

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

Научная статья
УДК 577.112.4:773.93:616.77
EDN: CRZFTJ
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-469-475



Новые термочувствительные смарт-биоматериалы на основе коллагена, модифицированного винилглицидиловым эфиром этиленгликоля, для 4D-биопечати

И.А. Фарион[✉], А.С. Буинов, А.Н. Никишина, В.Ф. Бурдуковский

Байкальский институт природопользования СО РАН, г. Улан-Удэ, Российская Федерация

Аннотация. Новизна и цель работы заключались в том, что реакционноспособный в условиях ультрафиолетового излучения коллаген впервые получен функционализацией боковых аминогрупп лизиновых фрагментов ненасыщенным винилглицидиловым эфиром этиленгликоля («винилоксом»), содержащим, аналогично глицидилметакрилату, эпоксидную группу. Особенностью данного подхода является то, что наличие этой группы с умеренной реакционной способностью обеспечивает избирательное протекание реакции прививки по боковым аминогруппам коллагена в нейтральной или слабощелочной среде и исключает характерное для аналога – глицидилметакрилата – образование побочных продуктов реакции Михаэля и гидролиза. По данным фотометрии установлено, что модификация в слабоосновном водном растворе при комнатной температуре и значительном избытке «винилокса» позволяет достичь степени прививки 23,4%. Впервые при добавлении полиэтиленгликоль диакрилата, поли(N-изопропилакриламида) к слабокислоте водному раствору коллагена получены пленкообразующие композиты, способные к фотоотверждению. Наличие винилоксидных групп позволило обеспечить удовлетворительные механические характеристики пленок в результате иницируемого ультрафиолетовым излучением сшивания коллагена, а присутствие поли(N-изопропилакриламида) – гидрофильно-гидрофобную смарт-чувствительность. Пленки обладают развитой фибриллярной структурой, а размеры пор позволяют обеспечить свободное перемещение питательных и прочих соединений. Согласно данным МТТ-теста, пленки не выделяют цитотоксических компонентов и сохраняют метаболическую активность стволовых клеток, обеспечивая достаточную их плотность на своей поверхности. Все вышеперечисленное определяет перспективность использования пленок как в качестве искусственного внеклеточного матрикса – скаффолда, так и в виде термочувствительных смарт-подложек для выращивания стволовых клеток на их поверхностях для последующей биопечати с лазерным переносом.

Ключевые слова: коллаген, поли(N-изопропилакриламид), винилглицидиловый эфир этиленгликоля, модификация биополимеров, регенеративная медицина

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-23-20057.

Для цитирования: Фарион И.А., Буинов А.С., Никишина А.Н., Бурдуковский В.Ф. Новые термочувствительные смарт-биоматериалы на основе коллагена, модифицированного винилглицидиловым эфиром этиленгликоля, для 4D-биопечати // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 4. С. 469–475. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-469-475. EDN: CRZFTJ.

CHEMICAL SCIENCES

Original article

New smart thermosensitive biomaterials on the basis of collagen modified by ethylene glycol vinyl glycidyl ether for 4D bioprinting

Ivan A. Farion[✉], Aleksandr S. Buinov, Alena N. Nikishina, Vitalii F. Burdukovskii

Baikal Institute of Nature Management SB RAS, Ulan-Ude, Russian Federation

Abstract. In this study, collagen reactive under UV radiation was obtained for the first time via the functionalization of the side amino groups of lysine moieties with unsaturated ethylene glycol vinyl glycidyl ether (Vinylox) containing, similarly to glycidyl methacrylate, an epoxy group. The presence of this group having a moderate reactivity provides

selective grafting of the side amino groups of collagen in a neutral or weakly alkaline medium and excludes the formation of by-products in the Michael reaction and hydrolysis characteristic of the analog—glycidyl methacrylate. Photometry data indicate that with modification in a weakly basic aqueous solution at room temperature and a significant excess of Vinylox, a grafting degree of 23.4% can be achieved. For the first time, film-forming composites capable of photocuring were obtained by adding polyethylene glycol diacrylate and poly(N-isopropylacrylamide) to a weakly acidic aqueous solution of collagen. The presence of vinyl oxide groups provided satisfactory mechanical characteristics of films as the result of UV-initiated collagen cross-linking, while the presence of poly(N-isopropylacrylamide) ensured hydrophilic-hydrophobic smart sensitivity. The films have a well-developed fibrillar structure, and the size of voids enables the free movement of nutrients and other compounds. According to MTT assay data, the films release no cytotoxic components and maintain the metabolic activity of stem cells, providing sufficient density of stem cells on their surface. All of the factors mentioned above determine the prospects of using the films both as an artificial extracellular matrix scaffold and as smart thermosensitive scaffolds used to grow stem cells on their surfaces for subsequent laser transfer bioprinting.

Keywords: collagen, poly(N-isopropylacrylamide), ethylene glycol vinyl glycidyl ether, biopolymer modification, regenerative medicine

Funding. The Russian Science Foundation (grant no. 22-23-20057) supported the work.

For citation: Farion I.A., Buinov A.S., Nikishina A.N., Burdukovskii V.F. New smart thermosensitive biomaterials on the basis of collagen modified by ethylene glycol vinyl glycidyl ether for 4D bioprinting. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(4):469-475. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-469-475. EDN: CRZFTJ.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из главных проблем 3D-биопринтинга является правильный подбор биоматериала, обеспечивающий максимальную схожесть механических и биологических характеристик с нативными тканями и органами. Более того, такие материалы должны соответствовать требованиям, выдвигаемым технологическими особенностями биопечати [1, 2], из которых важнейшими являются биосовместимость и биорезорбируемость. Среди большого разнообразия биополимеров наиболее перспективным с целью использования в качестве матриц для создания тканеинженерных конструкций является коллаген. Это один из наиболее распространенных белков, и он может быть легко выделен, например, из шкур и сухожилий крупного рогатого скота и крысиных хвостов [3].

Наиболее простой подход к получению гидрогелей коллагена – фибриллогенезис при pH ~7 и 37 °C в течение 30 мин. Тем не менее полученные таким образом гидрогели существенно уступают по механическим характеристикам нативным коллагеновым тканям. В этой связи предпринимаются различные попытки получения сшитых структур для улучшения механических свойств коллагеновых матриц. Методы химической сшивки коллагена основаны на наличии реакционноспособных концевых или боковых амино- и карбоксильных групп. В качестве сшивающих агентов обычно используются альдегиды, генипин и карбодиимиды [4–10]. Однако зачастую подобные методы не подходят для получения гидрогелей с инкапсулированными клетками [11] ввиду токсичности подобных сшивающих агентов.

Еще один распространенный подход к дизайну сшитых коллагеновых гидрогелей – придание коллагену способности к ковалентной сшивке под действием ультрафиолетового излучения с помощью привитых метакрилатных групп посредством его модификации метакриловым ангидридом [12, 13] или глицидилметакрилатом [14]. В то же время метакриловый ангидрид высокотоксичен, а в водной среде склонен, помимо основной реакции ацилирования лизиновых аминокислотных групп, также к побочным реакциям Михаэля по кратным

связям и гидролизу. К подобным побочным реакциям, помимо основной реакции эпоксиалкилирования, также склонен и глицидилметакрилат. Следовательно, поиск не склонных к вышеперечисленным побочным реакциям мало- или нетоксичных модифицирующих агентов для придания коллагену способности сшиваться под действием ультрафиолетового излучения является актуальной задачей.

Новизна и цель проведенной работы состоят в том, что для модификации коллагена впервые был использован нетоксичный ненасыщенный винилглицидиловый эфир этиленгликоля, содержащий, аналогично глицидилметакрилату, эпоксидную «якорную» группу. Особенность данного подхода состоит в том, что наличие эпоксидной «якорной» группы с умеренной реакционной способностью обеспечивает избирательное протекание реакции прививки по боковым аминокислотным группам коллагена в нейтральной или слабощелочной среде и исключает характерное для аналога – глицидилметакрилата – образование побочных продуктов реакции Михаэля, а также взаимодействие с реакционной водной средой. Более того, наличие винилокислородной группы определяет способность привитого коллагена к фотосополимеризации под действием ультрафиолета с ди(мет)акрилатами (поли)этиленгликолей в присутствии фотоинициаторов. Все это указывает на уникальность ненасыщенных глицидиловых эфиров как агентов для модификации биополимера коллагена с целью придания ему способности к фотосшиванию по кратным связям и, как следствие, использования модифицированного производного в качестве основной фотореактивной, биосовместимой и биодеградируемой полимерной матрицы в составе смарт-гидрогелей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве полимерной матрицы был использован коллаген (0,3 масс.% в 0,02 М растворе уксусной кислоты), предоставленный сотрудниками Института регенеративной медицины Первого московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, полученный из хвостов лабораторных крыс [3]. Ненасыщенный

винилглицидиловый эфир этиленгликоля – «винилокс» – был предоставлен сотрудниками Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН.

Поли(*N*-изопропилакриламид) с молекулярной массой, равной 40 кДа, полиэтиленгликоль диакрилат и неионогенное поверхностно-активное вещество Tween 20 были использованы как коммерческие чистые продукты компании Sigma-Aldrich (США).

Модификацию коллагена проводили в трехгорлой стеклянной колбе, снабженной мешалкой, входом и выходом аргона в которую при перемешивании последовательно загружали 3,000 мл раствора коллагена, 0,055 мл Tween 20, 1,300 мл 4%-го водного раствора NaHCO₃ и перемешивали в течение 15 мин в токе аргона. Затем добавляли 0,057 мл (0,060 г) винилглицидилового эфира этиленгликоля и перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре. По окончании процесса продукт модификации осаждали изопропанолом (25 мл) при интенсивном перемешивании, фильтровали и тщательно промывали изопропанолом на фторопластовом фильтре с размером пор 0,22 мкм. Затем сушили в вакууме при 30–40 °С до постоянной массы и хранили в эксикаторе над безводным CaCl₂.

Для определения количественного содержания свободных первичных аминогрупп, выраженного в соотношении моль NH₂ / г коллагена, использовали методику пробоподготовки, описанную в работе [14], с адаптацией к 0,3%-м массовым растворам коллагена в 0,02 М растворе уксусной кислоты вместо твердых образцов. Расчет проводили по формуле (1):

$$\frac{\text{moles}(Lys)}{g(\text{Collagen})} = \frac{2 \times Abs(346nm) \times 0,02}{1,4 \times 10^4 \times b \times x} \quad (1)$$

где *moles(Lys)* – мольное количество «свободных» первичных аминогрупп в 1 г коллагена (*g(Collagen)*); *Abs(346nm)* – величина поглощения подготовленного для фотометрии образца при длине волны 346 нм; 1,4×10⁴ – молярный коэффициент поглощения пикриламида *L*-лизина, *L*×моль⁻¹×см⁻²; *b* – толщина поглощаемого слоя, см; *x* – навеска коллагена, г.

За величину поглощения образца при длине волны 346 нм было взято среднее из десяти значений параллельных съемок ультрафиолетовых спектров на спектрофотометре УФ-1200 (Esoview, Китай). Подготовку образца сравнения проводили в отсутствие 2,4,6-тринитробензолсульфокислоты. Мольное количество свободных первичных аминогрупп лизиновых фрагментов в образцах немодифицированного коллагена – (55,15±0,35)×10⁻⁵ или (54,8–55,5)×10⁻⁵ моль NH₂ / г коллагена, что близко к значению для данного типа коллагена – (35,5–38,9)×10⁻⁵ моль NH₂ / г коллагена, определенное в работе [14].

После осуществления модификации было определено содержание свободных первичных аминогрупп в полученном производном. Для этого осуществляли операции по пробоподготовке образцов для съемки ультрафиолетовых спектров. Съемку ультрафиолетовых спектров и вычисление количества первичных аминогрупп проводили по формуле (1) аналогично вышеприведенным операциям для немодифицированного коллагена. Степень модификации вычисляли по формуле (2) [14]:

$$F = 1 - \frac{\text{moles}(Lys)_{\text{Funct.Collagen}}}{\text{moles}(Lys)_{\text{Collagen}}} \quad (2)$$

где *F* – степень функционализации коллагена; *moles(Lys)_{Funct.Collagen}* – мольное количество свободных первичных аминогрупп в функционализированном коллагене; *moles(Lys)_{Collagen}* – мольное количество свободных первичных аминогрупп в исходном коллагене.

Фотоотверждение осуществляли с помощью ультрафиолетового излучателя ОУФК-012 («Солнышко», Россия) с эффективным спектральным диапазоном излучателя ДРТ-125 230–400 нм и световым потоком 1850 лм при температуре 50 °С и давлении 0,5 мбар. Расстояние от пленки до излучателя составляло ~10 см. Время облучения – 10 мин.

Для визуализации морфологии поверхности пленок проводили микросъемку в проходящем свете (метод светлого поля), используя световой микроскоп OSEELANG модели OSL-002 (OSEELANG, Китай), снабженный USB-камерой-окуляром SEELANG с разрешением 2 Мпк и увеличением 40х. Увеличение объектива составляло 10х. Общее увеличение – 400х.

Механические характеристики материалов устанавливали с помощью испытательной машины Instron 5544 UTM (Instron, США) при комнатной температуре и влажности около 50% при скорости сжатия 3 мм×мин⁻¹.

МТТ-тест проводили для оценки влияния растворимых компонентов пленки на жизнеспособность клеток. Фрагменты пленок общей площадью 6 см² из каждой группы образцов инкубировали в течение 24 ч в 1 мл среды для культивирования клеток (DMEM/F12 с добавлением 100 ЕД/мл стрептомицина, 100 мкг/мл пенициллина, 1% добавки Gibco GlutaMAX, 5% фетальной бычьей сыворотки HyClone) в атмосфере, содержащей 5% CO₂, при 37 °С. Серийные разведения экстрактов в среде добавляли в тройные лунки к субконфлюентному монослою мышинных фибробластов 3Т3, культивированному в 96-луночном планшете. Додецилсульфат натрия добавляли в отдельные лунки в качестве положительного (токсичного) контроля и отдельно в культуральную среду в качестве отрицательного контроля. Планшеты инкубировали еще 24 ч в CO₂-инкубаторе при 37 °С. Затем среду заменяли 100 мкл раствора МТТ (0,5 мг/мл в среде Gibco DMEM/F12 без добавок) и инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37 °С в течение 3 ч. После удаления раствора МТТ во все лунки добавляли аликвоты диметилсульфоксида по 100 мкл и перемешивали. Жизнеспособность клеток определяли количественно путем измерения оптической плотности раствора при длинах волн 567 и 630 нм на спектрофотометре Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США).

Контактную цитотоксичность – конфлюэнтность – и жизнеспособность клеток на поверхностях засеянных стволовыми клетками пленках исследовали путем дифференциального окрашивания живых и мертвых клеток набором флуоресцентных красителей Calcein AM/EthD-1 (LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit). Мышинные фибробласты линии 3Т3 окрашивали после 76 ч инкубации на поверхности пленок. Для визуализации зеленых живых и красных мертвых клеток использовали сканирующий лазерный конфокальный микроскоп LSM 880 Airyscan (Carl Zeiss, Йена, Германия),

оснащенный модулем AiryScan и детектором GaAsP (Carl Zeiss, Йена, Германия). Z-сканы были получены с использованием линзы EC Plan-Neofluar (Carl Zeiss, Oberkochen, Германия) и лазеров с длинами волн 488 и 561 нм.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для определения количества свободных первичных аминогрупп лизиновых фрагментов коллагена, необходимого при расчете степени модификации, вместо более сложного в плане пробоподготовки и временных затрат «нингидринного» метода [15–17] мы применили более удобную фотометрическую методику с использованием в качестве аналитического агента для фотометрии привитых на макромолекулу коллагена пикриламидов боковых фрагментов лизина [14, 18]. Привитые пикриламиды образуются за счет взаимодействия 2,4,6-тринитробензолсульфонат-аниона со свободными первичными аминогруппами в слабощелочной среде [18] (рис. 1).

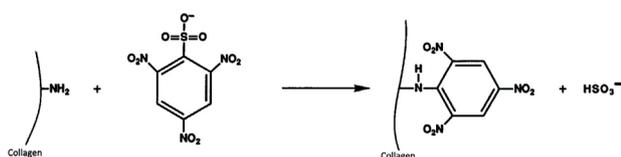


Рис. 1. Взаимодействие 2,4,6-тринитробензолсульфонат-аниона с первичными аминогруппами коллагена с образованием привитых пикриламидов

Fig. 1. Interaction of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonate anion with primary amino groups of collagen with formation of grafted picrylamides

Модификацию коллагена осуществляли в слабощелочной водной среде при комнатной температуре согласно схеме, приведенной на рис. 2.

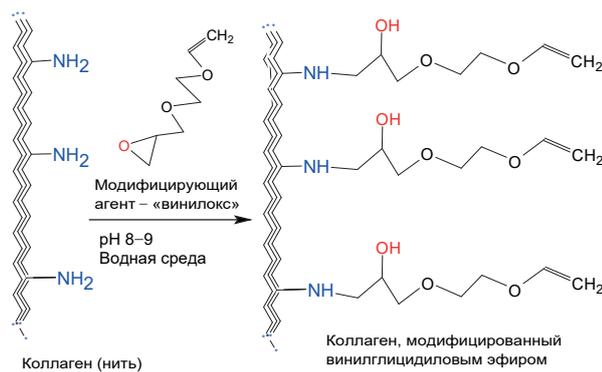


Рис. 2. Модификация коллагена «винилоксом»

Fig. 2. Modification of collagen with “Vinyllox”

Попытка осуществления модификации в присутствии эквимольного по отношению к модифицирующему агенту количества триэтиламина согласно методике [14] приводила к тому, что конечный продукт после осаждения изопропанолом и последующего тщательного высушивания в вакууме при комнатной температуре не был растворим в 0,02 М уксусной кислоте даже при

нагревании до температуры кипения. В то же время после проведения аналогичных операций с коллагеном в отсутствие «винилокса» высушенный в конечном итоге образец был растворим в данном растворе кислоты даже при комнатной температуре, что указывает на протекание конкурирующих процессов, приводящих к потере растворимости.

В связи с вышесказанным модификацию коллагена осуществляли 75-кратным мольным избытком «винилокса» в отсутствие триэтиламина, но с большим, двукратным, количеством водного раствора NaHCO_3 (4 масс.%) при pH ~8,5. В этом случае мы ориентировались на вышеописанную методику успешного получения привитых пикриламидов для количественного определения первичных аминогрупп при данном значении pH. После высушенный модифицированный коллаген растворялся в 0,02 М уксусной кислоте при нагревании до ~40 °С.

Наличие винилоксидных групп остатков «винилокса» в модифицированном производном подтверждено данными ^1H -спектроскопии ядерного магнитного резонанса (рис. 3). В спектре ^1H -ЯМР малоинтенсивный сигнал при 6,73 м.д. соответствует протонам $\text{O}-\text{CH}=\text{CH}_2$ винильной группы модифицирующего агента. Пики протонов $\text{O}-\text{CH}=\text{CH}_2$ при 4,14–4,17 м.д., по-видимому, перекрываются пиками «коллагеновых» протонов при 4,10–4,25 м.д. Малая интенсивность пиков протонов при кратной связи также характерна для модифицированных глицидилметакрилатом коллагенов [14].

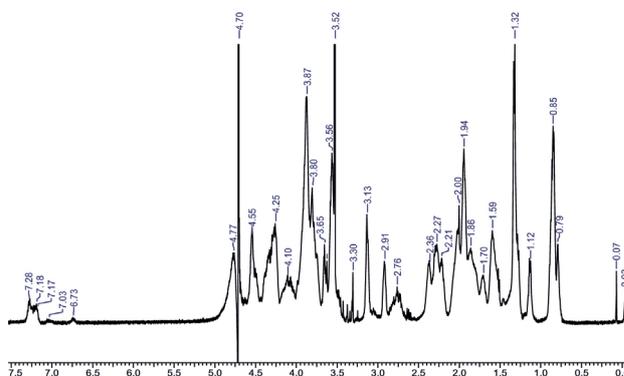


Рис. 3. ^1H -спектроскопия ядерного магнитного резонанса модифицированного «винилоксом» коллагена (3 масс.% в 0,02 М растворе CF_3COOD в D_2O)

Fig. 3. ^1H -NMR spectrum of vinyllox-modified collagen (3 Wt% in 0.02 M solution of CF_3COOD in D_2O)

Согласно расчетам по формуле (1), мольное количество свободных первичных аминогрупп лизиновых фрагментов в растворимом образце модифицированного коллагена составляло $(42,51 \pm 0,57) \times 10^{-5}$ моль NH_2 / г коллагена, что соответствует степени модификации, равной 23,4%.

Далее для качественной оценки гидрофильно-гидрофобных характеристик и морфологии поверхности смарт-имплантатов на поверхности обезжиренного горячей хромовой смесью предметного стекла были изготовлены термочувствительные смарт-пленки. Исходный раствор для получения пленок был на основе свежеприготовленного 0,6% масс. раствора модифици-

рованного коллагена в 0,02 М водном растворе уксусной кислоты с добавлением поли(*N*-изопропилакриламида) как наиболее изученного в регенеративной медицине термочувствительного смарт-полимера [2, 19, 20] (30% от массы коллагена), сшивающего агента, полиэтиленгликоль диакрилата с молекулярной массой, равной 700 Да (50% от массы коллагена), и фотоинициатора Irgacure 2959 (3% от массы коллагена). После отлива и последующего высушивания пленок при комнатной температуре и атмосферном давлении осуществляли фотоструктурирование (отверждение) пленки с помощью ультрафиолетового излучателя ОУФК-012 («Солнышко», Россия). В результате происходила фотосополимеризация кратных связей привитых на коллаген винилоксидных групп с двойными связями полиэтиленгликоль диакрилата с образованием пространственно-сшитой полимерной сетки.

На рис. 4 представлена микрофотография композиционной пленки, содержащей термочувствительный поли(*N*-изопропилакриламид), из которой видно, что поверхность содержит множество хаотично расположенных коллагеновых микрофибрилл. Данные микрофибриллы, как мы полагаем, образуются в процессе увеличения концентрации коллагеновой полимерной матрицы при высушивании образца. Вполне вероятно, что и полиэтиленгликоль диакрилат как сшивающий агент, и термочувствительные смарт-полимеры по мере высушивания образца адсорбируются на поверхности этих фибрилл, между которыми имеется свободное пространство – каналы, через которые к размножающимся стволовым клеткам могут свободно перемещаться нутриенты и выводиться продукты их жизнедеятельности. Из этого следует, что данные структуры могут с успехом выступать в качестве искусственного внеклеточного матрикса-скаффолда.

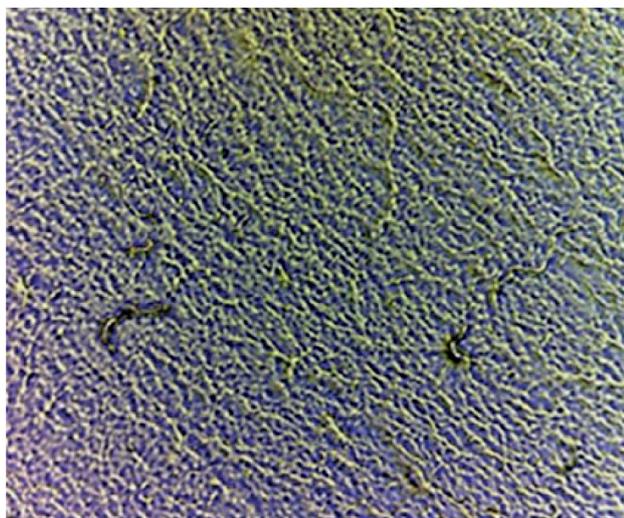


Рис. 4. Микрофотография поверхности отверждаемой ультрафиолетовым излучением пленки из коллагена, поли(*N*-изопропилакриламида), полиэтиленгликоль диакрилата при увеличении 400х

Fig. 4. Microphotograph of the surface of the UV-cured collagen / poly(*N*-isopropylacrylamide) / polyethylene glycol diacrylate film at a magnification of 400x

Для качественной оценки проявления гидрофильно-гидрофобных смарт-свойств пленок были проведены эксперименты по наблюдению за каплей воды на их поверхностях при комнатной температуре 20 °С и температуре, увеличенной до ~40 °С. Так, при 20 °С капля воды растекалась по поверхности, а затем медленно проникала внутрь структуры пленки из-за наличия пористости, но образцы на месте контакта не растворялись, а всего лишь частично набухали. В то же время при ~40 °С капля воды не растекалась по поверхности, а лишь медленно проникала внутрь структуры, но если эту пленку с каплей воды на поверхности быстро охлаждать, то в определенный момент она начинает растекаться по поверхности и быстро проникать внутрь структуры. Наблюдаемое явление является тепловым смарт-эффектом перехода через низшую критическую температуру растворения (НКТР), обеспечивающим наличие смарт-характеристик у поверхности, который проявляется в изменении гидрофильно-гидрофобных свойств. Таким образом, до перехода через НКТР поверхность является гидрофильной (быстрое растекание капли по поверхности с последующим проникновением внутрь структуры), тогда как после перехода через НКТР поверхность становится гидрофобной (капля воды не растекается по поверхности, а лишь медленно проникает внутрь структуры при увеличении гидрофобности поверхности при температуре выше НКТР).

Температура и степень усадки крайне важны для данного типа термочувствительных смарт-подложек, так как высокие значения усадки могут привести к отрыву от базовых подложек-носителей в процессе нагрева при биопечати с лазерным переносом (LIFT-биопечати) или пассаже выращенных на них клеточных слоев-имплантатов. Так, по данным термомеханического анализа, усадка сшитой высушенной пленки при 60–70 °С составляет всего 2–5%. Столь низкое значение можно объяснить микрофибрилярным строением пленки (см. рис. 4), где данные фибриллы играют роль компенсаторов уменьшения линейных размеров пленки при структурной реорганизации коллагеновых макромолекул. Что касается механических свойств, то модуль сжатия гидрогелевой пленки, содержащей 30% воды при 20 °С, составляет 55 кПа при компрессии около 45%, что свидетельствует о достаточной прочности данного гидрогеля, сравнимой с прочностными показателями пленок на основе глицидилметакрилированного коллагена [14].

Важно отметить, что по данным МТТ-теста полученный материал не выделял цитотоксических компонентов, сохраняя метаболическую активность стволовых клеток и обеспечивая достаточную их плотность на поверхности. Все вышеперечисленное определяет перспективность разработанных пленок в качестве термочувствительных смарт-подложек для выращивания стволовых клеток на их поверхностях с последующим LIFT-биопринтингом клеточными сфероидными с помощью точно сфокусированного лазерного излучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе предложен новый подход к модификации коллагена винилоксидными эфирами этиленгликоля, позволяющий получать растворимые в слабокислом водном растворе уксусной кислоты продукты со степенью модификации 23,4%. Фотоотвержденные полиэтиленгликоль диакрилатом биосовместимые пленки

модифицированного коллагена и поли(*N*-изопропилакриламид)а обладают удовлетворительными механическими характеристиками и гидрофильно-гидрофобной смарт-чувствительностью, что определяет перспективность их использования для задач регенеративной биомедицины.

REFERENCES

1. Blaeser A., Heilshorn S.C., Campos D.F.D. Smart bioinks as de novo building blocks to bioengineer living tissues. *Gels*. 2019;5(2):29. DOI: 10.3390/gels5020029.
2. Ohya S., Matsuda T. Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted gelatin as thermoresponsive three-dimensional artificial extracellular matrix: Molecular and formulation parameters vs. cell proliferation potential. *Journal of Biomaterials Science. Polymer edition*. 2005;16(7):809-827. DOI: 10.1163/1568562054255736.
3. Parenteau-Bareil R., Gauvin R., Berthod F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials*. 2010;3(3):1863-1887. DOI: 10.3390/ma3031863.
4. Kanagaraj J., Panda R.C., Jayakumar G.C. Interaction of glyoxal with collagenous matrix and its behavioral aspects for non-toxic and sustainable tanning system. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2020;17:879-890. DOI: 10.1007/s13762-019-02327-1.
5. He L., Lan W., Zhao Y., Chen S., Liu S., Cen L., et al. Characterization of biocompatible pig skin collagen and application of collagen-based films for enzyme immobilization. *RSC Advances*. 2020;10(12):7170-7180. DOI: 10.1039/C9RA10794K.
6. Liu B., Wang J., Ji L., Bai T., Zhang Y., Liu D. Structure validation of oxidized poly(2-hydroxyethyl acrylate) with multiple aldehyde groups and its application for collagen modification. *Royal Society Open Science*. 2021;8(2):201892. DOI: 10.1098/rsos.201892.
7. Adamiak K., Sionkowska A. Current methods of collagen cross-linking: review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;161:550-560. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.075.
8. Nashchekina Yu.A., Sirotkina M.Yu., Darvish D.M., Barsuk I.A., Moskalyuk O.A., Mikhailova N.A. The effect of carbodiimide on the structural, mechanical and biological properties of collagen films. *Cell and Tissue Biology*. 2021;15:586-593. DOI: 10.1134/S1990519X21060079.
9. Riacci L., Sorriente A., Ricotti L. Genipin-based crosslinking of jellyfish collagen 3D hydrogels. *Gels*. 2021;7(4):238. DOI: 10.3390/gels7040238.
10. Murueva A.V., Shershneva A.M., Nemtsev I.V. Shishatskaya E.I., Volova T.G. Collagen conjugation to carboxyl-modified poly(3-hydroxybutyrate) microparticles: preparation, characterization and evaluation *in vitro*. *Journal of Polymer Research*. 2022;29:324. DOI: 10.1007/s10965-022-03181-5.
11. Ng W.L., Chua C.K., Shen Y.-F. Print me an organ! Why we are not there yet. *Progress in Polymer Science*. 2019;97:101145. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2019.101145.
12. Ravichandran R., Islam M.M., Alarcon E.I., Samanta A., Wang S., Lundström P., et al. Functionalised type-I collagen as a hydrogel building block for bio-orthogonal tissue engineering applications. *Journal of Materials Chemistry. B*. 2016;4(2):318-326. DOI: 10.1039/c5tb02035b.
13. Behan K., Dufour A., Garcia O., Kelly D. Methacrylated cartilage ECM-based hydrogels as injectables and bioinks for cartilage tissue engineering. *Biomolecules*. 2022;12(2):216. DOI: 10.3390/biom12020216.
14. Tronci G., Russell S.J., Wood D.J. Photo-active collagen systems with controlled triple helix architecture. *Journal of Materials Chemistry. B*. 2013;1(30):3705-3715. DOI: 10.1039/c3tb20720j.
15. Buttafoco L., Kolkman N.G., Engbers-Buijtenhuijs P., Poot A.A., Dijkstra P.J., Vermes I., Feijen J. Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2006;27(5):724-734. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.06.024.
16. Huang G.P., Shanmugasundaram S., Masih P., Pandya D., Amara S., Collins G., Arinzeh T.L. An investigation of common crosslinking agents on the stability of electrospun collagen scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. 2015;103(2):762-771. DOI: 10.1002/jbm.a.35222.
17. Tu R., Shen S.-H., Lin D., Hata C., Thyagarajan K., Noishiki Y., Quijano R.C. Fixation of bioprosthetic tissues with monofunctional and multifunctional polyepoxy compounds. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1994;28(6):677-684. DOI: 10.1002/JBM.820280604.
18. Bubnis W.A., Ofner III C.M. The determination of ϵ -amino groups in soluble and poorly soluble proteinaceous materials by a spectrophotometric method using trinitrobenzenesulfonic acid. *Analytical Biochemistry*. 1992;207(1):129-133. DOI: 10.1016/0003-2697(92)90513-7.
19. Parfenov V.A., Khesuani Y.D., Petrov S.V., Karalkin P.A., Koudan E.V., Nezhurina E.K., et al. Magnetic levitational bioassembly of 3D tissue construct in space. *Science Advances*. 2020;6(29):eaba4174. DOI: 10.1126/sciadv.aba4174.
20. Grinberg V.Y., Burova T.V., Grinberg N.V., Buyanovskaya A.G., Khokhlov A.R., Kozhunova E.Yu., et al. Functionalized thermoresponsive microgels based on *N*-isopropylacrylamide: energetics and mechanism of phase transitions. *European Polymer Journal*. 2020;133:109722. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2020.109722.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Фарион Иван Александрович,
к.х.н., научный сотрудник,
Байкальский институт
природопользования СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
✉ fariv@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2723-6569>

Буинов Александр Станиславович,
инженер,
Байкальский институт
природопользования СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
buinov.aleksandr.96@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5216-685X>

Никишина Алена Николаевна,
инженер,
Байкальский институт
природопользования СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
alenaniknikishina@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0007-9260-7625>

Бурдуковский Виталий Федорович,
д.х.н., доцент, заместитель директора
по научной работе,
Байкальский институт
природопользования СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
burdvit@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3104-3591>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили
окончательный вариант рукописи.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 26.09.2023.
Одобрена после рецензирования 18.10.2023.
Принята к публикации 31.10.2023.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ivan A. Farion,
Cand. Sci. (Chemistry), Researcher,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
✉ fariv@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2723-6569>

Aleksandr S. Buinov,
Engineer,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
buinov.aleksandr.96@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5216-685X>

Alena N. Nikishina,
Engineer,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
alenaniknikishina@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0007-9260-7625>

Vitalii F. Burdukovskii,
Dr. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Deputy Director for Research,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
burdvit@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3104-3591>

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests
regarding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

Information about the article

The article was submitted 26.09.2023.
Approved after reviewing 18.10.2023.
Accepted for publication 31.10.2023.