трансплантируемых клеток. В этом случае скорость регенерации увеличивается, поскольку разрушение гидрогеля стимулирует васкуляризацию и слияние донорских клеток с тканями хозяина [5]. Однако при этом особенно важно, чтобы продукты разложения матрицы не были токсичны.

Гидрогели по источнику происхождения можно разделить на природные и синтетические. К природным относятся белки и полисахариды [3]. Этим полимерам свойственна хорошая биосовместимость, биоактивность и низкая токсичность [3,6]. Тем не менее, поскольку их получают из естественных источников, сложно

поддерживать стабильность характеристик в различных партиях поставляемых материалов, что негативно сказывается на воспроизводимости результатов экспериментов. В литературе есть данные о слишком быстрой деградации или деформировании матриц на основе подобных материалов [6], а также сложностях с контролем характеристик геля (например, жесткость и пористость) и точным определением молекулярной структуры геля.

Коллаген — структурный белок, являющийся основным компонентом соединительной ткани [7]. На сегодняшний день известно до 30 различных типов этого белка, структурно все они состоят из правозакрученной тройной спирали из трех полипептидных цепей [2]. I тип коллагена — самый распространенный и хорошо изученный, широко представлен в костях, дерме, связках и сухожилиях, а также в роговице глаза [8].

Показано, что коллагеновый гель способствует пролиферации, миграции, а также остеогенной дифференцировке мезенхимальных стволовых клеток (МСК), обеспечивая высокий уровень выживаемости клеток [9]. Поскольку это естественный компонент ВКМ, он биологически активен, не токсичен и способен к биодеградации [8]. Кроме того, коллаген обладает относительно низкой иммуногенностью, что позволяет использовать гель на его основе в регенеративной медицине.

Недостатками коллагеновых гелей считаются низкие механические свойства и достаточно слабая устойчивость к ферментативному разложению. Клетки во время культивирования в гелях синтезируют собственные белки ВКМ, что способствует контракции коллагеновой матрицы. Было выявлено, что наиболее значительный вклад в это вносит секреция фибронектина [10].

С целью улучшения механических свойств коллагеновый гель можно модифицировать. Самым распространенным способом является формирование сшивков (внутри- и межмолекулярных связей) физическими методами (УФ излучение, нагревание до высокой температуры) или с помощью химических агентов (глутарового альдегида, формальдегида) [11]. Однако такие методы зачастую разрушительны или токсичны для клеток и пригодны для того, чтобы сначала получить трехмерный скаффолд и лишь потом заселять его клетками.

В случае, если клетки возможно сначала распределить по субстрату и затем запустить процесс образования геля, систему можно использовать в виде инъекций [12]. Такой подход ограничивает использование разнообразных материалов и их модификаций, но позволяет обеспечить более плотный контакт между трансплантируемым материалом и тканями реципиента, ускоряя и облегчая заживление. Метод также позволяет более равномерно распределить клетки по объему геля [13]. Эти факторы положительно сказываются на воспроизводимости результатов, в частности, при использовании полученной трехмерной системы как платформы для тестирования лекарств.

Кроме того, целесообразным способом улучшения механических свойств коллагенового геля может стать добавление других полимеров, в частности, карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), которая уже зарекомендовала себя как нетоксичный и недорогой материал, усиливающий стабильность композитных структур.

Е. Abdolahinia с соавторами [14] с помощью компьютерного моделирования продемонстрировали, что КМЦ взаимодействует с аминокислотными остатками коллагена. При взаимодействии полимеров образуются преимущественно водородные и ван-дер-ваальсовы связи.

М. Zhang с соавторами [15] установили, что наиболее сильное взаимодействие между полимерами в растворе происходит при соотношении масс сухого вещества КМЦ и сукцинированного коллагена 1:1. Молекулы КМЦ имеют в составе группы $-\text{COOH}$, $-\text{COONa}$ и исходные (незамещенные) гидроксильные группы целлюлозы. Коллаген при этом по большей части имеет карбоксильные группы и в меньшей степени гидроксильные. Было показано, что на преобладание тех или других типов взаимодействий оказывает влияние соотношение масс полимеров в растворе. Так, при содержании КМЦ не более 50% в смеси преобладают водородные связи, что благоприятно сказывается на смешивании полимеров и стабильности полученной смеси. При доле КМЦ более 70% основным становится электростатическое отталкивание. Таким образом, исследование М. Zhang может быть полезно для предварительного подбора соотношений КМЦ и коллагена для получения наиболее стабильных гелевых композиций.

С. Ding с соавторами [16] выявили, что КМЦ снижает скорость образования фибрилл коллагена *in vitro*, при этом диаметр самих фибрилл уменьшается. Кроме

того, добавление полисахарида улучшает термическую стабильность коллагеновых гелей.

Известны разработки двухслойных скаффолдов на основе коллагена и КМЦ, предназначенные для реконструкции тканей кожи [16], а также для предотвращения спаечных процессов после операций на органах брюшной полости [17]. КМЦ при этом является слоем, препятствующим адгезии клеток. Целью настоящей работы является исследование структурных свойств композитных коллагеновых гелей и их стабильности в условиях *in vitro*.

1. Экспериментальная часть

1.1. Материалы. Формирование гелей

Коллаген I типа (получен в Центре клеточных технологий в Институте цитологии РАН методом кислотной экстракции) доводили до концентрации 2 mg/ml в конечном объеме. Коллаген смешивали с 1% (w/v) раствором КМЦ в буферном растворе (phosphate buffered saline, PBS) (10, 20, 30% от конечного объема геля, в контрольные образцы КМЦ не добавляли). Затем добавляли 10X 199 среду в количестве 10% от конечного объема. В полученную смесь добавляли 4M водный раствор NaOH до изменения окраски с желтой на розовую, свидетельствующую о переходе из кислой среды в нейтрально-слабощелочную. Раствор доводили с помощью PBS до конечного объема.

После добавления каждого компонента смесь хорошо перемешивали на вортексе (Biosan, Латвия), а манипуляции проводили на льду во избежание преждевременного гелеобразования. Смесь добавляли в равном объеме в лунки планшета и инкубировали 15 min при 37°C для образования геля, после чего образцы заливали PBS.

При приготовлении гелей для культивирования в них fetMSC добавляли суспензию так, чтобы количество клеток составило $25 \cdot 10^4$ в 1 ml геля, и перемешивали с помощью автоматического дозатора. До конечного объема смесь доводили средой DMEM/F-12.

1.2. Методы исследования

1.2.1. Оценка гидролитической деградации гелей

Степень деградации матриц оценивали с помощью количественного определения выхода коллагена из гелей по методу Лоури–Хартри [18]. Готовили гели согласно приведенной выше методике в 24-луночном планшете в объеме 300 μ l на лунку. Скаффолды инкубировали в PBS (1 μ l на лунку) при 37°C в течение 1, 7 и 21 суток. Во избежание испарения жидкости лунки запечатывали пленкой Parafilm (Bemis, США), планшет дополнительно оборачивали пищевой пленкой.

По окончании инкубации отбирали по 500 μl жидкости с каждой лунки и переносили в микроцентрифужные пробирки, центрифугировали 10 min при 10 000 rpm. Отбирали по 300 μl надосадочной жидкости в стеклянные пробирки, добавляли по 700 μl PBS. В качестве контроля использовали 1000 μl PBS. Затем добавляли по 900 μl реагента А, который содержит тартрат натрия-калия, карбонат натрия и NaOH. Содержимое пробирок перемешивали на вортексе, после чего нагревали в течение 10 min при 37°C на водяной бане. Далее в пробирки добавляли по 100 μl реагента В, содержащего тартрат натрия-калия, сульфат меди (I) и NaOH. Снова перемешивали растворы на вортексе и инкубировали в течение 10 min при комнатной температуре. Затем в каждую пробирку добавляли по 3 ml реагента С, содержащего реактив Фолина и воду в соотношении 1:15. Перемешивали, нагревали в течение 10 min при 37°C на водяной бане.

Измерение оптической плотности проводили в кварцевых кюветах на спектрофотометре ПЭ-5400 УФ (Экротех, Россия) при длине волны $\lambda = 650 \text{ nm}$. Массу белка находили по уравнению для калибровочной кривой, полученной ранее в лаборатории:

$$D = 0.002x + 0.003367,$$

где x — масса коллагена в μg , D — оптическая плотность.

Далее находили процент выхода белка по формуле

$$\text{Protein desorption} = \frac{m_{\text{measured}}}{m_{\text{initial}}} \cdot 100\%.$$

По результатам анализа строили график зависимости растворения коллагена от количества КМЦ в геле на разных сроках инкубирования.

1.2.2. Исследование морфологии поверхности матриц

Готовили гели, согласно приведенной выше методике, путем нанесения на покровные стекла. Затем образцы дважды промывали от PBS в деионизированной воде и высушивали на воздухе. Изображения морфологии поверхности матриц получали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-7001F (Jeol, Япония) в режиме вторичных электронов при ускоряющем напряжении 5 keV и токе пучка 10 pA. Предварительно на образцы методом магнетронного распыления на установке Emitech K950 (UK) наносили слой золота толщиной 20 nm.

1.2.3. Устойчивость коллагена в матрицах к ферментативному расщеплению

К исследуемым образцам гелей добавляли коллагеназу I типа, растворенную в буфере TESCA (содержит кальций, необходимый для работы фермента), из расчета 12 U на 1 mg коллагена, к контрольным — только буфер. Инкубировали на термощейкере в течение 1 h

при температуре 37°C. Далее раствор переносили в микроцентрифужные пробирки, центрифугировали в течение 10 min при 10 000 rpm. Надосадочную жидкость аккуратно отбирали, к осадку добавляли по 80 μl буфера для нанесения проб. Затем пробы нагревали в течение 5 min при 99°C.

Электрофорез проводили в 7.5% полиакриламидном геле, нанося по 10 μl пробы в карман. После завершения процесса гель окрашивали красителем Кумасси в течение 30 min и отмывали в горячей воде с добавлением ледяной уксусной кислоты до отчетливого проявления белковых полос.

1.2.4. Статистическая обработка результатов

Расчеты проводили в программах Microsoft Excel и GraphPad Prism. Для сравнения выборок использовали однофакторный (one-way) и двухфакторный (two-way) дисперсионный анализ (ANOVA).

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Оценка гидролитической деградации гелей

Поскольку клетки культивируют в жидкой питательной среде, коллагеновые матрицы подвержены гидролитической деградации. Стабильность — важная характеристика матриц, так как зачастую необходимо знать, с какой скоростью из них высвобождаются определенные вещества. В связи с этим была проведена оценка деградации гелей в фосфатном буфере при 37°C (для имитации физиологических условий) на трех сроках инкубирования (1, 7 и 21 суток).

Выход коллагена из гелей определяли количественно по методу Лоури–Хартри. Принцип метода состоит в том, что ионы меди образуют с пептидными связями комплексы, которые взаимодействуют с реактивом Фолина, образуя окрашенный продукт реакции [18]. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации белка и измеряется спектрофотометрическим методом. На рис. 1 представлены результаты исследования. Видно, что существует тенденция к уменьшению

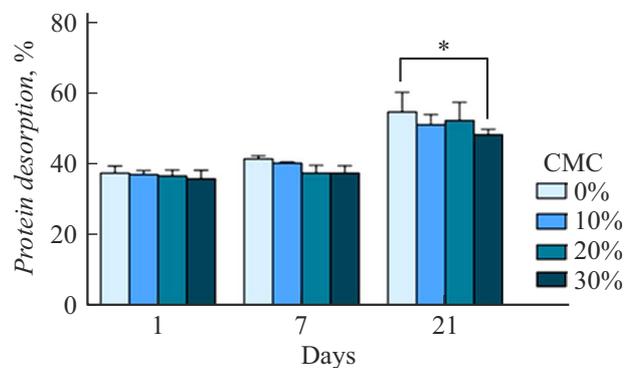


Рис. 1. Зависимость процента выхода коллагена из геля от количества КМЦ (СМЦ) в матрице на трех сроках инкубирования (two-way ANOVA, критерий Тьюки: $p < 0.05$).

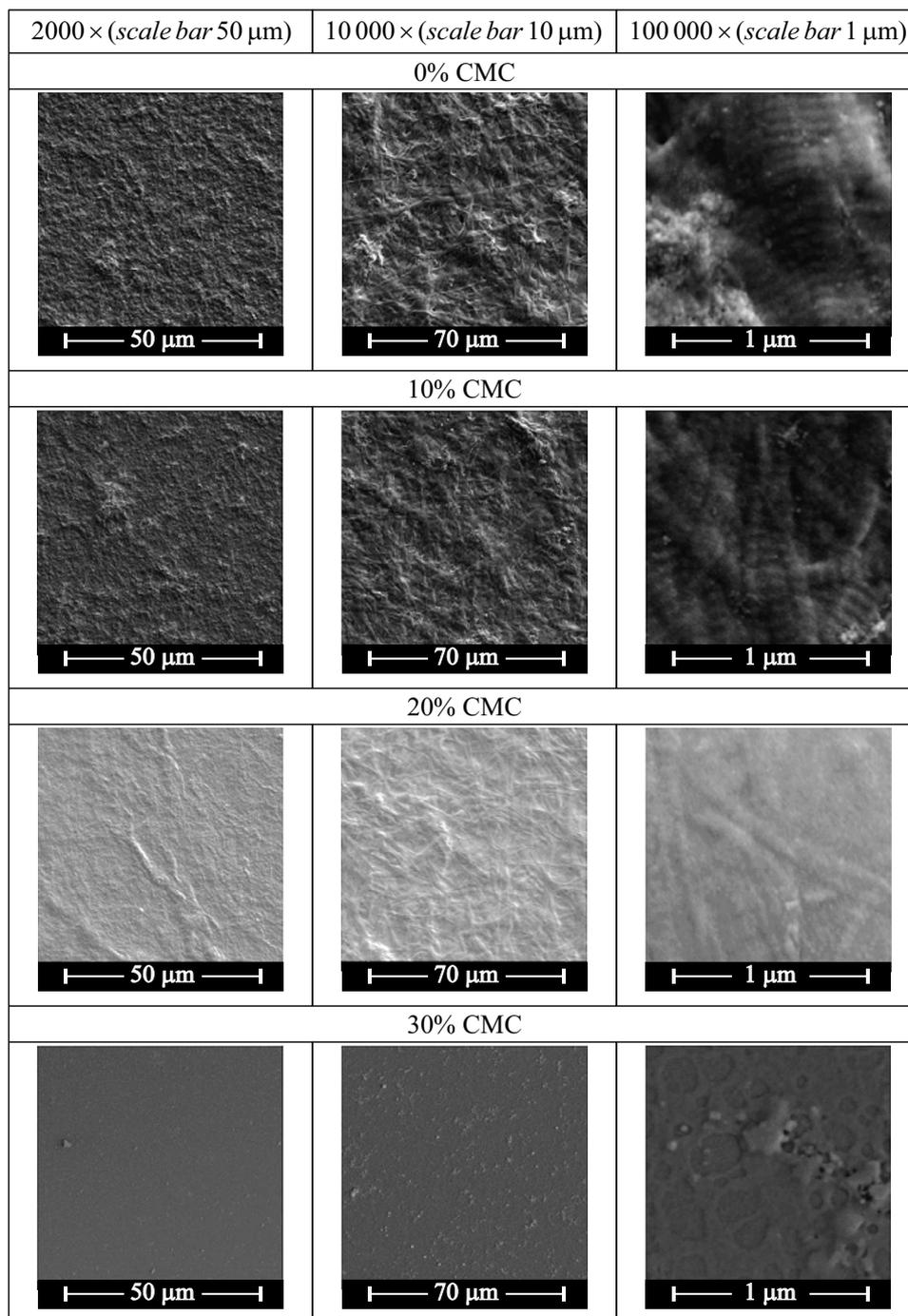


Рис. 2. СЭМ-изображения поверхностей матриц с различными количествами КМЦ (СМС) при разных увеличениях.

процента выхода белка с увеличением содержания КМЦ в геле. Но статистически значимые ($p < 0.05$) отличия получили через 21 сутки инкубирования в фосфатном буфере для геля с 30% содержанием КМЦ по сравнению с чистым коллагеновым гелем. Однако этот эффект выражен слабо, и по результатам можно утверждать, что добавление в коллагеновый гель КМЦ не влияет на скорость деградации композитного геля.

Подобное увеличение стабильности можно объяснить образованием комплексов между молекулами коллагена

и КМЦ. Основываясь на результатах исследований Е. Abdolahinia и М. Zhang с соавторами [14,15], между этими полимерами возникают электростатические, водородные и ван-дер-ваальсовы связи.

2.2. Исследование поверхности матриц методом СЭМ

На рис. 2 представлены изображения поверхности гелей при трех увеличениях. Видно, что в гелях из чи-

стого коллагена образуются крупные фибриллы с ярко-выраженной нативной структурой. По мере добавления КМЦ количество фибрилл и их диаметр уменьшаются, исчезает нативность. В гелях с содержанием КМЦ 30% фибриллы не образуются.

Полученные данные можно объяснить образованием комплексов между коллагеном и КМЦ. Взаимодействие полимеров (в частности, образование водородных связей) препятствует сборке фибрилл, нарушая естественную структуру белка. Ранее в исследовании С. Ding с соавторами [15] было показано, что КМЦ снижает скорость образования коллагеновых фибрилл и приводит к уменьшению их диаметра.

2.3. Устойчивость коллагена в матрицах к ферментативному расщеплению

Кроме гидролитической деградации, коллагеновый гель также подвержен ферментативной деградации под действием протеаз. Клетки способны секретировать коллагеназы, расщепляющие коллаген, изменяя таким образом свое микроокружение [19]. Коллагеназы фрагментируют белок, а небольшие фрагменты диффундируют затем в окружающую жидкую среду. Устойчивость к такому виду деградации — еще один показатель стабильности гелей.

Чтобы понять, влияет ли добавление КМЦ на устойчивость коллагена к ферментативному расщеплению, гели инкубировали в буфере TESCA с добавлением коллагеназы. Затем гели вместе с раствором центрифугировали и анализировали осадок с помощью электрофореза.

По результатам анализа получили электрофореграмму, типичную для коллагена I типа: полосы, соответствующие α -цепям и их димерам (β). При обработке коллагеназой с увеличением содержания КМЦ происходит истончение белковых полос, т.е. количество коллагена в геле уменьшается (рис. 3). По мере деградации коллагена небольшие фрагменты белка выходят из геля и после центрифугирования остаются в супернатанте. Чем активнее происходит деградация, тем меньше белка обнаруживается в исследуемом осадке.

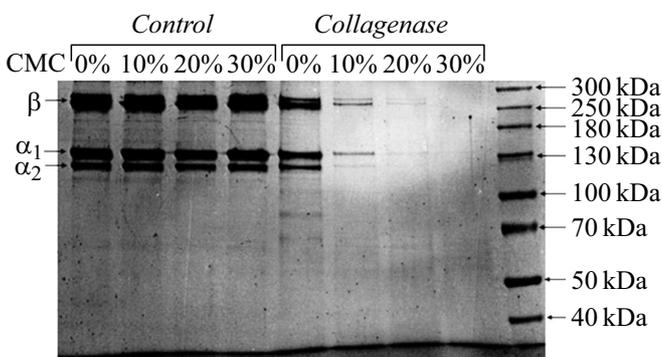


Рис. 3. Электрофореграмма матриц. Крайняя дорожка справа соответствует белковому маркеру, содержащему компоненты с определенной молекулярной массой (kDa).

Полученные результаты согласуются с приведенными выше. КМЦ препятствует образованию фибрилл коллагена, в результате чего упаковка белка становится менее плотной и появляется больше доступных сайтов для связывания с коллагеназой. Таким образом, КМЦ снижает устойчивость коллагеновых гелей к ферментативной деградации.

Заключение

Коллагеновые гели являются перспективными носителями для культивирования и трансплантации клеток, используемых в регенеративной медицине благодаря хорошей цито- и биосовместимости. Однако недостаточно высокие механические показатели приводят к их быстрой деградации, а следовательно, и к ограничениям использования в качестве носителей для длительного культивирования клеток. В работе были изучены композитные матрицы на основе коллагена и КМЦ. Добавление КМЦ в коллагеновый гель делает его более жестким и упругим. КМЦ потенциально может повышать стабильность коллагенового геля к гидролитической деградации благодаря образованию комплексов с белком. Тем не менее КМЦ снижает устойчивость коллагена к ферментативному расщеплению коллагеназой, препятствуя образованию фибрилл-нативной формы белка.

Финансирование работы

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-03-00400_a).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] A. Cipitria, M. Salmeron-Sanchez. *Adv Healthc Mater.*, **6** (15), 1700052 (2017). DOI: 10.1002/adhm.201700052
- [2] K. Gelse, E. Pöschl, T. Aigner. *Adv. Drug. Deliv Rev.*, **12** (55), 1531 (2003). DOI: 10.1016/j.addr.2003.08.002
- [3] F. Ruedinger, A. Lavrentieva, C. Blume, I. Pepelanova, T. Scheper. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2** (99), 623 (2015). DOI: 10.1007/s00253-014-6253-y
- [4] J.L. Drury, D.J. Mooney. *Biomaterials*, **24** (24), 4337 (2003). DOI: 10.1016/s0142-9612(03)00340-5
- [5] R.S. Ashton, A. Banerjee, S. Punyani, D.V. Schaffer, R.S. Kane. *Biomaterials*, **36** (28), 5518 (2007). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.08.038
- [6] M.W. Tibbitt, K.S. Anseth. *Biotechnol Bioeng.*, **4** (103), 655 (2009). DOI: 10.1002/bit.22361
- [7] D. Fan, U. Staufer, A. Accardo. *Bioengineering (Basel)*, **4** (6), 113 (2019). DOI: 10.3390/bioengineering6040113
- [8] K. Gelse, E. Pöschl, T. Aigner. *Adv. Drug Deliv Rev.*, **12** (55), 1531 (2003). DOI: 10.1016/j.addr.2003.08.002
- [9] L. Salvatore, N. Gallo, M.L. Natali, A. Terzi, A. Sannino, M. Madaghiele. *Front Bioeng. Biotechnol.*, **9**, 644595 (2021). DOI: 10.3389/fbioe.2021.644595

- [10] C. Somaiah, A. Kumar, D. Mawrie, A. Sharma, S.D. Patil, J. Bhattacharyya, R. Swaminathan, B.G. Jaganathan. *PLoS ONE*, **12** (10), 1 (2015).
DOI: 10.1371/journal.pone.0145068
- [11] P. Gillery, F.X. Maquart, J.P. Borel. *Exp. Cell. Res.*, **1** (167), 29 (1986). DOI: 10.1016/0014-4827(86)90201-6
- [12] K. Adamiak, A. Sionkowska. *Int. J. Biol. Macromol.*, **161**, 550 (2020). DOI: 10.1016/j.jbiomac.2020.06.075
- [13] G.D. Nicodemus, S.J. Bryant. *Tissue Eng. Part B Rev.*, **2** (14), 149 (2008). DOI: 10.1089/ten.teb.2007.0332
- [14] E.D. Abdolahinia, B. Jafari, S. Parvizpour, J. Barar, S. Nadri, Y. Omid. *BioImpacts*, **2** (11), 111 (2021).
DOI: 10.34172/bi.2021.18
- [15] M. Zhang, C. Ding, J. Yang, S. Lin, L. Chen, L. Huang. *Carbohydr Polym.*, **137**, 410 (2016).
DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.10.098
- [16] C. Ding, R. Shi, Z. Zheng, M. Zhang. *Connect Tissue Res.*, **1** (59), 66 (2018). DOI: 10.1080/03008207.2017.1306059
- [17] C.K. Bektas, I. Kimiz, A. Sendemir, V. Hasirci, N. Hasirci. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **14** (29), 1764 (2018).
DOI: 10.1080/09205063.2018.1498718
- [18] Y. Wang, K. Kanie, T. Takezawa, M. Horikawa, K. Kaneko, A. Sugimoto, A. Yamawaki-Ogata, Y. Narita, R. Kato. *Carbohydr Polym.*, **285**, 119223 (2022).
DOI: 10.1016/j.carbpol.2022.119223
- [19] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall. *J. Biol. Chem.*, **1** (193), 265 (1951).