

Алгоритм идентификации разных форм аллогенного коллагенсодержащего материала как основы для биочернил с помощью оптических методов анализа

© П.Е. Тимченко^{1,2}, О.О. Фролов^{1,2}, Н.А. Рябов², Е.В. Тимченко^{1,2}, Л.Т. Волова², С.С. Иванов¹

¹ Самарский университет,
443086 Самара, Россия

² Самарский государственный медицинский университет,
443099 Самара, Россия

e-mail: laser-optics.timchenko@mail.ru

Поступила в редакцию 30.11.2023 г.

В окончательной редакции 10.02.2024 г.

Принята к публикации 05.03.2024 г.

Представлены результаты исследования по оценке состава разных форм аллогенного коллагенсодержащего материала (гидрогеля) в качестве потенциального компонента биочернил в перспективном направлении тканевой инженерии с помощью оптических методов (рамановской и ИК спектроскопии). В результате проведенных исследований с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) установлено, что в негидролизованной форме коллагена относительное содержание пролина и гидроксипролина меньше, чем в гидролизованной форме, что может говорить о нарушениях структурной организации коллагенсодержащего материала (по спектральным особенностям пролина и гидроксипролина). На основе дисперсионного анализа был разработан алгоритм идентификации разных форм аллогенного коллагенсодержащего материала с помощью дерева решений. Установлено, что с помощью методов рамановской и ИК спектроскопии можно проводить экспресс-анализ состава и типов коллагеновых материалов, а также контролировать степень денатурации коллагена при разработке биочернил.

Ключевые слова: рамановская спектроскопия, ИК спектроскопия, алгоритм идентификации коллагенов, гидрогель, биочернила, коллагенсодержащий материал, дисперсионный анализ.

DOI: 10.61011/OS.2024.04.58211.21-24

Введение

На сегодняшний день актуальным аспектом в тканевой инженерии, в частности, 3D-биопринтинге при разработке и анализе биочернил, является использование оптических методов анализа для качественной и количественной оценки состава гидрогелей [1]. В основу биочернил могут входить материалы различного происхождения, среди которых на сегодня перспективным является использование аллогенных биоматериалов, которые, как известно, обладают рядом преимущественных качеств, такими как низкий иммунный ответ, биомиметичность и биоразлагаемость [2,3]. К примеру, каркасы, используемые в инженерии костной и хрящевой ткани, должны иметь взаимосвязанную пористую структуру, хорошую биосовместимость и механические свойства, соответствующие натуральным аналогам. В этой связи перспективным материалом является коллагенсодержащий материал — ключевой компонент внеклеточного матрикса [4,5].

Для объективной оценки качества гидрогелей и биочернил необходимо иметь данные о структуре содержащихся в них компонентов, поэтому важным представляется оценка структурных и качественных особенностей коллагенсодержащего материала, а также его состояния (гидролизованности и негидролизованности).

Оптические методы нашли широкое применение в работах различных авторов [6,7].

Использование метода рамановской спектроскопии имеет ряд преимуществ над другими оптическими методами ввиду оперативности и возможности широкого применения для биомедицинских задач. Так, спектроскопия комбинационного рассеяния была использована в исследованиях характеристик внеклеточного матрикса в образцах тканей. С помощью рамановской спектроскопии также было проведено исследование костного мозга [8], в результате которого установлено, что основной вклад в спектры комбинационного рассеяния костного мозга с помощью ВМ-МСС вносят нуклеиновые кислоты (выделенные пуриновые и/или пиримидиновые основания и структура ДНК/РНК), белки (отдельные аминокислоты, амидные группы вторичной структуры белков и различные колебания внутри связей C—C или C—N) и липиды (вибрации внутри углеводородной цепи).

Таким образом, рамановская спектроскопия для оценки клеточных популяций и составов биоматериалов является эффективным методом.

Помимо метода комбинационного рассеяния перспективным является также метод инфракрасной спектроскопии (FTIR), используемый для быстрой и качественной химической структурной характеристики свойств

коллагена [9]. Данный метод является востребованным, поскольку позволяет проводить точное определение химических структурных свойств коллагена из разных источников. При помощи такого неразрушающего метода как FTIR можно получить ценную информацию на молекулярном уровне о типах функциональных групп, типах связей и молекулярных конформациях, а также легко охарактеризовать и отличить качество биоматериалов на основе коллагена, входящих в состав биологических тканей человека [10]. Что подтверждается данными литературного обзора, в котором авторами было освещено использование FTIR для изучения биоматериалов на основе коллагена, извлеченного из различных источников, а также для характеристики материалов на основе коллагена, используемых при заживлении ран, в качестве заменителей кожи, коллагенсодержащих агентов для доставки лекарств, материалов, используемых в тканевой инженерии, регенерации кости и остеогенной дифференциации и др. [11].

Целью работы являлось проведение исследований по оценке состава разных форм коллагенсодержащего материала как основы для биочернил, с помощью рамановской и FTIR-спектроскопии.

Материалы и методы исследований

Материалами исследований являлись 2 группы образцов:

1 группа — коллагенсодержащий материал, негидролизованная форма;

2 группа — коллагенсодержащий материал, гидролизованная форма.

Исходным материалом для получения коллагенсодержащего материала являлась минерализованная аллогенная губчатая костная ткань, которую подвергали очистке от крови, липидов, стромы костного мозга и других компонентов по запатентованной оригинальной технологии „Лиопласт“® (ТУ-9398-001-01963143-2004) с последующей лиофилизацией. Затем из минерализованной костной ткани получали деминерализованную ткань путем химического удаления костного минерального компонента (КМК) (гидроксипатита). Следующим этапом являлось получение гелевой формы или гидрогеля коллагенсодержащего материала из деминерализованной костной ткани путем экстракции комплекса белков кислотой, с последующей нейтрализацией полученного геля щелочью. Для поддержания стабильного значения pH гидрогеля в него добавляли буферный раствор. Итоговый гидрогель был средней вязкости, слабо текучий, прозрачный, со значением pH 7.2–7.4. Далее следовала стадия лиофилизации полученного гидрогеля (получение лиофилизата). Гидролизат коллагена получали ферментативным методом с использованием фермента трипсина (ОООНПП „ПанЭко“, Трипсин 1:250, активность 349 ед/мг, Кат. № П032, WA200226).

Эксперименты проводились с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния, реализованный

с помощью стенда [12], который имеет в своем составе полупроводниковый лазер (LML-785.0RB-04,450 мВт), спектрограф (SharmrockSR-303i) с интегрированной цифровой камерой, охлаждаемой до -60°C , оптический модуль комбинационного рассеяния (PBL785) и компьютер.

Спектрограф SharmrockSR-303i обеспечивает разрешение 0.15 nm по длине волны при низком уровне собственных шумов. Спектры КР регистрировались с помощью оптического зонда [13].

После получения спектров КР была проведена их обработка [14]. Весь анализ спектров производился в диапазоне $450\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$. С помощью методов SNV и Maximum Likelihood Estimation Savitzky-Golay filter (MLE-SG) ($= 4$) были проведены нормализация и сглаживание спектров КР.

Для фильтрации автофлуоресценции в КР-спектре был применен метод вычитания флуоресцентной составляющей полиномиальной аппроксимацией I-ModPoly со степенью полинома 11.

В качестве дополнительного метода анализа биоматериалов проводилась ИК фурье-спектроскопия образцов, на приборе ФТ-801 („СИМЕКС“, Россия). ИК спектр образцов снимали на приставке многократного нарушенного полного внутреннего отражения (МНПВО) с элементом из селенида цинка. Использовался метод отражения (количество отражений — 3). В процессе работы использовалось программное обеспечение Zair3.5. Разрешение измерения составляло 4 cm^{-1} , диапазон $500\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$.

ИК спектры применяются для идентификации соединений и установления степени их чистоты (качественно), а также они могут быть использованы для качественного анализа смесей при контроле над ходом реакции. Однако наиболее распространенное и важное применение ИК спектров — это выяснение и подтверждение предполагаемого строения соединений. Наличие почти любой функциональной группы в молекуле можно установить при помощи данного прибора.

Результаты исследований

На рис. 1 представлены усредненные нормированные спектры КР исследуемых образцов.

Как видно из рисунка, для гидролизованной формы коллагена характерны большие значения амплитуды интенсивности линий КР в спектральном диапазоне от $800\text{--}1464\text{ cm}^{-1}$, причём для данного образца наиболее характерны линии КР 854 и 876 cm^{-1} (C–C stretching, proline and hydroxyproline (collagen assignment)), $1003/1036\text{ cm}^{-1}$ (Phenylalanine (Breathing mode) (collagen assignment)), 1094 cm^{-1} (Phospholipids), 1270 cm^{-1} (Amide III/ α -helix), 1449 cm^{-1} (CH_2 bending and scissoring modes of collagen and phospholipids).

Авторы работы [15] отмечают, что относительное количество пролина (на спектрах КР 854 cm^{-1}) непо-

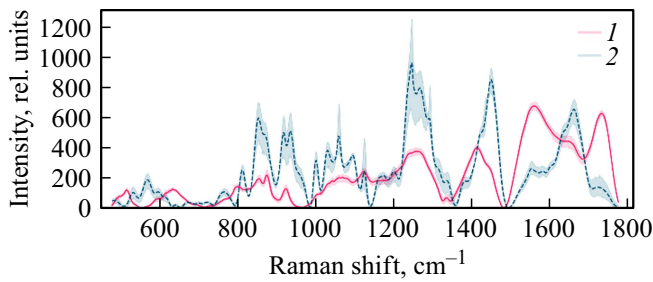


Рис. 1. Усредненные нормированные спектры КР исследуемых образцов: 1-я группа (красная линия), 2-я группа (синяя линия).

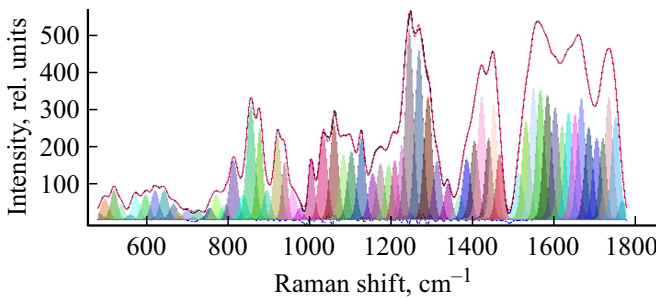


Рис. 2. Итоговая модель декомпозиции спектра КР линиями Voigt (черная сплошная линия — исходный спектр, красная пунктирная — смоделированный спектр, синяя пунктирная — разность между исходным и смоделированным спектром).

средственно влияет на синтез коллагена, так как важнейший этап в синтезе белка — посттрансляционная модификация является следствием химической реакции гидроксирования пролина. В гидролизованной форме коллагенсодержащего аллогенного материала сохраняется комплекс аминокислот — основных белковых компонентов костной ткани (пролин, фенилаланин, гидроксипролин), которые используются организмом как строительные компоненты в процессе синтеза коллагена при замещении имплантируемой в организм конструкции собственными тканями организма.

Использование оптических методов позволяет оценить качество гидролизованной формы коллагенсодержащего материала путем подтверждения сохранности комплекса основных значимых аминокислот.

Таким образом, изменение относительного содержания пролина и гидроксипролина может говорить о качестве биоматериала.

Увеличение гидроксипролина в гидролизованной форме коллагена, соответствующее линии 854 cm^{-1} , входящего в состав белка коллагена и связанного с пептидами костного матрикса, может свидетельствовать о снижении резорбтивных процессов [16].

Волновое число 1036 cm^{-1} соответствует колебаниям в молекуле фенилаланина [17]. Данная аминокислота важна при изучении остеорезорбции, так как она также участвует в процессе синтеза коллагена и определяет

такие свойства коллагеновых фибрилл, как упругость и эластичность. Уменьшение интенсивности линии на данном волновом числе наблюдается на спектрах негидролизованного коллагена.

В области спектра $1559\text{--}1736\text{ cm}^{-1}$ проявляются наиболее значимые изменения между группами. Так, в гидролизованной форме коллагена имеется пик на линии 1663 cm^{-1} (Amide I/ α -helix), который достаточно слабо выражен в негидролизованной форме коллагена. В то время как линии 1559 cm^{-1} (amid II Parallel/Antiparallel β -sheet structure) и 1736 cm^{-1} (phospholipids) наиболее выражены в негидролизованной форме коллагена.

Для повышения информативности полученных спектров КР было проведено разложение (рис. 2) на сумму 66 спектральных линии профиля Voigt, описываемых формулой (1). Состав спектральных линий определен на основе автоматического многоитерационного моделирования 21 спектра КР.

$$f(x; A, x_0, \sigma, a) = \frac{(1 - \alpha)A}{\sigma_g \sqrt{2\pi}} e^{-(x-x_0)^2/2\sigma_g^2} + \frac{\alpha A}{\pi} \left[\frac{\sigma}{(x - x_0)^2 + \sigma^2} \right], \quad (1)$$

где $\sigma_g = \sigma/\sqrt{2\ln 2}$ — FWHM, A — амплитуда, α — коэффициент, контролирующий относительный вес гауссовой и лоренцевой составляющих ($\sigma = 0$ соответствует гауссиану, $\alpha = 1$ — лоренциану), x_0 — положение максимума линии.

Использованный метод оптимизации модели — Limited-memory BFGS(L-BFGS-B). Усредненное значение метрик для полученных в результате разложения спектров КР составило: $R^2 = 99.68\%$, $\chi^2 = 11640$, $aic = 633$, $bic = 849$.

Амплитуды линий, полученные в результате разложения, были проанализированы методом ANOVA (дисперсионный анализ). Амплитуды семи наиболее информативных линий показаны на рис. 3.

Распределение амплитуды любой из 7 линии позволяет хорошо различать спектры 1-й и 2-й группы, поэтому для создания решающего дерева можно использовать любую из этих линий. Распределение амплитуд

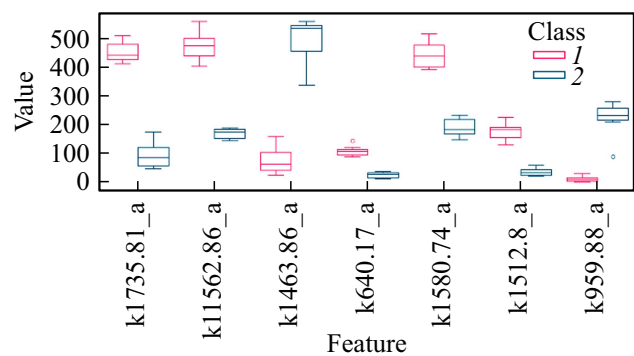


Рис. 3. Значения амплитуды наиболее информативных линий: 1 — первая группа, 2 — вторая группа.

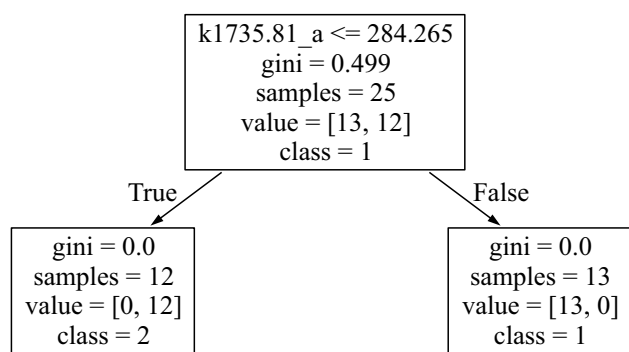


Рис. 4. Дерево решений.

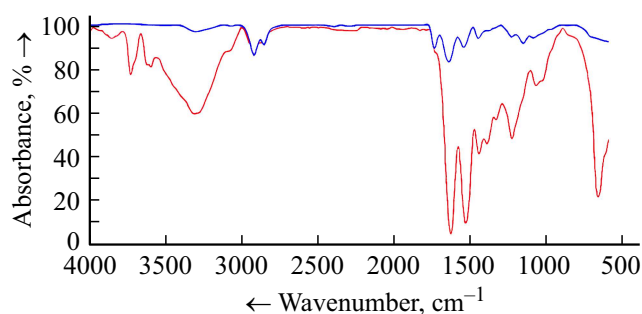


Рис. 5. Усредненные FTIR-спектры исследуемых образцов: группа 1 — негидролизованная форма коллагенсодержащего материала (красная линия), группа 2 — гидролизованная форма коллагенсодержащего материала (синяя линия).

линий с наибольшим различием наблюдается для линии КР $\sim 1736 \text{ cm}^{-1}$ (phospholipids).

С учетом дисперсионного анализа можно определить критерий различия спектров 1-й и 2-й группы по одной линии с помощью дерева решений (рис. 4). Если амплитуда линии ниже 284.265 отн. ед, то это спектр КР соответствует гидролизованной формы коллагена.

При анализе FTIR — спектров негидролизованного коллагенсодержащего материала наблюдаются основные функциональные группы, характерные для структуры коллагена (рис. 5) (Group 2). На FTIR-спектре присутствуют пики, относящиеся к амиду I (1631 cm^{-1}), амиду II (изгиб группы N–H при 1534 cm^{-1}) и валентным колебаниям амида III при 1231 cm^{-1} . Также на спектре отмечается выраженная гидроксильная полоса в области при 3300 cm^{-1} , соответствующая валентным колебаниям N–H. В спектре также отмечается присутствие групп –COOH и –OH, характеризующихся наличием пиков при 1739 , 1645 и 1073 cm^{-1} [18]. Что говорит о подтверждении присутствия коллагеновой структуры в исследуемом образце, в том числе и данными литературы [19].

В гидролизованной форме коллагенсодержащего материала (Group 2) после проведения ферментативной обработки образца коллагенсодержащего материала наблюдается снижение интенсивности пиков амида I и амида III, а также снижение интенсивности колебания

боковых цепей пролина, присутствующих в коллагенсодержащем материале при $1325\text{--}1340 \text{ cm}^{-1}$, что говорит о разворачивании тройных спиралей вследствие денатурации коллагена. Тройная спиральная структура коллагена подтверждена интенсивностью пика, характерного для амида III при 1447 cm^{-1} .

Выводы

В результате проведенных исследований с помощью рамановской спектроскопии установлено, что в негидролизованной форме коллагена относительное содержание пролина и гидроксипролина меньше, чем в гидролизованной форме, что может говорить о нарушениях процессов синтеза коллагенов. В то же время увеличение гидроксипролина в гидролизованной форме коллагена, соответствующее линии 854 cm^{-1} , входящего в состав белка коллагена и связанного с пептидами костного матрикса, может свидетельствовать о снижении резорбтивных процессов.

В результате проведенного математического анализа по обработке спектров КР установлено, что распределение амплитуд линий КР с наибольшим различием наблюдается для линии $\sim 1736 \text{ cm}^{-1}$ (phospholipids).

На основе дисперсионного анализа был разработан алгоритм идентификации разных форм коллагена для биочернил с помощью дерева решений. Показано, что в случае, если амплитуда линии КР 1736 cm^{-1} ниже 284.265 rel. units, то это спектр лиофилизированного геля коллагена гидролизованной формы.

С помощью метода FTIR удалось охарактеризовать пики негидролизованного образца коллагенсодержащего материала, относящиеся к амиду I (1631 cm^{-1}), амиду II (при 1534 cm^{-1}) и амиду III при 1447 cm^{-1} . При переводе в гидролизованное состояние образца отмечается значительное увеличение интенсивности данных пиков, ввиду предполагаемой денатурации коллагеновой структуры.

Таким образом, с помощью двух оптических неразрушающих скрининговых методов метода ИК и КР-спектроскопии можно проводить качественный экспресс-анализ состава и типов коллагена при разработке биочернил с использованием биологических материалов в направлении 3D-биопринтинга.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] R. Tehseen, Z. Rabia, Z. Faiza, I. Kanwal, M. Nawshad, S.S. Zaman, A. Rahim, S.A.A. Rizvi, I.U. Rehman. Appl. Spectrosc. Rev., **53** (9), 703 (2018). DOI:10.1080/05704928.2018.1426595
- [2] D.F. Williams. Biomater., **29** (20), 2941 (2008). DOI:10.1016/j.biomaterials.2008.04.023

- [3] S. Prokoshkin, Y. Pustov, Y. Zhukova, P. Kadirov, S. Dubinskiy, V. Sheremetyev, M. Karavaeva. *Materials*, **52**, 2024 (2021). DOI:10.3390/ma14123327
- [4] T. Long, J. Yang, S.S. Shi, Y.P. Guo, Q.F. Ke, Z.A. Zhu. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, (7), 1455 (2015). DOI:10.1002/jbm.b.33328
- [5] M.B. Fauzi, Y. Lokanathan, B.S. Aminuddin, B.H.I. Ruszymah, S.R. Chowdhury. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, **68**, 163 (2016). DOI:10.1016/j.msec.2016.05.109
- [6] Г.И. Долгих, В.Е. Привалов. *Лазерная физика. Фундаментальные и прикладные исследования* (ООО „Рея“, Владивосток, 2016).
- [7] Г.В. Лактюшкин, В.Е. Привалов., В.Г. Шеманин. *ЖТФ*, **58** (1), 20 (1998).
- [8] M. Jackson, L.P. Choo, P.H. Watson, W.C. Halliday., H.H. Mantsch. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1270** (1), 1 (1995) DOI:10.1016/0925-4439(94)00056-v
- [9] H.L. Casal, H.H. Mantsch. *Biochim. Biophys. Acta*, **779** (4), 381 (1984). DOI:10.1016/0304-4157(84) DOI: 10.1016/0304-4157(84)90017-0
- [10] M. Jackson, H.H. Mantsch. *Spectrochim. Acta Rev.*, **15**, 53 (1993).
- [11] E.V. Timchenko, P.E. Timchenko, E.V. Pisareva, M.A. Daniel, L.T. Volova, A.A. Fedotov, O.O. Frolov, A.N. Subatovich. *J. Opt. Technology*, **87** (3), 161 (2020). DOI:10.1364/JOT.87.000161
- [12] P.E. Timchenko, E.V. Timchenko, L.T. Volova, M.A. Zybin, O.O. Frolov, G.G. Dolgushov. *Optical Memory and Neural Networks*, **29** (4), 354 (2020).
- [13] P.E. Timchenko, E.V. Timchenko, L.T. Volova, O.O. Frolov. *J. Opt. Technology*, **88** (9), 485 (2021). DOI:10.1364/JOT.88.000485
- [14] R.H. Christenson. *Clinical biochemistry*, **30** (8), 573 (1997). DOI:10.1016/S0009-9120(97)00113-6
- [15] W.J. Marshall, M. Lapsley, A.P. Day, R.M. Ayling. *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects: Third Edition* (2014).
- [16] R. Polak, R.N. Pitombo. *Cryobiology*, **63** (2), 61 (2011).
- [17] T. Mitra, G. Sailakshmi, A. Gnanamani. *Proceedings of the Indian Academy of sciences. Chemical sciences*, **126** (1), 127 (2014). DOI:10.1007/s12039-013-0543-2.
- [18] B. Dong, O. Arnoult, M.E. Smith, G. Wnek. *Macromol Rapid Commun.*, **30** (7), 539 (2009). DOI:10.1002/marc.200800634.
- [19] S.J. Kew, J.H. Gwynne, D. Enea, R. Brookes, N. Rushton. *Acta Biomater.*, **8** (10), 3723 (2021). DOI:10.1016/j.actbio.2012.06.018