

УДК 576.5

МОДУЛЯЦИЯ АДГЕЗИИ И МИГРАЦИИ КЛЕТОК NIH/3T3 В КОЛЛАГЕНОВЫХ МАТЕРИАЛАХ ПРОИЗВОДНЫМИ ТАКСИФОЛИНА

© 2024 г. Ю. В. Шаталин^a, М. И. Кобякова^{a, b}, В. С. Шубина^{a, *}

^aИнститут теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия

^bИнститут клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФИЦ ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, 630060 Россия

*e-mail: shubinavictoria@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.09.2023 г.

Подписана в печать 20.09.2023 г.

Принята к публикации 21.09.2023 г.

Одной из актуальных задач тканевой инженерии является разработка стабильных нетоксичных материалов, поддерживающих миграцию клеток в процессе регенерации ткани. Данное исследование направлено на получение новых гелевых материалов на основе коллагена и производных таксифолина, пентаглутарата таксифолина и конъюгата таксифолина с глиоксалевой кислотой и изучение их свойств. В работе было показано, что увеличение доли полифенолов в геле приводит к уменьшению скорости деградации материала. Полученные материалы не оказывают негативного влияния на жизнеспособность фибробластов мыши линии NIH/3T3. Клетки прикрепляются к поверхности материалов и распластываются на поверхности материала, содержащего пентаглутарат таксифолина. Было также установлено, что фибробласты мигрируют через полученные материалы. Увеличение доли конъюгата таксифолина с глиоксалевой кислотой в материале приводит к ингибированию миграции через материал, тогда как увеличение доли пентаглутарата таксифолина в материале, напротив, приводит к значительному увеличению миграции клеток через него. Полученные результаты указывают на возможность модуляции адгезии и миграции клеток в биоматериалах путем включения различных производных таксифолина в их состав. Таким образом, материалы, полученные на основе коллагена и производных таксифолина, могут представлять интерес для регенеративной медицины.

Ключевые слова: конъюгат таксифолина с глиоксалевой кислотой, пентаглутарат таксифолина, коллаген, деградация, жизнеспособность фибробластов, адгезия, миграция

DOI: 10.31857/S0233475524010062, EDN: zlbkxh

ВВЕДЕНИЕ

Проблема ожогов является одной из самых серьезных на сегодняшний день [1]. Эффективность заживления ран зависит от нескольких факторов, в том числе размера, глубины, местоположения, инфицирования и пр. Хотя на данный момент в клинической практике применяются различные ранозаживляющие материалы, нет четкого алгоритма выбора материалов при различных видах ран [2]. Кроме того, с расширением представлений о механизмах заживления ран изменяются требования к разрабатываемым материалам [2]. Следует также отметить, что эффективность ранозаживляющего действия таких покрытий зависит от фазы регенерации и существенно различается

при поражениях различной степени тяжести, что исключает универсальность их применения [3]. Материалы, полученные на основе коллагена, играют важную роль в лечении ран и стимуляции регенеративных процессов [4, 5]. Коллаген является основным белком внеклеточного матрикса [6]. Он продуцируется фибробластами и вовлечен во все фазы регенерации. Данный биополимер нетоксичен, биоразлагаем, обладает низкой иммуногенностью, способствует организации новосинтезированного коллагена [7]. Тем не менее проводятся постоянные исследования, направленные на получение новых материалов на основе данного биополимера. Многие из них нацелены на преодоление высокой скорости биodeградации

материалов, полученных на основе коллагена, а также включение в состав коллагеновой матрицы различных биологически активных соединений (например, антибактериальных средств, таких как цефтазидим и доксициклин [8–10], или соединений, способствующих регенерации ткани [11–13]). Коллагеновая матрица рассматривается как средство адресной доставки биологически активных веществ, из которой соединения высвобождаются постепенно, благодаря чему они способны оказывать пролонгированное действие в зоне повреждения [14–16]. Для стабилизации структуры коллагена и материалов на его основе, полипептидные цепи данного биополимера сшивают. Существуют химические, физические и ферментативные методы сшивки коллагена. Достоинства и недостатки данных методов рассмотрены в следующих обзорах [17, 18]. Можно отметить несколько моментов. Использование кросс-сшивающих агентов позволяет получать материалы с более высокой степенью сшивки и равномерным распределением сшивок внутри материала [18, 19]. Однако при деградации ряда таких материалов в организме могут формироваться токсичные продукты [8, 20–22]. Формирование нетоксичных материалов с улучшенными механическими свойствами возможно в результате непосредственной сшивки карбоксильных групп глутаминовой/аспарагиновой кислот с аминокислотными группами лизина полипептидных цепей коллагена [23]. Однако в этом случае вовлечение карбоксильных групп глутаминовой кислоты полипептида в формирование сшивки приводит к уменьшению миграции клеток в материале: снижается их прикрепление, распластывание, выживаемость и рост [24]. В последнее время все большую популярность приобретают природные нетоксичные кросс-сшивающие агенты [18], в том числе полифенолы [25–29]. Согласно существующим данным, природные полифенолы стабилизируют структуру коллагена и увеличивают его устойчивость к деградации в биологических системах [25, 30, 31]. Стабилизация структуры полипептидов полифенолами может быть обусловлена как межмолекулярными взаимодействиями (водородные связи, гидрофобные взаимодействия) [27, 32], так и ковалентными связями полипептид — полифенол [22, 27, 33–36]. В частности, в качестве перспективных природных кросс-сшивающих агентов рассматривают генипин [37–40] и полифенол — дубильную кислоту [28, 40, 41].

Мы предположили, что стабилизация коллагена с помощью производных таксифолина, содержащих в своей структуре карбоксильные группы, является рациональным подходом для получения материалов, которые будут более устойчивы

к деградации, чем нативный коллаген. При этом сшивка будет формироваться между карбоксильной группой полифенола и остатками лизина полипептида. Таким образом, карбоксильные группы глутаминовой кислоты боковых цепей полипептида будут оставаться свободными, что является критичным для прикрепления клеток к коллагену и их миграции через материал. Кроме того, материалы на основе коллагена и таксифолина будут постепенно высвобождать активный компонент (полифенол) в области повреждения. Существуют данные, согласно которым флавоноиды [42–44] и их производные [45–47], а также материалы, включающие в свой состав полифенольные соединения [11, 12, 48, 49], способствуют лучшему заживлению ран. В частности, нами было показано, что препараты, полученные на основе конъюгатов таксифолина с карбонильными соединениями — продуктами перекисного окисления липидов, такими как ацетальдегид и малоновый диальдегид, способствуют интенсификации регенерационных процессов и репарации волосяных фолликулов и сальных желез [49]. Целью настоящей работы являлось изучение биосовместимости новых материалов на основе коллагена и производных таксифолина, конъюгата таксифолина с глиоксалевой кислотой (DfTf) и пентаглутарата таксифолина (TfG5) (рис. 1). Основное внимание было сфокусировано на изучении влияния данных материалов на жизнеспособность клеток, оценке способности материалов поддерживать адгезию клеток и изучении миграции клеток через данные материалы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали коллаген (ЗАО “Зеленая Дубрава”, Россия) и таксифолин (96%), любезно предоставленный ЗАО “НПФ “Флавит” (Россия).

Получение гидрогелей на основе коллагена и производных таксифолина. Получение и характеристика конъюгата таксифолина с глиоксалевой кислотой и пентаглутарата таксифолина подробно описаны в работах [50, 51] и [52, 53] соответственно.

Материалы на основе коллагена и производных таксифолина получали следующим образом. К 1 мл 5% водного раствора полифенола добавляли 100 мМ раствор 4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилморфолина (DMTMM) [52] в молярном соотношении 1:3. В случае пентаглутарата таксифолина раствор содержал 10% диметилсульфоксида. Затем к 1 мл раствора полифенола добавляли 1 мл 4% раствора коллагена, смесь быстро перемешивали и заливали в подготовленные формы. Для оценки деградации материала смесь заливали в цилиндрические формы диаметром

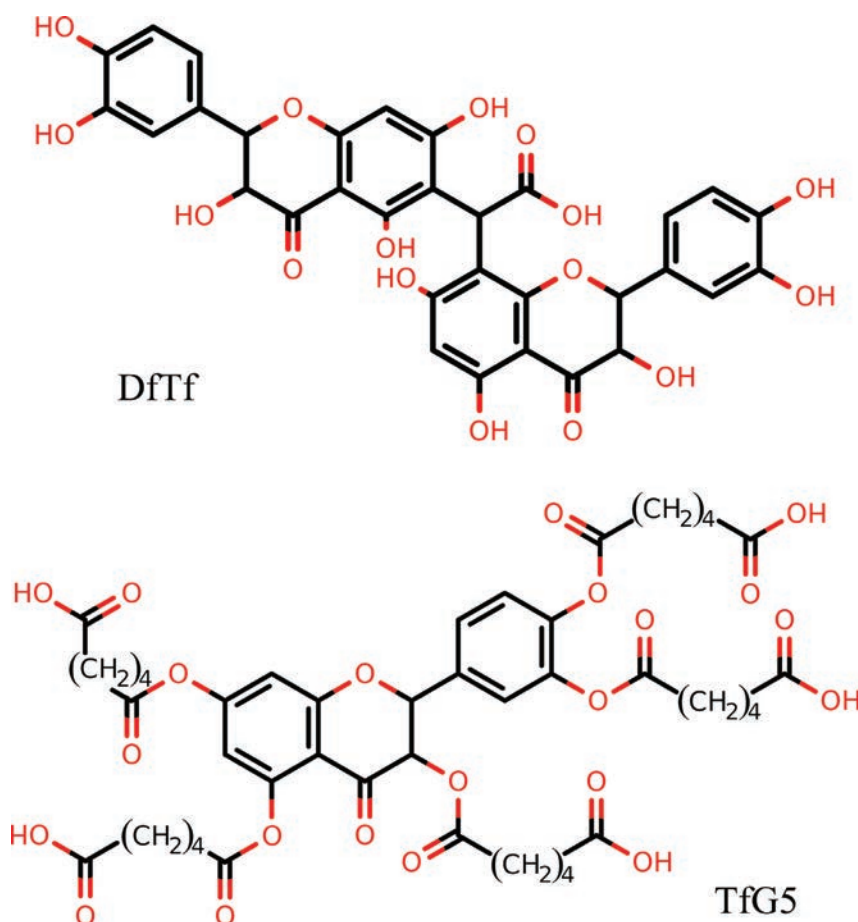


Рис. 1. Полифенолы, используемые для стабилизации коллагена. DfTf — конъюгат таксифолина с глиоксальной кислотой, TfG5 — пентаглутарат таксифолина.

1.5 см и объемом 1 мл. Для оценки влияния материалов на жизнеспособность клеток и миграции клеток через материал 100 мкл смеси наносили на вкладыши с проницаемой мембраной (8 мкм, SPL, Южная Корея) для 24-луночного планшета. Для оценки способности материалов поддерживать адгезию клеток и возможного контактного цитотоксического действия 1 мл смеси помещали в 35-мм чашки Петри (SPL). Концентрация полифенола в геле составляла 0; 0.5; 1.0; и 2.5%, концентрация коллагена — 2%. Концентрацию белка определяли спектрофотометрическим методом [53].

Доля аминокрупп, участвующих в формировании сшивки. Долю аминокрупп, участвующих в формировании сшивки, определяли по изменению количества терминальных аминокрупп полипептида нингидриновым методом [53]. Для этого 100 мг геля предварительно лиофилизировали, после чего помещали в 100 мкл фосфатно-солевого буфера (pH 7.4). К полученной суспензии добавляли 25 мкл 0.2% раствора нингидрина в ацетоне. Приготовленный раствор инкубировали при 90 °C в течение 15 мин, охлаждали до комнатной температуры и регистрировали оптическую плотность

супернатанта при 570 нм. Расчет доли аминокрупп, участвующих в формировании поперечных сшивок, проводили по формуле:

$$\text{Доля аминокрупп} = (A_m - A_{cp}) / (A_{np} - A_{cp}) \times 100\%,$$

где A_m — оптическая плотность анализируемого материала; A_{np} — оптическая плотность нативного коллагена; A_{cp} — оптическая плотность коллагена, кросс-сшитого с использованием глиоксальной кислоты.

Анализ деградации материала. Деградацию гелевого материала оценивали по количеству полипептида, перешедшего в раствор в процессе инкубации в фосфатно-солевом буфере (pH 7.4). Количество полипептида считали эквивалентным количеству терминальных аминокрупп, регистрируемых в растворе нингидриновым методом. К образцу гелевого материала объемом 100 мкл добавляли 1 мл раствора фосфатно-солевого буфера (pH 7.4) и помещали в термостат (37 °C) с орбитальным перемешиванием (100 об/мин). Через определенные промежутки времени отбирали 100 мкл водной фазы, центрифугировали при 10000 об/мин для удаления нерастворимой фракции и определяли количество

аминогрупп в суспензии. Степень деградации определяли по формуле:

Степень деградации = $(A_c - A_0)/(A_{np} - A_0) \times 100\%$, где A_c – оптическая плотность анализируемой суспензии; A_{np} – оптическая плотность нативного коллагена; A_0 – оптическая плотность буферного раствора.

Динамика высвобождения полифенола из геля. Для определения динамики высвобождения полифенола из коллагенового геля фрагмент геля объемом 100 мкл помещали в фосфатно-солевой буфер (pH 7.4) объемом 1 мл, после чего смесь помещали в термостат (37 °C) с орбитальным перемешиванием (100 об/мин). Через определенные промежутки времени отбирали 100 мкл водной фазы, центрифугировали при 10000 об/мин для удаления нерастворимой фракции и определяли концентрацию полифенола, перешедшего в раствор, спектрофотометрическим методом. Расчет концентрации полифенола в растворе проводили по среднему коэффициенту экстинкции ($\epsilon_{330} = 3146 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и $\epsilon_{228} = 5765 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для DfTf и TfG5 соответственно).

Влияние DfTf, TfG5 и материалов, полученных на их основе, на жизнеспособность клеток. В работе использовали эмбриональные мышечные фибробласты N1H 3T3, полученные из Всероссийской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде DMEM/F-12 (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Himedia, Бразилия), 80 мкг/мл сульфата гентамицина (Sigma-Aldrich, США) и 24 мкг/мл флуконазола (Белмедпрепараты, Белоруссия) при 37 °C и 5% CO₂. Для открепления клеток от поверхности культурального пластика использовали раствор трипсина–EDTA 0.05% (ПанЭко, Россия).

Влияние DfTf и TfG5 на жизнеспособность клеток. В лунки 96-луночного планшета высевали клетки (15 тыс. клеток/см²) и культивировали в течение 24 ч. Затем к клеткам добавляли полифенолы (DfTf и TfG5) в различных концентрациях (0.0; 0.8; 1.6; 3.1; 6.3; 12.5; 25.0; 50.0; 100.0 мкМ) и инкубировали в течение 24 ч. Далее оценивали жизнеспособность клеток. Для этого клетки фиксировали 70% этанолом в течение 30 мин, после чего окрашивали 0.5% раствором кристаллического фиолетового (Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин. Клетки лизировали раствором 0.1% додецилсульфата натрия, затем измеряли оптическую плотность (A) на микропланшетном ридере Infinite F200 (Tecan, Австрия) при 550 нм. Долю жизнеспособных клеток в присутствии полифенолов определяли следующим образом: Доля клеток, % от контроля = $(A_{\text{клеток}} / A_{\text{окрашенных после инкубации с материалами}}) \times 100\%$.

окрашенных после инкубации с полифенолами / A окрашенных контрольных клеток) $\times 100\%$.

Влияние материалов, полученных на основе коллагена и производных таксифолина (DfTf и TfG5), на жизнеспособность клеток. В лунки 24-луночного планшета высевали клетки (15 тыс. клеток/см²) и культивировали в течение 24 ч. Затем в лунки устанавливали вкладыши с проницаемой мембраной (8 мкм), покрытые материалами на основе DfTf и TfG5, и инкубировали еще в течение 24 ч. Далее оценивали жизнеспособность клеток. Для этого клетки фиксировали 70% этанолом в течение 30 мин, затем окрашивали 0.5% раствором кристаллического фиолетового (Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин. Клетки лизировали раствором 0.1% додецилсульфата натрия и измеряли оптическую плотность (A) на микропланшетном ридере Infinite F200 (Tecan, Австрия) при 550 нм. Долю жизнеспособных клеток определяли следующим образом: Доля клеток, % от контроля = $(A_{\text{клеток}} / A_{\text{окрашенных после инкубации с материалами}}) \times 100\%$.

Оценка миграции фибробластов через материалы, полученные на основе коллагена и производных таксифолина (DfTf и TfG5). Материалы готовили на вкладыше с проницаемой мембраной (8 мкм). Клетки (50 тыс. клеток) высевали на поверхность данных материалов и инкубировали в течение 5 ч в среде DMEM/F-12, содержащей 10% ЭТС. В лунки 24-луночного планшета, в которых находились вкладыши, также добавляли среду DMEM/F-12, содержащую 10% ЭТС. Спустя 5 ч инкубации во вкладыше заменяли среду на DMEM/F-12, не содержащую ЭТС, и инкубировали еще 24 ч. После этого клетки, мигрировавшие через материалы, снимали с поверхности лунок 24-луночного планшета и внешней стороны мембраны вкладыша с помощью раствора трипсина–EDTA 0.05% и подсчитывали в камере Горяева. В качестве контроля на вкладыш наносили нативный коллаген. Концентрация полифенола в исследуемых материалах составляла 0; 0.5; 1.0; и 2.5%.

Оценка адгезии и распластывания фибробластов на поверхности полученных материалов. Материалы, содержащие 2.5% полифенола, готовили в 35-мм чашках Петри. Затем на их поверхность высевали клетки (15 тыс. клеток/см²) и инкубировали в течение 24 ч. Далее образцы окрашивали в течение 30 мин Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, США) (5 мкг/мл), пропидий иодидом (Sigma-Aldrich, США) (10 мкг/мл), а также ацетоксиметилловым эфиром кальцеина (кальцеин-AM) (Sigma-Aldrich, США) (100 нМ) и изучали с помощью конфокального микроскопа TCS SP5 (Leica Microsystems,

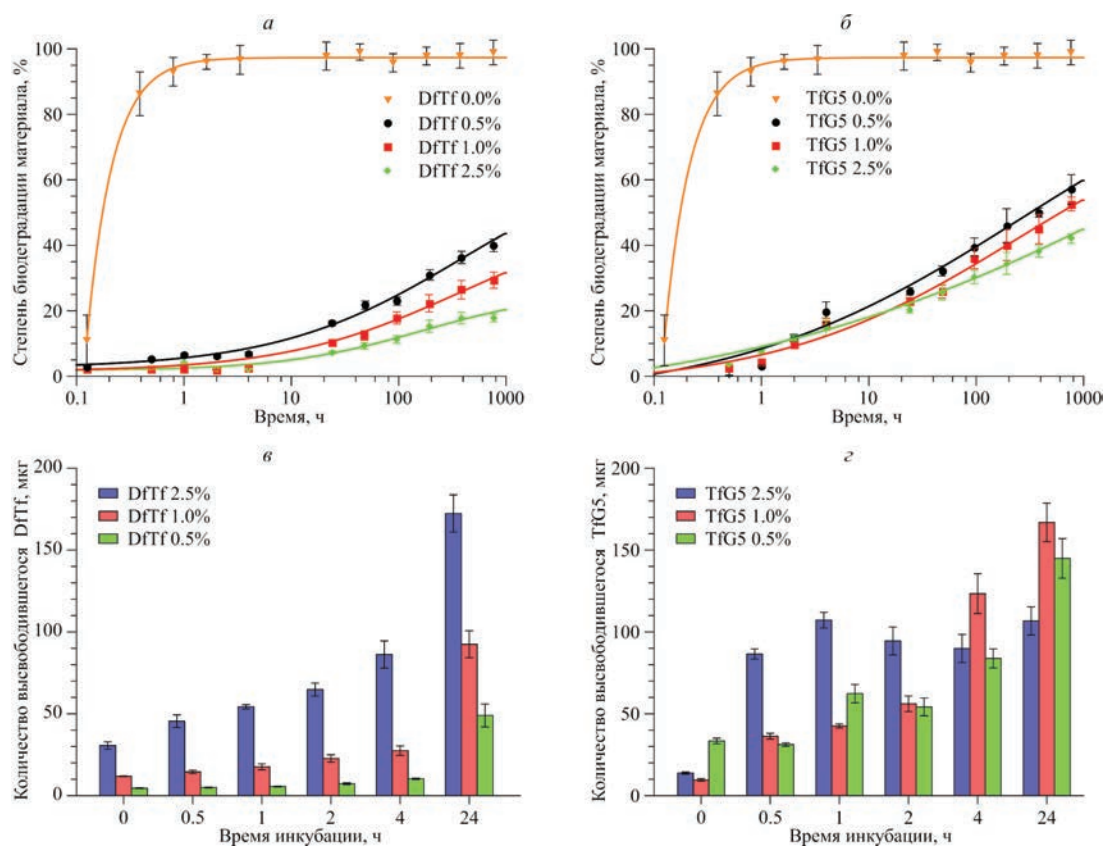


Рис. 2. Характеристика гелевых материалов. а, б — Дегградация гелевых материалов, полученных на основе коллагена и полифенолов. в, г — Динамика высвобождения полифенолов из гелевых материалов.

Германия). В качестве контроля на чашки Петри наносили нативный коллаген.

Статистический анализ. Все эксперименты были выполнены в трех независимых повторах. Каждый образец был проанализирован в трех технических повторах. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Сравнение средних значений проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим попарным сравнением с помощью Тьюки-теста. Для расчетов применяли статистический программный пакет GraphPad Prism 9.0.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика полученных материалов. Формирование сшивок между полипептидными цепями осуществлялось с помощью TfG5 и DfTf. DfTf содержит в своей структуре одну карбоксильную группу, тогда как TfG5 содержит пять карбоксильных групп, способных после активации формировать ковалентную связь с аминокруппами белка. Отметим, что полифенолы, по всей видимости,

также могут стабилизировать структуру коллагена за счет нековалентных взаимодействий.

Было показано, что доля аминокрупп, участвующих в формировании поперечных сшивок, дозозависимо возрастает с увеличением количества полифенола, введенного в состав материала. Так, доля аминокрупп, участвующих в формировании сшивки, составляет 73 ± 7 , 80 ± 3 и $90 \pm 5\%$ при доле DfTf в материале 0.5, 1.0 и 2.5% соответственно. Доля аминокрупп, участвующих в формировании сшивки, составляет 69 ± 3 , 73 ± 5 и $78 \pm 4\%$ при доле TfG5 в материале 0.5, 1.0 и 2.5% соответственно. Было установлено, что доля фрагментов полипептида, высвобождающихся в процессе деградации материалов, уменьшается с увеличением доли полифенола в материале (рис. 2а, 2б). Полной деградации материалов на протяжении всего эксперимента не наблюдалось. Было обнаружено, что в процессе деградации материала в окружающую среду высвобождается (биологически активный) полифенол (рис. 2в, 2г).

Влияние DfTf, TfG5 и материалов, полученных на их основе, на жизнеспособность клеток NIH 3T3. Было показано, что DfTf и TfG5 не влияют на жизнеспособность клеток NIH 3T3 во всем диапазоне

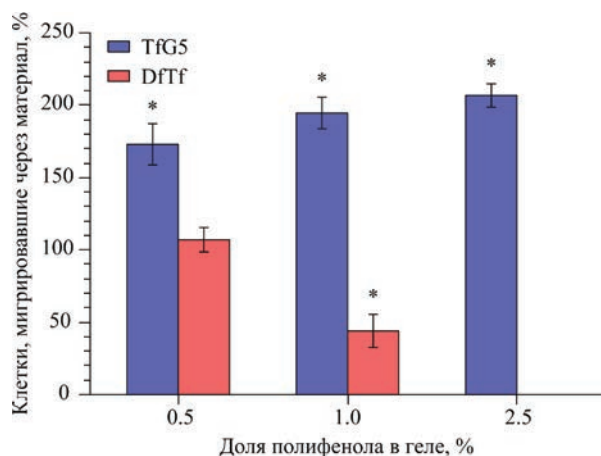


Рис. 3. Миграция фибробластов N1H 3T3 через гелевые материалы. За 100% принимали количество клеток, мигрировавших через нативный коллаген. * Достоверные различия по сравнению с контролем (коллаген), $p < 0.001$.

исследуемых концентраций (0.8–100 мкМ). Изучение влияния материалов на основе DfTf и TfG5 на жизнеспособность клеток проводили без непосредственного контакта клеток с поверхностью материалов. Клетки находились в лунках 24-луночных планшетов, в которые были погружены вкладыши с проницаемой мембраной (8 мкм), покрытые материалами на основе коллагена и производных таксифолина (DfTf и TfG5). Спустя 24 ч инкубации оценивали жизнеспособность клеток. За время инкубации материалы частично деградировали, а продукты их распада переходили в раствор. Было установлено, что во всех образцах количество живых клеток соответствовало контрольным значениям. Таким образом, бесконтактного цитотоксического действия материалов выявлено не было.

Миграция фибробластов через материалы, полученные на основе коллагена и производных таксифолина (DfTf и TfG5). Было обнаружено, что TfG5 способствует миграции клеток через материал. Увеличение доли TfG5 в материале приводит к увеличению числа клеток, мигрировавших через материал (рис. 3). DfTf при его доле в материале 0.5% не влияет на миграцию клеток, тогда как увеличение доли данного полифенола в материале до 1.0% приводит к снижению миграции клеток в среднем на 55%. При доле DfTf в материале 2.5% клеток, мигрировавших через материал, обнаружено не было. За 100% принимали количество клеток, мигрировавших через нативный коллаген.

Для последующей оценки способности материалов поддерживать адгезию клеток и возможного контактного цитотоксического действия были

отобраны материалы, содержащие максимальное количество полифенола (2.5%).

Адгезия и распластывание фибробластов на поверхности полученных материалов. Было установлено, что в процессе культивирования контрольный образец (коллаген, нанесенный на поверхность чашки) полностью деградирует, фибробласты прикрепляются к поверхности чашки и распластываются на ней (рис. 4). Показано, что исследуемые материалы подвергаются частичной деградации. Однако в поле зрения были обнаружены крупные фрагменты геля, которые в дальнейшем изучали с помощью конфокального микроскопа. Несмотря на полное отсутствие миграции клеток через материал, содержащий 2.5% DfTf, было установлено, что фибробласты прикрепляются к поверхности данного материала (рис. 4). Они имеют округлую форму, но сохраняют жизнеспособность. Сканирование образцов в разных плоскостях позволило обнаружить единичные мертвые клетки. Изучение фрагментов геля, содержащего 2.5% TfG5, миграция через который превышала в 2 раза миграцию через контрольный образец (коллаген), показало, что фибробласты прикрепляются к поверхности данного материала и распластываются на ней. Сканирование образцов позволило выявить единичные мертвые клетки.

Таким образом, токсического действия на клетки, вызванного взаимодействием с поверхностью исследуемых материалов, в том числе в местах деградации материалов, выявлено не было.

Полученные результаты говорят о том, что включение производных таксифолина, DfTf и TfG5, в состав коллагеновой матрицы позволяет получать нетоксичные стабильные материалы. О стабилизации структуры коллагена полифенольными соединениями ранее уже сообщалось в литературе [25, 30, 31]. Стабилизация структуры полипептидов полифенолами может быть обусловлена как межмолекулярными взаимодействиями (водородные связи, гидрофобные взаимодействия) [27, 32], так и ковалентными связями полипептид — полифенол [22, 27, 33–36]. В рамках данной работы также установлено, что способность фибробластов к адгезии и распластыванию на поверхности полученных материалов различна. Отличается способность клеток мигрировать через материалы, полученные на основе DfTf и TfG5. Таким образом, полученные данные подчеркивают влияние агента, стабилизирующего структуру коллагена, на свойства полученного материала. Показано, что увеличение доли DfTf в материале приводит к снижению миграции клеток через материал. Увеличение доли полифенола в материале приводит

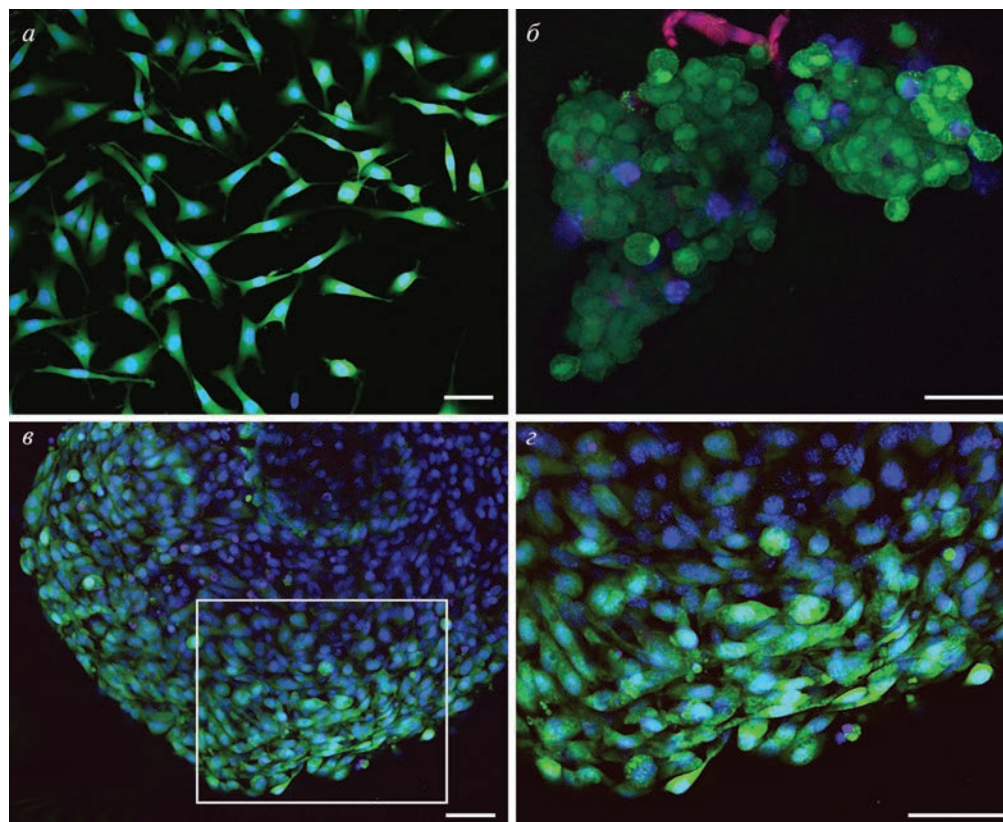


Рис. 4. Фибробласты NIH 3Т3 на поверхности гелевых материалов после инкубации в течение 24 ч. *а* — Контроль. Клетки высевали на поверхность коллагеновой матрицы, не содержащей полифенол. В процессе инкубации коллагеновая матрица деградировала, и фибробласты прикрепились к поверхности чашки. *б–з* — Клетки на поверхности гелевого материала, содержащего 2.5% DfTf (*б*), 2.5% TfG5 (*в*), 2.5% TfG5 при большем увеличении (*з*). Ядра клеток окрашены Hoechst 33342 (синий канал) и пропидий иодином (красный канал) для выявления мертвых клеток. Цитоплазма живых клеток окрашена кальцеином-АМ (зеленый канал). Масштабный отрезок 50 мкм.

к увеличению взаимодействий между фрагментами полифенола и аминокислотными остатками коллагена, изменению трехмерной архитектуры материала в целом, которая, как известно, влияет на прикрепление, распластывание и миграцию клеток. Важную роль в данных процессах играют карбоксильные группы остатков глутаминовой кислоты полипептида. В частности, было показано, что формирование сшивки за счет данных карбоксильных групп приводит к снижению прикрепления, распластывания, миграции, а также выживаемости и роста клеток [24]. Согласно существующим данным, в трехспиральной структуре коллагена присутствуют аминокислотные остатки, которые в совокупности формируют области взаимодействия коллагена с интегриновыми рецепторами клеток. Карбоксильные группы глутаминовой кислоты (Е) играют первостепенную роль в этих взаимодействиях [54, 55]. Так области GxOGEx' важны для взаимодействия с $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ и $\alpha 11\beta 1$ интегриновыми рецепторами. GFOGER имеет наибольшее сродство к $\alpha 2\beta 1$ и $\alpha 11\beta 1$ рецепторами, тогда как GLOGEN имеет

большее сродство к $\alpha 1\beta 1$ и $\alpha 10\beta 1$ рецепторам [55]. Первоначально мы полагали, что карбоксильная группа DfTf будет формировать ковалентную связь с аминогруппами аминокислотных остатков лизина полипептидной цепи, таким образом изменяя и стабилизируя структуру коллагеновых волокон. Мы также предполагали, что нековалентные взаимодействия между функциональными группами и циклическими структурами полифенола и аминокислотными остатками полипептида будут вносить свой вклад в стабилизацию материала. Однако данные о стабильности исследуемых материалов, полученные в ходе данной работы, говорят о том, что материалы, полученные на основе DfTf являются более стабильными, чем материалы, полученные на основе TfG5, хотя последний содержит в своей структуре пять карбоксильных групп, которые потенциально могут участвовать в формировании ковалентной связи полифенола с аминогруппами аминокислотных остатков полипептида. Эти данные позволяют нам предположить, что, во-первых, не все карбоксильные группы TfG5 участвуют в формировании ковалентной связи,

и, во-вторых, вероятно, DfTf может формировать дополнительные связи с коллагеном. Предположительно, отдельные гидроксильные группы DfTf взаимодействуют с карбоксильными группами аминокислотных остатков коллагена. Взаимодействия гидроксильных групп с карбоксильными группами могут быть электростатическими или же в результате реакции этерификации может формироваться ковалентная (сложноэфирная) связь. Это могло бы объяснить снижение миграции клеток через материал при увеличении доли DfTf в нем, а также плохое распластывание фибробластов на поверхности материала с долей DfTf 2.5%. С другой стороны, мы не можем исключать того, что карбоксильные группы полипептида остаются свободными, но формирующаяся трехмерная архитектура материала создает неблагоприятные условия для дальнейшего распластывания и миграции клеток через него.

Примечательным является то, что увеличение доли TfG5, напротив, приводит к усилению миграции клеток через материал. Как уже упоминалось, вероятно, часть карбоксильных групп TfG5 не вовлечена в формирование ковалентных сшивок и потенциально может стабилизировать структуру материала за счет нековалентных взаимодействий, а также участвовать в формировании областей взаимодействия материала с клетками, способствуя их распластыванию и миграции через материал. Полученные данные свидетельствуют о том, что модификация коллагеновых биоматериалов различными производными таксифолина позволяет модулировать адгезию клеток и их миграцию в материале. Полученные данные открывают новые направления в области регенеративной медицины и могут быть полезны, в частности, для разработки новых материалов, обеспечивающих направленную регенерацию тканей.

Авторы благодарны В.Г. Заикину (ЗАО «НПФ «Флавит») за любезно предоставленный таксифолин. Работа выполнена с использованием приборной базы ЦКП ИТЭБ РАН.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23–25–00149).

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. WHO Burns Available online: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/burns>
2. Shi C., Wang C., Liu H., Li Q., Li R., Zhang Y., Liu Y., Shao Y., Wang J. 2020. Selection of appropriate wound dressing for various wounds. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 182. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00182>
3. Rowan M. P., Cancio L.C., Elster E.A., Burmeister D.M., Rose L.F., Natesan S., Chan R.K., Christy R.J., Chung K.K. 2015. Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Crit Care.* **19**, 243. <https://doi.org/10.1186/s13054-015-0961-2>
4. Chattopadhyay S., Raines R.T. 2014. Collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers.* **101** (8), 821–833. <https://doi.org/10.1002/bip.22486>
5. Ермолов А. С., Смирнов С.В., Карасев Н.А., Курилин Б.Л., Кислухина Е.В., Киселевская-Бабинина И.В., Васильев В.А. 2016. Анализ основных показателей работы Московского городского ожогового центра после модернизации. *Журнал им. Н.В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь»*. (1), 60–62.
6. Fleck C. A., Simman R. 2010. Modern collagen wound dressings: Function and purpose. *J. Am. Coll. Certif. Wound Spec.* **2** (3), 50–54. <https://doi.org/10.1016/j.jcws.2010.12.003>
7. Liu R., Dai L., Si C., Zeng Z. 2018. Antibacterial and hemostatic hydrogel via nanocomposite from cellulose nanofibers. *Carbohydr. Polym.* **195**, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.085>
8. Adhirajan N., Shanmugasundaram N., Shanmuganathan S., Babu M. 2010. Collagen-based wound dressing for doxycycline delivery: In-vivo evaluation in an infected excisional wound model in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **61** (12), 1617–1623. <https://doi.org/10.1211/jpp.61.12.0005>
9. Jana P., Mitra T., Selvaraj T.K.R., Gnanamani A., Kundu P.P. 2016. Preparation of guar gum scaffold film grafted with ethylenediamine and fish scale collagen, cross-linked with ceftazidime for wound healing application. *Carbohydr. Polym.* **153**, 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.053>
10. Simões D., Miguel S.P., Ribeiro M.P., Coutinho P., Mendonça A.G., Correia I.J. 2018. Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **127**, 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.02.022>
11. Gomathi K., Gopinath D., Rafiuddin Ahmed M., Jayakumar R. 2003. Quercetin incorporated collagen matrices for dermal wound healing processes in rat. *Biomaterials.* **24** (16), 2767–2772. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00059-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00059-0)
12. Gopinath D., Ahmed M.R., Gomathi K., Chitra K., Sehgal P.K., Jayakumar R. 2004. Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. *Biomaterials.* **25** (10), 1911–1917. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00625-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00625-2)

13. Kim H., Kawazoe T., Han D.-W., Matsumara K., Suzuki S., Tsutsumi S., Hyon S.-H. 2008. Enhanced wound healing by an epigallocatechin gallate-incorporated collagen sponge in diabetic mice: Wound healing by EGCG-incorporated collagen sponge. *Wound Repair Regen.* **16** (5), 714–720. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00422.x>
14. Chak V., Kumar D., Visht S. 2013. A review on collagen based drug delivery systems. *Int. J. Pharm. Teach. Pract.* **4** (4), 811–820.
15. Hwang J., Sullivan M.O., Kiick K.L. 2020. Targeted drug delivery via the use of ECM-mimetic materials. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 69. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00069>
16. Terzopoulou Z., Michopoulou A., Palamidi A., Koliakou E., Bikiaris D. 2020. Preparation and evaluation of collagen-based patches as curcumin carriers. *Polymers.* **12** (10), 2393. <https://doi.org/10.3390/polym12102393>
17. Oryan A., Kamali A., Moshiri A., Baharvand H., Daeimi H. 2018. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. *Int. J. Biol. Macromol.* **107** (Pt A), 678–688. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.184>
18. Gu L., Shan T., Ma Y., Tay F.R., Niu L. 2019. Novel biomedical applications of crosslinked collagen. *Trends Biotechnol.* **37** (5), 464–491. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.007>
19. 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.* **41** (4), 296–303. <https://doi.org/10.5395/rde.2016.41.4.296>
20. Gough J. E., Scotchford C.A., Downes S. 2002. Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen/poly(vinyl alcohol) films by the mechanism of apoptosis. *J. Biomed. Mater. Res.* **61** (1), 121–130. <https://doi.org/10.1002/jbm.10145>
21. Reddy N., Reddy R., Jiang Q. 2015. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends Biotechnol.* **33** (6), 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.03.008>
22. Wang X., Ma B., Chang J. 2015. Preparation of decellularized vascular matrix by co-crosslinking of procyanidins and glutaraldehyde. *Biomed. Mater. Eng.* **26** (1–2), 19–30. <https://doi.org/10.3233/BME-151548>
23. Huang G. P., Shanmugasundaram S., Masih P., Pandya D., Amara S., Collins G., Arinzech T.L. 2015. An investigation of common crosslinking agents on the stability of electrospun collagen scaffolds: An investigation of common crosslinking agents. *J. Biomed. Mater. Res. A.* **103** (2), 762–771. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35222>
24. 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.* **49**, 218–234. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.059>
25. Shavandi A., Bekhit A.E.-D.A., Saeedi P., Izadifar Z., Bekhit A.A., Khademhosseini A. 2018. Polyphenol uses in biomaterials engineering. *Biomaterials.* **167**, 91–106. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.03.018>
26. Manjari M. S., Aaron K.P., Muralidharan C., Rose C. 2020. Highly biocompatible novel polyphenol cross-linked collagen scaffold for potential tissue engineering applications. *React. Funct. Polym.* **153**, 104630. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104630>
27. Zhang X., Li Z., Yang P., Duan G., Liu X., Gu Z., Li Y. 2021. Polyphenol scaffolds in tissue engineering. *Material. Horiz.* **8**, 145–167. <https://doi.org/10.1039/D0MH01317J>
28. Kaczmarek B. 2020. Tannic acid with antiviral and antibacterial activity as a promising component of biomaterials — A minireview. *Materials.* **13** (14), 3224. <https://doi.org/10.3390/ma13143224>
29. Kaczmarek B., Mazur O. 2020. Collagen-based materials modified by phenolic acids — A review. *Materials.* **13** (16), 3641. <https://doi.org/10.3390/ma13163641>
30. Schlebusch H., Kern D. 1972. Stabilization of collagen by polyphenols. *Angiologica.* **9** (3–6), 248–252. <https://doi.org/10.1159/000157937>
31. Тараховский Ю. С., Селезнева И.И., Васильева Н.А., Егорочкин М.А., Ким Ю.А. 2007. Ускорение фибриллообразования и температурная стабилизация фибрилл коллагена в присутствии таксифолина (дигидрокверцетина). *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* **144** (12), 640–643. <https://doi.org/10.1007/s10517-007-0433-z>
32. Madhan B., Subramanian V., Rao J.R., Nair B.U., Ramasami T. 2005. Stabilization of collagen using plant polyphenol: role of catechin. *Int. J. Biol. Macromol.* **37** (1–2), 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.08.005>
33. Han B., Jaurequi J., Tang B.W., Nimni M.E. 2003. Proanthocyanidin: A natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *J. Biomed. Mater. Res.* **65A** (1), 118–124. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10460>
34. Greco K. V., Francis L., Huang H., Ploeg R., Boccacini A.R., Ansari T. 2018. Is quercetin an alternative natural crosslinking agent to genipin for long-term dermal scaffolds implantation? *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **12** (3), e1716–e1724. <https://doi.org/10.1002/term.2338>
35. He L., Mu C., Shi J., Zhang Q., Shi B., Lin W. 2011. Modification of collagen with a natural cross-linker, procyanidin. *Int. J. Biol. Macromol.* **48** (2), 354–359. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.12.012>
36. Pinheiro A., Cooley A., Liao J., Prabhu R., Elder S. 2016. Comparison of natural crosslinking agents for the stabilization of xenogenic articular cartilage. *J. Orthop.*

- Res.* **34** (6), 1037–1046.
<https://doi.org/10.1002/jor.23121>
37. Scialla S., Gullotta F., Izzo D., Palazzo B., Scalera F., Martin I., Sannino A., Gervaso F. 2022. Genipin-cross-linked collagen scaffolds inducing chondrogenesis: A mechanical and biological characterization. *J. Biomed. Mater. Res. A*. **110** (7), 1372–1385.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.37379>
 38. Du A., Liu D., Zhang W., Wang X., Chen S. 2022. Genipin-crosslinked decellularized scaffold induces regeneration of defective rat kidneys. *J. Biomater. Appl.* **37** (3), 415–428.
<https://doi.org/10.1177/08853282221104287>
 39. Isali I., McLellan P., Wong T.R., Cingireddi S., Jain M., Anderson J.M., Hijaz A., Akkus O. 2022. In vivo delivery of M0, M1, and M2 macrophage subtypes via genipin-crosslinked collagen biotextile. *Tissue Eng. Part A*. **28** (15–16), 672–684.
<https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2021.0203>
 40. Нашекина Ю. А., Луконина О.А., Михайлова Н.А. 2020. Химические сшивающие агенты для коллагена: механизмы взаимодействия и перспективность применения в регенеративной медицине. *Цитология*. **62** (7), 459–472.
<https://doi.org/10.31857/S0041377120070044>
 41. Chen C., Yang H., Yang X., Ma Q. 2022. Tannic acid: A crosslinker leading to versatile functional polymeric networks: A review. *RSC Adv.* **12** (13), 7689–7711,
<https://doi.org/10.1039/D1RA07657D>
 42. Shevelev A. B., La Porta N., Isakova E.P., Martens S., Biryukova Y.K., Belous A.S., Sivokhin D.A., Trubnikova E.V., Zylkova M.V., Belyakova A.V., Smirnova M.S., Deryabina Yu.I. 2020. In vivo antimicrobial and wound-healing activity of resveratrol, dihydroquercetin, and dihydromyricetin against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*. *Pathogens*. **9** (4), 296.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9040296>
 43. Carvalho M. T.B., Araújo-Filho H.G., Barreto A.S., Quintans-Júnior L.J., Quintans J.S.S., Barreto R.S.S. 2021. Wound healing properties of flavonoids: A systematic review highlighting the mechanisms of action. *Phytomedicine*. **90**, 153636.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153636>
 44. Nguyen V.-L., Truong C.-T., Nguyen B.C.Q., Vo T.-N.V., Dao T.-T., Nguyen V.-D., Trinh D.-T.T., Huynh H.K., Bui C.-B. 2017. Anti-inflammatory and wound healing activities of calophyllolide isolated from *Calophyllum inophyllum* Linn. *PLoS One*. **12** (10), e0185674.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185674>
 45. Bhaskar Rao A., Ernala P., Deepthi Seelam S., Vennapusa H., Sistla R., Kuncha M., Surekha Mullapudi V., Rao Yerramilli S. 2015. Wound healing: A new perspective on glucosylated tetrahydrocurcumin. *Drug Des. Devel. Ther.* **9**, 3579–3588.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S85041>
 46. Yeh C.-J., Chen C.-C., Leu Y.-L., Lin M.-W., Chiu M.-M., Wang S.-H. 2017. The effects of artocarpin on wound healing: In vitro and in vivo studies. *Sci. Rep.* **7**, 15599.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-15876-7>
 47. Шубина В. С., Шаталин Ю.В. 2012. Влияние липосомных препаратов на основе комплексов таксифолина с металлами переменной валентности на регенерацию кожи при химическом ожоге. *Цитология*. **54** (3), 251–260.
 48. Ang L., Darwis Y., Koh R., Gah Leong K., Yew M., Por L., Yam M. 2019. Wound healing property of curcuminoids as a microcapsule-incorporated cream. *Pharmaceutics*. **11** (5), 205.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11050205>
 49. Шубина В. С., Шаталин Ю.В. 2012. Регенерация кожи после химического ожога в присутствии препаратов на основе производных таксифолина. *Клеточные технологии в биологии и медицине*. **3**, 160–166.
 50. Shubina V.S., Shatalin Y.V. 2017. Antioxidant and iron-chelating properties of taxifolin and its condensation product with glyoxylic acid. *J. Food Sci. Technol.* **54** (6), 1467–1475.
<https://doi.org/10.1007/s13197-017-2573-0>
 51. Shubina V. S., Kozina V.I., Shatalin Yu.V. 2021. Comparison of antioxidant properties of a conjugate of taxifolin with glyoxylic acid and selected flavonoids. *Antioxidants (Basel)*. **10** (8), 1262.
<https://doi.org/10.3390/antiox10081262>
 52. Шаталин Ю. В., Шубина В.С. 2015. Материал на основе коллагена и таксифолина. *Биофизика*. **60** (3), 583–588.
 53. Шаталин Ю. В., Шубина В.С. 2019. Железосвязывающая и железовосстанавливающая способность материала, полученного на основе коллагена и таксифолина (дигидрохверцетина), в физиологических и патофизиологических условиях. *Хим.-фарм. журн.* **53** (2), 52–56.
<https://doi.org/10.30906/0023-1134-2019-53-2-52-56>
 54. Davidenko N., Hamaia S., Bax D.V., Malcor J.-D., Schuster C.F., Gullberg D., Farndale R.W., Best S.M., Cameron R.E. 2017. Selecting the correct cellular model for assessing of the biological response of collagen-based biomaterials. *Acta Biomater.* **65**, 88–101.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.10.035>
 55. Majid Q. A., Fricker A.T.R., Gregory D.A., Davidenko N., Cruz O.H., Jabbour R.J., Owen T.J., Basnett P., Lukasiewicz B., Stevens M., Best S., Cameron R., Sinha S., Harding S.E., Roy I. 2020. Natural biomaterials for cardiac tissue engineering: A highly biocompatible solution. *Front Cardiovasc Med.* **7**, 554597.
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.554597>

New Materials Based on Collagen and Taxifolin Derivatives: Production and Properties

© 2024 г. Yu. V. Shatalin¹, M. I. Kobyakova^{1,2}, V. S. Shubina^{1,*}

¹*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia*

²*Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630060 Russia*

*e-mail: shubinavictoria@yandex.ru

In this work, the properties of gel materials based on collagen and derivatives of taxifolin, pentaglutarate of taxifolin, and conjugate of taxifolin with glyoxylic acid were studied. It was shown that the increase in the proportion of the polyphenols in a gel led to the decrease in the rate of degradation of the materials. The materials had no negative impact on the viability of NIH/3T3 cells. The cells attached to the surface of the materials. Moreover, it was shown that they spread to the surface of the material containing pentaglutarate of taxifolin. It was also found that fibroblast migrated throughout the materials. An increase in the proportion of conjugate of taxifolin with glyoxylic acid in a material led to a decrease in cell migration throughout the material, whereas an increase in the proportion of pentaglutarate of taxifolin in a material led to a significant increase in cell migration throughout the material. The obtained data suggest that new materials for regenerative medicine can be derived from collagen and taxifolin derivatives.

Keywords: taxifolin, conjugate of taxifolin with glyoxylic acid, taxifolin pentaglutarate, collagen, degradation, cell viability, adhesion, migration