

УДК 577.12

СТАБИЛЬНОСТЬ КОЛЛАГЕНОВОГО ГЕЛЯ ПОСЛЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ

© 2023 г. Ю.А. Нашекина*, **, #, Н.А. Трусова*, П.О. Никонов*,
А.В. Нашекин**, Н.А. Михайлова*

*Институт цитологии РАН, Тихорецкий просп., 4, Санкт-Петербург, 194064, Россия

**Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН,
ул. Политехническая, 26, Санкт-Петербург, 194021, Россия

#E-mail: nashchekina.yu@mail.ru

Поступила в редакцию 12.08.2022 г.

После доработки 12.12.2022 г.

Принята к публикации 21.12.2022 г.

Коллаген I типа является наиболее распространенным белком внеклеточного матрикса в организме человека, обеспечивающим основу структуры тканей и регулирует клеточные функции. В процессе жизнедеятельности компоненты внеклеточного матрикса, в частности коллаген, подвергаются ультрафиолетовому облучению. Целью данной работы было изучение влияния ультрафиолетового облучения на стабильность и структуру коллагеновых фибрилл. Было показано, что ультрафиолетовое облучение оказывает стабилизирующее действие на коллагеновый гель с концентрацией 0.5 мг/мл. При анализе диаметров коллагеновых фибрилл после УФ облучения методом сканирующей электронной микроскопии изменение размеров не выявлено. Степень распластанности клеток, культивируемых на коллагеновых фибриллах после ультрафиолетового облучения, больше по сравнению с площадью клеток, культивируемых на коллагеновых фибриллах без обработки. Методом ИК-Фурье-спектроскопии также показано, что ультрафиолетовое облучение вызывает смещение полосы амида коллагена A в более низкочастотную область, что свидетельствует об изменении структурного порядка коллагена.

Ключевые слова: коллаген I типа, УФ-облучение, ИК-Фурье-спектроскопия, сканирующая электронная микроскопия.

DOI: 10.31857/S0006302923020060, EDN: CALMAF

Коллаген – это один из самых распространенных белков в организме и основной белок внеклеточного матрикса. Он является структурным компонентом кожи, костей и хрящевой ткани и составляет почти 33% белков организма человека [1]. Молекула коллагена представляет собой тройную спираль – три полипептидные α -цепи, образующие конформацию суперспирали [2]. Последовательность аминокислотных остатков в молекуле коллагена четко определена: глицин – каждый третий остаток в повторяющейся последовательности; Gly–X–Y, где на месте X и Y, как правило, находятся аминокислоты пролин и гидроксипролин. Молекулярная структура коллагена стабилизируется внутри- и межцепочечными водородными связями между NH-группой глицина и карбонильной группой C=O остатков другой полипептидной цепи. В организме человека

молекулы коллагена собираются в тройные спирали фибрилл [3, 4]. Они подвергаются воздействию внешних факторов, таких, например, как ультрафиолетовое (УФ) излучение [5]. Такие факторы могут вызывать различные физические, химические и физико-химические «ответы» в живых организмах на разных молекулярных уровнях. УФ-излучение отвечает за загар кожи, но при этом считается основным причинным фактором старения кожи и многих видов рака кожи [5].

Благодаря нитевидной форме и таким ассоциативным характеристикам, как гидрофильность, биосовместимость и хорошие кровоостанавливающие свойства, коллаген широко используется в качестве биоматериала для формирования носителей для культивирования и трансплантации клеток [6].

Коллагеновые носители часто «сшивают» различными методами для обеспечения необходимой структурной стабильности и механической

Сокращения: УФ – ультрафиолетовый, РЭМ – растровая электронная микроскопия.

прочности для решения задач регенеративной медицины [7, 8]. Для этой цели используют химические [9, 10] или физические [11, 12] методы. Все химические методы воздействуют на химическую структуру коллагеновых волокон [13]. Химические сшивающие агенты обычно взаимодействуют со свободными первичными аминогруппами (на остатках лизина) и карбоксилатными анионами (на остатках глутамата или аспартата). Многие из этих же боковых цепей аминокислот представляют собой основные участки связывания клеток на коллагеновых материалах, поэтому химические сшивающие агенты могут влиять на биологическую активность клеток [14]. В отличие от химических сшивающих агентов УФ-облучение стимулирует образование связей между остатками ароматических аминокислот, таких как тирозин и фенилаланин [15]. Следовательно, УФ-облучение обеспечивает прочное соединение внутри полипептидных цепей без использования кислотных и основных боковых цепей, которые важны для взаимодействия клеток с коллагеновыми носителями.

Достоинствами УФ-облучения являются простота в применении и отсутствие токсического эффекта, свойственного большинству сшивающих агентов. В процессе УФ-облучения коллагена конкурируют два процесса – сшивание и УФ-индуцированная денатурация белка. Именно баланс этих двух процессов влияет на свойства получаемых коллагеновых носителей [16]. Во многих исследованиях изучалось влияние УФ-излучения на свойства молекулярного коллагена. Было показано, что раствор коллагена после облучения теряет способность образовывать естественные фибриллы. Однако коллаген находится в организме в фибриллярной форме, поэтому для восстановления различных повреждений органов и тканей также используется фибриллярный коллаген. К сожалению, до настоящего времени опубликовано очень мало данных о влиянии УФ-излучения на стабильность коллагена, в связи с чем, целью данной работы является изучение влияния УФ-излучения на структуру, стабильность и биологические свойства коллагенового геля, используемого для культивирования клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Коллаген I типа выделяли из сухожилий хвоста крысы методом кислотной экстракции [17]. Для переноса коллагена из раствора в гель значения ионной силы и pH доводили до физиологических условий добавлением десятикратной среды 199 (Gibco, США) и NaOH (ООО «Реактив», Россия) соответственно. Коллагеновый гель с концентрациями 0.5, 1.0, 2.0 и 3.0 мг/мл готовили на льду [6].

УФ-облучение коллагена проводили спектральной полосой в диапазоне длин волн 254–290 нм в течение 30, 60 и 120 мин.

Степень деградации коллагенового геля оценивали через 1 и 7 сут инкубирования в физиологических условиях в фосфатном буфере по количеству растворившегося и выделившегося из геля коллагена [18].

Структуру коллагеновых фибрилл до и после УФ-облучения оценивали с помощью растрового электронного микроскопа (РЭМ) JSM-7001F (Jeol, Япония), а также с помощью ИК-Фурье-спектрометра IR Prestige-21 (Shimadzu, Япония) в режиме пропускания, в диапазоне 4000–600 см⁻¹ со спектральным разрешением 2 см⁻¹.

Для обеспечения стока заряда при РЭМ-исследованиях образцы напыляли слоем золота в 30 нм с помощью магнетронного напыления.

Биосовместимость *in vitro* исследовали на клеточной линии FetMSCs (получена из Коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН, при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение №075-15-2021-683)). Клетки культивировали на полистирольных чашках в среде DMEM/F12 (Gibco, США) с добавлением 10% бычьей эмбриональной сыворотки (Gibco, США), 1% пенициллина/стрептомицина (Sigma-Aldrich, Германия) при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂ в воздухе. Подробное описание методики флуоресцентного окрашивания клеток описано в нашей ранее опубликованной работе [19]. Окрашивание проводили следующим образом: адгезировавшие клетки промывали фосфатно-солевым буфером, фиксировали 4%-м раствором формальдегида (Sigma-Aldrich, США), затем к клеткам добавляли раствор детергента. Родамин фаллоидин (Thermo Fisher Scientific, США) использовали для окрашивания актина. Организацию актинового цитоскелета анализировали с использованием конфокального микроскопа FV3000 (Olympus Corporation, Япония).

Результаты, полученные для пяти повторных экспериментов, обрабатывали в программе Microsoft Excel 2007, определяя среднее значение отклонения и стандартную ошибку среднего *SE*. Для сравнения результатов использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стабильность коллагенового геля *in vitro* и *in vivo* является важным параметром для успешной регенерации тканей и органов. Стабилизация коллагеновых гелей является одним из важных этапов в создании биосовместимых коллагеновых носителей.

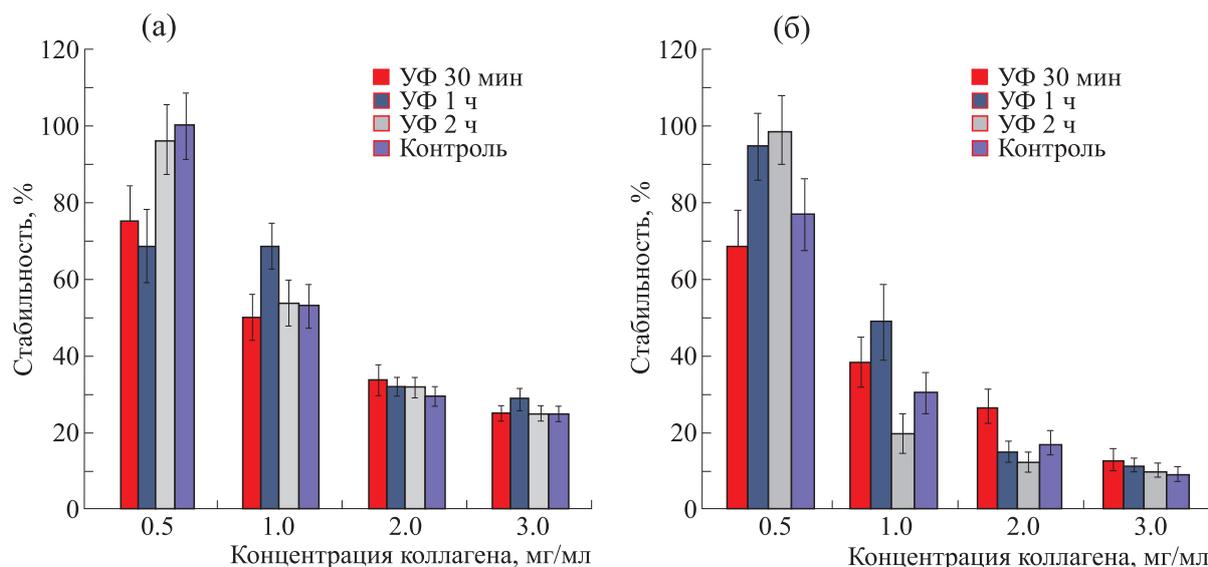


Рис. 1. Стабильность коллагенового геля при инкубировании в физиологических условиях (фосфатный буфер, pH 7.2, температура 37°C): (а) – после суточного инкубирования, (б) – после недельного инкубирования.

На рис. 1 представлены результаты исследования. Чем больше концентрация коллагенового геля, тем он более стабилен. Также можно видеть, что УФ-облучение оказывает различное воздействие на гели с разной концентрацией коллагена (рис. 1а). Для коллагеновых гелей с самой низкой концентрацией белка (0.5 мг/мл) УФ-облучение оказывает стабилизирующий эффект после суточного инкубирования (рис. 1а). После недельного инкубирования такой эффект не наблюдался (рис. 1б). Длительное воздействие УФ-облучения (в течение 2 ч) оказывает не стабилизирующее, а разрушающее действие. Сшивание или деградацию гелей с более высокими концентрациями белка (2–3 мг/мл) после УФ-облучения не наблюдали.

Структура фибрилл имеет определенную периодичность светлых и темных колец. Такое структурирование обусловлено особенностями молекулярного строения коллагена. Пять молекул коллагена выровнены параллельно друг другу с шагом около 67 нм [20]. Это продольное или осевое смещение представляет собой характерную D-периодичность исчерченности фибрилл, которая представляет собой сумму областей разрыва и перекрытия между молекулами коллагена. При анализе результатов РЭМ (рис. 2) мы можем наблюдать светлые и темные области промежутков, которые связаны с молекулярной структурой коллагеновых фибрилл.

Данные РЭМ демонстрируют отсутствие каких-либо изменений в морфологии коллагеновых фибрилл в течение всего периода облучения (30–120 мин) (рис. 2). Диаметр коллагеновых фибрилл

и их D-периодичность также не изменяются. Наши результаты согласуются с ранее опубликованными данными атомно-силовой микроскопии о влиянии УФ-облучения на структуру коллагеновых фибрилл [20]. Авторы не обнаружили изменений в структуре и морфологии поверхности пленок на основе фибриллярного коллагена после обработки УФ-облучением.

ИК-спектры коллагеновых фибрилл демонстрируют отчетливые сигналы для амида А при 3330–3325 см^{-1} и амида В при 3080 см^{-1} . На рис. 3 представлены ИК-спектры коллагеновых фибрилл до и после УФ-обработки в течение разных периодов времени. Согласно полученным результатам, интенсивность сигнала необработанных коллагеновых фибрилл выше почти во всей спектральной области, чем у обработанных коллагеновых фибрилл (рис. 3).

Сигнал при 3330 см^{-1} представляет собой амид А со сложным контуром. Восемь компонентов этой полосы были определены путем разложения пика на составляющие в области 3600–2800 см^{-1} . Амидная полоса коллагена А связана с NH-растяжением [18]. Частота амидных полос зависит от конформации коллагена; чем меньше структурный порядок белка, тем ниже частота этих амидных полос [18]. Когда структурный порядок белка уменьшается, частота амидных полос также уменьшается. УФ-облучение вызывает сдвиг полосы А амида коллагена на более низкую частоту, что свидетельствует об изменении структурного порядка коллагена.

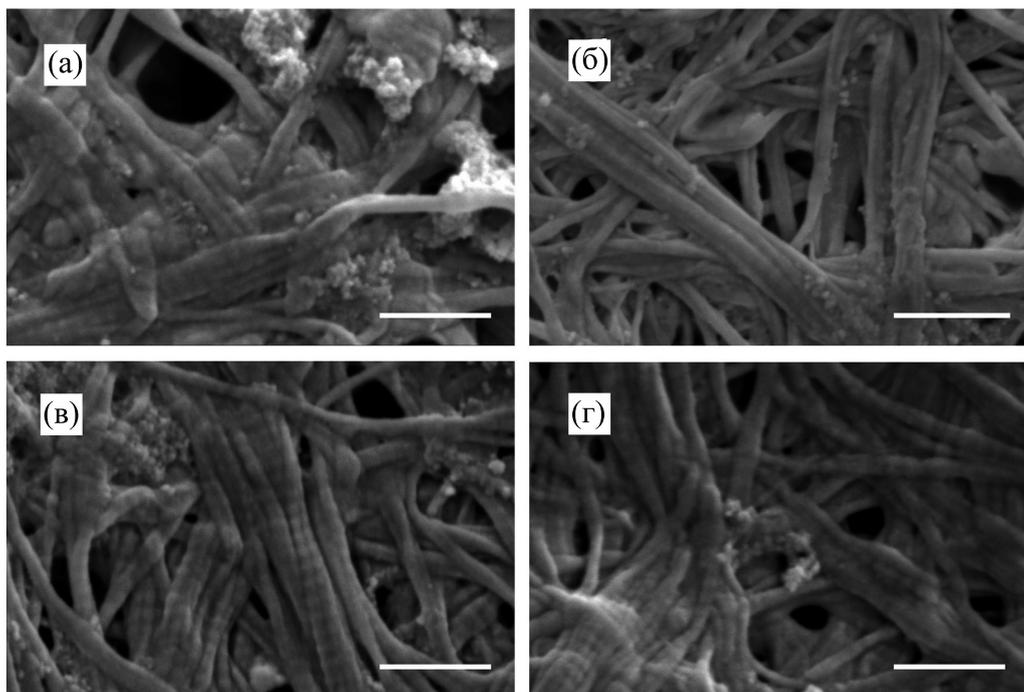


Рис. 2. РЭМ-изображения коллагеновых фибрилл после УФ-облучения: (а) – коллагеновые фибриллы до обработки; (б) – коллагеновые фибриллы после УФ-облучения в течение 30 мин; (в) – после УФ-облучения в течение 60 мин; (г) – после УФ-облучения в течение 120 мин. Шкала 500 нм.

Измененные структурные характеристики коллагенового геля после УФ-облучения могут влиять на поведение клеток, культивируемых на таких субстратах. В результате проведенных экспериментов было обнаружено достоверных отличий в количестве адгезировавших клеток на коллагеновых фибриллах до и после УФ-облуче-

ния. Однако можно отметить, что степень распластывания клеток на коллагеновых фибриллах после обработки УФ-облучением (30 и 60 мин) увеличивается по сравнению с клетками на интактных коллагеновых фибриллах. Такой эффект может быть обусловлен сшиванием коллагеновых фибрилл под действием УФ-облучения, что при-

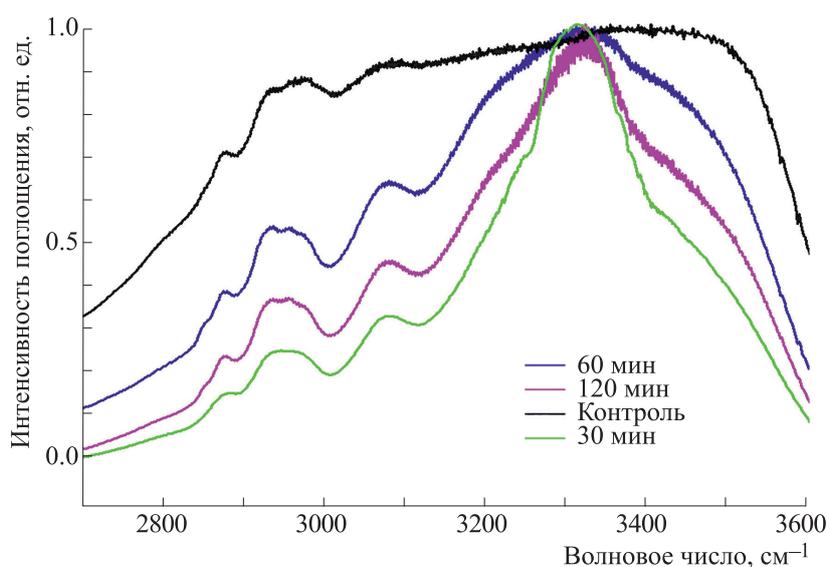


Рис. 3. Нормированные ИК-Фурье-спектры коллагеновых фибрилл после УФ-облучения в течение 30, 60 и 120 мин.

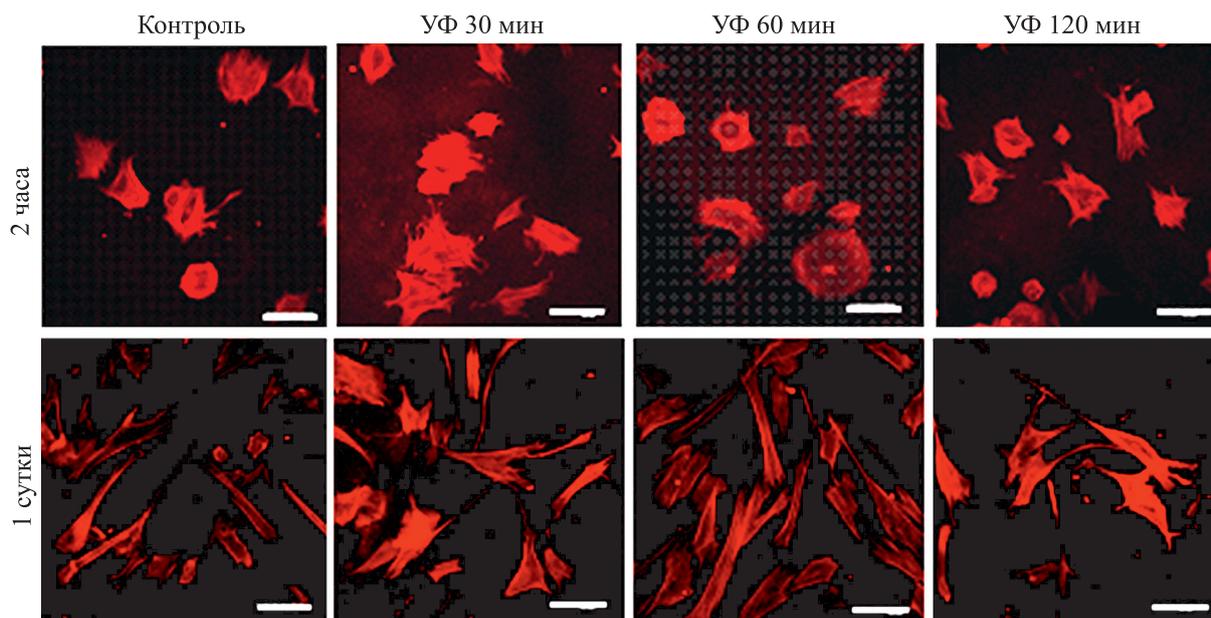


Рис. 4. Флуоресцентные микрофотографии FetMSC с актиновыми филаментами, окрашенными после двухчасового и суточного культивирования на коллагеновых фибриллах до (контроль) и после УФ-облучения. Шкала 50 мкм.

водит к увеличению жесткости поверхности и, следовательно, к увеличению степени распластанности клеток, культивируемых на таких поверхностях. Однако при дальнейшем увеличении времени УФ-облучения (120 мин) степень распластывания клеток снова снижается. При более длительном культивировании клеток (в течение суток) на коллагеновых фибриллах до и после УФ-обработки зависимость повторялась. Наиболее распластанные клетки наблюдали на коллагеновых фибриллах, обработанных УФ-облучением в течение 30 и 60 мин, а также после 2 ч культивирования.

Результаты, представленные в этом исследовании, показали, что УФ-облучение индуцирует сшивание коллагеновых фибрилл, но не изменяет их диаметр. Степень распластанности клеток на обработанных УФ-облучением коллагеновых фибриллах выше, чем на необработанных коллагеновых фибриллах. Таким образом, УФ-облучение при коротком времени экспозиции (до 120 мин) может быть использовано для сшивания и стабилизации фибриллярных структур коллагена.

БЛАГОДАРНОСТИ

Спектральные и электронно-микроскопические исследования проводили с использованием оборудования Федерального ЦКП «Материаловедение и диагностика в передовых технологиях».

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-03-00400а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Bailey and R. Paul, *J. Soc. Leather Technol. Chem.*, **82**, 104 (1998).
2. S. Ricard, *Perspect. Biol.*, **1**, 3 (2011).
3. S. Ricard-Blum, *Perspect. Biol.*, **3**, 1 (2011).
4. Yu. A. Nashchekina, A. A. Starostina, N. A. Trusova, et al., *J. Physics: Conf. Series*, **1697**, 012053 (2020).
5. A. Amaro-Ortiz, B. Yan, and J. A. D'Orazio, *Molecules*, **19**, 6202 (2014).
6. Yu. A. Nashchekina, N. M. Yudintceva, P. O. Nikonov, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.*, **163**, 123 (2017).
7. M. G. Haugh, C. M. Murphy, R. C. McKiernan, et al., *Tissue. Eng. Part A*, **17**, 1201 (2011).
8. Y. Hu, L. Liu, W. Dan, et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, **55**, 221 (2013).
9. S. J. Hollister and R. D. T. Maddox, *J. Biomater.*, **23**, 4095 (2002).
10. J. S. Pieper, T. Hafmans, J. H. Veerkamp, et al. *Biomaterials*, **21**, 581 (2000).
11. M. G. Haugh., PhD Thesis (Trinity Colledge, Dublin University, Ireland, 2008).
12. D.-H. Lew, P. H.-T. Liu, and D. P. Orgill, *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, **82**, 51 (2007).
13. L. H. Olde Damink, P. J. Dijkstra, M. J. van Luyn, et al., *Biomaterials*, **17**, 765 (1996).
14. N. Davidenko, D. V. Bax, C. F. Schuster, et al., *Mater. Sci.: Mater. Med.*, **27**, 14 (2016).
15. N. Metreveli, L. Namicheishvili, K. Jariashvili, et al., *Int. J. Photoenergy*, **76830**, 1 (2006).

16. M. P. Ohan, K. S. Weadock, and M. G. Dunn, J. Biomed. Mater. Res., **60**, 384 (2002).
17. G. Chandrakasan, D. A. Torchia, K. A. Piez, J. Biol. Chem., **251**, 6062 (1976).
18. O. H. Lowry, N. J. Rosbrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265. (1951).
19. Y. Nashchekina, A. Chabina, A. Nashchekin, et al., *Polymers*, **12**, 1042 (2020).
20. A. Sionkowska, J. Photoch. Photobiol. B: Biology, **82**, 9 (2006).
21. A. Kaminska and A. Sionkowska, *Pol. Degr. Stability*, **51**, 19 (1996).

Stability of Collagen Gel after UV Irradiation

Yu.A. Nashchekina*, ******, **N.A. Trusova***, **P.O. Nikonov***, **A.V. Nashchekin****, and **N.A. Mikhailova***

**Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretsky prosp. 4, St. Petersburg, 194064 Russia*

***Ioffe Institute, Russian Academy of Sciences, Polytekhnicheskaya ul. 26, St. Petersburg, 194021 Russia*

Type I collagen is the most abundant extracellular matrix protein in the human body, as well as is the main structural element in tissues and regulates cellular functions. In lifetime, the organism and extracellular matrix components such as collagen are exposed to UV irradiation. The purpose of this work was to study the effect of UV irradiation on the stability and structure of collagen fibrils. It has been shown that UV irradiation has a stabilization effect on collagen gel at a concentration of 0.5 mg/ml. Scanning electron microscope images have shown that the diameter of the collagen fibrils is not changed after UV irradiation. The degree of spreading of cells cultured on collagen fibrils after UV irradiation is greater compared to those cultured on collagen fibrils unirradiated with UV light. UV irradiation promotes a shift of the collagen amide A band to lower frequency, indicating that it induces structural changes in collagen.

Keywords: type I collagen, UV irradiation, FTIR spectroscopy, scanning electron microscopy