

УДК 577.12

ВЛИЯНИЕ КАРБОДИИМИДА НА СТРУКТУРНО-МЕХАНИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОЛЛАГЕНОВЫХ ПЛЕНОК

© 2021 г. Ю. А. Нашекина¹, *, М. Ю. Сироткина¹, Д. М. Дарвиш¹, И. А. Барсук²,
О. А. Москалюк³, Н. А. Михайлова¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

²Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, 194044 Россия

³Санкт-Петербургский государственный университет промышленных технологий и дизайна,
Санкт-Петербург, 191186 Россия

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

Поступила в редакцию 18.01.2021 г.

После доработки 28.02.2021 г.

Принята к публикации 01.03.2021 г.

Коллаген – один из важнейших белков внеклеточного матрикса. Благодаря своей высокой биосовместимости, он является привлекательным природным полимером и материалом для создания тканеинженерных матриц, в частности матриц, имитирующих строу роговицы глаза. В данной работе из тканей животных был экстрагирован и охарактеризован коллаген I типа, и на его основе сформированы коллагеновые пленки. С целью создания дополнительных ковалентных связей в пленках применяли сшивающий агент 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC/NHS). Исследовано влияние обработки EDC/NHS на механические свойства и деградацию пленок из коллагена I типа. Показано увеличение жесткости матриц и их устойчивости к биодegradации после обработки коллагена. Проведен анализ влияния обработки коллагена EDC/NHS на жизнеспособность и морфологию клеток роговицы линии SIRC. Показано, что обработка пленок сшивающим агентом повышает жизнеспособность клеток линии SIRC и не изменяет их морфологию.

Ключевые слова: коллаген I типа, карбодиимид, клеточная линия SIRC, биодegradация, механические свойства коллагеновых пленок

DOI: 10.31857/S004137712103007X

Согласно данным ВОЗ, на 2017 г. в мире насчитывают около 36 млн людей, страдающих от слепоты. Поражения роговицы являются одной из основных причин слепоты. Заболевания роговицы имеют различную этиологию, но все они проявляются в разрушении структуры ткани. При серьезных осложнениях показана пересадка кадаверной (трупной) донорской роговицы – кератопластика (Bourges, 2017; Di Zazzo et al, 2017). Помимо ряда достоинств, кератопластика имеет существенные недостатки и, прежде всего, большую вероятность тканевой несовместимости трансплантата, несмотря на хорошую биосовместимость по отношению к органу зрительной си-

стемы – глазу. Также остро стоят вопросы дефицита и хранения донорского материала (Gain et al., 2016). Альтернативой донорской роговице может служить искусственный кератопротез и тканеинженерные конструкции, которые представляют собой пленку или матрицу, с выращенными на них клетками. Перспективным материалом для формирования такой пленки является белок внеклеточного матрикса – коллаген I типа. Коллаген – основной структурный белок внеклеточного матрикса, он составляет около 30% от всех белков тела человека. Молекула коллагена включает в себя три левозакрученных полипептидных α -цепи, которые в свою очередь образуют правозакрученную тройную спираль (Holmes et al., 2018). Коллаген в нативном виде обладает значительной прочностью и устойчивостью к биодegradации за счет многочисленных межмолекулярных ковалентных связей. Однако при обработке ферментами или кислотами во время экстракции коллагена из тканей нативные незрелые ковалентные связи разрываются, и в раствор выходит молекулярный коллаген. Коллагеновые матрицы, изготавливаемые из раствора коллагена, обладают низкими прочностными ха-

Принятые сокращения: ГА – глутаровый альдегид; ЛСК – лимбальные стволовые клетки; DMEM F-12 – питательная среда Игла в модификации Дюльбекко; питательная смесь F-12; EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид; MES – 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота; MTT – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид; NHS – N-гидроксисукцинимид; PBS – фосфатно-солевой буфер; SDS – додецилсульфат натрия; SIRC – клеточная линия из ткани роговицы кролика “Statens Seruminstitut Rabbit Cornea”.

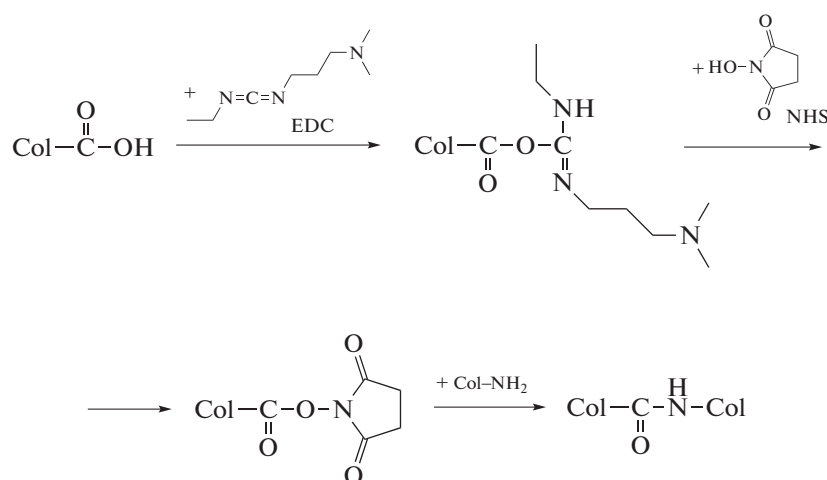


Рис. 1. Схема реакции сшивания коллагена (Col) с помощью имидов.

EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид, NHS – N-гидроксисукцинимид.

рактическими и требуют обработки сшивающими агентами для образования дополнительных межмолекулярных связей. На сегодняшний день в литературе представлен достаточно широкий спектр различных способов сшивания молекул коллагена (Нащекина и др., 2020б). Все подобные методы условно можно разделить на два класса – физические и химические методы сшивания. К физическим методам относятся дегидротермальный и радиационный методы. Дегидротермальный метод заключается в нагревании образца до температуры свыше 90°C в глубоком вакууме для его обезвоживания. В результате образуются ковалентные связи между амидной и карбоксильной группами, а также между амидной и гидроксильной группами (Oliveira et al., 2019). Сшивание коллагена путем облучения матрицы ультрафиолетовым или рентгеновским излучением позволяет точно регулировать время и интенсивность воздействия, а также одновременно стерилизовать образец (Rýgllová et al., 2017).

Большинство химических сшивающих агентов можно подразделить на реагирующие с ε-аминогруппами коллагена и реагирующие с карбоксильными группами коллагена. К первой группе относятся эпоксиды, хиноны, формальдегид, глутаровый альдегид и изоцианат, ко второй группе – карбодиимид и ацилазид (Paul et al., 2003; Rýgllová et al., 2017). Среди химических сшивающих агентов наибольшую популярность имеют глутаровый альдегид и карбодиимид.

Глутаровый альдегид (ГА) образует ковалентные сшивки между свободными первичными аминами лизина, иногда аргинина и карбоксильной группой глутаминовой кислоты. Реакция сшивания ГА с остатками лизина или гидроксилизина приводит к образованию промежуточного основания Шиффа, а дальнейшая реакция приводит к альдольной кон-

денсации, в результате чего образуются ГА-связи (Rýgllová et al., 2017; Нашекина и др., 2020a). Карбодиимиды относятся к типу сшивающих агентов, которые при образовании межмолекулярных связей не включаются в конечный продукт и образуют так называемые “связи нулевой длины”, из-за чего они имеют низкую цитотоксичность (Rýgllová et al., 2017). Наиболее часто используемым карбодиимидом является 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC) (Paul et al., 2003).

EDC активирует карбоксильную группу глутаминовой или аспарагиновой кислоты в полипептидной цепи, которые затем могут реагировать с аминогруппами лизина или гидроксилизина в других цепях, с образованием амидной связи. Добавление N-гидроксисукцинимид (NHS) снижает скорость гидролиза активированной группы и повышает эффективность реакции. Побочные продукты реакции (производные мочевины) проявляют определенную степень цитотоксичности, но они растворимы в воде и могут быть вымыты из конструкции после сшивания (Rose et al., 2014; Rýgllová et al., 2017; Oryan et al., 2018). Реакция сшивки с карбодиимидом представлена на рис. 1.

Несмотря на большое количество опубликованных данных по использованию карбодиимид для сшивания коллагена, все еще недостаточно информации о влиянии разных концентраций EDC на свойства коллагеновых пленок, обработанных этим сшивающим агентом. Также в литературе полностью отсутствуют данные по взаимодействию клеток роговицы с коллагеновыми пленками, сшитыми EDC. Целью настоящего исследования была оценка структурно-механических свойств коллагеновых пленок, обработанных раствором EDC разной концентрации, а также исследование цитосовместимо-

сти полученных пленок по отношению к клеткам роговицы линии SIRC.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Выделение коллагена I типа. Коллаген I типа выделяли из сухожилий крысиных хвостов путем кислотной экстракции (Швед и др., 2007). Коллаген экстрагировали в 0.5 М растворе уксусной кислоты и осаждали NaCl, доведя концентрацию соли в растворе до 0.9 М. После проведения ряда диализов в уксусной кислоте и фосфатов натрия коллаген стерилизовали диализом против 0.5%-ного раствора хлороформа и снова диализовали против раствора уксусной кислоты. Чистоту выделенного белка подтверждали методом SDS-электрофореза.

Приготовление коллагеновых пленок. Из полученного раствора коллагена I типа с концентрацией 4.6 мг/мл методом полива формировали пленки. Пленки были высушены при температуре 37°C в течение 2 сут. Для изучения взаимодействия клеток с коллагеновой поверхностью пленки отливали на дно лунок 24 и 96-луночных плат.

Сшивание коллагена в пленках. Сшивающие агенты 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид (EDC) (Sigma-Aldrich, США) и N-гидроксисукцинимид (NHS) (Sigma-Aldrich, США) растворяли в 0.05 М 2-(N-морфолино) этансульфоновой кислоте (MES-буфере) (Sigma-Aldrich, США) при pH 5.5. Сшивающие агенты растворяли до конечной концентрации, соответствующей определенному мольному соотношению к количеству карбоксильных групп коллагена (их количество в коллагене составляет 1.2 мМ на 1 г коллагена). Мольное соотношение EDC, NHS и карбоксильных групп коллагена I типа представлено в табл. 1. Пленки, полученные из раствора коллагена I типа, инкубировали в растворе в течение 1 ч. Затем для удаления непрореагировавших веществ и побочных продуктов реакции пленки промывали 2 раза по 10 мин в растворе фосфатно-солевого буфера (PBS) и 2 раза по 10 мин в бидистилляте "Super-Q". Пленки стерилизовали под действием UV-излучения в течение 20 мин.

Оценка механических свойств пленок. Исследование механических свойств пленок проводили на установке INSTRON 1122 (Instron, США), при скорости растяжения 10 мм/мин. В процессе испытаний записывали диаграммы растяжения материалов, на основе которых определяли следующие величины: прочность (σ_p), измеряемую в мегапаскалях (МПа); эластичность (ϵ) – относительное удлинение при разрыве в процентах (%); модуль упругости (E) в гигапаскалях (ГПа).

Оценка биодegradации пленок под действием протеолитического фермента коллагеназы. Бактериальную коллагеназу (Sigma-Aldrich, США) растворяли в буфере TES-Ca (50 мМ TES и 0.36 CaCl₂) (Sigma-Aldrich, США) и добавляли к образцу в количестве 1 U

Таблица 1. Мольное соотношение EDC, NHS и карбоксильных групп коллагена I типа

Сшивающий агент	Мольное соотношение	
EDC	0.2	5.2
NHS	0.1	2.6
COOH	1	1

на 1 мг коллагена. Затем образцы инкубировали в течение 1 ч при постоянном перемешивании и температуре 37°C. Биодegradацию пленок оценивали по количеству растворившегося коллагена методом определения оксипролина в растворе.

Измерение оксипролина в растворе. Оксипролин – одна из основных аминокислот коллагена, которая отсутствует в большинстве других белков. Измерение оксипролина в растворе позволяет определить количество коллагена в образце. Коллагеновые пленки до и после обработки коллагеназой гидролизуют в стеклянных ампулах в 6 М HCl при 120°C в течение 1 сут. Полученные гидролизаты высушивали в лиофилизаторе FreeZone (Labconco, Германия). Затем к сухим образцам добавляли 200 мкл воды и 1 мл реактива А (0.62 М хлорамин Т в растворе, содержащем 1 часть изопропанола, 1 часть H₂O и 8 частей ацетатного-цитратного буфера (pH = 6.0)). Из полученного раствора отбирали по 1 мл смеси и инкубировали 20 мин при комнатной температуре. После этого добавляли 1 мл реагента Б (32.3 М 4-Диметиламинобензальдегид (ПДАБА) в растворе, содержащем 7 частей изопропанола и 3 части HClO₄ (60%)) и инкубировали 15 мин при температуре 65°C. Затем раствор охлаждали и фотометрировали на спектрофотометре ПЭ-5400УФ (Экротим, Россия) при длине волны 550 нм; сравнение проводили с контрольным образцом.

Культивирование клеток линии SIRC. Клетки роговицы кролика линии Seruminstitut Rabbit Cornea (SIRC) были предоставлены ЦКП "Коллекция культур клеток позвоночных" (Институт цитологии РАН). Клетки культивировали в среде DMEM-F12 (Биолот, Россия), содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки (HyClone, США), 0.4% гентамицина (Gibco, США) и 0.5% L-глутамина (Lonza, США) при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Для экспериментов клетки рассевали в лунки 96-луночных плат в количестве 700 и 6500 клеток на лунку, а также на стекла диаметром 11 мм в лунки 24-луночных плат в количестве 6500 клеток на лунку.

Флуоресцентная микроскопия. Клетки культивировали на пленках в течение 1 сут, после чего пленки с клетками промывали в PBS и фиксировали в 4%-

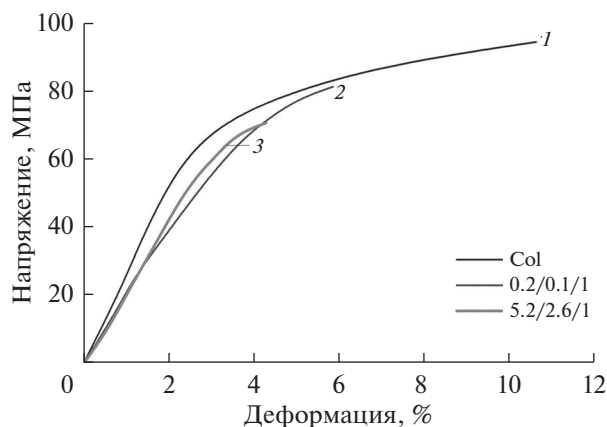


Рис. 2. Кривые растяжения образцов. Зависимость деформации растяжения от напряжения: *Кривая 1* – пленка на основе коллагена I типа (Col); *кривые 2 и 3* – пленки на основе Col, обработанные соответственно сшивающим агентом 0.2/0.1/1 и 5.2/2.6/1 (указано мольное соотношение EDC, NHS и карбоксильных групп (COOH) молекулы коллагена).

ном растворе формальдегида (Sigma-Aldrich, США) в течение 20 мин. Затем пленки обрабатывали 0.1%-ным раствором Тритон X-100 (Sigma-Aldrich, США). Окраску цитоскелета проводили путем обработки 8%-ным раствором родамин-фаллоидина (Invitrogen, США). Препараты фиксировали на предметном стекле, ядра клеток окрашивали DAPI с помощью заключающей среды Mounting Medium with DAPI (Abcam, США).

Организацию актинового цитоскелета анализировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Olympus FV3000 (Германия) и флуоресцентного микроскопа LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss AG, Германия).

МТТ анализ. Жизнеспособность клеток после 1 и 4 сут культивирования оценивали с помощью МТТ метода. После культивирования клеток линии SIRC в каждую лунку 96-луночной платы вносили 50 мкл раствора 3-(4,5-диметилтиазол 2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ) (5 мг/мл) в среде DMEM-F-12 и клетки инкубировали еще 2 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. По окончании инкубации среду с МТТ осторожно удаляли, и в каждую лунку добавляли 50 мкл DMSO (Биолот, Россия). Клетки в растворе ресуспендировали и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Показатели оптической плотности измеряли на спектрофотометре при длине волны 570 нм. Значение оптической плотности для контрольного образца принимали 100%.

Статистическая обработка данных. Для установления достоверности различий полученных данных использовали *t*-критерий Стьюдента. Данные представляли в виде средних значений ± SD (Standard Deviation, стандартное отклонение) ($n = 3$ для исследования биодеградации, $n = 5$ для МТТ-теста).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Коллаген I типа, выделенный из сухожилий крысиных хвостов, был охарактеризован методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле. Важным признаком структурной целостности выделенного коллагена является наличие на электрофореграмме определенного набора (5 и более) бандов, соответствующих описанным ранее в литературных источниках (Lillie et al., 1987; Rýgllová et al., 2013). Образец коллагена I типа содержит два банды (размером 120–140 кДа, в зависимости от источника коллагена), соответствующих мономерам двух α -цепей ($\alpha 1$ и $\alpha 2$). Кроме того, в образце присутствуют димеры и тримеры α -цепей, которые представлены в виде так называемых β - и γ -компонентов соответственно.

На основе выделенного коллагена формировали пленки. Далее пленки обрабатывали в растворе сшивающего агента. Количество сшивающего агента для эксперимента рассчитывали в мольном соотношении относительно карбоксильных групп коллагена (EDC/NHS/COOH). Нами были использованы концентрации компонентов в составе сшивающего агента близкие к использованным другими авторами (Duan, Sheardown 2007; Ahmad et al., 2015): EDC/NHS/COOH – 0.2/0.1/1 и 5.2/2.6/1.

На первом этапе было проанализировано влияние сшивающих агентов на механические свойства пленок. Пленки испытывали в режиме растяжения, результаты исследований представлены на рис. 2 и в табл. 2. Полученные результаты показывают, что эластичность сшитых пленок обратно пропорциональна концентрации сшивающего агента: наименее эластичными оказались пленки с высокой концентрацией EDC. В тоже время прочность и модуль упругости сшитых пленок несколько снижаются по сравнению с контрольными образцами. Это согласуется с данными, представленными в работах других авторов (Angele et al., 2004; Powell, Boyce 2006; Liu et al., 2018).

Исследование влияния сшивающих агентов на скорость деградации проводили путем обработки пленок бактериальной коллагеназой. Количество растворенного коллагена определяли по количеству оксипролина в пробе. Результаты представлены на рис. 3. Анализ показал значительное повышение устойчивости сшитых коллагеновых пленок к действию коллагеназы.

При формировании коллагеновых пленок для улучшения их механических характеристик мы использовали сшивающие агенты, которые могут оказывать токсическое влияние на культивируемые клетки. В связи с чем, важной характеристикой пленок, которую необходимо исследовать, является их цитотоксичность. Для выявления возможной цитотоксичности пленок, обработанных сшивающим агентом, мы оценивали жизнеспособность клеток с помощью МТТ теста. Для исследования была выбрана линия клеток SIRC роговицы кролика. Клет-

Таблица 2. Характеристика и параметры механических свойств пленок на основе коллагена I типа при растяжении*

Образец	Ширина, мм	Толщина, мм	Прочность, МПа	Удлинение при разрыве, %	Модуль упругости, ГПа
Col 1	5	0.008	92 ± 9	10.3 ± 2	2.4 ± 0.4
0.2/0.1/1	3	0.012	83 ± 7	6.4 ± 2	2.3 ± 0.3
5.2/2.6/1	3	0.011	71 ± 9	4.3 ± 1	2.1 ± 0.5

* Состав образцов указан в подписи к рис. 2

ки стандартной линии SIRC имеют преимущество по сравнению с первичными лимбальными стволовыми клетками (ЛСК), популяция которых гетерогенна; также свойства ЛСК зависят от возраста и состояния здоровья донора.

Жизнеспособность клеток, культивируемых на коллагеновых пленках, обработанных сшивающим агентом, исследовали в сравнении с контрольными образцами (покровное стекло и пленки, обработанные растворителем для сшивающего агента – MES). Так как EDC/NHS относится к сшивающим агентом “нулевой длины”, то есть реагент участвует в реакции сшивания молекул коллагена, но сам не встраивается в новообразованную связь, ожидается, что он не должен оказывать негативного эффекта на клетки. Полученные результаты подтверждают это предположение (рис. 4). Негативное влияние могут оказывать остатки сшивающего агента в случае недостаточного отмывания его после обработки пленок. Обработка сшивающим агентом не только не несет отрицательного эффекта, что свидетельствует о полном удалении остатков непрореагировавшего сшивающего агента, но и оказывает достоверное положительное влияние на жизнеспособность клеток после 1 сут культивирования в случае обработки пленок сшивающим агентом в меньшей концентрации. Данная тенденция (в пределах погрешности) наблюдается и при использовании более высокой концентрации сшивающего агента. К тому же было показано достоверное положительное влияние сшитых пленок на жизнеспособность клеток после 4 сут культивирования. Увеличение количества жизнеспособных клеток линии SIRC на сшитых пленках через 1 и 4 сут после посева, вероятно, связана не с химическими, а с механическими свойствами пленки. Сравнительно недавно было показано, что жесткость матриц прямо пропорционально влияет на распластанность, адгезию и пролиферацию культивируемых клеток (Wong et al., 2004).

Морфологию клеток и организацию их актинового цитоскелета оценивали с помощью световой и флуоресцентной микроскопии. Результаты представлены на рис. 5. Было продемонстрировано, что

клетки, растущие на обработанных сшивающим агентом пленках, являются намного более распластанными по сравнению с контролем. В контрольных образцах (стекло) клетки имеют округлую форму, собраны в агрегаты, цитоскелет имеет неорганизованную структуру. На коллагеновых пленках, не обработанных или обработанных растворителем MES, большинство клеток имеют округлую форму, единичные клетки распластаны. На сшитых пленках большее количество клеток находятся в распластанном состоянии. В клетках наблюдается хорошо организованный цитоскелет, ядра несколько увеличены.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Коллаген широко используется в тканевой инженерии, этот белок имеет ряд преимуществ по сравнению с другими синтетическими и природными материалами, поскольку обладает высокой биосовместимостью.

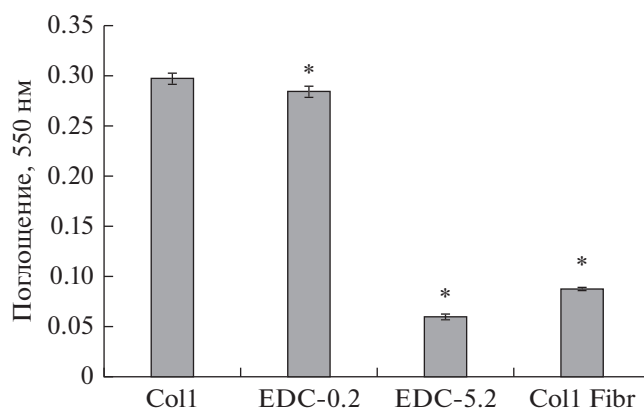


Рис. 3. Диаграмма, иллюстрирующая характер деградации коллагеновых пленок под действием коллагеназы. Col – пленка на основе коллагена I типа, EDC-0.2 и EDC-5.2 пленки, обработанные раствором с соотношением компонентов сшивающего агента к карбоксильным группам коллагена (EDC/NHS/COOH) 0.2/0.1/1 и 5.2/2.6/1 соответственно. Звездочкой отмечены статистически достоверные отличия от контроля ($p \leq 0.05$).

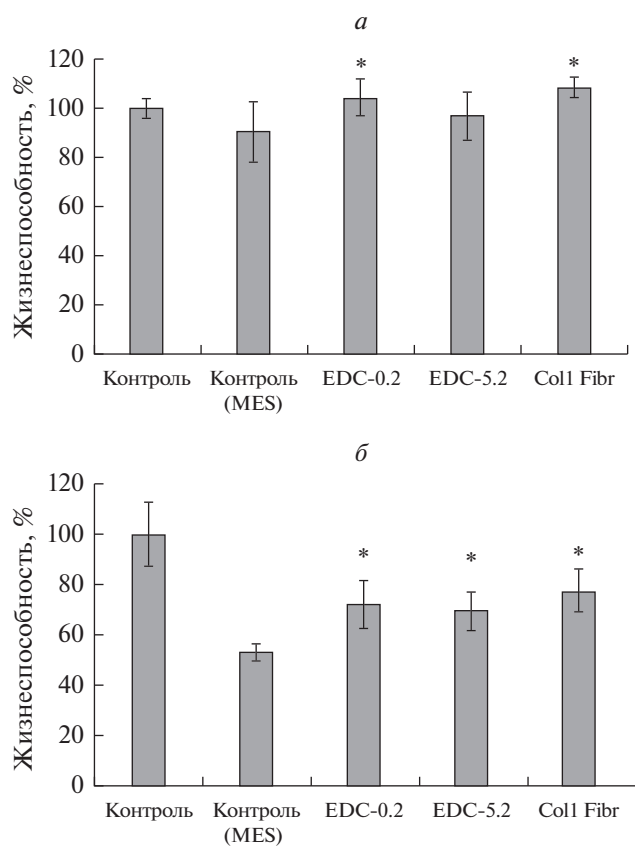


Рис. 4. Жизнеспособность клеток линии SIRC, культивируемых на шитых коллагеновых пленках в течение 1 сут (*а*) и 4 сут (*б*). На диаграмме представлены относительные значения данных, полученных в МТТ-тесте; за 100% был принята оптическая плотность контроля. Контроль – клетки на культуральном пластике, контроль (MES) – клетки на пленках на основе коллагена I типа, обработанных растворителем для сшивающего агента (MES-буфером), EDC-0.2 и EDC-5.2 – клетки на пленках, обработанных раствором с соотношением компонентов сшивающего агента к карбоксильным группам коллагена (EDC/NHS/COOH) 0.2/0.1/1 и 5.2/2.6/1 соответственно. Звездочкой отмечены статистически достоверные отличия от контроля ($p \leq 0.05$).

мостью и присутствует в подавляющем большинстве тканей животных и человека.

Кислотная экстракция позволяет получить коллаген I типа близкий к его нативной структуре. Нативный коллаген, в отличие от сформированных коллагеновых пленок, имеет незрелые и зрелые ковалентные связи. При кислой экстракции коллагена разрушаются незрелые альдиминовые ковалентные связи, а также электростатические и гидрофобные связи в фибриллах. В раствор выходит молекулярный коллаген. Поэтому необработанные пленки, полученные из раствора коллагена, имеют нестабильные механические свойства и большую скорость биodeградации по сравнению с нативным коллагеном.

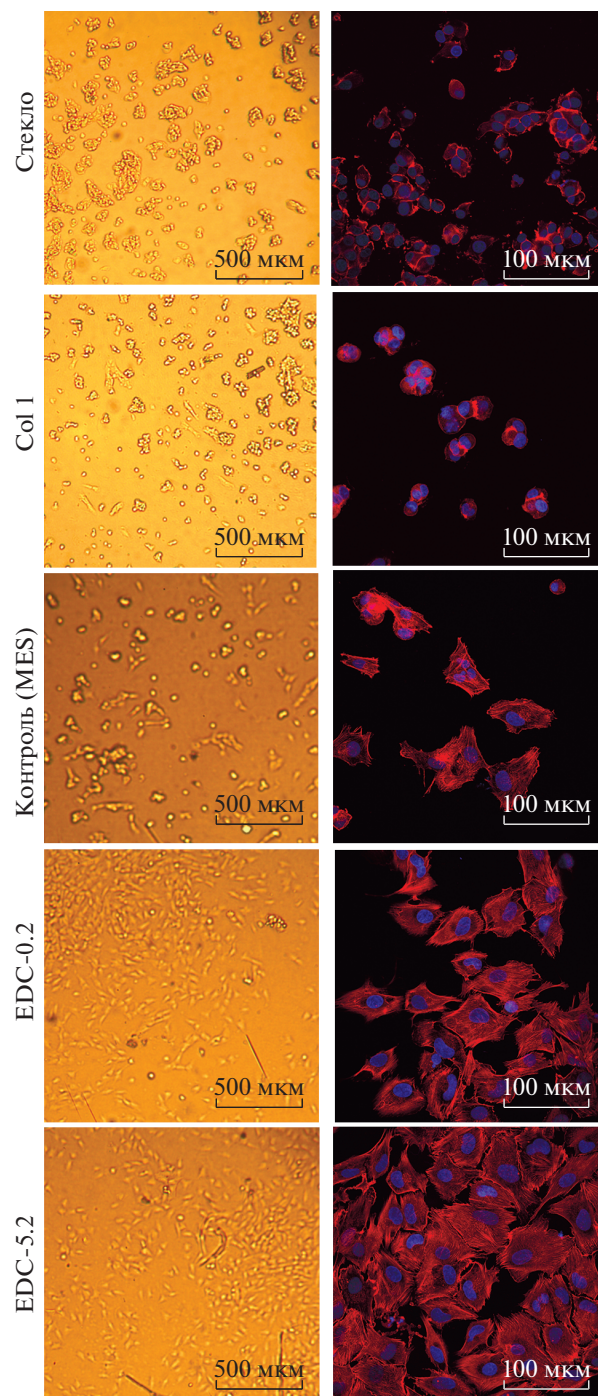


Рис. 5. Морфология и структура актинового цитоскелета клеток линии SIRC в разных условиях культивирования. Стекло – контрольные клетки на покровном стекле, контроль (MES) – клетки на пленках на основе коллагена I типа, обработанных растворителем для сшивающего агента (MES-буфером), EDC-0.2 и EDC-5.2 – клетки на пленках, обработанных раствором с соотношением компонентов сшивающего агента к карбоксильным группам коллагена (EDC/NHS/COOH) 0.2/0.1/1 и 5.2/2.6/1 соответственно. Левая панель – световая микроскопия, ув. об. 8×, правая панель – конфокальная микроскопия, ув. об. 40×. Красный цвет – актиновые микрофиламенты, окраска родамин-фаллоидином; синий цвет – ядра клеток, окраска DAPI.

Для улучшения механических свойств и снижения скорости биodeградации, пленки на основе молекулярного коллагена I типа обрабатывали раствором сшивающего агента EDC/NHS. Данный сшивающий агент — один из наиболее распространенных и часто используемых химических сшивающих агентов в тканевой инженерии. EDC/NHS имеет важное преимущество, поскольку он не высвобождается в процессе биodeградации пленок, так как реагент не встраивается в конечную цепь, образуя так называемые “связи нулевой длины”.

При испытании механических свойств коллагеновых пленок было показано, что эластичность пленок снижается при увеличении концентрации сшивающего агента. Снижение эластичности можно объяснить увеличением числа ковалентных связей, препятствующих перегруппировке структурных элементов в процессе деформирования. Такие результаты согласуются с литературными данными. Так, например, было показано (Powell, Boyce, 2006), что эластичность матриц уменьшается с увеличением количества сшивающего агента, а прочность и модуль упругости при этом имеют нелинейную зависимость от этого параметра. Однако встречаются работы, в которых получены противоречащие нашим результатам данные: увеличение эластичности коллагеновых матриц и снижение прочности и модуля упругости с увеличением количества сшивающего агента (Liu et al., 2008). Подобный эффект, вероятно, связан с влажностью исследуемых матриц. Даже незначительное количество воды в пленках существенно влияет на их механические свойства (Angele et al., 2004).

Результаты наших исследований показали значительное увеличение устойчивости к биodeградации сшитых пленок. Увеличение ковалентных и нековалентных внутри- и межмолекулярных связей коллагена повышает устойчивость пленок к действию матриксных металлопротеаз, в частности коллагеназы. Эти результаты хорошо согласуются с данными о значительном повышении биостабильности пленок, обработанных сшивающим агентом EDC/NHS (Angele et al., 2004; Powell, Boyce, 2006).

Для исследования возможности применения полученных пленок коллагена для решения задач офтальмологии мы культивировали на них клетки роговицы кролика линии SIRC. Клетки линии SIRC относятся к самоиммортизировавшимся линиям клеток. Обычно данную линию применяют для первичного скрининга токсичности и проницаемости глазных капель (Rönkkö et al., 2016). При использовании сшитых коллагеновых пленок регистрировали достоверное увеличение жизнеспособности клеток в случае использования сшивающего агента в малой концентрации как через 1 сут, так и через 4 сут после посева (в случае обработки пленок сшивающим агентом в большей концентрации наблюдали тенденцию к увеличению жизнеспособности через 1 сут после посева). Было показано увеличение рас-

пластанности клеток на пленках, обработанных сшивающим агентом. Эти результаты хорошо согласуются с данными других авторов (Wong et al., 2004) о том, что распластанность клеток, показатели их адгезии и пролиферации обратно пропорциональны эластичности матриц. Отсутствие отрицательного эффекта обработки пленок сшивающим агентом на жизнеспособность клеток также подтверждается в других исследованиях (Wang et al., 2017). Из литературы известно о положительном влиянии обработки пленок EDC/NHS на пролиферативную активность клеток по сравнению с контролем (Powell, Boyce, 2006; Zhao et al., 2015).

Полученные данные позволяют сделать заключение, что коллагеновые пленки, обработанные раствором EDC/NHS, могут быть перспективным материалом для изготовления тканеинженерных конструкций и использоваться для кератопластики при восстановлении роговицы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работы по механическим испытаниям и исследованию взаимодействия клеток с пленками выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-03-00400_a). Разработка метода приготовления пленок выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках темы государственного задания № 0103-2019-0012.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При проведении исследования были соблюдены все применимые международные и национальные принципы использования лабораторных животных.

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. 2020а. Биологические и реологические свойства коллагена, сшитого глутаровым альдегидом. Журн. техн. физики. Т. 9. С. 601. (Nashchekina Yu.A., Lukonina O.A., Darvish D.M., Nashchekin A.V., Elokhovskii V.Yu., Yudin V.E., Mikhailova N.A. 2020. Biological and rheological properties of collagen cross-linked with glutaraldehyde. Tech. Phys. V. 65. P. 1535.)
- Нащекина Ю.А., Луконина О.А., Михайлова Н.А. 2020а. Химические сшивающие агенты для коллагена: механизмы взаимодействия и перспективность применения в регенеративной медицине. Цитология. Т. 62. № 7. С. 459. (Nashchekina Yu.A., Lukonina O.A., Mikhailova N.A. Chemical cross-linking agents for collagen: Interaction mechanisms and perspectives for regenerative medicine. Tsitologiya. V. 62. № 7. P. 459.)

- 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, нанесенного на полилактидную матрицу. Цитология. Т. 49. № 1. С. 32. (Shved Yu.A., Kukhareva L.B., 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. 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. Reg. Biomaterials. V. 2. P. 77.
- Angele P., Abke J., Kujat R., Faltermeier H., Schumann D., Nerlich M., Kinner B., Englert C., Ruzczak Z., Mehrl R., Mueller R. 2004. Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. Biomaterials. V. 25. P. 2831.
- Bourges J.L. 2017. Corneal dystrophies. J. Fr. Ophthalmol. V. 40. P. e177.
<https://doi.org/10.1016/j.jfo.2017.05.003>
- Duan X., Sheardown H. 2007. Incorporation of cell-adhesion peptides into collagen scaffolds promotes corneal epithelial stratification. J. Biom. Sci. Pol. Ed. V. 18. P. 701.
- Gain P., Jullienne R., He Z., Aldossary M., Acquart S., Cognasse F., Thuret G. 2016. Global survey of corneal transplantation and eye banking. JAMA Ophthalmol. V. 134. P. 167.
- Holmes D.F., Lu Y., Starborg T., Kadler K.E. 2018. Collagen fibril assembly and function. Curr. Top Dev. Biol. V. 130. P. 107.
- Lillie J.H., Wootton J.A., MacCallum D.K., McKelvey S.W., Minor R.R. 1987. Electrophoretic isolation and peptide mapping of collagen types from microsamples of tissue. Methods in Enzym. V. 145. P. 171.
- Liu W., Merrett K., Griffith M., Fagerholm P., Dravida S., Heyne B., Scaiano J. C., Watsky, M. A., Shinozaki N., Lagali N., Mungler R., Li F. 2008. Recombinant human collagen for tissue engineered corneal substitutes. Biomaterials. V. 29. P. 1147.
- Oliveira P.N., Montebault, A., Sudre G., Alcouffe P., Marcon L., Gehan H., Lux F., Albespy K., Centis V., Campos D., Roques S., Meulle M., Renard M., Durand M., Denost Q. et al. 2019. Self-crosslinked fibrous collagen/chitosan blends: Processing, properties evaluation and monitoring of degradation by bi-fluorescence imaging. Int. J. Biol. Macromol. V. 131. P. 353.
- Oryan A., Kamali A., Moshiri A., Baharvand H., Daemi H. 2018. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. Int. J. Biol. Macromol. V. 107. P. 678.
- Paul R.G., Bailey A.J. 2003. Chemical stabilisation of collagen as a biomimetic. Sci. World J. V. 3. P. 138.
- Powell H. M., Boyce S.T. 2006. EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability. Biomaterials. V. 27. P. 5821.
- Rönkkö S., Vellonen K.S., Järvinen K., Toropainen E., Urtti A. 2016. Human corneal cell culture models for drug toxicity studies. Drug Deliv. Transl. Res. V. 6. P. 660.
- Rose J.B., Pacelli S., Haj A.J., El Dua H.S., Hopkinson A., White J.L., Rose F. 2014. Gelatin-based materials in ocular tissue engineering. Materials. V. 7. P. 3106.
- Rýgllová Š., Braun M., Suchý T. 2017. Collagen and its modifications – crucial aspects with concern to its processing and analysis. Macrom. Mat. Eng. V. 302. P. e.1600460.
<https://doi.org/10.1002/mame.201600460>
- Wang Y., Wang X., Shang J., Liu H., Yuan Y., Guo Y., Huang B., Zhou Y. 2017. Repairing the ruptured annular fibrous by using type I collagen combined with citric acid, EDC and NHS: an *in vivo* study. Europ. Spine J. V. 2. P. 884.
- Wong J.Y., Leach J.B., Brown X.Q. 2004. Balance of chemistry, topography, and mechanics at the cell–biomaterial interface: Issues and challenges for assessing the role of substrate mechanics on cell response. Surf. Sci. V. 570. P. 119.
- Di Zazzo A., Kheirkhah A., Abud T.B., Goyal S., Dana R. 2017. Management of high-risk corneal transplantation. Surv. Ophthalmol. V. 62. P. 816.
- Zhao X., Liu Y., Li W., Long K., Wang L., Liu S., Wang Y., Ren L. 2015. Collagen based film with well epithelial and stromal regeneration as corneal repair materials: Improving mechanical property by crosslinking with citric acid. Mat. Sci. Eng. V. 55. P. 201.

Effect of Carbodiimide on the Structural, Mechanical and Biological Properties of Collagen Films

Yu. A. Nashchekina^{a,*}, M. Yu. Sirotkina^a, D. M. Darvish^a, I. A. Barsuk^b,
O. A. Moskalyuk^c, and N. A. Mikhailova^a

^aInstitute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia

^bKirov Military Medical Academy, St. Petersburg, 194044 Russia

^cSaint Petersburg State University of Industrial Technologies and Design, St. Petersburg, 191186 Russia

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

Collagen is one of the most important proteins in the extracellular matrix. Due to its high biocompatibility, it is an attractive natural polymer and material for the creation of tissue-engineered matrices, in particular matrices that mimic the stroma of the cornea of the eye. In this work, type I collagen was extracted and characterized from animal tissues, and collagen films were formed on its basis. In order to create additional covalent bonds in the films, the

crosslinking agent 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide and N-Hydroxysuccinimide (EDC/NHS) were used. The effect of EDC/NHS treatment on the mechanical properties and degradation of type I collagen films was investigated. An increase in the stiffness of matrices and their resistance to biodegradation after collagen processing has been shown. An analysis of the effect of collagen processing with EDC/NHS on viability and morphology of SIRC corneal cells was carried out. It was shown that the treatment of films with a cross-linking agent increases the viability of SIRC cells and does not have a negative effect on their morphology.

Keywords: type I collagen, carbodiimide, SIRC cell line, biodegradation, mechanical properties