

ХИМИЧЕСКИЕ СШИВАЮЩИЕ АГЕНТЫ ДЛЯ КОЛЛАГЕНА: МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

© 2020 г. Ю. А. Нащекина¹, *, О. А. Луконина¹, Н. А. Михайлова¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: yuliya.shved@gmail.com

Развитие регенеративной медицины способствует внедрению в практику клеточных технологий и разработке новых биоактивных материалов. Для культивирования и трансплантации клеток необходимо создавать такие носители, структура и свойства которых были бы идентичны нативному окружению клеток в тканях. Идеальным материалом для создания подобных носителей является основной белок соединительных тканей млекопитающих – коллаген. В процессе выделения коллагена из тканей разрушаются межмолекулярные связи, что приводит к существенной потере его структурных и механических функций. Актуальной задачей является поиск и создание сшивающих агентов, изучение их структурных свойств и молекулярных механизмов их взаимодействия с молекулами коллагена. Работа по поиску сшивающих агентов является важной фундаментальной и прикладной задачей современной биохимии. В обзоре рассмотрены разные способы и механизмы сшивания коллагеновых молекул, а также влияние полученных материалов на биосовместимость с культивируемыми клетками.

Ключевые слова: коллаген, глутаровый альдегид, карбоновые кислоты, генипин, имиды

DOI: 10.31857/S0041377120070044

Коллаген изучают в исследовательских лабораториях с начала 20-го века, а в последние десятилетия он находит широкое применение в регенеративной медицине в качестве носителя для культивирования и трансплантации клеток. Коллаген используют для модификации синтетических полимерных материалов (Швед и др., 2007; Nashchekina et al., 2019). Интерес к этому белку, прежде всего, обусловлен тем, что коллаген является самым распространенным белком в тканях человека и занимает одну треть от общего белка организма. Это главный опорный гликопротеин, присутствующий во внеклеточном матриксе и в соединительной ткани, и поддерживающий их структурную целостность. Поэтому он является наиболее благоприятным субстратом для культивирования и трансплантации большинства клеток *in vitro* (Нащекина и др., 2017).

К настоящему времени описано 28 типов коллагена, различия между которыми обусловлены их разной локализацией в тканях, выполняемыми функциями и структурной сборкой основной полипептидной цепи (Sandhu et al., 2012). Большое количество коллагена находится в коже, костях, хрящах, базальной мембране, гладких мышцах, при

этом во всех тканях организма коллаген представлен различными типами. Так, например, кожа в основном состоит из смеси коллагенов I и IV типов, хрящ – I и II типов, роговица – I и V типов. Около 95% всего коллагена в организме человека составляют коллагены I, II и III типов, которые образуют механически прочные фибриллы. При биосинтезе коллагена *in vivo* происходит образование внутри- и межмолекулярных поперечных связей, которые придают его фибриллам стабильную структуру, механическую прочность и устойчивость к действию ферментов. Однако в процессе выделения коллагена из нативных тканей эти связи разрушаются, в результате чего сформированные на его основе носители в виде плёнок, гелей или пористых матриц, предназначенных для культивирования и трансплантации клеток, не обладают достаточной механической прочностью для трансплантации. Важным этапом при создании любых коллагеновых носителей является разработка условий сшивания, обеспечивающих не только механическую прочность и стабильность в процессе всего срока культивирования, но и не оказывающих токсического влияния на культивируемые клетки.

В последнее время активно проводятся исследования по поиску и разработке различных химических агентов и физических факторов для сшивания молекул коллагена *in vitro*. Самыми популярными способами для сшивки коллагена при формировании коллагеновых носителей являются фермента-

Принятые сокращения: ГА – глутаровый альдегид; EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимид; NHS – гидроксисукцинимид; ПА – проантоцианидины; PBS – фосфатно-солевой буферный раствор.

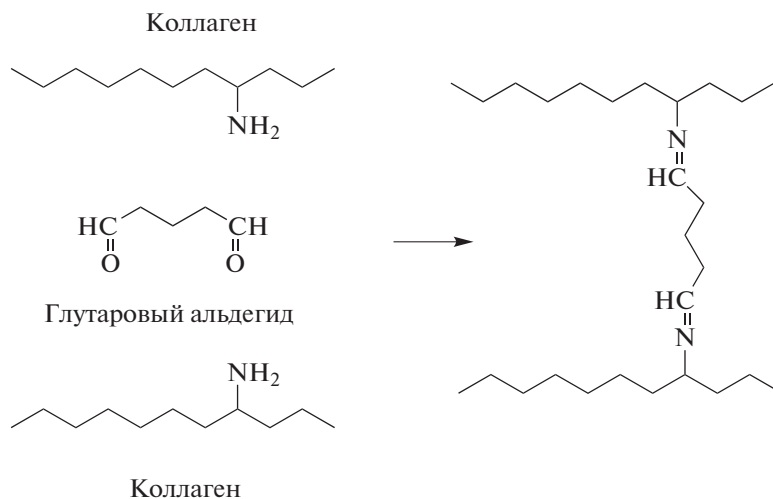


Рис. 1. Схема реакции сшивания молекул коллагена с помощью глутарового альдегида.

тивный, физический и химический. Выбор метода сшивки зависит от особенностей поставленной задачи, а также от типа культивируемых клеток.

В настоящем обзоре подробно рассматриваются условия сшивания коллагеновых молекул, а также анализируется влияние полученных носителей на культивируемые клетки.

ГЛУТАРОВЫЙ АЛЬДЕГИД

Сшивка коллагеновых волокон химическим способом заключается в их обработке с помощью химических сшивающих агентов. Среди многочисленных сшивающих агентов преимущественно используется глутаровый альдегид (ГА), поскольку он способен реагировать с функциональными группами как в белках, так и в углеводах.

ГА является линейным 5-углеродным диальдегидом и входит в число наиболее известных сшивающих агентов. Его химическая формула: C₅H₈O₂. ГА обладает бактерицидным, спорицидным и вирулицидным действием. Он широко используется для дубления в кожевенной промышленности, в качестве фиксирующего агента для электронной микроскопии и для снижения антигенности и тромбообразования при использовании биопротезных тканей (Chandran et al., 2012). В качестве сшивающего агента ГА был очень популярен из-за его коммерческой доступности и низкой стоимости в дополнение к его высокой реакционной способности. Он активно реагирует с аминогруппами при нейтральном значении pH и более эффективен, чем другие альдегиды при получении термически и химически стабильных сшивков. Фактически исследования реакций сшивания коллагена с моноальдегидом (формальдегидом) и диальдегидами, имеющими длину цепи от двух до шести атомов углерода (глиоксаля, малональдегида, сукциналдегида, глутаровый альдегид и адипальде-

гида), показали, что реакционная способность в этой серии имеет максимальное значение при пяти атомах углерода (Migneault et al., 2004).

ГА широко применяется в качестве сшивающего агента для биомедицинских материалов на основе коллагена (Нащекина и др., 2020). В медицинских исследованиях ГА используется для многих целей, например, для конструирования биопротезов сердечных клапанов, модификации желатина и других материалов и тканей. В стоматологии он используется для десенсибилизации чувствительного экспонированного дентина, для повышения механических свойств деминерализованного коллагена (Scheffel et al., 2015). Кроме того, его использовали для получения продуктов на основе очищенного коллагена, включая коллагеновые пасты и лиофилизированные коллагеновые губки (Peng et al., 2017).

Механизм сшивания молекул коллагена с помощью ГА (рис. 1) заключается в том, что альдегид реагирует с первичными аминогруппами остатков (гидроксил)-лизина в молекуле коллагена с образованием промежуточных оснований Шиффа, которые затем превращаются в стабильные и сложные поперечные связи. ГА является эффективным сшивающим агентом, потому что он образует стабильные сшивки лизина, а также полимеризует и сшивает остатки лизина на больших расстояниях друг от друга. Обычно 6–8 молекул ГА участвуют в одной сшивке “лизин–лизин” (Chandran et al., 2012).

Несмотря на широкое использование ГА в медицинских продуктах, по-прежнему имеются опасения его потенциальной цитотоксичности (Lee et al., 2001; Gough et al., 2002; Umashankar et al., 2012; Scheffel et al., 2015) и того, что он является инициатором неспецифической кальцификации тканей (Lee et al., 2001; Peng et al., 2012; Umashankar et al., 2012). Имеются довольно противоречивые данные о цитотоксичности материалов, сшитых ГА. Тем не менее, цитотоксич-

ность ГА зависит от используемой концентрации (Umashankar et al., 2012) и было показано, что ГА в концентрации до 8% не цитотоксичен (Reddy et al., 2015). ГА трудно использовать из-за его резкого запаха и низкого давления пара во время сшивания. Большинство результатов по сшиванию с помощью ГА было опубликовано на основе исследований *in vitro*, тогда как для точного понимания цитотоксичности и применимости в медицине материалов, сшитых ГА, необходим их анализ *in vivo*. Сшивка с помощью ГА является крайне нежелательной, поскольку при ее осуществлении в структуру коллагеновых волокон вводятся цитотоксические молекулы альдегида. Альдегид может оставаться неспецифически связанным с носителем даже после тщательной промывки, и, кроме того, молекулы альдегида, которые были включены в сшивки, могут высвобождаться из носителя в процессе его деградации, что также приведет к неблагоприятным последствиям. Было показано, что при использовании 0.25%-ного раствора ГА в 0.05 М уксусной кислоте происходит снижение пролиферативного потенциала хондроцитов, особенно в первые 15 сут наблюдения (Lee et al., 2001). Кроме того, было отмечено снижение способности данной культуры клеток синтезировать коллаген II типа.

Вместе с тем показано, что ГА оказывает токсическое влияние не на все типы клеток. Так, отсутствует цитотоксическое влияние альдегида на фибробласты кожи человека (Sheu et al., 2001; Delgado et al., 2017). Используя ГА в концентрации от 0 до 0.20%, исследователи обнаружили обратную закономерность его действия по отношению к фибробластам (Sheu et al., 2001). Было продемонстрировано, что при двух самых высоких концентрациях альдегида (0.15 и 0.20%) количество фибробластов увеличивалось со временем, а наиболее оптимальной с точки зрения низкой цитотоксичности была выбрана концентрация ГА 0.12%.

Токсический эффект присутствия ГА был выявлен на одонтоблестах при достижении концентрации 10% (Scheffel et al., 2015). Также было продемонстрировано, что обработка бычьего перикарда ГА вызывает токсический и антигенный ответы (Umashankar et al., 2012), которые в конечном итоге влияют на его долгосрочную эффективность в клиническом применении. Кроме того, ГА устойчив к коллагеназе, которая является основным ферментом в организме, ответственным за ремоделирование внеклеточного матрикса. Также было показано, что присутствие в коллагене ГА провоцирует апоптоз у остеобластов (Gough et al., 2002).

Поскольку после обработки скаффолдов ГА токсичность и кальцификация являются главными негативными факторами для жизнеспособности клеток, в настоящее время ведутся поиски способов снижения этих показателей. В частности, протезы сердечного клапана обрабатывали аминокислотами, такими как глицин и глутаминовая кислота (Gough et al., 2002). В

последнее время для улучшения сшивания ГА нативных тканей (например, бычьего перикарда) было предложено использовать защищенную нереакционноспособную мономерную форму ГА (Gough et al., 2002). Эта форма реагирует только со свободными аминокислотными остатками лизина после снятия защиты, обеспечивая более гомогенное распределение ГА.

Что касается механической прочности модифицированного коллагена, то применение ГА, как было показано во многих исследованиях, повышает этот показатель (Sheu et al., 2001; Lai, Ma, 2013). Многие механические характеристики носителей, такие как модуль упругости, вязкость, прочность, измеренные с помощью динамического механического анализатора, увеличивались с возрастанием концентрации ГА (Sheu et al., 2001). Однако его применение связано со структурными изменениями, в частности с повышением жесткости тканей, а также с изменениями вязкоупругих свойств сухожилий, что может клинически повлиять на функциональность протезов (Constable et al., 2018). При изучении влияния альдегида на амниотические мембраны было продемонстрировано улучшение стабильности мембран, влияние на нановолокнистые структуры, а также повышение эффективности сшивания с увеличением времени сшивки (Lai, Ma, 2013). Сшивание ГА также увеличивало температуру денатурации и устойчивость к ферментативной деградации коллагеновых пленок (Delgado et al., 2017).

КАРБОНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Недавно были предприняты попытки использовать карбоновые кислоты, например, лимонную кислоту, для сшивания и улучшения механических свойств и стабильности биоматериалов без негативного влияния на цитосовместимость (Jiang et al., 2012). Сшивание биоматериалов с применением лимонной кислоты обеспечивает их функциональность и приводит к лучшей гемосовместимости и увеличению доступности сайтов связывания для биоконъюгации (Reddy et al., 2015).

Карбоновые кислоты могут реагировать с гидроксильными и аминокислотными группами и, следовательно, сшивать как полисахариды, так и белки. На рис. 2 представлена схема реакции сшивания молекул коллагена с помощью одного из представителей карбоновых кислот – лимонной кислоты. Сшивание коллагена происходит за счёт взаимодействия аминокислотных групп коллагена и альдегидных групп лимонной кислоты, образующихся при деградации (рис. 2). Белки, сшитые карбоновыми кислотами, оказались биосовместимыми и обеспечивали желаемые улучшения свойств как биоматериалов на основе белков, так и углеводородов. Традиционно считалось, что сшивание карбоновыми кислотами (по меньшей мере, с тремя карбоксильными группами) происходит только при высокой температуре (150–175°C) и в присутствии катализаторов. Недавние исследования показали,

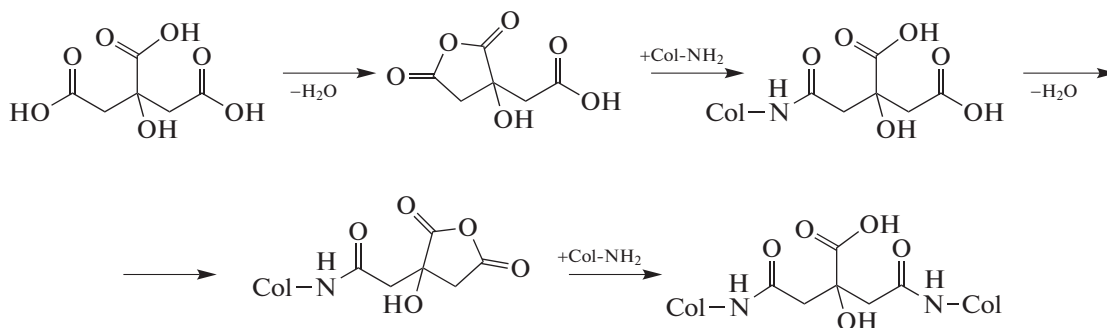


Рис. 2. Схема реакции сшивания коллагена (Col) с помощью лимонной кислоты.

что карбоновые кислоты даже с двумя карбоновыми группами могут сшивать биополимер во влажном и сухом видах и без необходимости использования потенциально цитотоксического катализатора (Naugh et al., 2009; Jiang et al., 2012). Исследования *in vitro* показали, что волокна, пленки и разделенные по фазам структуры коллагена могут быть сшиты с использованием лимонной кислоты.

Проводили экспериментальное сравнение лимонной кислоты и ГА в качестве сшивающих агентов для носителей, полученных с помощью электро-спиннинга. Мышечные фибробласты линии NIH 3T3 лучше адгезировали, пролиферировали и сохраняли жизнеспособность при культивировании на волокнах, сшитых лимонной кислотой (Jiang et al., 2012). Поскольку конъюгатное основание лимонной кислоты является важным промежуточным звеном в цикле Кребса, то лимонная кислота является цитосовместимым сшивающим агентом, а фрагменты лимонной кислоты, высвобождаемые во время деградации носителей, могут служить питательными веществами для клеток. Следовательно, лимонная кислота является перспективным сшивающим агентом для использования в регенеративной медицине.

Что касается механических характеристик, то сшитые с помощью лимонной кислоты коллагеновые волокна (по сравнению с ГА) показали более высокую прочность во влажном состоянии, но более низкую в сухом, а также могли сохранять свою фиброзную морфологию в натрий-фосфатном буфере при 37°C в течение 30 сут (Jiang et al., 2012). Увеличение концентрации лимонной кислоты повышает прочность волокон в сухом и влажном состоянии из-за образования ковалентных поперечных связей, но при этом не вызывает какой-либо значительной деформации коллагеновых волокон.

Лимонная кислота, в отличие от ГА, не может образовывать длинные сшивки, чтобы соединять реакционные участки коллагена на больших расстояниях и обеспечивать достаточное сшивание коллагеновых волокон, полученных методом электроформования. Для решения этой проблемы предложили использовать глицерин для увеличения длины сшивки по-

средством введения дополнительных гидроксильных групп, которые могут реагировать с карбоксильными группами лимонной кислоты, образуя разветвленную сеть, чтобы связывать функциональные группы на больших расстояниях и, таким образом, повысить эффективность сшивки (Jiang et al., 2012).

ГЕНИПИН

Генипин является природным сшивающим реагентом, который впервые был выделен в чистом виде из цветкового растения *Genipa americana*. Он представляет собой агликон иридоидного гликозида генипозиды, который был выделен ранее из плодов растений того же семейства *Gardenia jasminoides* Ellis. Также он может быть получен синтетическим путем (Büchi et al., 1967). Генипин и родственные иридоидные гликозиды широко используются в качестве противовоспалительных и желчегонных средств в фитотерапии (Liang et al., 2004). Кроме того, есть данные, что генипин может спонтанно реагировать с аминокислотами или белками с образованием темно-синих пигментов (Liang et al., 2004; Chiono et al., 2007). Эти пигменты используются при изготовлении пищевых красителей. Основной сферой применения генипина является сшивка биополимеров, содержащих аминокислоты, для биомедицинского использования. Он широко используется для ковалентной сшивки полисахаридов (хитозана и деацетилированной гиалуроновой кислоты), имеющих глюкозаминные звенья (Токарева и др., 2017). Другим объектом для сшивки с помощью генипина являются разнообразные белки, богатые лизином, аргинином и гидроксисилизином (Tsai et al., 2000; Bedran-Russo et al., 2006; Токарева и др., 2017). Кроме того, было показано, что генипин реагирует с сульфгидрильными группами глутатиона и цистеина *in vitro* (Tsai et al., 2000).

Механизм реакции генипина с аминокислотами (рис. 3) довольно сложен и напрямую зависит от значения pH (Токарева и др., 2017). Первая стадия реакции протекает при pH 4.0–10.5 и начинается с нуклеофильной атаки по 3 положению молекулы генипина, в результате чего происходит раскрытие цикла и последующая рециклизация с образованием ди-

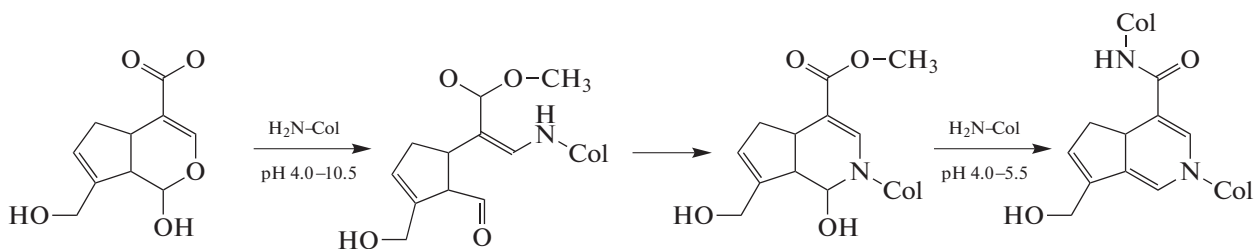


Рис. 3. Схема реакции сшивания коллагена (Col) с помощью генипина.

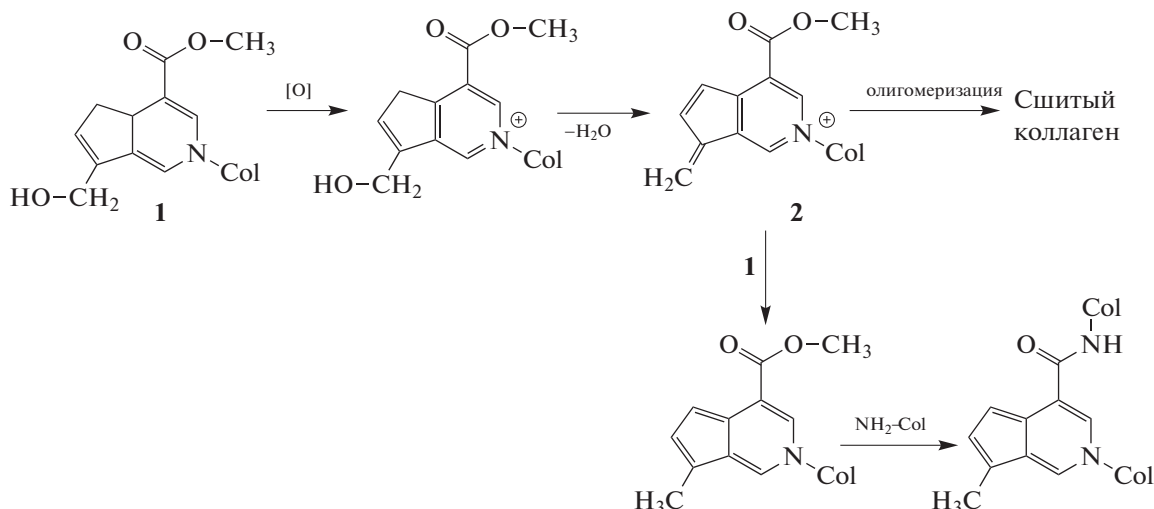


Рис. 4. Схема реакции сшивания коллагена (Col) генипином в присутствии окислителей. [O] – кислород.

гидропиридинового цикла. При pH 4.0–5.5 проходит более медленная реакция замещения по сложноэфирной группе, в результате чего образуется короткая связь между одной молекулой генипина и двумя молекулами коллагена.

Альтернативный вариант процесса сшивки инициируется окислителем, например, кислородом и приводит к олигомеризации остатков генипина (рис. 4). В процессе олигомеризации происходит ароматизация дигидропиридинового цикла с отщеплением одной молекулы воды. В результате, образующиеся голубые олигомерные продукты формируют более длинную сшивку, состоящую из 2–4 молекул генипина. Для осуществления этих реакций необходимы нейтральные или слабощелочные условия. Сильнощелочные значения pH (например, 13.6) приводят к альдольной конденсации генипина, в результате чего образуются олигомеры, содержащие до 80 звеньев. Альдегидные группы олигомеров вступают в реакцию со свободными аминогруппами полимеров и образуют еще более длинные сшивки, чем при остальных значениях pH (Zhang et al., 2014).

Генипин активно применяется для получения широкого спектра биоматериалов: волокон, мембран, губок и гидрогелей. Он используется для

сшивки хитозана, желатина и их смесей с другими полимерами для создания систем доставки лекарственных веществ (Chiono et al., 2007). Генипин является безопасным и нетоксичным веществом с высокой степенью биосовместимости (Tsai et al., 2000; Liang et al., 2004; Bedran-Russo et al., 2006; Chiono et al., 2007). Были проведены исследования с целью сравнения генипина с другими широко используемыми сшивающими агентами, такими как ГА, формальдегид, эпоксидные соединения и карбодиимид, и показана сравнительно низкая цитотоксичность генипина по сравнению с другими сшивающими агентами (Tsai et al., 2000; Liang et al., 2004). Например, сшитый генипином желатин в 10000 раз менее цитотоксичен, чем сшитый ГА желатин или биологические ткани (Liu et al., 2003). Кроме того, сшитые генипином биологические ткани демонстрируют отсутствие признаков кальцификации (Tsai et al., 2000; Huang et al., 2014).

Цитотоксичность генипина была исследована на фибробластах (Büchi et al., 1967), хондроцитах кролика (Yan et al., 2010), клетках нейробластомы (Chiono et al., 2007), клетках яичников китайского хомячка CHO-K1 (Tsai et al., 2000). Все результаты показали его более низкую токсичность по сравнению с

другими сшивающими агентами, а также лучшую адгезию, пролиферацию и жизнеспособность клеток. Например, сшитые генипином носители на основе коллагена и хитозана способствуют прикреплению и жизнеспособности хондроцитов и могут служить подходящим трехмерным носителем при восстановлении хрящевой ткани в регенеративной медицине (Yan et al., 2010).

Генипин очень популярен при создании композитных носителей. Носители на основе хитозана и желатина с 80%-ным содержанием последнего и сшитые с помощью генипина, могут быть использованы при регенерации периферических нервов (Chiono et al., 2007). Также показано, что генипин в диапазоне концентраций 0.2–0.8% способствует дифференцировке и пролиферации остеобластов, однако при повышении концентрации (более 0.8%) происходит ингибирование роста клеток (Liu et al., 2003).

Исследования по оценке генотоксического потенциала генипина в клетках CHO-K1 показали, что генипин не приводит к задержке клеточного цикла в отличие от ГА (Tsai et al., 2000). В то же время другие исследователи продемонстрировали снижение жизнеспособности клеток на сшитых генипином носителях (Torres-Giner et al., 2009) и даже цитотоксическое действие генипина на клетки (Liu et al., 2003).

Мембраны, волокна и гидрогели, обработанные генипином, демонстрировали улучшение механических свойств (Liang et al., 2004; Yan et al., 2010). Носители на основе коллагена и хитозана обладали более высокой ферментативной стабильностью. Кроме того, модуль упругости, измеренный с помощью динамического механического анализа, увеличивался с увеличением концентрации сшивающего агента (Yan et al., 2010). Генипин в низкой концентрации может эффективно сшивать аминокислоты, а увеличение его концентрации приводит к более высокой степени сшивки (Yan et al., 2010).

Генипин используется также и для укрепления носителей на основе смеси хитозана и желатина, что приводит к увеличению модуля упругости и механической жесткости образцов с увеличением количества сшивающего агента (Chiono et al., 2007). В результате образуются прочные нерастворимые в воде носители, однако генипин не оказывает значительного влияния на их термостойкость. Есть данные, что ткани, обработанные генипином, обладают сопоставимой с тканями, обработанными ГА, механической прочностью и устойчивостью к ферментативному расщеплению (Chiono et al., 2007). Генипин используют также и для укрепления коллагеновых волокон, полученных методом электроспиннинга (Huang et al., 2014). Как уже говорилось ранее, генипин является сшивающим агентом природного происхождения и, благодаря своей высокой биосовместимости, может непосредственно вводиться в ткани *in vivo*. Например, его применяли в качестве укрепляющего вещества для дентина, составляюще-

го основную часть ткани зубов (Bedran-Russo et al., 2006). Было показано, что обработка дентина 0.635%-ным раствором генипина увеличивает предел прочности на разрыв на 80%, что демонстрирует перспективность использования этого агента в стоматологии.

В целом, генипин зарекомендовал себя как безопасный и эффективный сшивающий агент для различных типов биоматериалов. Отличительной его особенностью является то, что степень сшивки можно регулировать, изменяя величину pH, однако способность генипина давать окрашенные соединения может ограничить его использование в некоторых областях медицины.

ИМИДЫ

Популярным сшивающим агентом для биоматериалов на основе коллагена является 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC). Известно, что это “мягкий” реагент для сшивания, не вызывающий денатурации белка (Usha et al., 2012). Растворимость в воде EDC также является дополнительным преимуществом. Часто при создании коллагеновых носителей карбодиимид используют в комбинации с N-гидроксисукцинимидом (NHS), в результате чего повышается эффективность связывания молекул коллагена и происходит стабилизация конечного продукта.

Схема реакции сшивания молекул коллагена состоит из нескольких этапов (рис. 5). Карбоксильные группы остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот коллагена вступают в реакцию с EDC с образованием интермедиатов изоацилмочевины. Далее реакционно-нестабильная изоацилмочевина реагирует с NHS с образованием полустабильного эфира. Группы карбоновой кислоты, активированные NHS, затем реагируют с аминокислотными остатками лизина и гидроксизина другой молекулы коллагена с образованием прочной амидной связи и высвобождают NHS.

Существенным достоинством этого механизма сшивания является то, что EDC сшивает молекулы коллагена путем образования изопептидов, не встраиваясь в макромолекулу (Usha et al., 2012). Кроме того, побочным продуктом реакции сшивки является мочевины, которая может быть легко удалена с помощью обычного промывания уже готовых сшитых материалов. Однако недостатком сшивки с помощью EDC является его ограниченная способность к поперечному сшиванию из-за его короткоцепочечной структуры и неспособности полимеризоваться (Delgado et al., 2017), то есть он может образовывать только внутримолекулярные и межмолекулярные сшивки небольшой длины в носителях на основе коллагена. Каждая сшивка с помощью EDC/NHS осуществляется с участием только одной свободной аминокислотной группы (Liang et al., 2004), в результате чего

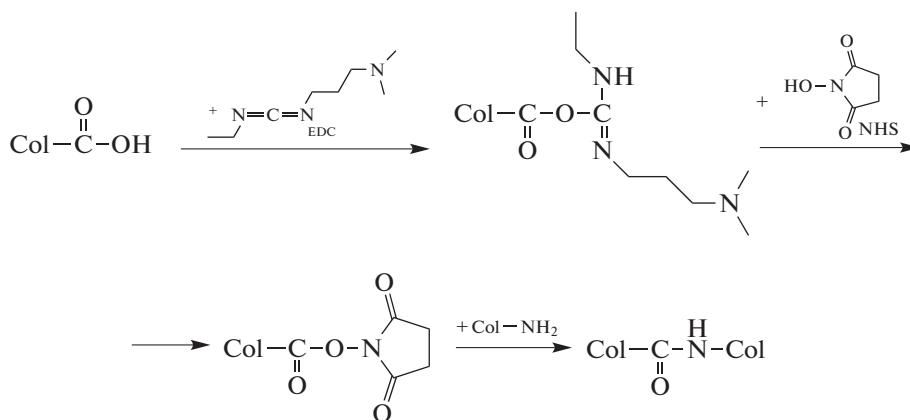


Рис. 5. Схема реакции сшивания коллагена (Col) с помощью имидов. EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодии-мид, NHS – N-гидрохисусцинимид.

происходит ограничение числа возможных образую-щихся сшивок.

Имиды EDC и NHS широко используются для сшивания различных типов коллагеновых носителей в качестве альтернативного варианта другим способам сшивки. Например, сшивка с помощью этих агентов является оптимальным вариантом для получения сосудистых трансплантатов с подходящими механическими свойствами (Buttafoco et al., 2006). Также были продемонстрированы положи-тельные результаты при сшивке коллагеновых воло-кон, полученных методом электроформования (Huang et al., 2014). Полученные таким образом во-локна сохраняли структуру до 3 мес. и не обладали цитотоксичностью.

Исследования *in vivo* коллагеновых носителей, сшитых EDC/NHS, также обычно дают хорошие ре-зультаты. Например, было показано, что 23 из 24 сши-тых коллагеновых носителей, имплантированных в роговицу кролика и свиньи для замещения верхнего слоя роговицы, оставались оптически прозрачными и не проявили каких-либо побочных реакций даже через 6 мес. после имплантации (Liu et al., 2006). Имплантированные носители способствовали реге-нерации эпителиальных клеток роговицы, слезной пленки и нервов. Сшитые коллагеновые импланта-ты имели аналогичные показатели мутности, топо-графии и толщины, что и строма роговицы человека.

В другом исследовании сшитый коллаген, им-плантированный крысам подкожно, показал низ-кую иммуногенность и редко вызывал повышенную инфильтрацию нейтрофилов и макрофагов (van Wa-chem et al., 1994). Также была проведена импланта-ция сшитого имплантата для устранения дефекта ахиллова сухожилия кролика. Спустя 10 сут имплан-тат резорбировал и был заменен новообразованным сухожилием (Goldstein et al., 1989). Известны приме-ры имплантации коллагенового волокна в сухожилие надколенника овцы (Enea et al., 2013). Однако им-

плантат обладал очень низкой скоростью деградации, что привело к замедлению регенерации тканей.

Смесь EDC/NHS, как и другие агенты, изучали с точки зрения обеспечения механических, физиче-ских и биологических характеристик. Сшивающие агенты существенно увеличивают прочность и жест-кость нитей (Cornwell et al., 2006; Usha et al., 2012). Сшивание коллагеновых пленок увеличивает проч-ность на разрыв до 57%, а модуль упругости – в 17 раз по сравнению с несшитыми (Reddy et al., 2015), сши-тые коллагеновые губки обладают улучшенной тер-мостабильностью и более низкой скоростью биоде-градации (Reddy et al., 2015). Кроме того, EDC может влиять на процесс фибриллообразования.

С помощью порошковой рентгеновской дифрак-ции было показано, что скорость образования фиб-рилл увеличивается в присутствии EDC/NHS по сравнению с нативным коллагеном (Usha et al., 2012). В другом исследовании методом атомно-сило-вой микроскопии было показано наличие четкой фиб-риллярной структуры в случае сшитого образца, чего не наблюдали в образце без сшивки (Shepherd et al., 2015). Хотя EDC широко используется как вариант, альтернативный сшивке ГА, пленки, сшитые с по-мощью EDC/NHS, не показали улучшения таких ха-рактеристик, как скорость денатурации и устойчи-вость к ферментативному расщеплению по сравне-нию с несшитыми образцами (Delgado et al., 2017).

При добавлении EDC плотность сшивки колла-геновых носителей ниже, чем при использовании других химических агентов (которые часто приводят к воспалительной реакции организма), однако био-совместимость сохраняется на высоком уровне. Многие исследовательские лаборатории не только показали отсутствие токсического влияния коллагена, сшитого EDC/NHS, но отмечали и увеличение жизнеспособности и пролиферации разных клеточ-ных линий, таких как мышечные остеобластоподоб-ные клетки MC3T3-E1 (Li et al., 2013), эндотелиаль-

ные клетки пупочной вены человека (HUVEC) (Wissink et al., 2000), мезенхимные стволовые клетки человека (Torres-Giner et al., 2009).

Высокую пролиферативную активность продемонстрировали гладкомышечные клетки человека при культивировании на искусственных кровеносных сосудах, сформированных на основе сшитого коллагена (Buttafoco et al., 2006). Однако показано и отрицательное влияние сшивающего агента на адгезию и пролиферацию таких клеток, как фибробласты и кератиноциты человека (Hanthamrongwit et al., 1996; Powell, Boyce, 2006; Vax et al., 2017). Возможно, это обусловлено тем, что промежуточные продукты реакции сшивания с помощью EDC/NHS являются нестабильными и токсичными, а, следовательно, оставаясь в сшитых коллагеновых носителях, могут оказывать токсическое воздействие на культивируемые клетки (Vax et al., 2017). Поэтому часто после обработки сшивающими агентами необходима тщательная промывка коллагеновых носителей (Ahmad et al., 2015).

В литературе есть сравнительные данные о сшивающих агентах, таких как ГА, генипин, EDC/NHS, и физических способах сшивки. EDC/NHS уступает физическим методам в обеспечении механической прочности коллагеновых скаффолдов (Cornwell et al., 2006), но способствует значительному увеличению пролиферации и адгезии клеток (Reddy et al., 2015). Гидрогели коллагена, сшитые EDC, обеспечивают аналогичную устойчивость к ферментативной деградации коллагеназой, как и гели, обработанные ГА (Reddy et al., 2015). Также показано, что коллагеновые нити обладают повышенным коэффициентом набухания из-за более низкой плотности швов и более высокой гидрофильности поверхности по сравнению с образцами, сшитыми физическими способами (Cornwell et al., 2006).

Показано, что коллагеновые носители, сшитые с помощью EDC, способствуют пролиферации и биосинтетической активности хондроцитов, в отличие от носителей, сшитых с помощью ГА, УФ-излучения и дегидротермальной обработки (Lee et al., 2001). Клетки, культивируемые на носителях, сшитых с помощью генипина, также уступают жизнеспособности клеток, культивируемых на несшитых носителях, что было продемонстрировано на мезенхимных стволовых клетках человека (Huang et al., 2014). В то же время сшитые с помощью генипина желатиновые гидрогели оказались менее цитотоксичными, чем сшитые с помощью EDC/NHS, а эффективность сшивки с помощью генипина превосходила EDC/NHS, что было показано с помощью существенного уменьшения количества свободных аминок групп почти в 3 раза (Liang et al., 2004).

Существенное влияние на свойства коллагеновых носителей оказывает не только структура сшивающего агента, но и его концентрация. Изменение концентрации EDC позволяет формировать колла-

геновые носители с контролируемыми физическими и биологическими свойствами для различных задач тканевой инженерии и регенеративной медицины (Davidenko et al., 2015). Однако есть данные о том, что концентрация EDC и NHS не оказывает существенного влияния на механику коллагеновых волокон, хотя высокая концентрация приводит к уменьшению биосовместимости сшитых носителей, важной для адгезии и пролиферации клеток, но обеспечивает устойчивость к коллагеназе (Ahmad et al., 2015). Это может быть обусловлено тем, что при высоких концентрациях диффузия агента в коллаген замедляется за счет быстрого начального сшивания молекул, расположенных на поверхности носителя, что снижает эффективность сшивки и оставляет реакционноспособные группы на поверхности коллагена (Powell et al., 2006; Vax et al., 2017).

Низкая концентрация сшивающего агента увеличивает биосовместимость носителя без потери механических свойств (Ahmad et al., 2015). Добавление максимальной концентрации сшивающего агента (25 мМ) приводит к изменению морфологии клеток, в результате чего они приобретают неспецифическую для них округлую форму. Введение большого количества сшивающего агента также приводило к существенному уменьшению пролиферации и адгезии клеток. Не только концентрация сшивающего агента, но и соотношение EDC к NHS влияет на свойства материала, в том числе и на степень сшивки коллагена (Olde Damink et al., 1996). Таким образом, подбор оптимальных концентрации и соотношения сшивающего агента к количеству карбоксильных групп в молекуле коллагена позволяет создать носитель с необходимыми параметрами (Ahmad et al., 2015; Davidenko et al., 2015).

ПРОАНТОЦИАНИДИНЫ (ПА)

ПА — широко распространенные растительные полифенолы, встречающиеся в овощах, фруктах, орехах, семенах и цветах в виде основных предшественников сине-фиолетовых и красных пигментов. В промышленности эти соединения добывают из виноградных зерен и сосновой коры. ПА впервые были выделены в 1947 г. французским фармацевтом Жаком Маскелье из красной кожицы арахиса (Nagpal et al., 2016). ПА также известны и под другими названиями, среди которых наиболее распространенными являются олигомерические процианидины, проантоцианоидоловые олигомеры, пикногенолы и лейкоцианидины (Han et al., 2003). ПА относятся к конденсированным танинам (дубильным веществам), представляющие собой бифлавоноиды из группы катехинов.

С точки зрения химического строения ПА представляют собой полимеры, состоящие из мономерных звеньев флаван-3-ола и имеющие скелет С6—С3—С6 (рис. 6). В зависимости от типа радикала (R) ПА делятся на 3 группы. ПА относят к классу пропе-

ларгонидинов в случае $R_1, R_2 = H$, к классу процианидинов в случае $R_1 = H, R_2 = OH$ и к классу продельфинидинов в случае $R_1, R_2 = OH$.

Механизм сшивания с помощью ПА включает в себя ковалентные, ионные, водородные связи и гидрофобные взаимодействия. Механизм сшивания ПА с коллагеном может происходить в основном за счет образования водородной связи между протеинамидной карбонильной и фенолгидроксильной группами в дополнение к ковалентной и гидрофобной связям, которые обеспечивают стабилизацию коллагена, обработанного ПА (Nagpal et al., 2016).

ПА обладают широким спектром биологических и фармакологических свойств, что позволяет широко использовать их не только в пищевой промышленности, но и в медицине. Они часто используются в качестве антиоксидантов из-за их антирадикальной активности, заключающейся в способности улавливать и поглощать свободные радикалы, а также ингибировать окислительное повреждение тканей. Считается, что способность ПА к поглощению радикалов обусловлена его характерной молекулярной структурой, а именно фенольными гидроксильными группами, выступающими в качестве доноров водорода, и сопряженными двойными связями в арильных кольцах (Chen et al., 2020). Кроме того, ПА обладают способностью неконкурентно ингибировать фермент ксантиноксидазу, который катализирует образование свободных радикалов (Fine, 2000). Исследования *in vivo* показали, что ПА является даже более эффективным “защитником” от свободных радикалов и окисления, чем витамин С, сукцинат витамина Е и бета-каротин (Fine, 2000). Способность гидрогелей из смеси коллагена и глюкоманна, сшитых с помощью ПА, поглощать радикалы возрастала: 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила — на 20%, а гидроксильного радикала — в 2 раза (Chen et al., 2020). Именно благодаря антиоксидантной активности материалы, модифицированные ПА являются предпочтительными при создании трансплантатов сосудистой ткани.

Существуют данные и об антивирусной, антибактериальной, антиканцерогенной и противовоспалительной активности ПА (Zhai et al., 2009). Благодаря своей способности увеличивать синтез коллагена, ингибировать ферменты, разрушающие структуру соединительной ткани, такие как эластаза, гиалуронидаза, коллагеназа, ПА стали широко использовать в качестве природных биосовместимых сшивающих агентов и агентов биомодификации (Choi et al., 2016). Важным достоинством этой группы соединений для использования в тканевой инженерии является их высокая афинность к белкам, богатым пролином, таким как коллаген, а также способность увеличивать активность фермента пролингидроксилазы, что важно для биосинтеза коллагена (Han et al., 2003; Nagpal et al., 2016).

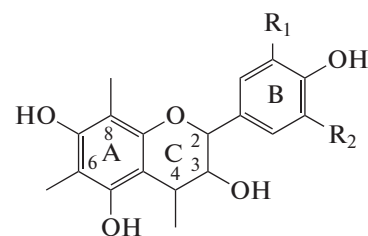


Рис. 6. Базовая структура проантоцианидинов: $R_1, R_2 = H$ (пропеларгонидины); $R_1 = H, R_2 = OH$ (процианидины); $R_1, R_2 = OH$ (продельфинидины).

Пролин — аминокислота с карбонильным кислородом, примыкающим к азоту вторичного амина, является очень хорошим акцептором водородных связей, поэтому богатые пролином белки, такие как коллаген, образуют особенно прочные водородные связи с ПА. Кроме того, коллаген имеет спиральную структуру, которая повышает доступность пептидного остова для связывания с водородом. Поскольку конденсированные танины состоят из сильно гидроксильных структур, они способны образовывать нерастворимые комплексы с углеводами и белками (Kim et al., 2005).

ПА не обладают острой и субхронической токсичностью, а пути их метаболизма хорошо изучены (Zhai et al., 2009). Цитотоксичность соединений была изучена на многих клетках, в числе которых фибробласты (Han et al., 2003; Kim et al., 2005), клетки пародонтальной связки человека (hPDLC) (0), клетки эндотелия пупочной вены человека (HUVEC) (Chen et al., 2020), интерстициальные клетки сердечного клапана (Zhai et al., 2006). Анализ цитотоксичности исследуемых материалов показал, что ПА в 120 раз менее токсичны для фибробластов, чем ГА, что свидетельствует о низкой токсичности остатков полифенолов (Han et al., 2003). Кроме того, ПА способствует пролиферации фибробластов в большом диапазоне концентраций вплоть до 200 г/мл (Han et al., 2003; Kim et al., 2005).

Результаты подкожной имплантации носителей, сшитых ПА, также показали низкую воспалительную реакцию в течение 3–6 нед. после трансплантации в отличие от несшитых носителей, а также высокую пролиферативную активность фибробластов (Han et al., 2003). Однако для других клеток диапазон концентраций ПА, не оказывающий токсического влияния, значительно ниже. Так, методом МТТ-анализа показано, что оптимальной концентрацией ПА, при которой сохраняется высокая жизнеспособность клеток hPDLC, является 10 мкМ, в то время как концентрация 20 мкМ оказывается уже токсической (Choi et al., 2016). И с помощью микроскопии (сканирующей электронной и флуоресцентной) было показано, что при концентрации ПА 10 мкМ клетки, культивируемые на сшитом коллагене, хорошо размножались и прикреплялись в непосред-

ственной близости друг к другу с многочисленными цитоплазматическими выростами. Клетки HUVES после 4-суточного культивирования на сшитых гидрогелях коллаген–глюкоманнан показали высокие адгезию и миграцию для всех изучаемых концентраций ПА (0.2–1.0 мг/мл) (Chen et al., 2020). Клетки образовывали мембранные выросты, включая филоподии и ламеллоподии, что облегчало дальнейшее распространение вплоть до образования монослоя и приводило к образованию веретенообразной формы клеток. Как и в случае с фибробластами, имплантация сшитых гидрогелей вызывала только умеренное воспаление спустя 4 нед. (Chen et al., 2020). МТТ-анализ клеток сердечного клапана после 6-суточного культивирования продемонстрировал, что ПА могут стимулировать пролиферацию, когда концентрация ПА ниже 125 мкг/мл (Zhai et al., 2006).

Исследование *in vitro* деградации коллагеновых носителей, сшитых ПА, доказали их устойчивость к расщеплению бактериальной коллагеназой. После подкожной имплантации через 3–6 нед. не обнаружили ухудшения сшивок, тогда как несшитые носители деградировали спустя несколько сут (Han et al., 2003; Zhai et al., 2006). Сшитые ПА пленки на основе смеси хитозана и желатина также оказались устойчивы к протеолитическому расщеплению, а скорость деградации сшитых пленок в течение 4-х нед. после имплантации была ниже, чем у несшитых пленок (Kim et al., 2005).

Для ПА были предложены три механизма защиты коллагена от деградации. Во-первых, устойчивость к протеазам может быть достигнута посредством необратимых конформационных изменений протеаз в каталитическом домене или аллостерического ингибирования других доменов, которые участвуют в биодеградации коллагена. Было показано, что ПА ингибирует образование матриксных металлопротеиназ (ММП). Во-вторых, ПА может косвенно влиять на выработку и активацию протеазы, модулируя иммунные ответы хозяина. В-третьих, ПА увеличивает плотность коллагеновой сетки, индуцируя экзогенные поперечные связи и уменьшая активность коллагеназы, тем самым повышая устойчивость носителей к ферментативной деградации (Nagpal et al., 2016). Обеспечение высокой стабильности сшивок с помощью ПА возможно путем уменьшения диэлектрической проницаемости раствора во время хранения. Так, при хранении в PBS в течение 30 сут при 37°C сшитых скаффолдов водородные связи дестабилизируются, однако при снижении диэлектрической проницаемости путем добавления этанола к PBS стабильность водородных связей не нарушается (Han et al., 2003). Кроме того, окраска с помощью реакции Фон Косса выявила, что в сшитых с помощью ПА носителях кальцификация не происходит (Han et al., 2003). Это объясняется тем, что ПА блокирует все анионные группы в спирали коллагена путем образования водородных связей. В результате происходит ингибирование образования кристаллическо-

го ядра кальция и снижение процесса кальцификации (Zhai et al., 2006; Chen et al., 2020).

ПА также оказывает влияние на механические и физические характеристики носителей. Так, ПА повышает прочность и эластичность материалов, увеличивая прочность на разрыв, уменьшает степень набухания (Kim et al., 2005), улучшает механическую жесткость с увеличением концентрации сшивающего агента (Chen et al., 2020). ПА по сравнению с ГА показал существенное увеличение предела прочности при растяжении, а модуль упругости увеличивался в зависимости от концентрации ПА (Zhai et al., 2006). ПА влияет и на поверхность коллагеновых носителей, а именно повышает шероховатость, что может оказать влияние на пролиферацию клеток (Choi et al., 2016). Однако было показано, что ПА поддерживает прежнюю морфологию носителей в течение всего периода имплантации (Chen et al., 2020) и превосходит ГА в поддержании естественной конфигурации сердечных клапанов (Zhai et al., 2006).

Таким образом, ПА являются перспективными агентами для использования в тканевой инженерии и регенеративной медицине. Они способны образовывать биосовместимые сшитые носители для различных целей, а скорость сшивания, механические характеристики и биоразлагаемость можно контролировать с помощью изменения концентрации ПА.

ФЕРМЕНТЫ

В качестве сшивающих агентов используются ферменты, которые могут быть обнаружены в биологических тканях. К ним относятся, например, лизилоксидаза, которая участвует в окислении и дезаминировании лизина с образованием альдегидной группы и альдегидных связей, или транслугутиназа, способная катализировать образование ковалентных связей между свободными аминогруппами (рис. 7) и гамма-карбоксамидными группами глутамина.

Несомненным достоинством ферментативного способа является его низкая токсичность и низкая иммуногенность, в отличие от химических и физических способов. Использование ферментов для сшивания коллагена является более мягким и безопасным методом для человека, поскольку не включает чужеродных и опасных для организма веществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современная регенеративная медицина активно использует методы и подходы клеточной и тканевой инженерии. Создание носителей, структура и свойства которых имитировали бы микроокружение клеток *in vivo*, позволит не только увеличить эффективность клеточного продукта для регенерации ткани, но и создать *in vitro* аналог живой ткани. Не вызывает сомнения перспектива использования для формирования таких носителей одного из самых распространенных белков внеклеточного матрикса — кол-

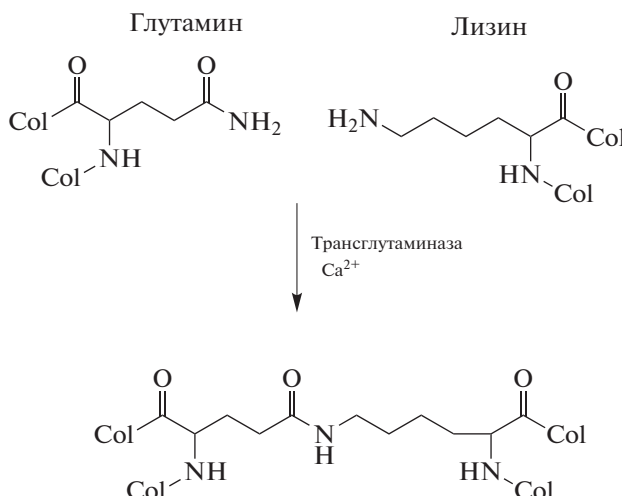


Рис. 7. Схема реакции сшивания коллагена ферментативным способом с помощью трансглутаминазы.

лагена. Сшивка коллагеновых молекул *in vitro* является важной задачей не только для фундаментальных, но и для прикладных исследований. Исследования последних лет показали, что для успешной разработки функциональных коллагеновых носителей необходимо подобрать такой сшивающий агент, который обеспечивал бы необходимые для выбранного типа ткани степень сшивки, прочность и биосовместимость. Данный обзор показывает, что для эффективного сшивания коллагена при формировании функциональной тканеинженерной конструкции, необходим правильный и тщательный выбор сшивающего агента. К сожалению, в настоящее время большинство сшивающих агентов не обладают универсальными свойствами. Использование одних позволяет получать достаточно прочные носители, но с низкой биосовместимостью, другие же, обладая достаточно хорошей биосовместимостью, с трудом подвергаются ферментативному разложению или имеют низкую проницаемость. Поэтому требуются дальнейшие поиски оптимальных сшивающих агентов, обеспечивающих формирование коллагеновых носителей, которые бы по структурным, механическим, биологическим и функциональным свойствам были идентичны нативным тканям.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект № 20-03-00400_a).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Нащекина Ю.А., Луконина О.А., Дарвиш Д.М., Нащекин А.В., Елоховский В.Ю., Юдин В.Е., Михайлова Н.А. 2020. Биологические и реологические свойства коллагена, сшитого глутаровым альдегидом. Журнал технической физики. Т. 90. Вып. 9. С. 1601. (*Nashchekina Yu.A., Lukonina O.A., Darvish D.M., Nashchekin A.V., Elokhovskiy V.Yu., Yudin V.E., Mikhailova N.A.* 2020. Biological and rheological properties of collagen crosslinked with glutaraldehyde. *J. Tech. Phys.* V. 90. P. 000.)
- Нащекина Ю.А., Юдинцева Н.М., Никонов П.О., Иванова Е.А., Смагина Л.В., Воронкина И.В. 2017. Влияние концентрации коллагенового геля на функциональную активность мезенхимных стромальных клеток костного мозга. Клеточные технологии в биологии и медицине. Т. 163. № 1. С. 12. (*Nashchekina Yu.A., Yuditnceva N.M., Nikonov P.O., Ivanova E.A., Smagina L.V., Voronkina I.V.* 2017. Effect of concentration of collagen gel on functional activity of bone marrow mesenchymal stromal cell. *Bull. Exper. Biol. Med.* V. 163. № 1. P. 123.) <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3751-9>
- Токарева М.И., Иванцова М.Н., Миронов М.А. 2017. Гетероциклы природного происхождения в качестве нетоксичных реагентов для сшивки белков и полисахаридов. Химия гетероциклических соединений. Т. 53. С. 21. (*Tokareva M.I., Ivantsova M.N., Mironov M.A.* 2017. Heterocycles of natural origin as non-toxic reagents for cross-linking proteins and polysaccharides. *Chem. Heterocyclic Compounds.* V. 53. P. 21.)

- Швед Ю.А., Кухарева Л.В., Зорин И.М., Билибин А.Ю., Блинова М.И., Пинаев Г.П.* 2007. Взаимодействие культивируемых клеток кожи с разными структурными формами коллагена, нанесённого на полилактидную матрицу. Цитология Т. 49. № 1. С. 32. (*Shved Yu.A., Kukhareva L.V., Zorin I.M., Bilibin A.Yu., Blinova M.I., Pinaev G.P.* 2007. Interaction of cultured skin cells with the polylactide matrix covered with different collagen structural isoforms. *Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya)*. V. 1. P. 89.)
- Ahmad Z., Shepherd J.H., Shepherd D.V., Ghose S., Kew S.J., Cameron R.E., Best S.M., Brooks R.A., Wardale J., Rushton N.* 2015. Effect of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and N-hydroxysuccinimide concentrations on the mechanical and biological characteristics of cross-linked collagen fibres for tendon repair. *Regen. Biomater.* V. 2. P. 77.
- Bax D.V., Davidenko N., Gullberg D., Hamaia S.W., Farndale R.W., Best S.M., Cameron R.E.* 2017. Fundamental insight into the effect of carbodiimide crosslinking on cellular recognition of collagen-based scaffolds. *Acta Biomater.* V. 49. P. 218.
- Bedran-Russo A.K.B., Pereira P.N.R., Duarte W.R., Drummond J.L., Yamauchi M.* 2006. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* V. 80. P. 268.
- Büchi G., Gubler B., Schneider R.S., Wild J.* 1967. The total synthesis of racemic genipin. *J. Am. Chem. Soc.* V. 89. P. 2776.
- Buttafoco L., Engbers-Buijtenhuijs P., Poot A.A., Dijkstra P.J., Daamen W.F., van Kuppevelt T.H., Feijen J.* 2006. First steps towards tissue engineering of small-diameter blood vessels: Preparation of flat scaffolds of collagen and elastin by means of freeze drying. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* V. 77. P. 357.
- Chandran P.L., Paik D.C., Holmes J.W.* 2012. Structural mechanism for alteration of collagen gel mechanics by glutaraldehyde crosslinking. *Connect. Tissue Res.* V. 53. P. 285.
- Chen J., Cai Z., Wei Q., Wang D., Wu J., Tan Y., Lu J., Ai H.* 2020. Proanthocyanidin-crosslinked collagen/konjac glucomannan hydrogel with improved mechanical properties and MRI trackable biodegradation for potential tissue engineering scaffolds. *J. Mater. Chem. B.* V. 8. P. 316.
- Chiono V., Pulieri E., Vozzi G., Ciardelli G., Ahluwalia A., Giusti P.* 2007. Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* V. 19. P. 889.
- Choi Y., Kim H.J., Min K.S.* 2016. Effects of proanthocyanidin, a crosslinking agent, on physical and biological properties of collagen hydrogel scaffold. *Restor. Dent. Endod.* V. 41. P. 296.
- Constable M., Burton H.E., Lawless B.M., Gramigna V., Buchan K.G., Espino D.M.* 2018. Effect of glutaraldehyde based cross-linking on the viscoelasticity of mitral valve basal chordae tendineae. *Biomed. Eng. Online.* V. 17. P. 93.
- Cornwell K.G., Lei P., Andreadis S.T., Pins G.D.* 2006. Cross-linking of discrete self-assembled collagen threads: Effects on mechanical strength and cell–matrix interactions. *J. Biomed. Mater. Res. A.* V. 80. P. 362.
- Davidenko N., Schuster C.F., Bax D.V., Raynal N., Farndale R.W., Best S.M., Cameron R.E.* 2015. Control of crosslinking for tailoring collagen-based scaffolds stability and mechanics. *Acta Biomater.* V. 25. P. 131.
- Delgado L. M., Fuller K., Zeugolis D.I.* 2017. Collagen cross-linking: biophysical, biochemical and biological response analysis. *Tissue Eng. Part A.* V. 23. P. 1064.
- Enea D., Gwynne J., Kew S., Arumugam M., Shepherd J., Brooks R., Ghose S., Best S., Cameron R., Rushton N.* 2013. Collagen fibre implant for tendon and ligament biological augmentation. *In vivo study in an ovine model.* *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* V. 21. P. 1783.
- Fine A.M.* 2000. Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. *Altern. Med. Rev.* V. 5. P. 144.
- Goldstein J.D., Tria A.J., Zawadsky J.P., Kato Y.P., Christiansen D., Silver F.H.* 1989. Development of a reconstituted collagen tendon prosthesis. A preliminary implantation study. *J. Bone Joint. Surg. Am.* V. 71. P. 1183.
- Gough J.E., Scotchford C.A., Downes S.* 2002. Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen/poly(vinyl alcohol) films is by the mechanism of apoptosis. *J. Biomed. Mater. Res.* V. 61. P. 121.
- Han B., Jaurequi J., Tang B.W., Nimni M.E.* 2003. Proanthocyanidin: A natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *J. Biomed. Mater. Res. A.* V. 65. P. 118.
- Hanthamrongwit M., Reid W.H., Grant M.H.* 1996. Chondroitin-6-sulphate incorporated into collagen gels for the growth of human keratinocytes: the effect of cross-linking agents and diamines. *Biomaterials.* V. 17. P. 775.
- Haugh M.G., Jaasma M.J., O'Brien F.J.* 2009. The effect of dehydrothermal treatment on the mechanical and structural properties of collagen-GAG scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A.* V. 89. P. 363.
- Huang G.P., Shanmugasundaram S., Masih P., Pandya D., Amara S., Collins G., Arinzech T. L.* 2014. An investigation of common crosslinking agents on the stability of electrospun collagen scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A.* V. 103. P. 762.
- Jiang Q., Reddy N., Zhang S., Roscioli N., Yang Y.* 2012. Water-stable electrospun collagen fibers from a non-toxic solvent and crosslinking system. *J. Biomed. Mater. Res. A.* V. 101. P. 1237.

- Kim S., Nimni M.E., Yang Z., Han B. 2005. Chitosan/gelatin-based films crosslinked by proanthocyanidin. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* V. 75. P. 442.
- Lai J.Y., Ma H.K. 2013. Glutaraldehyde cross-linking of amniotic membranes affects their nanofibrous structures and limbal epithelial cell culture characteristics. *Int. J. Nanomedicine.* V. 8. P. 4157.
- Lee C., Grodzinsky A., Spector M. 2001. The effects of cross-linking of collagen-glycosaminoglycan scaffolds on compressive stiffness, chondrocyte-mediated contraction, proliferation and biosynthesis. *Biomaterials.* V. 22. P. 3145.
- Li J., Ren N., Qiu J., Jiang H., Zhao H., Wang G., Boughton R.I., Wang Y., Liu H. 2013. Carbodiimide crosslinked collagen from porcine dermal matrix for high-strength tissue engineering scaffold. *Int. J. Biol. Macromol.* V. 61. P. 69.
- Liang H.C., Chang W.H., Liang H.F., Lee M.H., Sung H.W. 2004. Crosslinking structures of gelatin hydrogels cross-linked with genipin or a water-soluble carbodiimide. *J. Appl. Pol. Sci.* V. 91. P. 4017.
- Liu B.S., Yao C.H., Chen Y.S., Hsu S.H. 2003. *In vitro* evaluation of degradation and cytotoxicity of a novel composite as a bone substitute. *J. Biomed. Mater. Res. A.* V. 67. P. 1163.
- Liu Y., Gan L., Carlsson D.J., Fagerholm P., Lagali N., Watsky M.A., Griffith M. 2006. A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* V. 47. P. 1869.
- Migneault I., Dartiguenave C., Bertrand M.J., Waldron K.C. 2004. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechnol.* V.37. P. 790.
- Nagpal R., Singh P., Singh S., Tyagi S.P. 2016. Proanthocyanidin: A natural dentin biomodifier in adhesive dentistry. *J. Res. Dent.* V.4. P. 1.
- Nashchekina Y., Kukhareva L., Zorin I., Samusenko I., Bilibin A., Blinova M. 2019. Poly(D,L-lactide)/PEG blend films for keratinocytes cultivation and skin reconstruction. *Biomed. Mater.* V. 14. C. 065005.
<https://doi.org/10.1088/1748-605x/ab3aa2>
- Olde Damink L.H., Dijkstra P.J., van Luyn M.J., van Wachem P.B., Nieuwenhuis P., Feijen J. 1996. Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide. *Biomaterials.* V. 17. P. 765.
- Peng Y.Y., Glattauer V., Ramshaw J.A.M. 2017. Stabilisation of collagen sponges by glutaraldehyde vapour crosslinking. *Int. J. Biomater.* V. 1. P. 1.
- Powell H.M., Boyce S.T. 2006. EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability. *Biomaterials.* V. 27. P. 5821.
- Reddy N., Reddy R., Jiang Q. 2015. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends Biotechnol.* V. 33. P. 362.
- Sandhu S.V., Gupta S., Bansal H., Singla K. 2012. Collagen in health and disease. *J. Orofac. Res.* V. 2. P. 153.
- Scheffel D.L.S., Soares D.G., Basso F.G., de Souza Costa C.A., Pashley D., Hebling J. 2015. Transdental cytotoxicity of glutaraldehyde on odontoblast-like cells. *J. Dent.* V. 43. P. 997.
- Shepherd D.V., Shepherd J.H., Ghose S., Kew S.J., Cameron R.E., Best S.M. 2015. The process of EDC-NHS cross-linking of reconstituted collagen fibres increases collagen fibrillar order and alignment. *APL Mater.* V. 3. P. 8.
- Sheu M.T., Huang J.C., Yeh G.C., Ho H.O. 2001. Characterization of collagen gel solutions and collagen matrices for cell culture. *Biomaterials.* V. 22. P. 1713.
- Torres-Giner S., Gimeno-Alcaniz J.V., Ocio M.J., Lagaron J.M. 2009. Comparative performance of electrospun collagen nanofibers cross-linked by means of different methods. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* V. 1. P. 218
- Tsai C.C., Huang R.N., Sung H.W., Liang H.C. 2000. *In vitro* evaluation of the genotoxicity of a naturally occurring crosslinking agent (genipin) for biologic tissue fixation. *J. Biomed. Mater. Res.* V. 52. P. 58.
- Umashankar P., Kumari T., Mohanan P. 2012. Glutaraldehyde treatment elicits toxic response compared to decellularization in bovine pericardium. *Toxicol. Int.* V. 19. P. 51.
- Usha R., Sreeram K.J., Rajaram A. 2012. Stabilization of collagen with EDC/NHS in the presence of l-lysine: A comprehensive study. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* V. 90. P. 83.
- Van Wachem P.B., van Luyn M.J.A., Olde Damink L.H., Feijen J., Nieuwenhuis P. 1994. Biocompatibility and tissue regenerating capacity of crosslinked dermal sheep collagen. *J. Biomed. Mater. Res.* V. 28. P. 353.
- Wissink M.J.B., van Luyn M.J.A., Beermink R., Dijk F., Poot A.A., Engbers G. H.M., Beugelling T., van Aken W.G., Feijen J. 2000. Endothelial cell seeding on crosslinked collagen: effects of crosslinking on endothelial cell proliferation and functional parameters. *Thromb. Haemost.* V. 84. P. 325.
- Yan L.P., Wang Y.J., Ren L., Wu G., Caridade S.G., Fan J.B., Reis R.L. 2010. Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res. A.* V. 95. P. 465.
- Zhai W., Chang J., Lin K., Wang J., Zhao Q., Sun X. 2006. Crosslinking of decellularized porcine heart valve matrix by procyanidins. *Biomaterials.* V. 27. P. 3684.
- Zhai W., Chang J., Lü X., Wang Z. 2009. Procyanidins-cross-linked heart valve matrix: anticalcification effect. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* V. 90. P. 913.
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.31363>
- Zhang X., Chen X., Yang T., Zhang N., Dong L., Ma S., Liu X., Zhou M., Li B. 2014. The effects of different cross-linking conditions of genipin on type I collagen scaffolds: an *in vitro* evaluation. *Cell. Tiss. Bank.* V. 15. P. 531.

Chemical Cross-Linking Agents for Collagen: Interaction Mechanisms and Perspectives for Regenerative Medicine

Yu. A. Nashchekina^{a,*}, O. A. Lukonina^a, and N.A. Mikhailova^a

^a*Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064 Russia*

^{*}*e-mail: yuliya.shved@gmail.com*

The development of regenerative medicine contributes to the implementation of cellular technologies and the development of new bioactive materials. For the cell cultivation and transplantation, it is necessary to create scaffolds, the structure and properties of which would be identical to their native environment. The ideal material for forming such scaffolds is collagen - one of the main structural elements of most body tissues. In the process of collagen extraction from natural sources, bonds between molecules are broken, which leads to a significant loss of structural and mechanical functions. Therefore, the search for cross-linking agents, the study of their structure and mechanisms of interaction with collagen molecules is an critical fundamental and applied problem. The review discusses different methods and mechanisms of cross-linking of collagen molecules, as well as the effect of cross-linking conditions on the functional activity of cultured cells.

Keywords: collagen, glutaraldehyde, carboxylic acids, genipin, imides