

## СТРУКТУРА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОЛЛАГЕНОВЫХ ГЕЛЕЙ, ОБРАБОТАННЫХ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ

© А. А. Гайдаш<sup>1</sup>, В. К. Крутько<sup>1</sup>, О. Н. Мусская<sup>1</sup>, О. А. Сычева<sup>1</sup>,  
Л. В. Кульбицкая<sup>1</sup>, Г. Б. Мельникова<sup>2</sup>, К. В. Скроцкая<sup>3</sup>,  
М. И. Блинова<sup>4</sup>, А. И. Кулак<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси,  
220072, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Сурганова, д. 9, к. 1

<sup>2</sup> Институт тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси,  
220072, Республика Беларусь, г. Минск, ул. П. Бровки, д. 15

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт физико-химических проблем  
Белорусского государственного университета,  
220006, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Ленинградская, д. 14

<sup>4</sup> Институт цитологии РАН,  
194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4  
E-mail: algaidashspb@gmail.com

Поступила в Редакцию 9 августа 2022 г.

После доработки 25 декабря 2022 г.

Принята к публикации 25 декабря 2022 г.

*Изучены параметры конденсированного состояния фибриллярного коллагена, его структуры, состав и структурирование кальцийфосфатов в образцах коллагенового геля, полученных из сухожилий крысиных хвостов. Установлено, что после кислотной экстракции и гелеобразования при 37°C фибриллярный коллаген сохраняет доменную организацию, диспергирует до уровня субфибрилл, агрегирует, экстрафибрилярное пространство заполняется вязкой жидкостью. Дилатантность возникает при 37–40°C на малых и средних скоростях напряжений сдвига. В процессе кислотной экстракции фибриллярный коллаген аморфизуется, его первичные пептидные цепи гидратируются, подвергаются неравномерному упрочнению/разупрочнению, межцепочечные пространства сжимаются/расширяются. Кальцийфосфаты, источником которых являются исходные сухожилия и среда 199, в ходе гелеобразования структурируются в гидроксиапатиты, которые при введении гиалуроновой кислоты декарбонизируются и по структуре приближаются к гидроксиапатиту  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Гели, обработанные гиалуроновой кислотой, образуют прочные сети и формируют фибриллярные узлы повышенной связности, смещая дилатантность в сторону более высоких скоростей и напряжений сдвига. Коллагеновые волокна агрегируют в утолщенные, склонные к расслоению пластинчатые структуры. Расширяются заполненные водой межфибрилярные пространства. Гиалуроновая кислота препятствует аморфизации фибриллярного коллагена, снижает прочность межмолекулярного сцепления и подавляет рост структурных предшественников гидроксиапатита.*

Ключевые слова: коллагеновые гели; фибриллярные узлы; гиалуроновая кислота; пирофосфаты кальция; гидроксиапатит

DOI: 10.31857/S004446182211007X; EDN: GQXVZQ

Коллагенсодержащие материалы, получаемые из различных сырьевых источников, широко используются в материаловедении [1]. Одним из требований, предъявляемых к коллагенсодержащим материалам, предназначенным для использования в клеточной биотехнологии, трансплантологии, комбустиологии, косметологии, а также для лечения трофических язв, является устойчивость фибриллярного коллагена к действию коллагеназ. Повышение устойчивости к коллагеназам принципиально важно при лечении ожоговых ран, в которых высока активность коллагеназ [2, 3]. Основным способом повышения устойчивости коллагена к протеолитическому действию является применение сшивающих химических агентов. Чаще всего используют глутаровый альдегид, но его применение ограничено из-за сенсибилизации организма к альдегидам, содержащимся в том числе в различных парфюмерных и косметических средствах. Поэтому поиск других сшивающих агентов остается достаточно актуальным.

Известно, что гиалуроновая кислота повышает устойчивость фибриллярного коллагена к литическому действию коллагеназ [4, 5]. Однако механизм этого эффекта в полной мере не изучен, в частности, недостаточно данных о влиянии гиалуронатов на конденсированное состояние, внутримолекулярную динамику и текстуру поверхности коллагеновых фибрилл. Возможно, что механизм защиты гиалуроновой кислотой от литического действия коллагеназ заключается в изменении этих свойств фибриллярного коллагена.

Не менее важным, чем органическая часть коллагенсодержащих материалов, является минеральная фаза, основу которой составляют кальцийфосфаты, переходящие в гель из сухожилий и инкубационных сред в процессе его получения. Понимание механизмов структурирования кальцийфосфатов важно для предупреждения формирования продуктов, непредсказуемо изменяющих свойства конечного геля. Если гель предназначен для внесения в ожоговую рану, то присутствующие в нем нерастворимые кальцийфосфаты (например, гидроксиапатит) могут способствовать накоплению в ранах бактериальных патогенов за счет адсорбции их гидроксиапатитом с неоднозначными последствиями для заживления [6, 7]. Неоднозначны последствия применения коллагеновых гелей при лечении диабетических язв, так как кальцийфосфаты могут усугубить локальную кальцификацию вплоть до оссификации микрососудов [8, 9]. В то же время коллагеновый гель, предназначенный для остеопластики с химически активными кальцийфосфатами, содержащими  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,

$\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{OH}^-$ -ионы, при введении в костный дефект усилит регенераторный остеогенез [10].

Цель работы — оценка влияния гиалуроновой кислоты на характеристики конденсированного состояния, внутримолекулярной динамики, структуры фибриллярного коллагена и его сетей, процессов структурирования кальцийфосфатов в геле, полученном из соединительнотканного биоматериала.

### Экспериментальная часть

Технологическим основанием получения коллагенового геля являются достаточно высокий выход коллагенового белка, извлекаемого из первичного сырья (сухожилий), эффективность уксуснокислой экстракции, непродолжительность производственного цикла (3–4 нед), невысокая себестоимость, пригодность к хранению промежуточных и конечных продуктов. Сырьевой биоматериал (паравертебральные сухожилия хвостов крыс) получали из питомника «Рапполово» РАН, где животных содержали, подвергали эвтаназии и утилизировали в соответствии с требованиями «Положения о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании» от 24.07.2000 № 554.\*

Образцы сухожилий получали путем биопсии хвостов половозрелых самцов крыс Вистар массой тела 300–350 г. До начала препарирования биоматериал хранили в охлажденном состоянии при температуре  $+6^\circ\text{C}$  в течение 3–5 сут с момента эвтаназии животных. Сухожилия выделяли по следующему алгоритму: сепарирование кожи, круговой разрез связок, перелом и разделение позвоночника в средней части хвоста, вытягивание сухожильных нитей. Экстракт коллагена получали из сухожильной ткани, которую промывали охлажденным до температуры таящего льда 0.9%-ным раствором  $\text{NaCl}$  (раствор для инфузий  $9 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ , СП ООО «Фармлэнд») и далее экстрагировали коллаген уксусной кислотой (х.ч. ледяная, АО «База № 1 Химреактивов») по способу [11]. Стоковый раствор коллагена с конечной концентрацией  $2 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$  разводили Питательной средой 199 с L-глутамином (ООО «БиолоТ»), нейтрализовали  $0.34 \text{ M NaOH}$  (х.ч., ООО «СГС Хим») и помещали на 30 мин в  $\text{CO}_2$ -инкубатор (Galaxy 170R, New Brunswick) при  $37^\circ\text{C}$  для гелеобразования. Коллагеновые экстракты и гели хранили в холодиль-

\* Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации «Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил и норм СанПиН 2.3/2.4.3590-20» от 27.10.2020, № 32.

нике при  $+6^{\circ}\text{C}$  и непосредственно перед анализом выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин. Коллагеновые гели обрабатывали препаратом Гилартен (S.C. Rompharm Comrani S.R.L.), который содержит 2.0% гиалуроновой кислоты ( $M_r \approx 1\text{--}2$  МДа) высокой степени очистки, без животных белков, стабилизированной входящим в состав препарата 0.5%-ным раствором маннитола. Длительность обработки Гилартеном составляла 24 ч при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ . Образцы распределены в три группы: 1 — экстракты коллагена, 2 — коллагеновые гели нативные, 3 — коллагеновые гели, обработанные Гилартеном (1 мкг гиалуроновой кислоты на 1 мл геля).

Сканирующую электронную микроскопию проводили с использованием образцов объемом 10–15 мкл, которые наносили на обезжиренные покровные стекла равномерным тонким слоем; мазок высушивали при комнатной температуре на воздухе, фиксировали в парах 1.5%-ного глутарового альдегида (25%, Thermo Scientific Chemicals, кат. номер MFCD00007025) в течение 30 с; обезвоживали в водных растворах этанола (96.4% ректифицированный, ОАО «Минск кристалл») восходящей концентрации 15, 30, 45, 60, 75% по 10 с, 90% — 5 с, 96% (1, 2) по 1 с. Растворы глутарового альдегида и этанола приготовлены на деионизованной воде (система очистки Millipore Direct Q 3) для предотвращения артефактного осаждения кальцийфосфатов. Исследование выполнено на сканирующем электронном микроскопе LEO 1420 (Carl Zeiss) после напыления золотом на установке K550X (Emitech).

Атомно-силовая микроскопия выполнена на микроскопе NT-206 (ОДО «Микротестмашины»). Образцы в виде тонкой пленки наносили на стеклянные покровные стекла и высушивали при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 2–3 мин. Использовали стандартные кремниевые кантилеверы NSC 11 A с жесткостью  $3.0 \text{ Н}\cdot\text{м}^{-1}$  (MikroMasch) с радиусом кривизны 10 нм и комплекс с программой Surface Scan. Нагрузка кантилевера на поверхность образца составляла  $<100 \text{ нН}$ , режим сканирования контактный с латеральным разрешением  $256 \times 256$  точек. Изображения визуализировали с применением опций Surface Explorer, Flattering, Pulse filter, Profile и определяли профили поверхности. Адгезиометрию провели в точках по кривым отвода–подвода. Реологические измерения проводили на вискозиметре Брукфильда (Brookfield DV-11+Pro) при  $37^{\circ}\text{C}$  в интервале скоростей сдвига вязкости ( $\text{мПа}\cdot\text{с}$ )  $0.1\text{--}100 \text{ с}^{-1}$ , ротационную камеру заполняли коллагеновым гелем.

Рентгенофазовый анализ проводили на влажных (1.0 мл геля наносили на кювету) и отожженных

при  $500^{\circ}\text{C}$  в течение 3 ч образцах на дифрактометре ADVANCE D8 (Bruker) при  $\text{Cu}_{K\alpha} = 0.15405 \text{ нм}$  в диапазоне углов  $2\theta$   $10^{\circ}\text{--}60^{\circ}$  с шагом  $0.01^{\circ}$  и использованием базы данных ICDD PDF-2. Термический анализ выполнен на дериватографе STA 409 PC LUXX (Netzsch) при скорости потока воздуха  $50 \text{ мл}\cdot\text{мин}^{-1}$  (объем образца 0.2 мл). ИК-спектроскопию выполняли во влажном (в виде тонкой пленки на стандартной стальной подложке) и твердотельном (3 мг геля наносили на таблетку KBr массой 800 мг) вариантах на ИК-Фурье-микроскопе Hyperion (Bruker) в режиме отражения в диапазоне  $8000\text{--}2000 \text{ см}^{-1}$  с применением 15-кратного Gig-объектива. Спектры регистрировали на ИК-спектрометре Tensor-27 (Bruker) в диапазоне  $4000\text{--}400 \text{ см}^{-1}$ .

### Обсуждение результатов

Плотная фракция гелей представлена 2–3-слойной сетью фибриллярного коллагена, петли которой захватывают дисперсную среду с частицами детрита и кальцийфосфатов. Структура сети неоднородная: на основном протяжении непрерывная, но присутствуют разрывы и очаги уплотнения (рис. 1, а). Это отражает неравномерность структурных преобразований гелей в ходе гелеобразования. В разрывах межфибрилярное пространство заполнено обрывками коллагеновых фибрилл и частицами коагулятов. В уплотнениях ячейки сети уменьшаются в размерах, волокна упаковываются в тщи толщиной  $0.5\text{--}1.5 \text{ мкм}$  (рис. 1, б). Кроме того, имеются и обширные участки гомогенизации коллагеновых волокон с признаками деструкции (рис. 1, в). Основной формой поровых структур волоконной фракции являются межфибрилярные щели (размерами  $\sim 164 \pm 10 \times 418 \pm 20 \text{ нм}$ ), заполненные частицами кальцийфосфатов, а также дебрисом (рис. 1, г). Происхождение и состав дебриса не ясны. Возможно, это остатки неполного лизиса клеток и полимеров внеклеточного матрикса, а также частичного растворения кальцийфосфатов при взаимодействии с уксусной кислотой, что предполагает нейтрализацию отрицательно заряженных карбоксильных групп белковых структур, фосфатных и гидрофосфатных ионов, а также снижение степени гидратации. Именно дегидратацией объясняется сухой распад, который электронно-микроскопически обнаруживается в виде множественных трещин коллагеновых тяжей. Минимальная толщина фибрилл изменяется в пределах  $\sim 150 \text{ нм}$ , что соответствует субфибрилярному уровню организации коллагеновых волокон. В сетевой структуре гелей выявляются утолщенные участки в области схождения разнона-



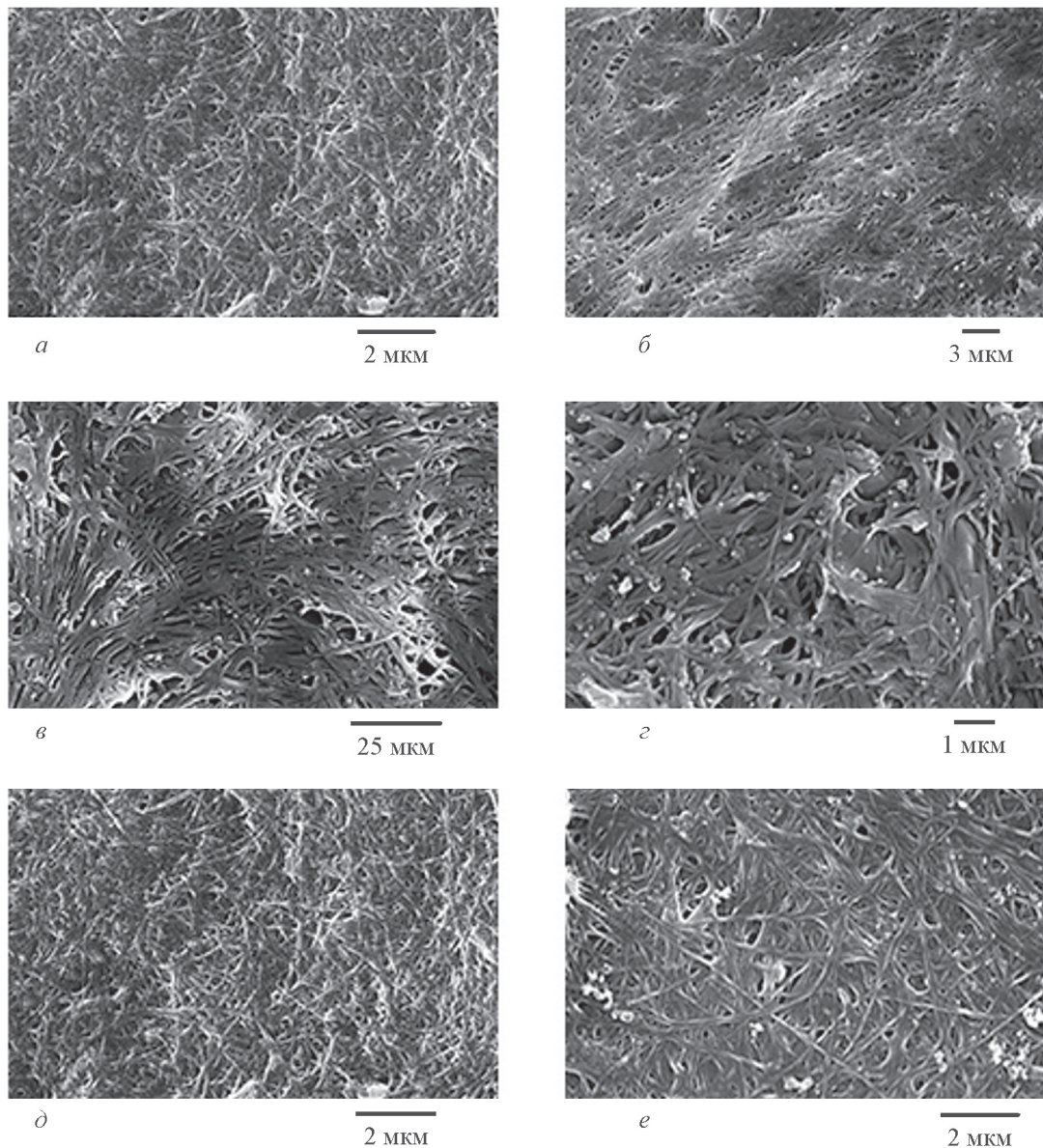


Рис. 1. Микрофотографии фибриллярного коллагенового геля.

*a* — непрерывная сеть фибриллярного коллагена; *б* — участки коллабирования сети и упаковки волокон в тяжи; *в* — очаг гомогенизации коллагеновых волокон с признаками деструкции; *г* — межфибриллярные щели, заполненные частицами кальцийфосфатов и дебрисом; *д* — фибриллярные узлы в виде утолщенных участков в области схождения разнонаправленных коллагеновых субфибрилл; *е* — утолщенные и деформированные фибриллярные узлы в геле, обработанном гиалуроновой кислотой.

правленных коллагеновых субфибрилл (рис. 1, *д*). Морфологически эти участки представляют собой редуцированный вариант фибриллярных узлов зрелой сухожильной ткани, которые являются центрами механорецепции и регулируют распределение механических нагрузок. Коллагеновые фибриллы в срединных участках узлов уплотнены и гомогенизированы, что свидетельствует о неслучайном их появлении. Показатель связности ( $r$ ) узлов изменяется в

пределах 3–5 (в исходных сухожильных пучках 3–4), что свидетельствует о снижении пластичности сетевой структуры [12].

Гиалуронат оказывает ретрактирующее воздействие на структуру плотной фазы геля — межфибриллярные щели расширяются и укорачиваются: 140 и 293 нм соответственно, фибриллы истончаются до 128 нм. Поверхность фибрилл сглаживается за счет покрытия гиалуронатом тонкой пленкой (сэн-

двич-эффект). Гиалуронат увеличивает связность коллагеновых фибрилл (показатель  $r$  возрастает до 6–7) и деформирует структуру фибриллярных узлов, которые утолщаются, местами растрескиваются и обрываются, поверхность гофрируется (рис. 1, *e*). Однозначных сведений о влиянии подобных подложек на скорость миграции и пролиферацию фибробластов нет. Подложки с подобной структурой поверхности сдерживают миграцию клеток [13]. В объемных средах внеклеточного матрикса гиалуронат в большей мере модулирует гидродинамические потоки интерстициальной жидкости — модуль упругости уменьшается, сопротивление коллагеновых волокон к сжатию увеличивается, но это увеличивает дисбаланс механических сил между клеткой и внеклеточным матриксом [14].

В коллагеновом геле визуализируется доменная организация фибрилл коллагена I типа (рис. 2, *a*). Мезоструктура коллагеновых фибрилл изменяется в пределах 100 нм по высоте и 150–200 нм по ширине. Длина нитей находится в пределах 0.5–5.0 мкм. Визуализируются 2–3 слоя фибриллярной фракции. Межфибрилярное пространство заполнено вязкой бесструктурной интерстициальной жидкостью (рис. 2, *b*).

Волокна в образцах коллагенового геля, обработанных гиалуроновой кислотой, покрыты тонкой пленкой межклеточного вещества (рис. 2, *в*), которая размывает контуры доменной организации фибриллярного коллагена. Механизмы взаимодействия гиалуроната с фибриллярным коллагеном не ясны. В биомиметических средах гиалуронат натрия адсорбируется на белковых матрицах по типу полярных пленок Ленгмюра с последовательным снижением поверхностного натяжения адсорбционного слоя, насыщенного гиалуронатом [15]. Это подтверждается данными атомно-силовой микроскопии, согласно которой установлено равномерное растекание экстрафибрилярного матрикса (пересыщенного гиалуронатом) по поверхности коллагеновых волокон. Гиалуронат увеличивает подвижность и способность тканевого флюида проникать вглубь, расслаивать коллагеновые волокна и пропитывать многослойные сухожильные пучки. Увеличение подвижности и проникающей способности экстрафибрилярной жидкости, возможно, обусловлено изменением свойств гиалуроната, который может трансформироваться в высокомолекулярный полугибкий полимер с разорванной и одновременно воссоздаваемой *de novo* структурой водородных связей [16]. При этом доменная структура коллагеновых фибрилл разупорядочивается, отдельные волокна сжимаются, пучки

рвутся. Сжатие фибриллярных слоев может быть обусловлено быстрой дегидратацией, неизбежно приводящей к уменьшению накопления модуля сдвига и увеличению сопротивления ретракции фибрилл [14, 17]. За пределами коллагеновых волокон, в экстрафибрилярном матриксе вода, наоборот, накапливается вследствие сорбции гиалуронатом: уменьшается плотность упаковки волокон коллагенового каркаса и расширяются поры (рис. 2, *з*). На поверхности волокон присутствуют глобулярные частицы диаметром 0.2–0.5 мкм (рис. 2, *д*), склонные к упорядоченной дислокации, формируя местами квазицепочечные структуры, состоящие из 2–3 агрегированных глобул. Поверхность глобул неоднородная: относительно гладкие участки сочетаются с вторичными везикулами. Очевидно, что морфогенез глобул обусловлен конформационными преобразованиями гиалуроновой кислоты в ходе сорбции воды. О повышенной вододерживающей способности геля свидетельствуют данные локальной адгезиометрии: гидрофильность плотной фазы коллагенового геля, обработанного гиалуроновой кислотой, превышает контрольные значения в 2 раза, составляя 1.8 и 4.0 нН соответственно в образцах коллагеновых гелей нативных и обработанных гиалуроновой кислотой.

Механизм гидратации гиалуроната известен — это образование водородных связей молекулами воды с карбоксильными остатками гиалуроновой кислоты и формирование tandemных водных мостиков [18]. Гиалуроновая кислота, по выражению A. Almond [19], ведет себя как «застывшая случайная катушка» со слоистой гидратной оболочкой и неоднородной молекулярной динамикой: чем дальше от поверхности гиалуроновой кислоты, тем более подвижны молекулы воды [19, 20]. Структура гидратной оболочки в определенной мере подобна структуре вышеописанных глобул (рис. 2, *e*): чем дальше от центра частиц, тем более шероховата поверхность глобул, вязкая кайма которой плавно сливается с окружающей интерстициальной жидкостью.

По данным реологических измерений в среде 199 в диапазоне малых скоростей сдвига достаточно быстро снижается вязкость (практически до вязкости воды), оставаясь стабильно низкой в интервале увеличивающихся скоростей деформации и напряжений сдвига (рис. 3). Гиалуроновая кислота значительно увеличивает исходную вязкость среды (в 30 раз) и резко ее уменьшает в интервале постоянных значений напряжений деформации сдвига, но в интервале роста сдвиговых напряжений стабилизирует ее текучесть (рис. 3). Реологическое поведение среды 199 свидетельствует о том, что в интервалах малых де-



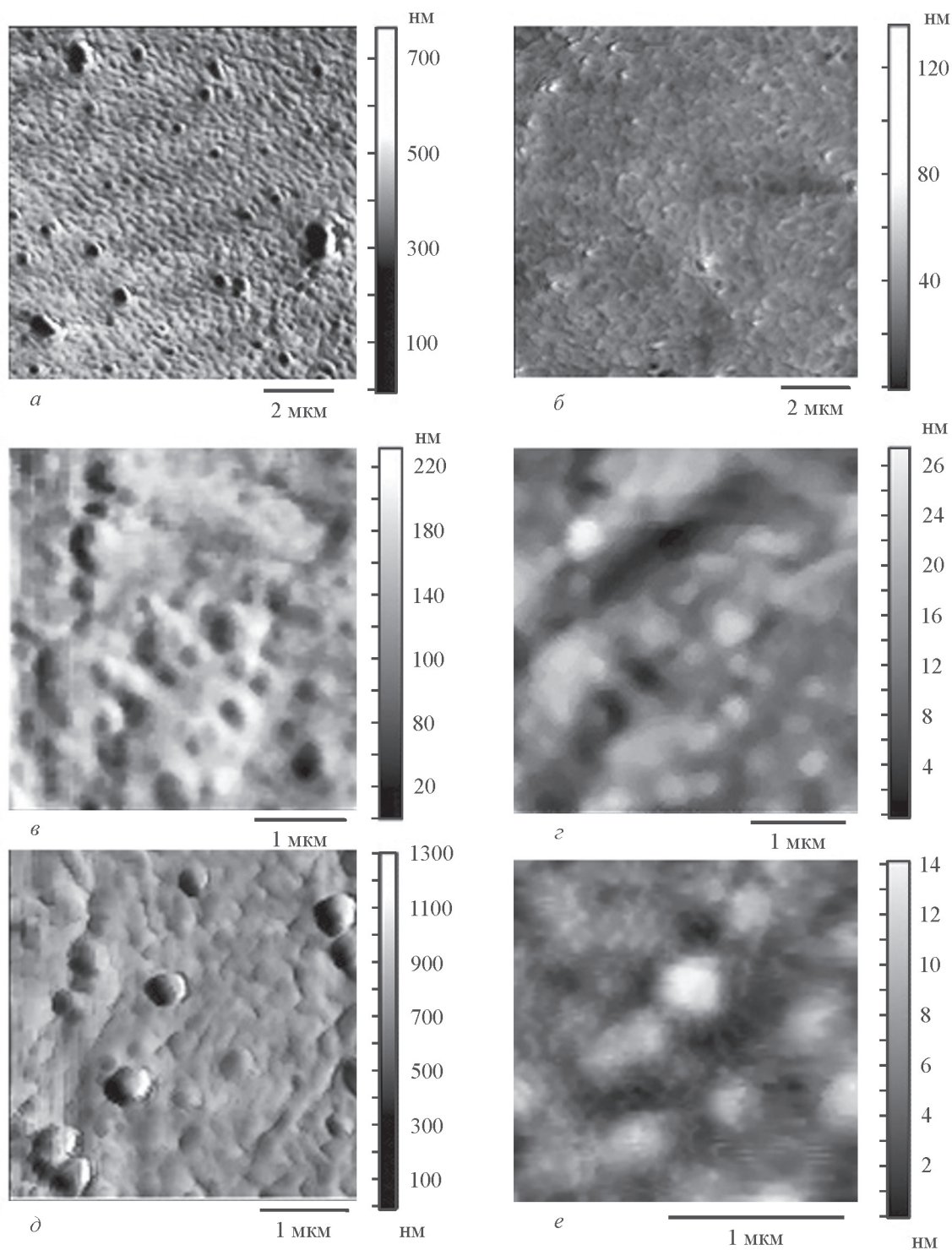


Рис. 2. Микрофотографии коллагенового геля.

*a* — мезоструктуры, собранные в фибриллы, отражающие доменную организацию коллагена I типа; *б* — межфибрилярное пространство, заполненное вязкой бесструктурной интерстициальной жидкостью; *в* — пленка межклеточного вещества с контурирующими доменами фибриллярного коллагена; *г* — расширение пор экстрафибрилярного матрикса геля, обработанного гиалуроновой кислотой; *д* — глобулярные частицы на поверхности гиалуронатной пленки; *е* — структура глобул, уплотненная в центре с рыхлой каймой по периферии в геле, обработанном гиалуроновой кислотой; *а-д* — режим «Латеральные силы» — сканирование в горизонтальном направлении; *г, е* — режим «Топография» — сканирование в вертикальном направлении.

формаций (близких к физиологическим) проявляются свойства тиксотропности. При увеличении механической нагрузки появляется прямая пропорциональная зависимость напряжения от скорости сдвига (рис. 3), свидетельствующая о том, что среды превращаются в ньютоновские жидкости. Тиксотропность, выявленная в виде способности сред к уменьшению вязкости при постоянном напряжении сдвига, является полезным технологическим эффектом: за счет возросшей текучести появляется возможность фильтровать полимерные растворы при постоянном давлении без нарушения структуры геля, а после снятия напряжения воспользоваться способностью тиксотропных жидкостей к восстановлению вязкости до сгущения искомой консистенции, например гелеобразование. В большей мере это необходимо учитывать при манипуляциях со средой 199, содержащей гиалуроновую кислоту, которая в водных растворах стремится к формированию нитчатых, пластинчатых и трубчатых структур, безусловно увеличивающих вязкость. При этом появляется и столь важное свойство гиалуроновой кислоты, как разделение межфазовых границ, что термодинамически делает выгодным формирование мембран на границах разделов — неслучайно гликозаминогликаны вообще и гиалуроновая кислота, в частности, входят в состав базальных мембран. Не менее важным свойством тиксотропности является приближение реологических характеристик исследованных сред — базовых технологических реагентов — к реологическим качествам внутриклеточной (цитоплазматической) жидкости. Тиксотропность при длительном покое образца может вызвать нежелательное сгущение, трудно предсказуемую зависимость

исходной текучести от состава, структуры и степени дисперсности плотной фазы, неясности с ограничением подвижности и способностью к диффузии.

Введение фибриллярного коллагена в среду 199 ожидаемо повышает вязкость раствора полимера непропорционально скорости течения и динамике напряжения сдвига (рис. 3). Реограммы демонстрируют псевдопластичное поведение в виде понижения эффективной вязкости с увеличением скорости сдвига. При этом в исходном геле на средних скоростях сдвига появляется кратковременный скачок вязкости, сопровождающийся столь же скачкообразным ростом напряжения сдвига (рис. 3), что указывает на дилатантность. Гель, обработанный гиалуроновой кислотой, также проявляет дилатантность, но при более высоких скоростях и напряжении сдвига (рис. 3). Следовательно, гиалуроновая кислота упрочняет связи в плотной фазе коллагенового геля, что может быть обусловлено реологическими свойствами гиалуроновой кислоты, а также особенностями структуры молекулы гиалуроновой кислоты в водных растворах и ее взаимодействиями с коллагеновым полимером. Реологические свойства гиалуроновой кислоты в значительной мере определяются кислотностью водных растворов. В частности, в кислом растворе за счет протонирования карбоксильных и ацетамидных групп и вследствие уменьшения заряда полимера усиливаются кооперативные взаимодействия с образованием упрочненных внутримолекулярных и межмолекулярных водородных связей. В результате увеличивается вязкость раствора гиалуроновой кислоты и образуются объемные частицы. При pH 2.5 в присутствии гиалуроновой кислоты соли переходят в вязкоупру-

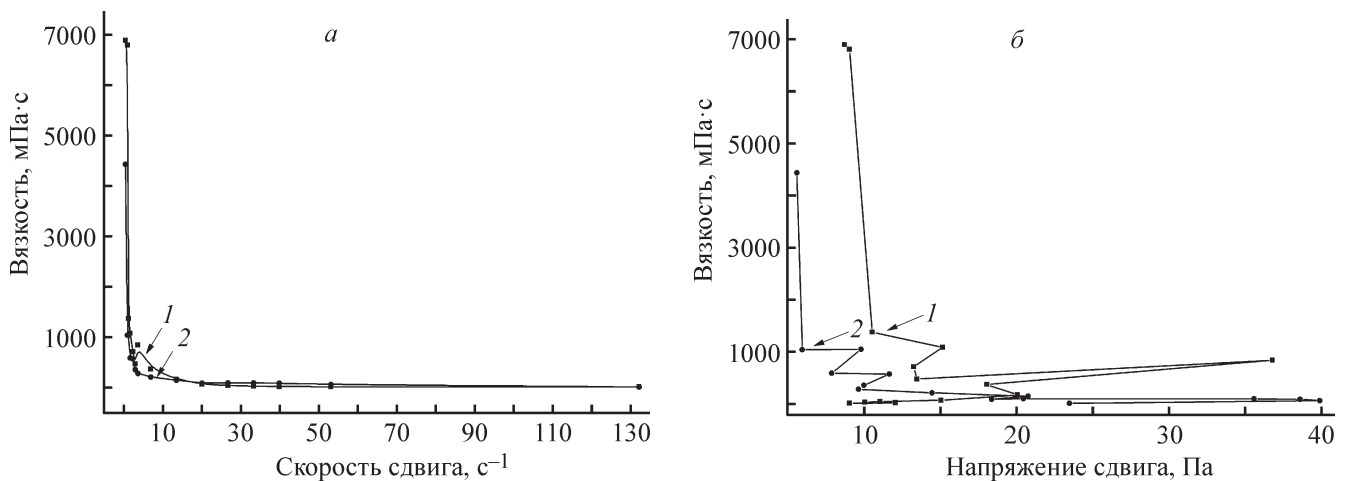


Рис. 3. Реограммы коллагеновых гелей.

*a* — зависимость вязкости от скорости сдвига, *б* — зависимость вязкости от напряжения сдвига; 1 — нативный коллагеновый гель; 2 — коллагеновый гель, обработанный гиалуроновой кислотой.

гое состояние [21]. При нейтральном pH гиалуроновая кислота полимеризуется [22]. Гиалуронатам в водных растворах свойственно формировать разветвленные сетчатые структуры. Отметим, что в данном исследовании использовали довольно сильное разбавление (менее  $1 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ ) гиалуроновой кислоты, и тем не менее она проявляет выраженную способность формировать сетчатые структуры, склонные к запутыванию. При этом чем длиннее молекула, тем более разветвлены ее цепи [23, 24].

На дифрактограммах образцов гелей наблюдаются рефлексы рентгеноаморфных гало органической и минеральной фаз (рис. 4, а).

На рентгенодифрактограммах экстракта коллагена и нативных образцов геля позиции пиков гало не изменяются и их положения в диапазоне  $21.3^\circ$  и  $21.2^\circ$  близки к положениям пиков гало нативных сухожильных пучков ( $21.1^\circ$ ), а также пиков гало образцов коллагеновых гелей, обработанных гиалуроновой кислотой соответственно (рис. 4, а, кривые 1–3). Восходящие крылья рефлексов гало коллагенового экстракта и геля смещаются в широкоугольную область, сдвигаясь от  $12.8^\circ$  в сухожильных пучках до  $14.7^\circ$  в экстракте и  $14.8^\circ$  в геле (рис. 4, а, кривые 1–3). Такого рода сдвиги указывают на увеличение вклада упругого рассеяния, обусловленные ростом дальнего порядка, и свидетельствуют о том, что в ходе гелеобразования нарастает упорядоченность фибриллярного коллагена. В образцах геля, обработанных гиалуроновой кислотой, пик гало и восходящее крыло смещены в широкоугольную область (к  $21.5^\circ$  и  $15.6^\circ$

соответственно), что свидетельствует об углублении упорядочивающего действия гиалуроновой кислоты в отношении фибриллярного коллагена (рис. 4, б, кривая 5). При отжиге гелей до  $500^\circ\text{C}$  пик гало и восходящее крыло смещаются в малоугловую сторону (рис. 4, а, кривая 4), что указывает на увеличение размеров кристаллических решеток и росте ближнего порядка, свойственное стабильно аморфным кристаллическим телам. В гелях, обработанных гиалуроновой кислотой, рефлексы, наоборот, смещаются в широкоугольную область к  $21.9^\circ$  и  $26.8^\circ$  соответственно (рис. 4, б, кривые 5, 6). Это свидетельствует об уменьшении размеров кристаллических решеток и росте дальнего порядка, что свойственно кристаллическим стабильно твердым телам. Гиалуроновая кислота за счет сшивающего действия препятствует аморфизации фибриллярного коллагена и удерживает его в относительно окристаллизованном состоянии.

В экстрактах коллагена рефлексы минеральной фазы отсутствуют (рис. 4, а, кривая 2). На дифрактограммах нативных образцов геля в характеристичных диапазонах наблюдаются выходы рефлексов (рис. 4, а, кривая 3) неорганических гидратированных пирофосфатов кальция  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  и гидроксиапатита  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Соотношение рефлексов минеральной фазы в образцах коллагеновых нативных гелей и образцах гелей, обработанных гиалуроновой кислотой, свидетельствует о явном переходе компонентов структурирующихся кальцийфосфатов при добавлении среды 199 в экстракт. В нативных гелях пирофосфаты кальция присутствуют в рентгеноамор-

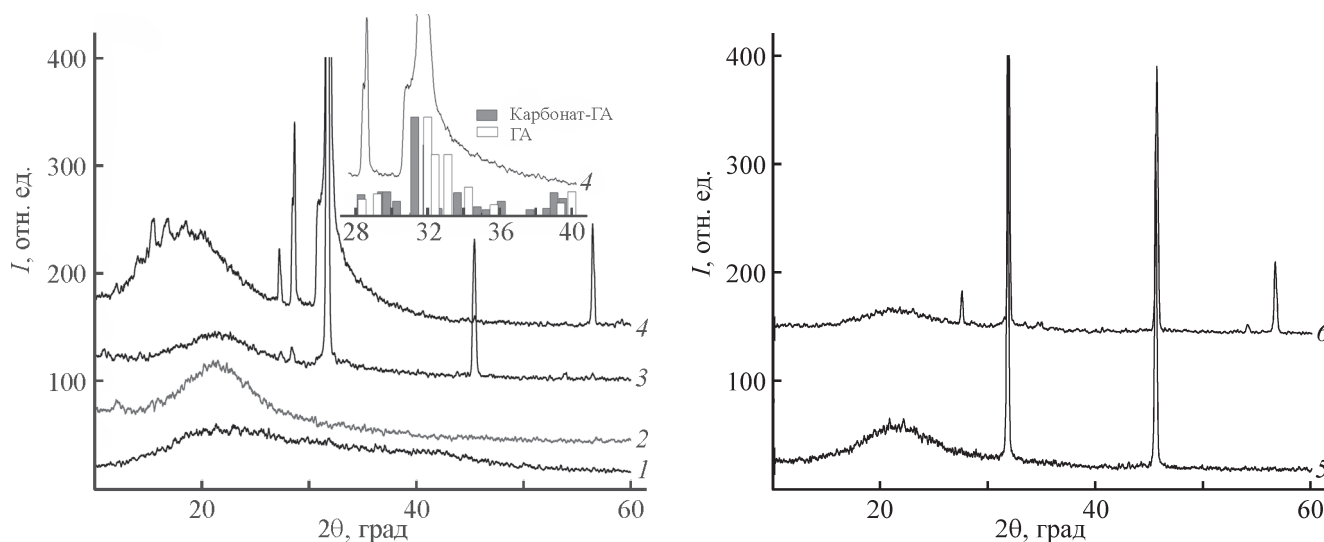


Рис. 4. Дифрактограммы образцов.

1 — сухожильные пучки; 2 — экстракт коллагена; 3 — коллагеновый гель; 4 — коллагеновый гель, термообработанный при  $500^\circ\text{C}$ ; 5 — коллагеновый гель, обработанный гиалуроновой кислотой; 6 — коллагеновый гель, обработанный гиалуроновой кислотой и термообработанный при  $500^\circ\text{C}$ .



фном состоянии, возможно, в форме моноклинных фенотипов. Известно, что моноклинные фенотипы пирофосфатов кальция активируют синтез гидроксиапатита [25]. Об этом свидетельствуют данные дифрактограмм: расширение основания характеристического рефлекса гидроксиапатита за счет удлинения, подъема и деформации его нисходящего крыла (рис. 4, а, кривая 3), что можно расценить как один из признаков начинающейся кристаллизации. В образцах гелей, обработанных гиалуроновой кислотой, рефлексы пирофосфатов кальция не регистрируются (рис. 4, б, кривая 5), а в отожженных образцах появляется слабый пик, смещенный в малоугловую область (рис. 4, б, кривая 6), что свидетельствует о склонности к агрегации пирофосфатов кальция с формированием химически неактивных триклинных форм пирофосфатов кальция, синтез которых в соответствии с отношением кальцийфосфат/пирофосфат кальция тем более активен, чем меньше концентрация пирофосфатов кальция [26]. Гиалуроновая кислота, по-видимому, связывает кальцийфосфаты, способствует их фиксации на органических макромолекулах и оказывает конденсирующее влияние на пирофосфаты кальция. Сочетание этих факторов приводит к уменьшению отношения кальцийфосфат/пирофосфат кальция, что, согласно [27], ингибирует синтез гидроксиапатита. О том, что в геле, обработанном гиалуроновой кислотой, не синтезируется гидроксиапатит *de novo*, свидетельствуют структурные особенности дифрактограмм апатитового комплекса: в нативных и отожженных образцах характеристичные рефлексы гидроксиапатита имеют острые, узкие на полувысотах пики и дополнительные рефлексы (рис. 4, б, кривые 5, 6). Это признаки структурной стабильности гидроксиапатита, агрегированного в укрупненные частицы. Механизмы ингибирующего действия гиалуроната в отношении синтеза гидроксиапатита во многом неясны, хотя известно, что химическое сродство протеогликанов с гидроксиапатитом довольно слабое — они могут лишь частично блокировать активные центры эпитакии на поверхности матриц и замедлять рост гидроксиапатита за счет увеличения объема адсорбата и стерических помех [28–30]. Не менее важен и механизм связывания поверхностных катионов гидроксиапатита карбоксильными полианионами гиалуроновой кислоты, что одновременно усиливает когезию, пластифицирует и сдерживает распад кристаллов кальцийфосфатов [31].

Скорость потери массы водной фазы в нативном геле выше, чем в экстракте коллагена: 87.2 и 76.4% соответственно. При этом снижается температура кипения 128°C в экстрактах до 124°C в гелях.

Приведенные значения показателей теплофизического поведения свидетельствуют о том, что вода, содержащаяся в гелях, в сравнении с таковой в экстрактах коллагена более подвижна и гипотонична. Увеличение подвижности, возможно, обусловлено кислотной гидрофобизацией поверхностей коллагеновых фибрилл, что повышает несмачиваемость плотной фазы. Гипотоничность, в свою очередь, явное следствие снижения осмолярности геля в связи с агрегацией тропоколлагена, усиливающейся в ходе гелеобразования. В гелях, обработанных гиалуроновой кислотой, значительно возрастают скорость потери массы (до 95.3%) и температура кипения (до 131°C) водной фазы, а температура экзотермических эффектов, наоборот, снижается до 428.5°C (в нативном геле 460.4°C). Это означает, что гиалуроновая кислота понижает осмолярность интерстициальной воды, возможно, за счет пропитывания и неизбежной агрегации коллагеновых субфибрилл. Не менее важно и дезинтегрирующее воздействие гиалуроновой кислоты на взаимодействие в системе вода–коллагеновые волокна по механизму уменьшения плотности водородных связей вследствие протонирования карбоксильных групп обоих участников сопряжения. Отсюда и вышеупомянутое снижение температуры экзотермических эффектов. Учитывая эти обстоятельства, морфометрические данные сканирующей электронной микроскопии о продольной ретракции коллагеновых волокон и увеличении пористости плотной фазы, а также результаты атомно-силовой микроскопии о двукратном повышении адгезивности тканевой жидкости, можно уверенно предположить, что ведущим механизмом обводнения геля гиалуроновой кислотой является набухание интерстиция.

Органическая фракция коллагеновых экстрактов и гелей представлена интенсивными полосами амидного комплекса\* в характеристичных позициях (табл. 1). В результате кислотной экстракции коллагена в условиях нагрева до 37°C положения полос амидов I и III смещаются в высокочастотную область относительно соответствующих показателей исходных сухожильных волокон (табл. 1). Высокочастотные сдвиги амида I свидетельствуют об упрочнении связей, что обусловлено уменьшением расхода карбонильных групп трипептидных центров фибриллярного коллагена на образование водородных связей с водой внутренней гидратной оболочки.

\* Практикум по колебательной спектроскопии: Учебное пособие / Т. Н. Носенко, В. Е. Ситникова, И. Е. Стрельникова, М. И. Фокина. СПб: Университет ИТМО, 2021. С. 126–130.

Таблица 1

Характеристичные частоты молекулярных групп органической фазы коллагеновых экстрактов и гелей по данным ИК-Фурье-микроскопии Hyperion

Вид и состояние образцов	Характеристичные частоты молекулярных групп $\nu$ , см <sup>-1</sup>		
	амид I	амид II	амид III
Нативное сухожилие	1712	1622	1164
Нативный экстракт	1729	1624	1235
Экстракт после выдерживания при 37°C в течение 30 мин	1740	1560	1299
Нативный гель	1674	1595	1344
Гель после выдерживания при 37°C в течение 30 мин	1737	1564	1321
Гель, обработанный гиалуроновой кислотой, после выдерживания при 37°C в течение 24 ч	1639	1563	1342

В свою очередь высокочастотный сдвиг в полосе амида III отражает увеличение прочности пептидных водородных связей между первичными цепями. Характеристичные полосы амида II, наоборот, смещаются в низкочастотную область, что свидетельствует об увеличении углов деформационных колебания N—H и соответственно указывает на разупрочнение пептидных связей в первичной цепи. В нативном геле в сравнении с экстрактом вторичные пептидные цепи более гидратированы — полосы амидов I и II смещены в низкочастотную область. При нагреве позиции полос амидов I и III смещаются в высокочастотную область. При этом как в нативных, так и в прогретых гелях полосы амида II устойчиво демонстрируют низкочастотные тренды (табл. 1).

В ходе кислотной экстракции и гелеобразования в условиях, близких к физиологическим (37°C), фибриллярный коллаген испытывает структурно-механические и конформационные преобразования в виде упрочнения/разупрочнения первичных пептидных цепей, сжатия/расправления межцепочечных пространств. Первичные пептидные цепи по-видимому, наиболее подвижны — сдвиговые деформации синхронно изменяются с повышением/понижением температуры. Вторичные и третичные полипептидные цепи более устойчивы и проявляют обратные зависимости: при упрочнении и соответственно дегидратации третичных цепей разупрочняются и соответственно гидратируются вторичные цепи. Это обусловлено структурно-механическими свойствами тройной спирали фибриллярного коллагена, которые в значительной мере определяются стабилизирующим влиянием гидроксипролина — основного и высокочувствительного регулятора локальной плотности водородных связей [32].

Гидроксипролин упорядочивает внутри- и межцепочечные водные сети. При этом внутрицепочеч-

ные молекулы воды образуют водородные связи с пептидными атомами кислорода, а молекулы воды межцепочечной группы связаны с интерстициальной водой наружных гидратных оболочек. Гидрофобные гетероциклы пролина выступают над тройной спиралью с интервалами 0.2 нм в виде боковых ответвлений, с которыми интерстициальная вода образует клатратные структуры. При дегидратации (например, при повышении температуры) количество межцепочечной воды уменьшается, а пептидные связи удлиняются (примерно на 0.03 нм) за счет складывания, конформационного сжатия пролиновых гетероциклов [33–35]. На ИК-спектрах вышеупомянутая обратная корреляция регистрируется в виде обратных соотношений интенсивностей полос амида III и амида I: при увеличении интенсивности полосы амида III уменьшается интенсивность полосы амида I. Аналогичные трансформации, обусловленные гидратацией, происходят и в первичной структуре гиалуронатов: вновь образованные водородные связи с карбоксильными группами за счет растяжения ОН-групп абсорбированной воды увеличивают подвижность и уменьшают плотность упаковки пирановых циклов [36]. В ИК-спектрах соответственно полосы асимметричных колебаний карбоксилатов смещаются в низкочастотную область (табл. 1). В ходе гелеобразования гиалуронат взаимодействует с фибриллярным коллагеном: сорбирует интерстициальную воду, что истончает наружные водные оболочки протеина (на ИК-спектре регистрируется высокочастотный сдвиг полос амида III) и соответственно удлиняет пептидные связи в первичных и вторичных цепях. На ИК-спектрах регистрируется смещение в низкочастотную область полос поглощений, связанных с амидом I и амидом II (табл. 1).

Минеральная фаза коллагеновых экстрактов и гелей верифицируется присутствием характери-

стичных полос ионов  $\text{PO}_4^{3-}$  апатитового комплекса, а именно: полносимметричные колебания связи  $\text{P—O}$  ( $\nu^1$ ), деформационные валентные колебания  $\text{P—O}$  ( $\nu^3$ ). Кроме того, регистрируются полосы групповых колебательных мод карбонильных групп (рис. 5, а).

В качестве эталонных взяты данные литературы о синтезированных нанокристаллических гидроксиапатитах (табл. 2) [22, 37, 38]. Колебательные моды  $\text{PO}_4^{3-}$  ионов в экстрактах по сравнению с эталонными образцами смещены в низкочастотную область, ближе к позициям полос карбонат-гидроксиапатита (табл. 2). С учетом этого положение полос карбонильных групп, а также увеличение значения индекса карбонизации до 4.1 (отношение интенсивностей полос  $[\text{CO}_3(\nu^3)]/[\text{P—O}(\nu^3)]$ ) свидетельствует о том, что в экстрактах гидроксиапатит карбонизирован.

Полосы  $\text{PO}_4^{3-}$  на ИК-спектрах гелей, и нативных, и прогретых, смещены в высокочастотную область, что свидетельствует о приближении гидроксиапатита к его стехиометрической форме (рис. 5, б; табл. 2). Одновременно с этим снижается индекс карбонизации до 2.2, а также уменьшается количество полос карбонильных групп. В ходе гелеобразования экстрактов гидроксиапатит декарбонируется. В ИК-спектрах гелей, обработанных гиалуроновой кислотой, полосы поглощения апатитового комплекса в еще большей мере смещены в высокочастотную область и соответственно еще более приближаются к полосам на ИК-спектрах нанокристаллического гидроксиапатита. Данные смещения полос происходят при уменьшении интенсивности полос, относящихся к карбонильным группам, при падении индекса карбонизации до 2.6 и увеличении доли структурных

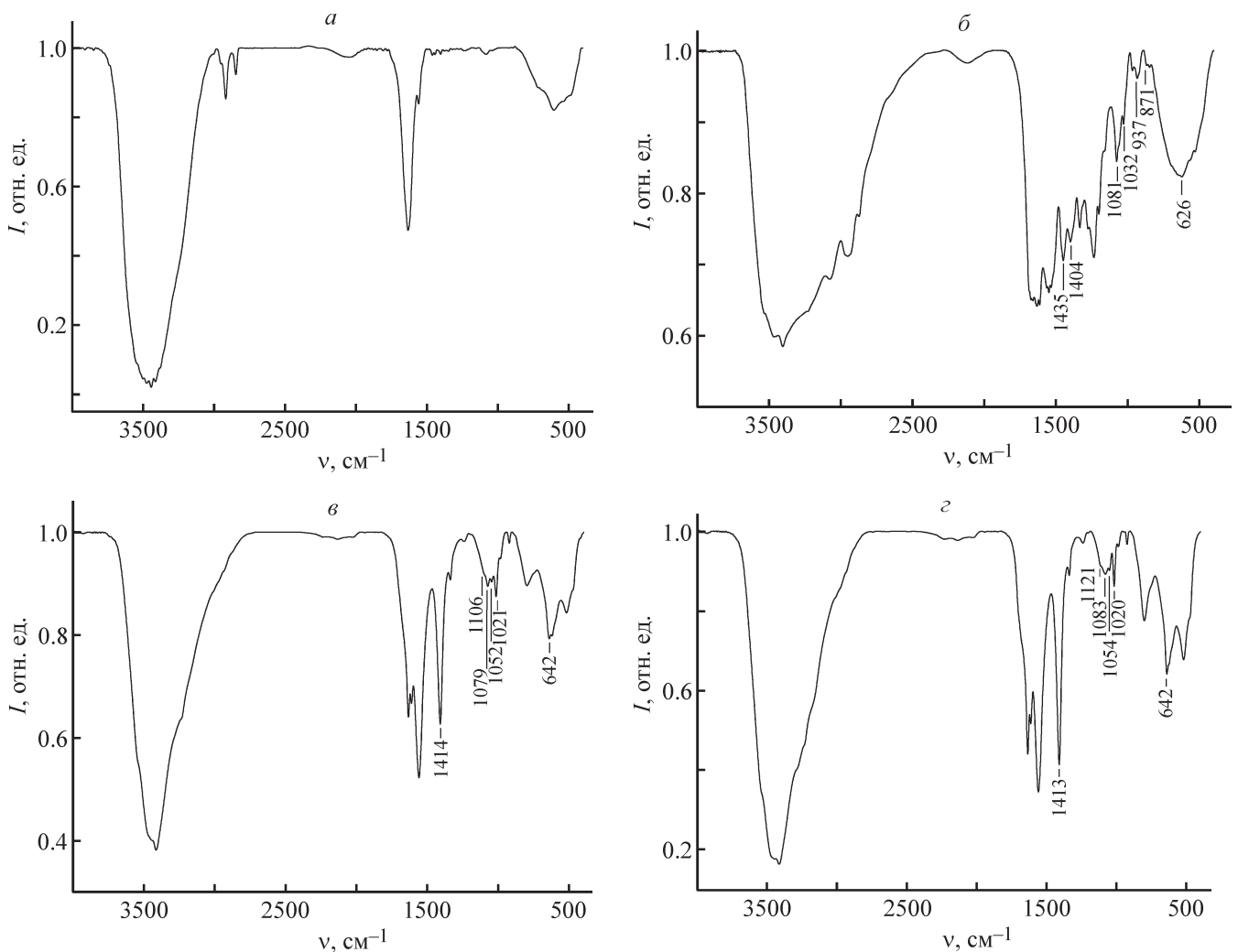


Рис. 5. ИК-спектры образцов.

а — сухожильные пучки нативные; б — экстракт коллагена; в — коллагеновый гель; г — коллагеновый гель, обработанный гиалуроновой кислотой.



Таблица 2

Характеристичные частоты молекулярных групп неорганической фазы коллагеновых экстрактов и гелей по данным ИК-спектроскопии в среде КВг

Вид и состояние образцов	Характеристичные частоты молекулярных групп $\nu,^* \text{ см}^{-1}$						
	СО <sub>3</sub> групповая ( $\nu^3$ )		СО <sub>3</sub> асимметричные	ОН структурная	РО <sub>4</sub> растяжения ( $\nu^1$ )	РО <sub>4</sub> изгиба ( $\nu^3$ )	
Стехиометрический гидроксиапатит	875 <sup>1</sup>	1429 <sup>1</sup>	1460 <sup>1</sup>	650 <sup>2</sup>	1029 <sup>2</sup>	1050 <sup>1</sup>	1090 <sup>1</sup>
Карбонат-гидроксиапатит	875 <sup>3</sup>	1410 <sup>3</sup>	1450 <sup>3</sup>	631 <sup>3</sup>	962 <sup>2</sup>	1040 <sup>3</sup>	1090 <sup>3</sup>
Нативное сухожилие	717	1407	1446 1456	607	—	1044	1085
Экстракт после выдерживания при 37°C в течение 30 мин	871	1404	1453	626	937	1032	1081
Нативный гель	—	1414	—	646	1021	1052	1079
Гель после выдерживания при 37°C в течение 30 мин	—	1414	—	642	1021	1052	1079 1106
Гель, обработанный гиалуроновой кислотой, после выдерживания при 37°C в течение 24 ч	—	1413	—	642	1020	1054	1083 1121

Примечание. «—» — отсутствие полос.

\* Литературный источник: 1 — [22], 2 — [37], 3 — [38].

ОН-групп до 1.25 ( $[OH]/[P-O(\nu^3)]$ ), что свидетельствует об интенсивных карбонатных замещениях в В-положениях в анионных подрешетках гидроксиапатита [38]. Вышеприведенные данные согласуются с данными рентгенофазового анализа о выявлении в гелях, обработанных гиалуроновой кислотой, кристаллизованного гидроксиапатита. Возможно, в связи с дегидратацией наружных оболочек коллагеновых волокон активируется изотермическая кристаллизация гидроксиапатита. Удалению воды из межцепочечных пространств коллагеновых фибрилл способствует гиалуронат, что объясняет ускорение кристаллизации гидроксиапатита. Таким образом, в ряду экстракт–гель нативный–гель, обработанный гиалуроновой кислотой, наблюдается последовательная декарбонизация гидроксиапатита, что способствует последовательному снижению растворимости и химической активности гидроксиапатита.

### Выводы

Коллагеновый гель, полученный из сухожилий с применением ацетатной экстракции, концентрированной инкубационной среды, очищенной от белков плазмы крови с помощью многоэтапного диализа, сохраняет сетевую структуру с формирова-

нием фибриллярных узлов повышенной связности, уменьшающих пластичность конечного продукта. В ходе гелеобразования нарастает упорядоченность фибриллярного коллагена как стабильно аморфного тела, волокна достигают предельной дисперсности на уровне субфибрилл, сохраняют характерную доменную организацию. При температурах 37–40°C гель проявляет дилатантность, сопровождающуюся скачкообразным повышением вязкости на малых и средних скоростях сдвига. При гелеобразовании фибриллярный коллаген подвергается внутримолекулярным структурно-механическим и конформационным преобразованиям в виде неравномерного упрочнения/разупрочнения первичных пептидных цепей, сжатия/расправления межцепочечных пространств, гидратируются внутренние и дегидратируются внешние водные компартменты. Кальцийфосфаты по мере созревания геля структурируются в пирофосфаты кальция и гидроксиапатиты с различной химической активностью.

Гиалуроновая кислота ретрактирует и агрегирует субфибриллы, расслаивает толстые тяжи, увеличивает пористость каркаса, деформирует фибриллярные узлы и значительно повышает их связность; препятствует аморфизации фибриллярного коллагена, удерживая его в кристаллизованном состоянии; кон-

денсует пирофосфаты кальция; подавляет рост и усиливает когезию кристаллов гидроксиапатита, переводя его в химически малоактивную форму. Ключевым эффектом является способность гиалуроновой кислоты повышать когерентность сетей коллагенового каркаса гелей, что позволит оптимизировать миграционное поведение стволовых клеток и контролировать их способность к тканеспецифической дифференцировке в заданных направлениях. Свойство гиалуроновой кислоты сдвигать условия возникновения дилатантности в сторону высоких значений скоростей и напряжений сдвига позволяет снизить риски преждевременного отвердевания коллагеновых гелей, что повышает предсказуемость их механического поведения в регенерирующих ранах. Способность гиалуроновой кислоты повышать кристалличность фибриллярного коллагена укрепляет внеклеточный матрикс, препятствует распространению тканевых отеков и способствует заживлению ожоговых ран и трофических язв.

### Благодарности

Работа выполнена с использованием оборудования ИТМО НАН Беларуси и Института цитологии РАН.

Авторы выражают благодарность к.т.н. Т. А. Кузнецовой и заведующему лабораторией нанопроцессов и технологий д.т.н. С. А. Чижику за помощь в проведении атомно-силовой микроскопии; к.б.н. Л. В. Кухаревой и к.б.н. Ю. А. Нащекиной за получение раствора и геля коллагена.

### Финансирование работы

Работа выполнена при финансовой поддержке государственной программы научных исследований «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия» по заданию 2.1.04.7 на 2021–2025 гг. (ИОНХ НАН Б, НИИ ФХП БГУ, ИТМО НАН Б), Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания № FMFU-2021-0008 (ИНЦ РАН).

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов, требующего раскрытия в данной статье.

### Информация о вкладе авторов

А. А. Гайдаш — разработка методологии получения и исследования свойств образцов сухожилий, коллагеновых экстрактов и гелей методом

ИК-спектроскопии, анализ результатов, полученных сканирующей и атомно-силовой микроскопией, написание статьи, литературный поиск; В. К. Крутько — участие в проведении экспериментов по обработке образцов гиалуроновой кислотой и определению фазового состава; О. Н. Мусская — проведение реологического исследования; О. А. Сычева — проведение термического анализа; Л. В. Кульбицкая — проведение ИК-спектроскопии; Г. Б. Мельникова — проведение атомно-силовой микроскопии; К. В. Скроцкая — проведение сканирующей электронной микроскопии; М. И. Блинова — проведение экспериментов по получению коллагеновых экстрактов и гелей; А. И. Кулак — формулирование задач и цели исследования.

### Информация об авторах

*Гайдаш Александр Александрович*, д.м.н., проф.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2277-4643>

*Крутько Валентина Константиновна*, к.х.н., доцент  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1670-207X>

*Мусская Ольга Николаевна*, к.х.н., доцент  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9821-8969>

*Сычева Ольга Алексеевна*  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9796-1849>

*Кульбицкая Людмила Викторовна*  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5273-7421>

*Мельникова Галина Борисовна*, к.т.н., доцент  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-7523>

*Скроцкая Катарина Владимировна*  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0649-1125>

*Блинова Миральда Ивановна*, к.б.н.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3159-9741>

*Кулак Анатолий Иосифович*, д.х.н., проф., академик НАН Беларуси  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1398-3806>

### Список литературы

- [1] *Jing Xie, Min Bao, Stéphanie M. C. Bruekers, Wilhelm T.S. Huck*. Collagen gels with different fibrillar microarchitectures elicit different cellular responses *ACS // Appl. Mater.* 2017. Interfaces. V. 9. P. 19630–19637. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b03883>
- [2] *Stricklin G. P., Jancic L. Li., Wenczak B. A., Nanney L. B.* Localization of mRNAs representing collagenase and TIMP in sections of healing human burn wounds // *Am. J. Pathol.* 1993. V. 143 (6). P. 1657–1666.
- [3] *Kandhwai M., Behl T., Singh S., Sharma N., Arora S., Bhatia S., Al-Harrasi A., Sachdeva M., Bungau S.* Role

- of matrix metalloproteinase in wound healing // *Am. J. Transl. Res.* 2022. V. 14 (7). P. 4391–4405.
- [4] *Suh H., Lee J.-E.* Behavior of fibroblasts on a porous hyaluronic acid incorporated collagen matrix // *Yonsei Med. J.* 2002. V. 43 (2). P. 193–202. <https://doi.org/10.3349/ymj.2002.43.2.193>
- [5] *Anandagoda N., Ezra D. G., Cheema U. Bailly M., Brown R. A.* Hyaluronan hydration generates three-dimensional meso-scale structure in engineered collagen tissues // *J. Royal Soc. Interface.* 2012. V. 9 (75). P. 2680–2687. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0164>
- [6] *O'Brien W. J., Fan P. L., Loeshe W. J., Walker M. C., Apostolids A.* Adsorption of streptococcus mutans on chemically treated hydroxyapatite // *Dent. Res.* 1978. V. 57 (9–10). P. 910–914.
- [7] *Kolmas J., Groszyk E., Kwiatkowska-Różycka D.* Substituted hydroxyapatites with antibacterial properties // *BioMed Res. Int.* 2014. P. 1–15. <https://doi.org/10.1155/2014/178123>
- [8] *Edmonds M.* Vascular disease in the lower limb in type I diabetes // *Cardiovasc. Endocrinol. Metab.* 2019. V. 8 (1). P. 39–46. <https://doi.org/10.1097/XCE.0000000000000168>
- [9] *Hayden M. R., Tyagi S. C., Kolb L., Sowers J. R., Khanna R.* Vascular ossification — calcification in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, chronic kidney disease, and calciphylaxis — calcific uremic arteriolopathy: The Emerging role of sodium thiosulfate // *Cardiovasc. Diabetol.* 2005. P. 1–22. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-4-4>
- [10] *Laydi F., Rahouadj R., Cauchois G., Stoltz J-F., de Isla N.* Hydroxyapatite incorporated into collagen gels for mesenchymal stem cell culture // *Biomed. Mater. Eng.* 2013. V. 23 (4). P. 311–315. <https://doi.org/10.3233/BME-130755>
- [11] Пат. РФ 2214827 (опубл. 2003). Способ получения коллагена для лечения патологий тканей организма.
- [12] *Burla F., Dussi S., Martinez-Torres C., Tauber J., van der Gucht J., Koenderink G. H.* Connectivity and plasticity determine collagen network fracture // *PNAS.* 2020. V. 117. N 15. P. 8326–8334. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920062117>
- [13] *Salchert K., Oswald J., Streller U., Grimmer M., Herold N., Werner C.* Fibrillar collagen assembled in the presence of glycosaminoglycans to constitute bioartificial stem cell niches *in vitro* // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2005. V. 16. N 6. P. 581–585. <https://doi.org/10.1007/s10856-005-0535-y>
- [14] *Kreger S. T., Voytik-Harbin S. L.* Hyaluronan concentration within a 3D collagen matrix nodulates matrix viscoelasticity, but not fibroblast response // *Matrix Biol.* 2009. V. 28. N 6. P. 336–346. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2009.05.001>
- [15] *Nonogaki T., Xu S., Kugimiya S., Sato S., Miyata I., Yonese M.* Two dimensional auto-organized nanostructure formation of hyaluronate on bovine serum albumin monolayer and its surface tension // *Langmuir.* 2000. V. 16. N 9. P. 4272–4278. <https://doi.org/10.1021/la990444c>
- [16] *Knill C. J., Kennedy J. F., Latif Y., Ellwood D.* Effect of metal ions on the rheological flow profiles of hyaluronate solutions // *Hyaluronan Proceedings of an Int. Meeting.* 2002. V. 1. P. 175–180.
- [17] *Bernanke D. H., Markwald R. R.* Effects of two glycosaminoglycans on seeding of cardiac cushion tissue cells into a collagen-lattice culture system // *The Anatomical Record.* 1984. V. 210. N 1. P. 25–31. <https://doi.org/10.1002/ar.1092100105>
- [18] *Donati A., Magnani A., Bonechi C., Barbucci R., Rossi C.* Solution structure of hyaluronic acid oligomers by experimental and theoretical NMR, and molecular dynamics simulation // *Biopolymers.* 2001. V. 59. N 6. P. 434–445. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(200111\)59:6<434::AID-BIP1048>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-0282(200111)59:6<434::AID-BIP1048>3.0.CO;2-4)
- [19] *Almond A., DeAngelis P. L., Blundell C. D.* Hyaluronan: The Local solution conformation determined by NMR and computer modeling is close to a contracted left-handed 4-fold helix // *J. Molec. Biol.* 2006. V. 358. N 5. P. 1256–1269. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.02.077>
- [20] *Průšová A., Šmejkalová D., Chytil M., Velebný V., Kučerík J.* An Alternative DSC approach to study hydration of hyaluronan. *Carbohydrate polymers // Carbohydrate Polym.* 2010. V. 82. N 2. P. 498–503. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.05.022>
- [21] *Cowman M. K., Schmidt T. A., Raghavan P., Stecco A.* Viscoelastic properties of hyaluronan in physiological conditions // *F1000Res.* 2015. V. 25. N 4. P. 622–632. <https://doi.org/10.12688/f1000research.6885.1>
- [22] *Gatej I., Popa M., Rinauo M.* Role of the pH on hyaluronan behavior in aqueous solution // *Biomacromolecules.* 2015. V. 6. N 1. P. 61–67. <https://doi.org/10.1021/bm040050m>
- [23] *Scott J. E., Cummings C., Brass A., Chen Y.* Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. *Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer // Biochem. J.* 1991. V. 274. P. 699–705. <https://doi.org/10.1042/bj2740699>
- [24] *Knepper P. A., Covici S., Fadel J. R., Mayanil C. S., Ritch R.* Surface-tension properties of hyaluronic acid // *J. Glaucoma.* 1995. V. 4. N 3. P. 194–199.
- [25] *Cheng P. T., Pritzker K. P.* Pyrophosphate, phosphate ion interaction: Effects on calcium pyrophosphate and calcium hydroxyapatite crystal formation in aqueous solutions // *J. Rheumatol.* 1983. V. 10. N 5. P. 769–777.
- [26] *Cheng P. T., Pritzker K. P.* The effect of calcium and magnesium ions on calcium pyrophosphate crystal formation in aqueous solutions // *J. Rheumatol.* 1981. V. 8. N 5. P. 772–782.



- [27] *Thouverey C., Bechko G., Pikula S., Buchet R.* Inorganic pyrophosphate as a regulator of hydroxyapatite or calcium pyrophosphate dihydrate mineral deposition by matrix vesicles // *Osteoarth. Cartilage*. 2009. V. 17. P. 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2008.05.020>
- [28] *Chen C. C., Boskey A. L.* Mechanisms of proteoglycan inhibition of hydroxyapatite growth // *Calcif. Tissue Int.* 1985. V. 37. N 4. P. 395–400. <https://doi.org/10.1007/BF02553709>
- [29] *Boskey A. L., Dick B. L.* Hyaluronan interactions with hydroxyapatite do not alter *in vitro* hydroxyapatite crystal proliferation and growth // *Matrix*. 1991. V. 11. N 6. P. 442–446. [https://doi.org/10.1016/S0934-8832\(11\)80198-8](https://doi.org/10.1016/S0934-8832(11)80198-8)
- [30] *Paschalis P., Vynios D. H., Tsiganos C. P., Dalas E., Maniatis C., Koutsoukos P. G.* Effect of proteoglycans on hydroxyapatite growth *in vitro*: The Role of hyaluronan // *Biochim. Biophys. Acta*. 1993. V. 1158. N 2. P. 129–136. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(93\)90006-T](https://doi.org/10.1016/0304-4165(93)90006-T)
- [31] *Prabakaran K., Balamurugan A., Rajeswari S.* Development of calcium phosphate based apatite from hen's eggshell // *Bull. Mater. Sci.* 2005. V. 28. N 2. P. 115–119. <https://doi.org/10.1007/BF02704229>
- [32] *Ghaneaian A., Reza S.* Comparative analysis of the viscoelastic properties of collagen-like proteins by virtual creep test // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2020. V. 20. P. 1–10. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1753578>
- [33] *Ghaneaian A., Reza S.* Mechanical elasticity of proline-rich and hydroxyproline-rich collagen-like triple-helices studied using steered molecular dynamics // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2018. V. 86. P. 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.06.021>
- [34] *Hongo C., Noguchi K., Okuyama K., Tanaka Y., Nishino N.* Repetitive interactions observed in the crystal structure of a collagen-model peptide, [(Pro-Pro-Gly)<sub>9</sub>]<sub>3</sub> // *J. Biochem.* 2005. V. 138. N 2. P. 135–144. <https://doi.org/10.1093/jb/mvi108>
- [35] *Okuyama K., Hongo C., Wu G., Mizuno K., Noguchi K., Ebisuzaki S., Tanaka Y., Nishino N., Bachinger H. P.* High-resolution structures of collagen-like peptides [(Pro-Pro-Gly)<sub>4</sub>-Xaa-Yaa-Gly-(Pro-Pro-Gly)<sub>4</sub>]: Implications for triple-helix hydration and Hyp(X) puckering // *Biopolymers*. 2009. V. 91. N 5. P. 361–372. <https://doi.org/10.1002/bip.21138>
- [36] *Servaty R., Schiller J., Binder H., Arnold K.* Hydration of polymeric components of cartilage — an infrared spectroscopic study on hyaluronic acid and chondroitin sulfate // *Int. J. Biolog. Macromol.* 2001. V. 28. N 2. P. 121–127. [https://doi.org/10.1016/s0141-8130\(00\)00161-6](https://doi.org/10.1016/s0141-8130(00)00161-6)
- [37] *Anunziata O. A., Maria L., Beltramone M. R.* Hydroxyapatite/MCM-41 and SBA-15 nanocomposites: preparation, characterization and applications // *J. Mater.* 2009. V. 2. N 4. P. 1508–1519. <https://doi.org/10.3390/ma2041508>
- [38] *Gibson I.R., Bonfield W.* Novel synthesis and characterization of an AB-type carbonate-substituted hydroxyapatite // *J. Biomed. Mater. Res.* 2002. V. 59. N 4. P. 697–708. <https://doi.org/10.1002/jbm.10044>
-