

ИНДУЦИРОВАННАЯ РИБОФЛАВИНОМ РЕАКЦИЯ ФОТОСШИВАНИЯ КОЛЛАГЕНА ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ: ТОЧНОСТЬ ПЕЧАТИ, ВРЕМЯ ДЕГРАДАЦИИ, ЦИТОСОВМЕСТИМОСТЬ

© 2022 г. Н. В. Аргучинская¹ *, Е. Е. Бекетов¹, Е. В. Исаева¹, А. А. Кисель¹,
П. С. Еремин², С. А. Иванов¹, П. В. Шегай³, А. Д. Каприн³

¹Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ “НМИЦ радиологии”
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Обнинск, Калужская область, 249031 Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 121099 Россия

³Федеральное государственное бюджетное учреждение “Национальный медицинский исследовательский
центр радиологии” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 125284 Россия

*e-mail: nnv1994@mail.ru

Поступила в редакцию 12.04.2022 г.

После доработки 29.06.2022 г.

Принята к публикации 13.07.2022 г.

Исследовано влияние условий индуцированной рибофлавином реакции фотосшивания коллагена на точность печати скаффолдов, а именно на площадь формируемых ниш и толщину филаментов, а также на время деградации и биосовместимость скаффолдов. Толщина филаментов в скаффолдах с рибофлавином была меньше на 13–29%, а площадь ниш больше на 23–40% по сравнению с контрольной группой без использования рибофлавина. Добавление рибофлавина уменьшало процент потери массы и увеличивало время деградации скаффолда в буферном растворе и в растворе коллагеназы в 1.2–1.3 и 1.4–2 раза соответственно в зависимости от времени воздействия УФ-излучения. Показано наличие оптимального диапазона времени облучения. Культивирование мезенхимальных стволовых клеток на сшитом рибофлавином скаффолде в течение недели не приводило к снижению их жизнеспособности и темпов пролиферации.

Ключевые слова: тканевая инженерия, экструзионная биопечать, цитосовместимость, фотополимеризуемый гидрогель, коллаген I типа, рибофлавин, МСК

DOI: 10.56304/S0234275822040044

Коллаген – один из наиболее распространенных природных биоматериалов, используемых в тканевой инженерии и регенеративной медицине. Он представляет собой семейство волокнистых гликопротеинов животного происхождения [1] и может быть экстрагирован из тканей животных [2] или получен рекомбинантно [3, 4]. Коллаген обеспечивает механическую целостность различных тканей и органов, а также регулирует ряд биологических процессов, включая прикрепление клеток к субстрату, их миграцию и дифференцировку, обладает высокой биосовместимостью и хорошо сочетается с другими материалами [5–7]. Слабыми сторонами использования коллагена являются его низкая механическая прочность, нестабильность [8] и изменение формы скаффолда при взаимодействии с клетками [9].

Тканеинженерные конструкции, должны облегчать клеточную инфильтрацию, воспроизводить механические свойства и обеспечивать биодеграда-

цию, соответствующую скорости образования нативной ткани. Поэтому для повышения механической прочности и ферментативной деградации коллагена применяют химическую [10, 11], физическую [12] и ферментативную реакцию сшивания [13], армирование волокнами синтетического происхождения [14], комбинацию с другими природными материалами [6, 15].

Реакция сшивания является наиболее широко используемым способом, применяемым для увеличения механической жесткости геля, и позволяет варьировать время деградации. В качестве химических веществ для этой реакции наиболее часто используются глутаровый альдегид [16, 17], генипин [11], окисленный сахар [18], дубильная кислота [19], 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид (EDC) и N-гидроксисукцинимид (NHS) [20]. Однако из-за необходимых стадий последующей промывки реакция сшивания занимает много времени, кроме того, веще-

ства, используемые для этой цели, чаще всего являются цитотоксичными (Irgacure 2959, генипин) и снижают биосовместимость полученного материала. Для образования ковалентных связей в молекуле коллагена могут использоваться ферменты, чаще всего транслугтаминаза [21]. К физическим методам, увеличивающим жесткость геля относятся дегидротермическая обработка [22, 23] и ультрафиолетовое облучение (УФ) [12]. Реакция модификации, индуцированная УФ-излучением, более быстрая и эффективная, по сравнению с дегидротермической обработкой. Однако обе эти реакции могут вызывать частичную денатурацию коллагена [24].

Фотоинициатором для УФ-отверждения может служить рибофлавин, также называемый витамином В2. Основным его преимуществом в отличие от других фотоинициаторов является его природное происхождение, он существует в организме и не является цитотоксическим [25]. Реакция, индуцируемая рибофлавином, может проходить двумя путями. В реакции I типа рибофлавин поглощает энергию УФ-излучения и превращается в свободные радикалы, которые далее взаимодействуют с молекулярным кислородом с образованием продуктов окисления. Этот механизм происходит преимущественно при низкой концентрации кислорода [26]. В реакции типа II рибофлавин передает энергию молекулярному кислороду, радикалы образующегося синглетного кислорода окисляют коллаген, и впоследствии между аминокислотами в его составе образуются меж- или внутримолекулярные ковалентные сшивки [26, 27]. Рибофлавин эффективен не только как генератор синглетного кислорода. Он способен поглощать радикалы, осуществляя баланс между образованием и дезактивацией синглетного кислорода [28].

Ранее эффективность рибофлавина в качестве сшивающего агента для коллагена была показана в экспериментальных исследованиях и при клиническом применении. Так, рибофлавин используется в области офтальмологии для укрепления коллагеновой структуры роговицы глаза при лечении кератоконуса [29]; предложено его применение в реставрационной стоматологии в качестве предварительной обработки дентина [30].

Grunert и соавт. [31] продемонстрировали, что инъекционные гидрогели на основе коллагена, сшитые рибофлавином, могут восстанавливать кольцевые дефекты межпозвоночных дисков *in vivo*. Также рибофлавин использовали для реакции сшивания многокомпонентного гидрогеля, включающего в себя метакририлованный гликолевый хитозан и коллаген II типа [32]. В исследованиях с применением 3D-печати были установлены модуль упругости [9, 33], средство к воде [33], реологические свойства [12], биосовместимость коллагена, модифицированного

рибофлавином [33]. Нео и соавт. определили оптимальную концентрацию рибофлавина для увеличения модуля упругости [33]. Остаются неизвестными концентрация рибофлавина и время облучения, необходимые для сшивания коллагена и обеспечения жизнеспособности клеток в скаффолдах. Кроме того, представленные выше данные были получены для коллагена низкой концентрации (0.3–1.2%) и вопрос применения рибофлавина как фотосенсибилизатора при печати скаффолдов коллагеном высокой концентрации также остается открытым.

Целью настоящего исследования была оценка влияния условий реакции сшивания рибофлавином скаффолдов из коллагена высокой концентрации (80 мг/мл) на точность печати, время их биодеградации и цитосовместимость.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Общие параметры 3D-печати

Экструзионную биопечать осуществляли на 3D-биопринтере Rokit Invivo (Южная Корея) с ПО версии 1.68. Слайсинг модели проводили в программе NewCreatorK версии 1.57.63. В качестве базового гидрогеля использовали ателоколлаген свиньи I типа Viscoll (80 мг/мл, PA8 ООО фирмы “Имтек”, Россия). Печать производили на нейтрализованным коллагеном в чашки Петри (Corning), которые располагали на печатном столе. Подача гидрогеля осуществлялась через иглы 21G типа “Luer-Lock” (Vogt Medical, Германия). Температура столика для разных групп составляла 0 и 37°C, а температура раствора коллагена в шприце поддерживалась при +4°C. После осуществления печати гидрогелем коллагена скаффолды заливали раствором рибофлавина (Sigma Aldrich, США) с концентрацией 10 мг/мл в 0.1M NaOH (“ПанЭко”, Россия). Реакцию фотосшивания индуцировали ультрафиолетовым излучением с длиной волны 365 нм (80 мВт/см²).

В исследовании по биосовместимости осуществляли печать методом послойного наложения (FDM-печать). Температура экструдера для полилактида (PLA) составляла 210°C. Перед использованием формы из PLA стерилизовали УФ-излучением (254 нм) в течение 1 ч.

Культура мезенхимальных стволовых клеток

Экспериментальные исследования были выполнены с использованием мезенхимальных стволовых клеток (МСК), выделенных из жировой ткани человека. В качестве доноров были выбраны женщины ($n = 10$) в возрасте от 25 до 40 лет. Донорство осуществлялось при проведении плановых операций по липосакции после подписания пациентами информированного согласия.

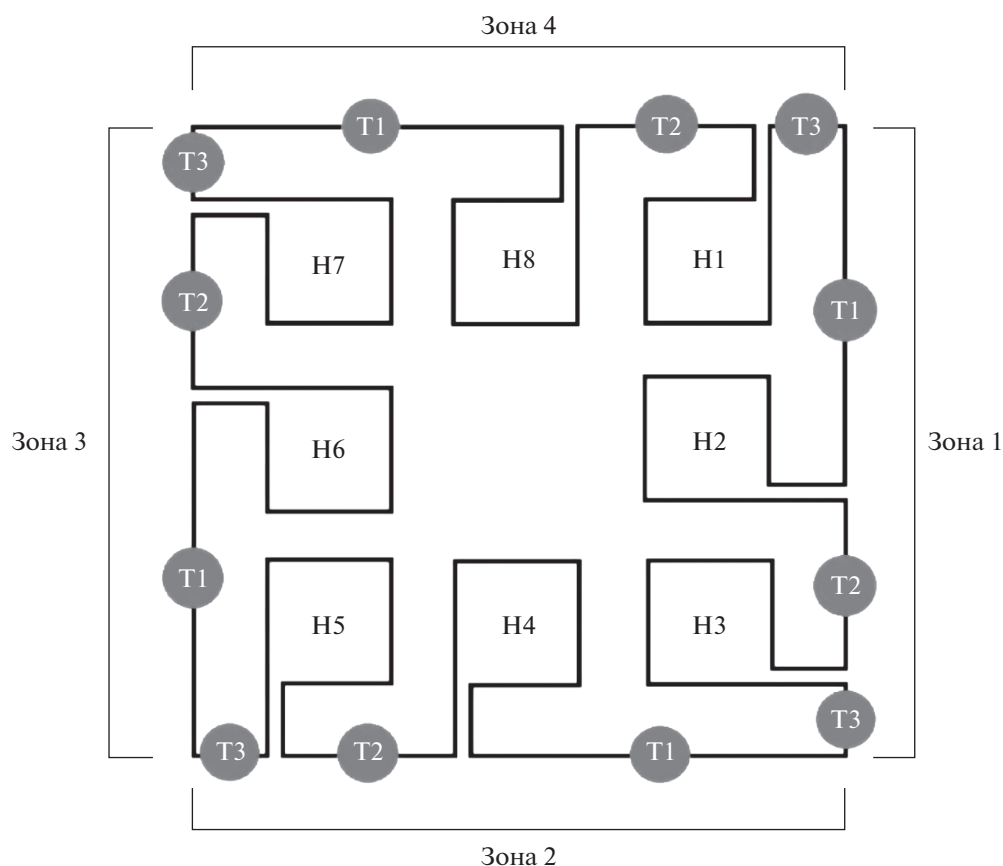


Рис. 1. Схематическое изображение напечатанного объекта и точки, в которых проводилась оценка толщины линий и площади ниш (Т – точка, Н – ниша) в различных зонах объекта.

Fig. 1. Schematic representation of the printed object and the points at which the thickness of the lines and the area of the niches (T – point, N – niche) were estimated in different zones of the object.

Выделение клеток проводили по ранее описанной методике [35]. Липоаспират, в стерильных условиях отмывали 3 раза от туменесцентной жидкости раствором Хартмана (АО Биохимик, Россия), после чего добавляли 0.015%-ный раствором коллагеназы II типа (Sigma-Aldrich) в количестве, равном объему отмывтой жировой ткани и инкубировали в течение 30 мин при +37°C. После ферментативной обработки добавляли раствор Хартмана в соотношении 1 : 1 об./об. для снижения активности фермента. Полученную суспензию клеток фильтровали через сито с диаметром пор 100 мкм и отмывали 3 раза фосфатно-солевым буфером (ФСБ) с последующим центрифугированием при 300 г в течение 7 мин.

Первичную культуру клеток переносили в культуральный флакон из расчета 5×10^5 клеток на 1 см² и культивировали в среде DMEM с содержанием глюкозы 1 г/л с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Франция), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, глутамина (150 мкг/мл), в CO₂-инкубаторе при +37°C по стандартной методике до 5 пассажа [36]. Для

подтверждения принадлежности выделенных клеток к МСК, проводили исследование фенотипического профиля по основным поверхностным маркерам, характерным для МСК. Для эксперимента использовали клетки 5-го пассажа.

Оценка точности печати

Для печати был разработан объект с 8 нишами, каждая площадью 4 мм². Схематическое изображение объекта представлено на рис. 1.

Высота объекта – 1000 мкм, высота слоя печати – 333 мкм. С учетом потенциальной ошибки процесса калибровки базового слоя, выход материала на первом слое составил 115%. Перемычка между печатью в режиме “Skirt¹” и основным контуром пропечатывается, чтобы исключить возможность недостаточного давления в момент печати основного объекта. После печати полученные матрицы заливали раствором рибофлавина

¹ Контурная обводка, печатается для того, чтобы подготовить экструдер и добиться плавной экструзии филамента перед печатью.

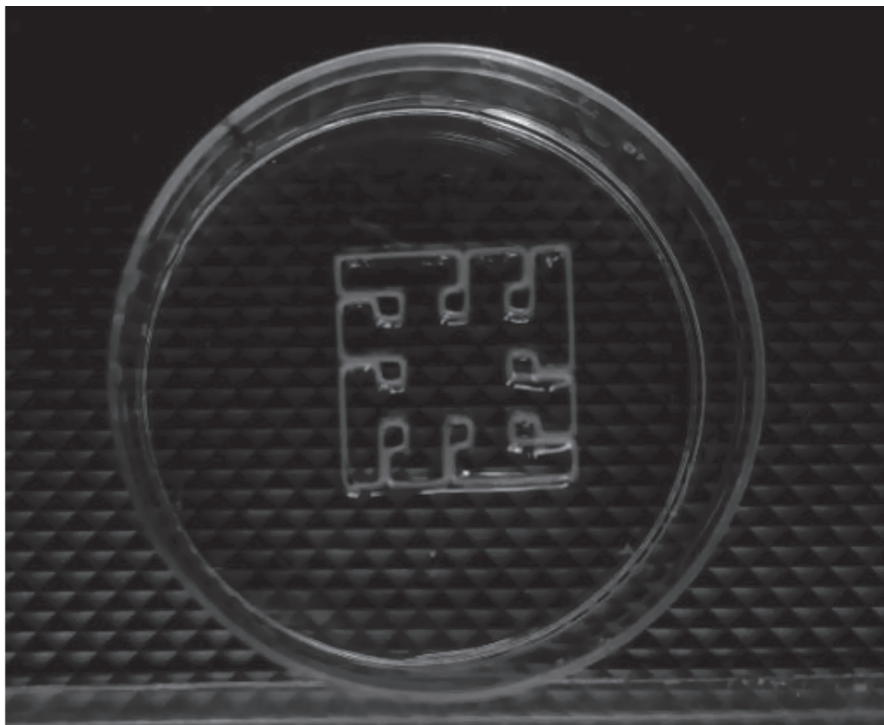


Рис. 2. Напечатанный объект, с помощью которого проводилась оценка толщины линий и площади ниш – вариант 5.3.
Fig. 2. The printed object, which was used to estimate the thickness of the lines and the area of the niches – option 5.3.

с концентрацией 10 мг/мл в 0.1 М NaOH и подвергали УФ облучению, инкубировали 1 сут в ФСБ, после чего фотографировали (рис. 2). Изображения анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ версии 1.8.0.

Оценка времени биодеградации

Для оценки времени биодеградации осуществляли печать скаффолдов размером $1 \times 1 \times 0.02$ см. Температура столика 0°C . После печати матрицы заливали раствором рибофлавина с концентрацией 10 мг/мл в 0.1 М NaOH и подвергали УФ облучению в течение 5 или 20 мин. Общее время инкубации в растворе рибофлавина составило 30 мин. Затем этот раствор сливали и трижды промывали скаффолды раствором ФСБ, чтобы удалить остатки рибофлавина. В качестве контрольной группы, использовали скаффолды, инкубируемые 30 мин без облучения в растворе 0.1М NaOH без рибофлавина.

Биодеградацию полученных скаффолдов исследовали при их инкубации в растворах ФСБ и коллагеназы с концентрацией 0.1 мг/мл (Gibco, Termo Fisher, США). Степень деградации после инкубации в ФСБ оценивали через 14 сут, в растворе коллагеназы через 1, 3, 6 ч. После инкубации скаффолды высушивали в сушильном шкафу при 37°C и взвешивали на аналитических весах (Ohaus Adventurer Pro AV114C, США). Потерю веса во всех группах рассчитывали относительно

контроля. Процент оставшейся массы скаффолда между определенными интервалами времени рассчитывали по формуле (1).

$$\%_{m \text{ ост.}} = \frac{m_{n1}}{m_{n2}} \times 100\%, \quad (1)$$

где m_{n1} – масса скаффолда, высушенного через $n1$ ч
 m_{n2} – масса скаффолда, высушенного через $n2$ ч.

Оценка биосовместимости

Для оценки биосовместимости осуществляли печать скаффолдов из коллагена размером $1.2 \times 3.6 \times 0.052$ см и форм PLA $1 \times 1 \times 0.7$ см. Формы из PLA представляли собой полые кубы без верхнего и нижнего основания, которые вставляли в скаффолд из коллагена, таким образом формировались три лунки, в каждую из которых высевали МСК в количестве 1.2×10^4 . Процесс печати изображен на рис. 3. Скаффолды с клетками инкубировали в питательной среде DMEM с содержанием глюкозы 1 г/л (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera). Через 3 и 7 сут клетки снимали со скаффолдов раствором трипсина-ЭДТА (“ПанЭко”), и подчитывали количество клеток в камере Горяева.

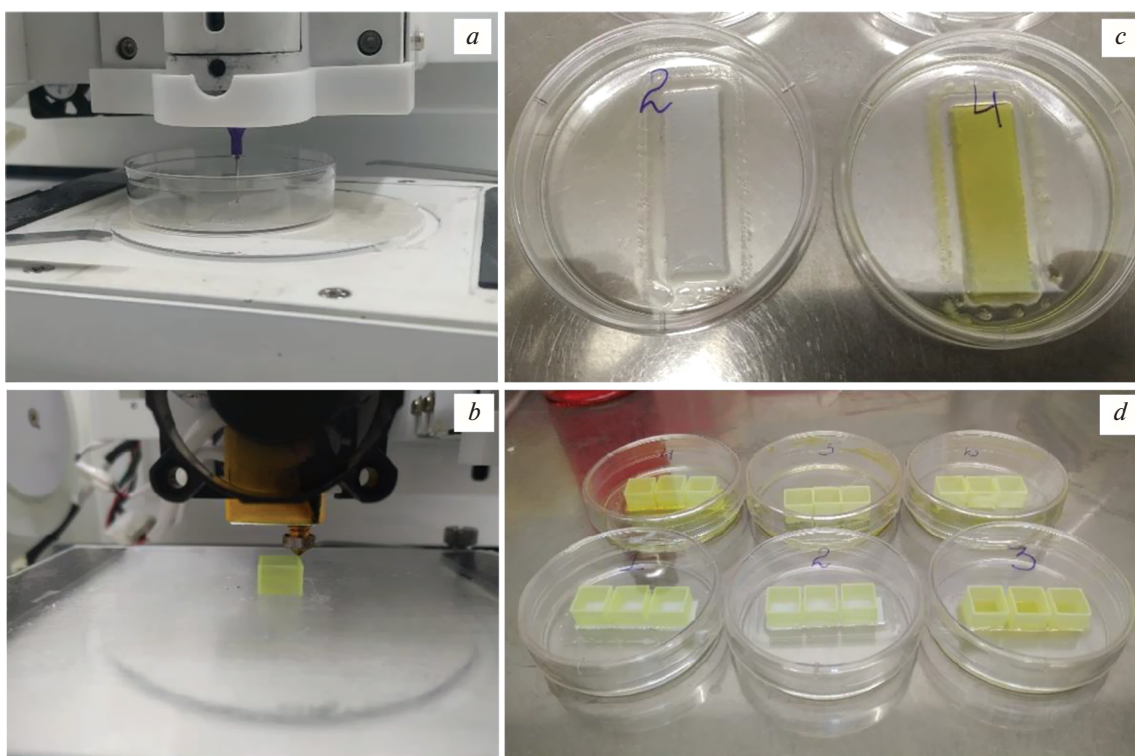


Рис. 3. (a) Процесс печати коллагенового скаффолда, (b) процесс печати формы из PLA, (c) скаффолды из коллагена после полимеризации, (d) скаффолды из коллагена после полимеризации со вставками PLA.

Fig. 3. (a) Collagen scaffold printing process, (b) PLA form printing process, (c) post-polymerized collagen scaffolds, (d) post-polymerized collagen scaffolds with PLA inserts.

Статистический анализ

Полученные данные обрабатывали при помощи статистического программного обеспечения R версии 3.4.1 со стандартными инструментами. Сравнение проводили с применением дисперсионного анализа и критерия Тьюки. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. В таблицах представляли средние значения показателей и стандартную ошибку среднего значения. Погрешность подсчета клеток в камере Горяева оценивали в соответствии с распределением Пуассона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Точность печати

Коллаген – наиболее широко используемый материал в 3D-биопечати. Однако скаффолды на его основе обладают слабыми механическими свойствами. Один из вариантов решения этой проблемы – принудительная сшивка полимера. В этом исследовании в качестве фотоинициатора для сшивания коллагена использовали рибофлавин. Облучение проводили УФ с длиной волны 365 нм, что соответствует одному из максимумов поглощения хромофора рибофлавина [37]. Были протестированы различные режимы (табл. 1) УФ-излучения длительностью 5 мин, с температурой сто-

лика 0 и 37°C и вариантами инкубации в рибофлавине (до или после облучения).

По полученным предварительным данным, представленным в табл. 2, наиболее близким к заданным значениям печати (ширина филамента – 0.5 мм, площадь ниши – 4 мм²) оказалась группа варианта 5. Скаффолды в этой группе имели наименьшую толщину филаментов и наибольшую площадь ниш. Худшие результаты наблюдали в группах вариантов 3 и 6, что может быть связано с долгим пребыванием в растворах и чрезмерным набуханием коллагена. Парное сравнение групп с использованием критерия Тьюки показало достоверное отличие группы 5 от всех остальных, поэтому она была дополнительно исследована при различных временах облучения (табл. 3).

В качестве контрольной группы, использовали скаффолды, инкубируемые 35 мин без облучения в растворе 0.1M NaOH без рибофлавина (табл. 3, вариант 5.6). Было обнаружено, что для указанного режима (табл. 1, вариант 5) добавление рибофлавина обеспечивает реакцию фотосшивания, при которой уменьшается толщина филаментов на 13–29% и увеличивается площадь ниши на 23–40% по сравнению с образцами без рибофлавина и на 34–60% и 43–63% по сравнению с образцами с

Таблица 1. Описание вариантов инкубации скаффолдов в растворах рибофлавина
Table 1. Description of incubation options for scaffolds in riboflavin solution

Вариант/метод	Раствор рибофлавина			t °С при печати, облучении и инкубации
	время до облучения, мин.	время облучения, мин.	время после облучения, мин	
1	30	5	—	0
2	—	5	30	0
3	30	5	30	0
4	30	5	—	37
5	—	5	30	37
6	30	5	30	37

Таблица 2. Значения площади ниш и толщины филаментов после инкубации скаффолдов в растворе рибофлавина
Table 2. Values of niche area and filament thickness after incubation of scaffolds in riboflavin solution

Вариант/метод	Размеры, $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ (% от заданного размера)	
	толщина филаментов (мм)	ниши(мм ²)
1	1.433 ± 0.046 (279)	1.139 ± 0.037 (29)
2	1.588 ± 0.005 (309)	0.946 ± 0.048 (24)
3	1.937 ± 0.053 (376)	0.908 ± 0.062 (23)
4	1.035 ± 0.054 (201)	1.083 ± 0.070 (27)
5	0.493 ± 0.059 (96)	2.499 ± 0.083 (63)
6	1.343 ± 0.059 (261)	0.355 ± 0.093 (9)

Таблица 3. Описание вариантов инкубации скаффолдов в растворе рибофлавина при различных временах облучения
Table 3. Description of incubation options for scaffolds in riboflavin solution with different irradiation times

Вариант/метод	Раствор рибофлавина			Раствор NaOH	t °С при печати, облучении и инкубации
	время до облучения, мин.	время облучения, мин.	время после облучения, мин		
5.1	0	0	35	—	37
5.2	0	5	30	—	37
5.3	0	10	25	—	37
5.4	0	15	20	—	37
5.5	0	20	15	—	37
5.6	—	—	—	35	37

Таблица 4. Значения площади ниш и толщины филаментов с различным временем УФ облучения
Table 4. Values of niche area and filament thickness with different UV irradiation time

Вариант/метод	Размеры, $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ (% от заданного размера)	
	толщина филаментов (мм)	ниши (мм ²)
5.1	1.182 ± 0.035 (230)	1.342 ± 0.082 (34)
5.2	0.780 ± 0.041 (156)	1.913 ± 0.090 (48)
5.3	0.661 ± 0.044 (129)	2.194 ± 0.093 (55)
5.4	0.752 ± 0.045 (146)	2.108 ± 0.109 (53)
5.5	0.901 ± 0.044 (175)	1.554 ± 0.096 (55)
5.6	0.636 ± 0.046 (123)	2.183 ± 0.111 (39)

Таблица 5. Изменение веса скаффолдов при различном времени инкубации в растворе коллагеназы
Table 5. Change in the weight of scaffolds at different times of incubation in collagenase solution

Способ обработки	Вес скаффолда, $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ (% относительно веса в контроле после печати)				% оставшейся массы скаффолдов		
	время инкубации, ч						
	0	1	3	6	1–3	3–6	1–6
Контроль	0.0045 ± 0.0005	0.0077 ± 0.0013 (169 ± 48)	0.0048 ± 0.0014 (106 ± 45)	0.0009 ± 0.0004 (20 ± 11)	62 ± 28.5	19 ± 14.0	11 ± 6.7
Рибофлавин, +УФ 5 мин		0.0047 ± 0.0005 (104 ± 24)	0.0047 ± 0.0010 (104 ± 34)	0.0018 ± 0.0006 (39 ± 18)	100 ± 31.9	38 ± 20.7	38 ± 16.7
Рибофлавин, +УФ 20 мин		0.0058 ± 0.0010 (128 ± 38)	0.0023 ± 0.0002 (52 ± 10)	0.0013 ± 0.0003 (28 ± 10)	40 ± 10.4	56 ± 17.8	22 ± 8.9

рибофлавином, но без облучения соответственно (табл. 4).

Между группами со временем облучения 5, 10 и 15 мин не было достоверных отличий в значениях площади ниш. Однако достоверное улучшение в толщине филаментов было показано при облучении в течение 10 минут, где полученное значение было наиболее близко к заданному (0.514 мм против 0.661 мм). Облучение в течение 20 мин привело к худшему результату как в оценке площади ниш, так и толщины филаментов.

Время биодеградации

Известно, что коллаген подвержен ферментативной деградации. Ранее Ibusuki и соавт. [34] и Нео и соавт. [33] отмечали замедление деградации скаффолдов за счет реакции фотосшивания, индуцированной рибофлавином. В нашей работе

для изучения деградации скаффолдов из коллагена, модифицированных рибофлавином, в условиях *in vitro* образцы инкубировали в ФСБ или растворе коллагеназы с концентрацией 0.1 мг/мл. В качестве контроля использовали группу коллагеновых матриц без обработки рибофлавином.

Полученные данные подтвердили, что инкубация в ФСБ приводила к деградации скаффолда. Наименьшая потеря его массы составила 10% через 14 сут при облучении образцов в течение 20 мин. У образцов, которые облучали 5 мин, потеря массы составила 31%.

Инкубирование скаффолдов в растворе коллагеназы создает условия более близкие к существующим в организме. Результаты этих экспериментов аналогичны результатам, полученным при инкубации в ФСБ: добавление рибофлавина уменьшало процент потери массы скаффолда. Однако, в отличие от инкубации в ФСБ увеличение времени

Таблица 6. Жизнеспособность и пролиферация МСК на скаффолде, сшитом рибофлавином
Table 6. Viability and proliferation of MSCs on a riboflavin-linked scaffold

	Количество клеток, $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ [Интервал с учетом ошибки]		
	3 сутки	7 сутки	увеличение роста, (в <i>n</i> раз)
Контроль	$6.67 \times 10^3 \pm 0.18$ [5.49×10^3 ; 7.85×10^3]	$12.5 \times 10^3 \pm 0.13$ [10.89×10^3 ; 14.11×10^3]	1.88 ± 0.57
Рибофлавин, + УФ 5 мин	$8.13 \times 10^3 \pm 0.16$ [6.82×10^3 ; 9.43×10^3]	$13.75 \times 10^3 \pm 0.12$ [12.06×10^3 ; 15.44×10^3]	1.69 ± 0.48
Рибофлавин, + УФ 20 мин	$7.08 \times 10^3 \pm 0.17$ [5.87×10^3 ; 8.30×10^3]	$15.00 \times 10^3 \pm 0.12$ [13.23×10^3 ; 16.77×10^3]	2.12 ± 0.61

воздействия УФ-излучения до 20 мин не приводило к меньшей деградации, а при облучении в течение 5 мин в течение первых 3 часов массы скаффолдов не изменялись (табл. 5). Таким образом, добавление рибофлавина приводит к сшиванию коллагена и увеличивает время его деградации на 40–50%.

Биосовместимость

Образование рибофлавином свободных радикалов при поглощении энергии УФ, которое и приводит к возникновению ковалентных связей в молекулах коллагена, может вызывать гибель клеток, инкорпорированных в скаффолд или посеянных на него до сшивки. Согласно литературным данным жизнеспособность фибробластов, инкорпорированных в коллагеновые скаффолды, после реакции фотосшивания рибофлавином, может достоверно снижаться [20, 38]. Таким образом, вопрос о биосовместимости сшитого коллагена актуален.

В нашей работе клетки высевали на скаффолд после воздействия на него УФ-излучения и отмывки от рибофлавина. На 3 сутки количество клеток на скаффолде составляло более 50% от посеянных, это связано с тем, что не все клетки к нему прикрепилась. К 7 суткам скорость пролиферации прикрепившихся клеток увеличилась в 1.88 ± 0.57 ; 1.69 ± 0.48 ; 2.12 ± 0.61 раз в контроле, в группах с облучением 5 и 20 мин соответственно (табл. 6). Согласно представленным в таблице данным, статистически значимые различия между этими тремя группами отсутствуют. Это означает, что рибофлавин не оказывает негативного воздействия на клетки, они прикрепляются к скаффолду и способны к делению.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что лучшее качество печати коллагеновых матриц наблюдается при ее осуществлении на теплый (37°C) столик 3D-принтера. Время УФ облучения после инкубации в растворе рибофлавина достоверно не влияло на изменение площади ниш, однако достоверное улучшение тол-

щины филаментов было получено при облучении в течение 10 мин, и, следовательно, именно эта длительность воздействия может обеспечить лучшую реакцию фотосшивания. При исследовании биодеградации полученных скаффолдов установлено, что увеличение времени воздействия УФ-излучения не уменьшало деградацию скаффолда в условиях, близких к условиям в организме. Результаты проведенных исследований по цитосовместимости свидетельствуют о том, что МСК при культивировании на поверхности скаффолда из коллагена, полученного индуцированной рибофлавином реакцией фотосшивания не утратили жизнеспособность и имели высокую скорость пролиферации. Таким образом, предложенная процедура получения скаффолдов из коллагена высокой концентрации (80 мг/мл), характеризующихся замедленной деградацией и точностью печати за счет использования рибофлавина в качестве фотосенсибилизатора может быть использована в тканевой инженерии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meyer M. Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. *Biomed. Eng. Online*, 2019, 18(1).
<https://doi.org/10.1186/s12938-019-0647-0>
2. Jafari H., Lista A., Siekapen M., Ghaffari-Bohlouli P., Nie L., Alimoradi H., Shavandi A. Fish Collagen: Extraction, Characterization, and Applications for Biomaterials Engineering. *Polymers (Basel)*, 2020, 12(10), 2230.
<https://doi.org/10.3390/polym12102230>
3. Tytgat L., Dobos A., Markovic M., Van Damme L., Van Hoorick J., Bray F., Thienpont H., Ottevaere H., Dubruel P., Ovsianikov A., Van Vlierberghe S. High-Resolution 3D Bioprinting of Photo-Cross-linkable Recombinant Collagen to Serve Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules.*, 2020, 21(10), 3997–4007.
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00386>
4. Werkmeister J.A., Ramshaw J.A.M. Recombinant protein scaffolds for tissue engineering. *Biomed. Mater.*, 2012, 7, 012002.
<https://doi.org/10.1088/1748-6041/7/1/012002>

5. Koide T. Designed triple-helical peptides as tools for collagen biochemistry and matrix engineering. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2007, 362(1484), 1281–1291.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2115>
6. Yang X., Lu Z., Wu H., Li W., Zheng L., Zhao J. Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, 2018, 83, 195–201.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.09.002>
7. Zhang Y., Zhou D., Chen J., Zhang X., Li X., Zhao W., Xu T. Biomaterials based on marine resources for 3D bioprinting applications. *Mar. Drugs.*, 2019, 17, 555.
<https://doi.org/10.3390/md17100555>
8. Chan B.P., So K.F. Photochemical crosslinking improves the physicochemical properties of collagen scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.*, 2005, 75(3), 689–701.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.30469>
9. Rich H., Odlyha M., Cheema U., Mudera V., Bozec L. Effects of photochemical riboflavin-mediated crosslinks on the physical properties of collagen constructs and fibrils. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2014, 25(1), 11–21.
<https://doi.org/10.1007/s10856-013-5038-7>
10. Kamimura W., Koyama H., Miyata T., Takato T. Sugar-based crosslinker forms a stable atelocollagen hydrogel that is a favorable microenvironment for 3D cell culture. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2014, 102, 4309–4316.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.35106>
11. Bi L., Cao Z., Hu Y., Song Y., Yu L., Yang B., Mu J., Huang Z., Han Y. Effects of different cross-linking conditions on the properties of genipin-cross-linked chitosan/collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2011, 22(1), 51–62.
<https://doi.org/10.1007/s10856-010-4177-3>
12. Diamantides N., Wang L., Pruiksma T., Siemiatkoski J., Dugopolski C., Shortkroff S., Kennedy S., Bonassar L.J. Correlating rheological properties and printability of collagen bioinks: the effects of riboflavin photocrosslinking and pH. *Biofabrication.*, 2017, 9(3), 034102.
<https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa780f>
13. Orban J.M., Wilson L.B., Kofroth J.A., El-Kurdi M.S., Maul T.M., Vorp D.A. Crosslinking of collagen gels by transglutaminase. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 2004, 68(4), 756–762.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.20110>
14. Brown J.H., Das P., DiVito M.D., Ivancic D., Tan L.P., Wertheim J.A. Nanofibrous PLGA electrospun scaffolds modified with type I collagen influence hepatocyte function and support viability in vitro. *Acta Biomater.*, 2018, 73, 217–227.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.02.009>
15. Jiang J.P., Liu X.Y., Zhao F., Zhu X., Li X.Y., Niu X.G., Yao Z.T., Dai C., Xu H.Y., Ma K., Chen X.Y., Zhang S. Three-dimensional bioprinting collagen/silk fibroin scaffold combined with neural stem cells promotes nerve regeneration after spinal cord injury. *Neural Regen. Res.*, 2020, 15(5), 959–968.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.268974>
16. Peng Y.Y., Glattauer V., Ramshaw J.A.M. Stabilisation of Collagen Sponges by Glutaraldehyde Vapour Crosslinking. *Int. J. Biomater.*, 2017, 2017, 8947823.
<https://doi.org/10.1155/2017/8947823>
17. Chandran P.L., Paik D.C., Holmes J.W. Structural mechanism for alteration of collagen gel mechanics by glutaraldehyde crosslinking. *Connect Tissue Res.*, 2012, 53(4), 285–297.
<https://doi.org/10.3109/03008207.2011.640760>
18. Kamimura W., Koyama H., Miyata T., Takato T. Sugar-based crosslinker forms a stable atelocollagen hydrogel that is a favorable microenvironment for 3D cell culture. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.*, 2014, 102, 4309–4316.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.35106>
19. Yeo M.G., Kim G.H. A cell-printing approach for obtaining hASC-laden scaffolds by using a collagen/polyphenol bioink. *Biofabrication*, 2017, 9(2), 025004. PMID:28402968
<https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa6997>
20. Jafari-Sabet M., Nasiri H., Ataee R. The effect of crosslinking agents and collagen concentrations on properties of collagen scaffolds. *J. Arch. Mil. Med.*, 2016, 4.
<https://doi.org/10.5812/JAMM.42367>
21. Chen R., Ho H., Sheu T. Characterization of collagen matrices crosslinked using microbial transglutaminase. *Biomaterials*, 2005, 26(20), 4229–4235.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.11.012>
22. Nakada A., Shigeno K., Sato T., Hatayama T., Wakatsuki M., Nakamura T. Optimal dehydrothermal processing conditions to improve biocompatibility and durability of a weakly denatured collagen scaffold. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, 2017, 105, 2301–2307.
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.33766>
23. Pawelec K.M., Confalonieri D., Ehlicke F., van Boxtel H.A., Walles H., Kluijtmans S.G.J.M. Osteogenesis and mineralization of mesenchymal stem cells in collagen type I-based recombinant peptide scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.*, 2017, 105(7), 1856–1866.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.36049>
24. Weadock K., Miller E., Keuffel E., Dunn M. Effect of physical crosslinking methods on collagen-fiber durability in proteolytic solutions. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1996, 32, 221–226.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199610\)32:2<221::AID-JBM11>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199610)32:2<221::AID-JBM11>3.0.CO;2-M)
25. Choi G., Cha H.J. Recent advances in the development of nature-derived photocrosslinkable biomaterials for 3D printing in tissue engineering. *Biomater. Res.*, 2019, 23, 18.
<https://doi.org/10.1186/s40824-019-0168-8>
26. Ionita G., Matei I. Application of Riboflavin Photochemical Properties in Hydrogel Synthesis. *Biophysical Chemistry. Advance Applications.*, 2019.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.88855>
27. Tonndorf R., Gossela E., Aibibu D., Lindner M., Gelin-sky M., Cherif C. Wet spinning and riboflavin crosslinking of collagen type I/III filaments. *Biomed Mater.*, 2018, 14(1), 015007.
<https://doi.org/10.1088/1748-605X/aaebda>
28. Raiskup F., Spoerl E. Corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A. I. Principles. *Ocul Surf.*, 2013, 11(2), 65–74.
<https://doi.org/10.1016/j.jtos.2013.01.002>
29. Maier P., Reinhard T., Kohlhaas M. Corneal Collagen Cross-Linking in the Stabilization of Keratoconus. *Dtsch. Arztebl. Int.*, 2019, 116(11), 184–190.
<https://doi.org/10.3238/arztebl.2019.0184>

30. Daood U., Heng C.S., Neo Chiew Lian J., Fawzy A.S. In vitro analysis of riboflavin-modified, experimental, two-step etch-and-rinse dentin adhesive: Fourier transform infrared spectroscopy and micro-Raman studies. *Int. J. Oral. Sci.*, 2015, 7(2), 110–124. <https://doi.org/10.1038/ijos.2014.49>
31. Grunert P., Borde B.H., Towne S.B., Moriguchi Y., Hudson K.D., Bonassar L.J., Härtl R. Riboflavin crosslinked high-density collagen gel for the repair of annular defects in intervertebral discs: An *in vivo* study. *Acta Biomater.*, 2015, 26, 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.06.006>
32. Choi B., Kim S., Lin B., Bezouglaia O., Kim J., Evseenko D., Aghaloo T., Lee M. Visible-light-initiated hydrogels preserving cartilage extracellular signaling for inducing chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *Acta Biomater.*, 2015, 12C, 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.10.013>
33. Heo J., Koh R.H., Shim W., Kim H.D., Yim H.G., Hwang N.S. Riboflavin-induced photo-crosslinking of collagen hydrogel and its application in meniscus tissue engineering. *Drug Deliv Transl Res.*, 2016, 6(2), 148–58. <https://doi.org/10.1007/s13346-015-0224-4>
34. Cheema U., Rong Z., Kirresh O., MacRobert A.J., Vadgama P., Brown R.A. Oxygen diffusion through collagen scaffolds at defined densities: implications for cell survival in tissue models. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2012, 6(1), 77–84. <https://doi.org/10.1002/term.402>
35. Смышляев И.А., Гильфанов С.И., Копылов В.А., Гильмутдинов Р.Г., Пулин А.А., Корсаков И.Н., Гильмутдинова И.Р., Петрикина А.П., Еремин П.С., Крючкова О.В., Абельцев В.П., Загородний Н.В., Зорин В.Л., Васильев В.С., Пупынин Д.Ю., Еремин И.И. Оценка безопасности и эффективности внутрисуставного введения стромально-васкулярной фракции жировой ткани для лечения гонартроза: промежуточные результаты клинического исследования. *Травматология и ортопедия России*, 2017, 23(3), 17–31.
36. Самчук Д.П., Лукьянова Е.Н., Еремин И.И., Зорин В.Л., Зорина А.И., Гринаковская О.С., Корсаков И.Н., Деев Р.В., Гильмутдинова И.Р., Лазарева Н.Л., Еремин П.С., Петрикина А.П., Гомзяков А.Е., Тимашиков Д.А., Витько Н.К., Котенко К.В., Копнин П.Б., Пулин А.А. Экспрессия генов миогенеза клетками слизистой оболочки десны. *Гены и Клетки*, 2015, 10(4), 68–77.
37. Lu M., Song X., Yang M., Kong W., Zhu J. Combined effects of glutaraldehyde and riboflavin/uv365 on the self-assembly of type I collagen molecules observed with atomic force microscopy. *Int. J. of Food Properties.*, 2018, 21(1), 2181–2192. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1510837>
38. Ibusuki S., Halbesma G.J., Randolph M.A., Redmond R.W., Kochevar J.E., Gill T.J. Photochemically cross-linked collagen gels as three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Tissue Eng.*, 2007, 13(8), 1995–2001. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0153>

Riboflavin-Induced Photocrosslinking of High-Concentrated Collagen: Printing Accuracy, Degradation Time and Cytocompatibility

N. V. Arguchinskaya^{a, #}, E. E. Beketov^a, E. V. Isaeva^a, A. A. Kisel^a,
P. S. Eremin^b, S. A. Ivanov^a, P. V. Shegay^c, and A. D. Kaprin^c

^aA. Tsyb Medical Radiological Research Center, National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Kaluga oblast, 249031 Russia

^bNational Medical Research Center of Rehabilitation and Balneology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 121099 Russia

^cNational Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 125284 Russia

[#]e-mail: nnv1994@mail.ru

Abstract—The effect of riboflavin-induced collagen photocrosslinking on the scaffold printing accuracy, namely on the area of formed niches and filament thickness, as well as on the degradation time and biocompatibility of scaffolds has been studied. The thickness of the filaments in the scaffolds with riboflavin was 13–29% less and the niche area was 23–40% larger than in the control group without riboflavin. The riboflavin addition reduced weight loss and increased the scaffold degradation time in the buffer solution and collagenase solution by 1.2–1.3 and 1.4–2.0 times, respectively, depending of the time of exposure to UV light. The presence of an optimal illumination interval was established. Cultivation of mesenchymal stem cells on a riboflavin-crosslinked scaffold for a week did not lead to a decrease in their viability and proliferation rate.

Keywords: tissue engineering, extrusion bioprinting, cytocompatibility, photopolymerizable hydrogel, type I collagen, riboflavin, MSC