

Пятая международная конференция

**ФИЗИКА —  
НАУКАМ О ЖИЗНИ**

Санкт-Петербург • 16–19 октября • 2023



# Структура и свойства фибрин-коллагеновых скаффолдов в зависимости от видового происхождения коллагена

Линькова Д.Д., Семенычева Л.Л., Рубцова Ю.П., Чарыкова И.Н.,  
Кобякова И.И., Часова В.О., Алейник Д.Я., Егорихина М.Н.

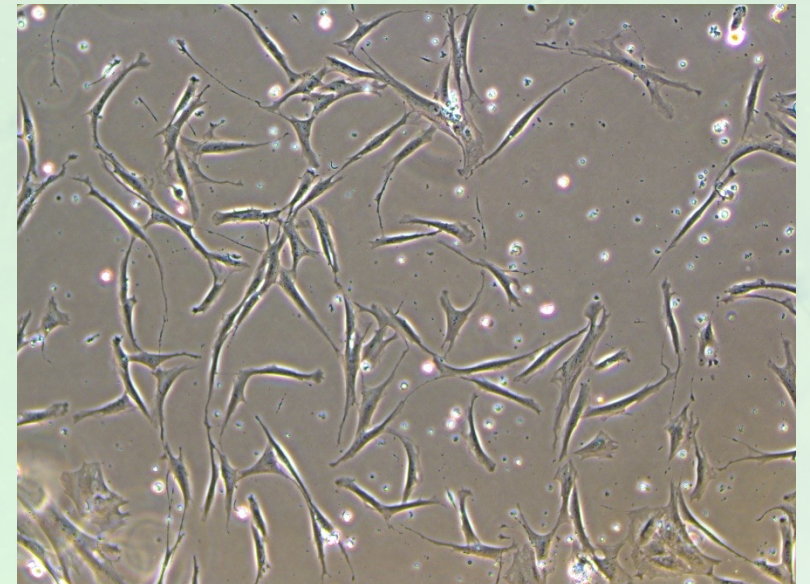
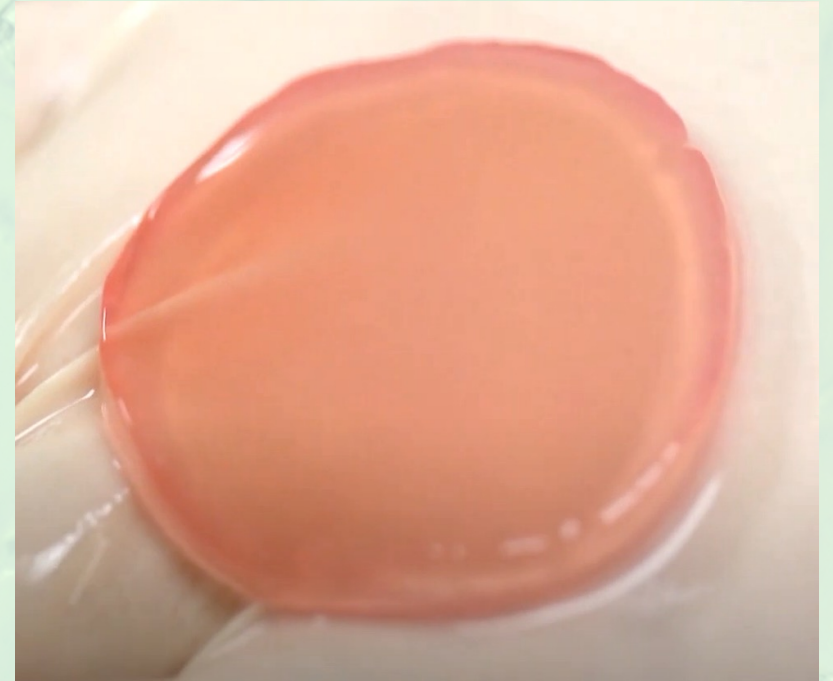
Нижний Новгород  
2023



# Объект исследования

## Биомедицинский клеточный продукт сложного состава:

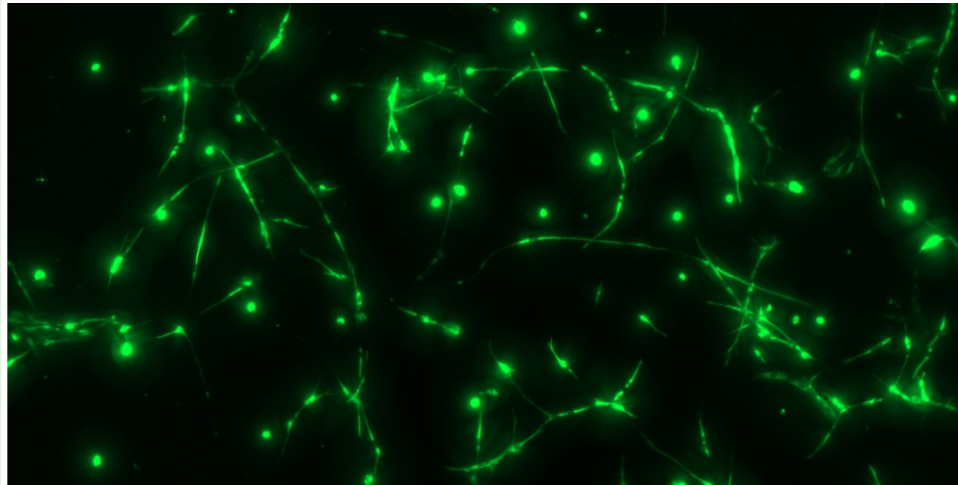
- *Матрица* – гидрогелевый скаффолд на основе коллагена I типа и криопреципитата плазмы крови
- *Клеточный компонент* – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) жировой ткани человека
  - Культуры третьего пассажа
  - Жизнеспособность 98-99%
  - Иммунофенотип: CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>-</sup> [Dominici и др., 2006]



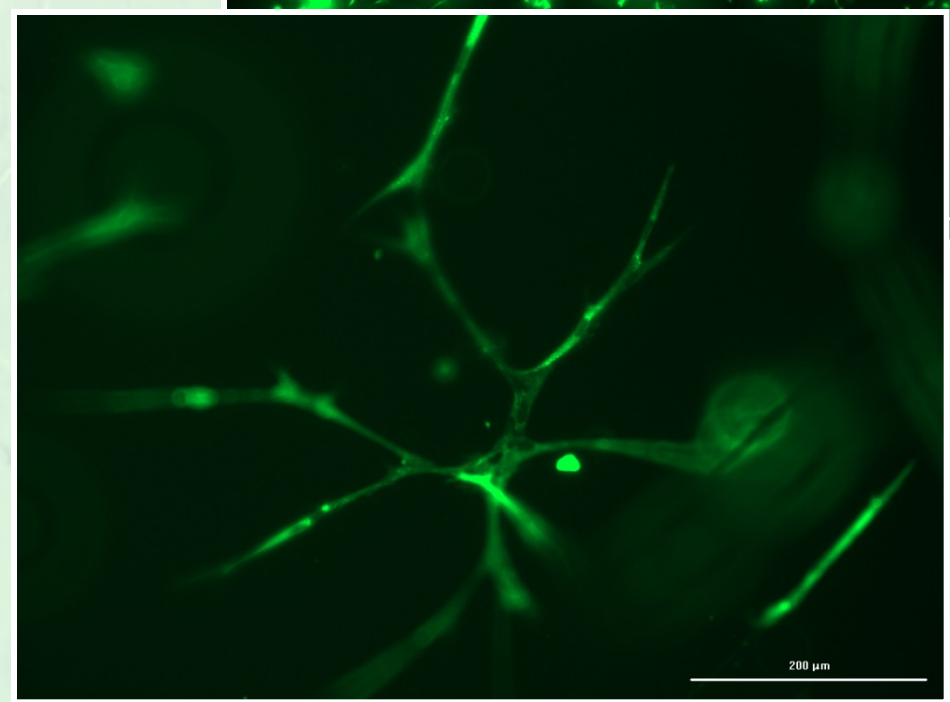
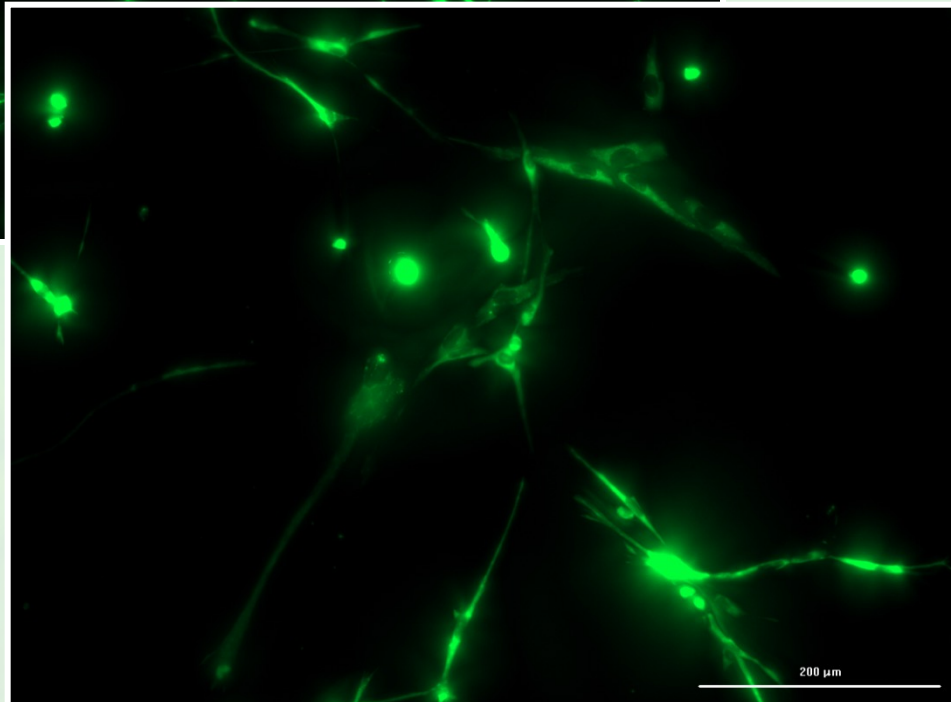
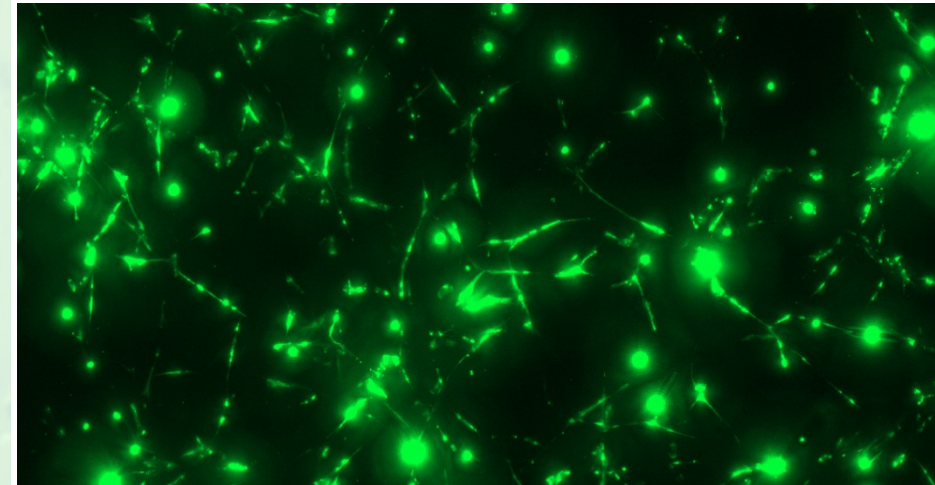


# Культура МСК в скаффолдах (3 сутки)

Скаффолды с бычьим коллагеном

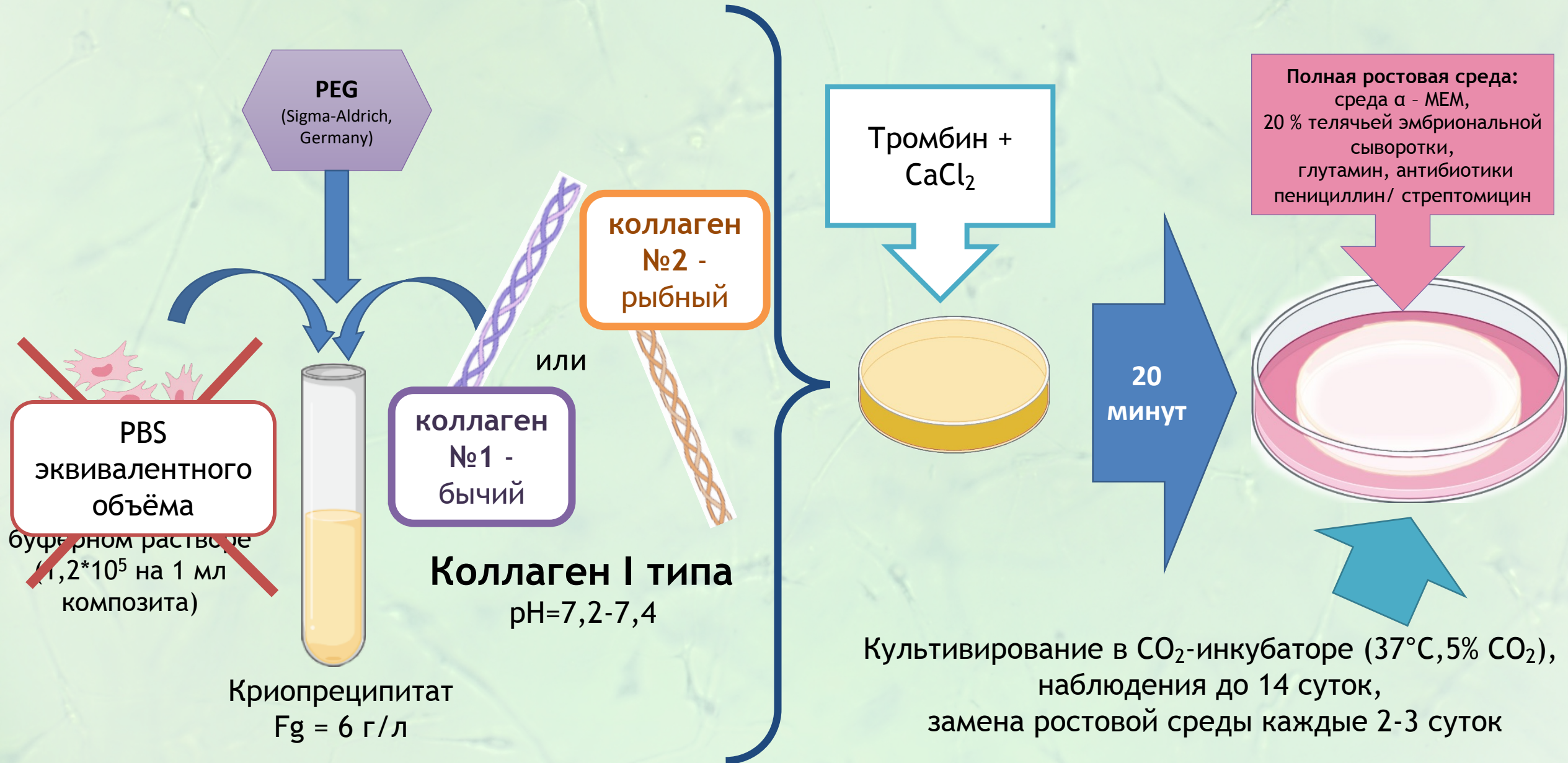


Скаффолды с рыбным коллагеном



Флуоресцентная микроскопия (DiO perchlorate; Z-stack 300 μm)

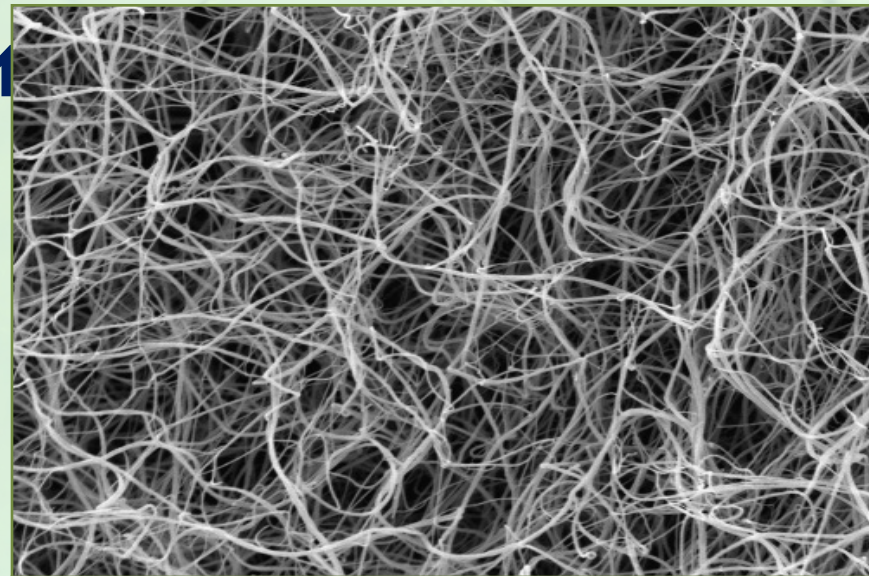
# Формирование скаффолдов (Пат.№2653434 РФ... от 11.04.2017)



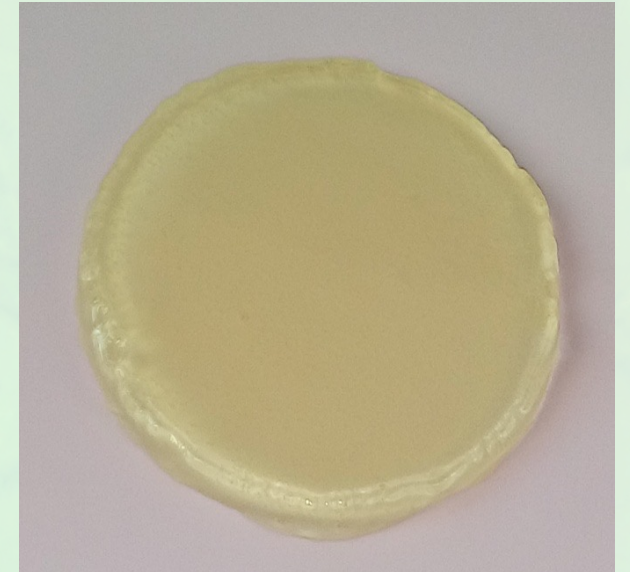


# Внешний вид

# архитектура

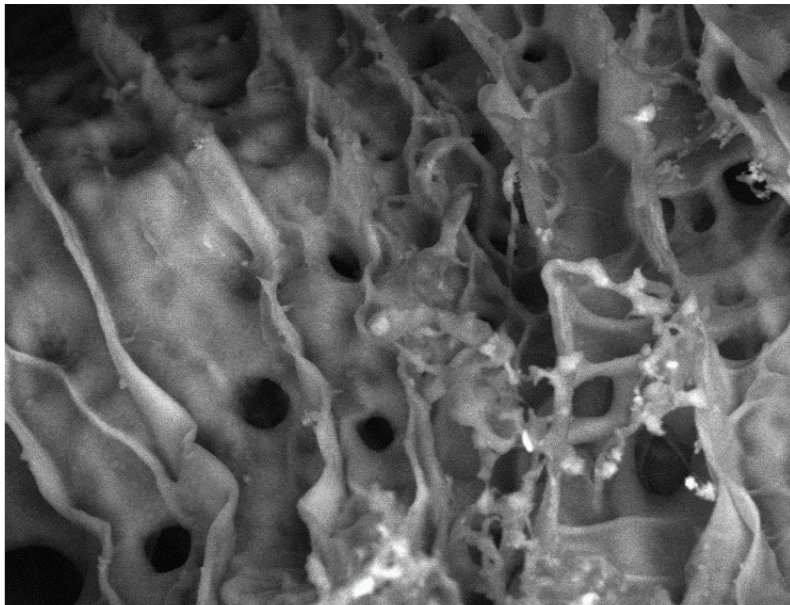


Структура фибринового скаффолда  
Janmey P.A. et al. 2009



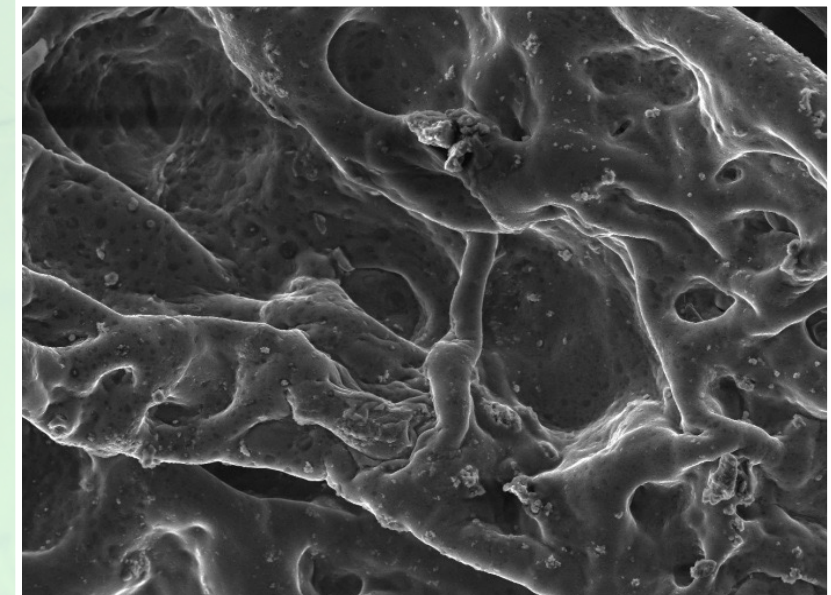
Скаффолд с бычьим коллагеном

Скаффолд с рыбным коллагеном



## У скаффолдов с бычьим коллагеном:

- Внутренняя структура более упорядочена
- Межпоровые пространства меньше, чем в скаффолдах с рыбным коллагеном





**экзогенный  
Ca<sup>2+</sup>**

(Sadeghi-Ataabadi  
et al., 2017)

**тромбин**

(Blombäck, Bark, 2004)

**фибриноген**

толщина, плотность и ветвление  
фибриллярных волокон,  
пористость

**фибрин**

(основной структурообразующий белок)

**Структура скаффолда**

**экзогенный  
Ca<sup>2+</sup>**

(Sadeghi-Ataabadi  
et al., 2017)

**тромбин**

(Blombäck, Bark, 2004)

**фактор  
XIII**

**фибриноген**

**фибронектин**

катализирует образование  
γ-глутамил-ε-лизил  
амидной связи между  
мономерами фибрина  
(Collet и др., 2005; Falvo, Gorkun,  
Lord, 2010)

толщина, плотность и ветвление  
фибриллярных волокон,  
пористость

ковалентно и нековалентно  
связывается с фибриновой  
матрицей с образованием  
высокомолекулярных  
мультимеров  
(Ramanathan, Karuri, 2014)

**фибрин**

(основной структурообразующий белок)

**Структура скаффолда**



- перекрестное сшивание молекул (Bryant et al. 2003)
- увеличение толщины волокон фибрина (Шпичка и др., 2016)

экзогенный  $\text{Ca}^{2+}$   
(Sadeghi-Ataabadi et al., 2017)

тромбин  
(Blombäck, Bark, 2004)

ПЭГ

фактор XIII

фибриноген

фибронектин

катализирует образование  $\gamma$ -глутамил- $\epsilon$ -лизил амидной связи между мономерами фибрина (Collet и др., 2005; Falvo, Gorkun, Lord, 2010)

толщина, плотность и ветвление фибриллярных волокон, пористость

ковалентно и нековалентно связывается с фибриновой матрицей с образованием высокомолекулярных мультимеров (Ramanathan, Karuri, 2014)

фибрин

(основной структурообразующий белок)

Структура скаффолда



- перекрестное сшивание молекул (Bryant et al. 2003)
- увеличение толщины волокон фибрина (Шпичка и др., 2016)

экзогенный  $\text{Ca}^{2+}$

(Sadeghi-Ataabadi et al., 2017)

ПЭГ

тромбин

(Blombäck, Bark, 2004)

фактор XIII

фибриноген

фибронектин

коллаген I типа

катализирует образование  $\gamma$ -глутамил- $\epsilon$ -лизил амидной связи между мономерами фибрина (Collet и др., 2005; Falvo, Gorkun, Lord, 2010)

образование микрофибрилл

толщина, плотность и ветвление фибриллярных волокон, пористость

ковалентно и нековалентно связывается с фибриновой матрицей с образованием высокомолекулярных мультимеров (Ramanathan, Karuri, 2014)

взаимопроникающие микрофибриллы (Brougham et al., 2015; Rowe, Stegemann, 2006)

фибрин

(основной структурообразующий белок)

Структура скаффолда

- перекрестное сшивание молекул (Bryant et al. 2003)
- увеличение толщины волокон и др.

экзогенный  
 $\text{Ca}^{2+}$   
(Sadeghi-Ataahadi)

**Влияет ли вид коллагена сополимеризованного с фибриногеном в условиях реакции ферментативного гидролиза на структурные характеристики скаффолдов???**

Все компоненты за исключением коллагена, были одинаковы и использовались в равных концентрациях и соотношениях

• образование микрофибрилл

аимопроницающие микрофибриллы  
(Brougham et al., 2015; Rowe, Stegemann, 2006)

катали  
γ-глута  
амидн  
моном  
(Collet и  
Lord, 201

(Ramanathan, Karim, 2014)

Структура скаффолда



# Молекулярно-массовые параметры исходных и гидролизованных тромбином образцов БК и РК

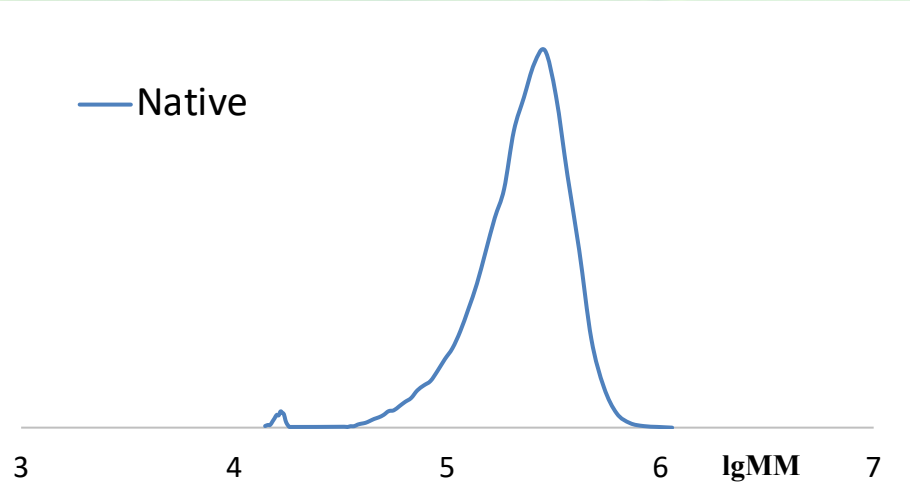
№ п/п	образец	Значения параметров за время гидролиза							
		Исходный		мин				3 суток	
				1		60			
		M <sub>w</sub> , кДа		M <sub>w</sub> , кДа		M <sub>w</sub> , кДа		M <sub>w</sub> , кДа	
		Значение	Доля	Значение	Доля	Значение	Доля	Значение	Доля
1	Рыбный коллаген	300	96%	125-127 макромолекулы	15%	124	16%	121	16%
2		17-18	4%	17-18	2%	17-18	2%	17-18	8%
3		-	-	9-10	83%	9-10	82%	9-10	76%
4	Бычий коллаген	950	93%	990 исходный	7%	980	8%	>10 <sup>3</sup>	10%
5		17	7-8%	17	5%	17	1-2%	17	3%
6		-	-	9-10	88%	9-10	90-91%	9-10	87%

Примечание: соотношении коллаген : тромбин = 10<sup>2</sup>:1

# Молекулярно-массовые параметры нативных молекул и гидролизатов

Кривые ММР исходных образцов

— Native

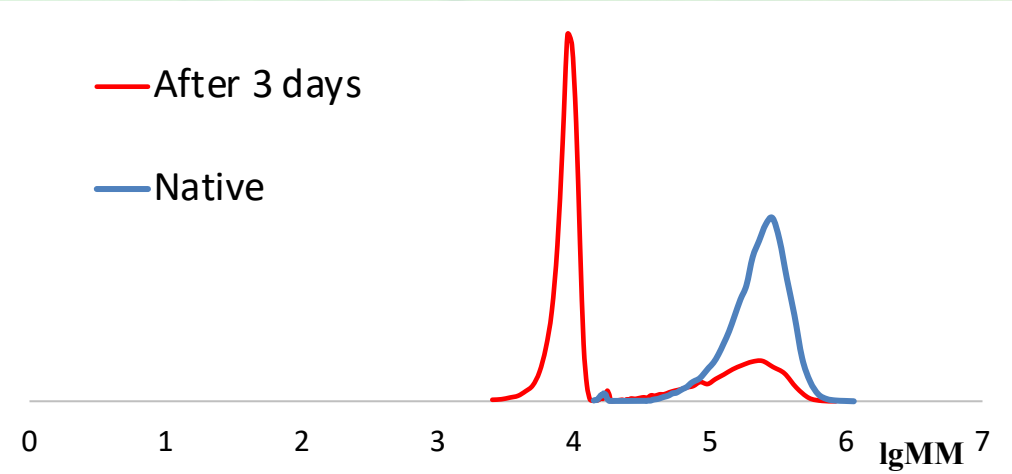


Рыбный  
коллаген

Кривые ММР гидролизатов тромбином

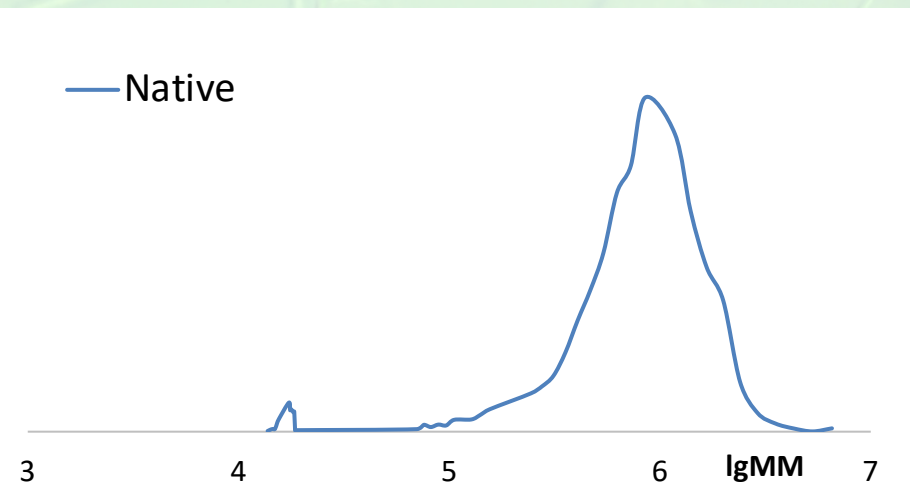
— After 3 days

— Native



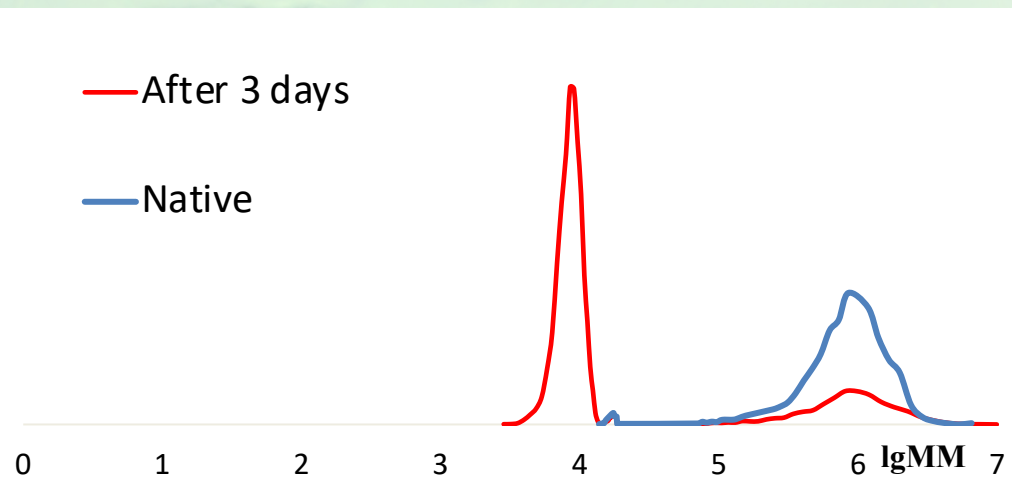
Бычий  
коллаген

— Native



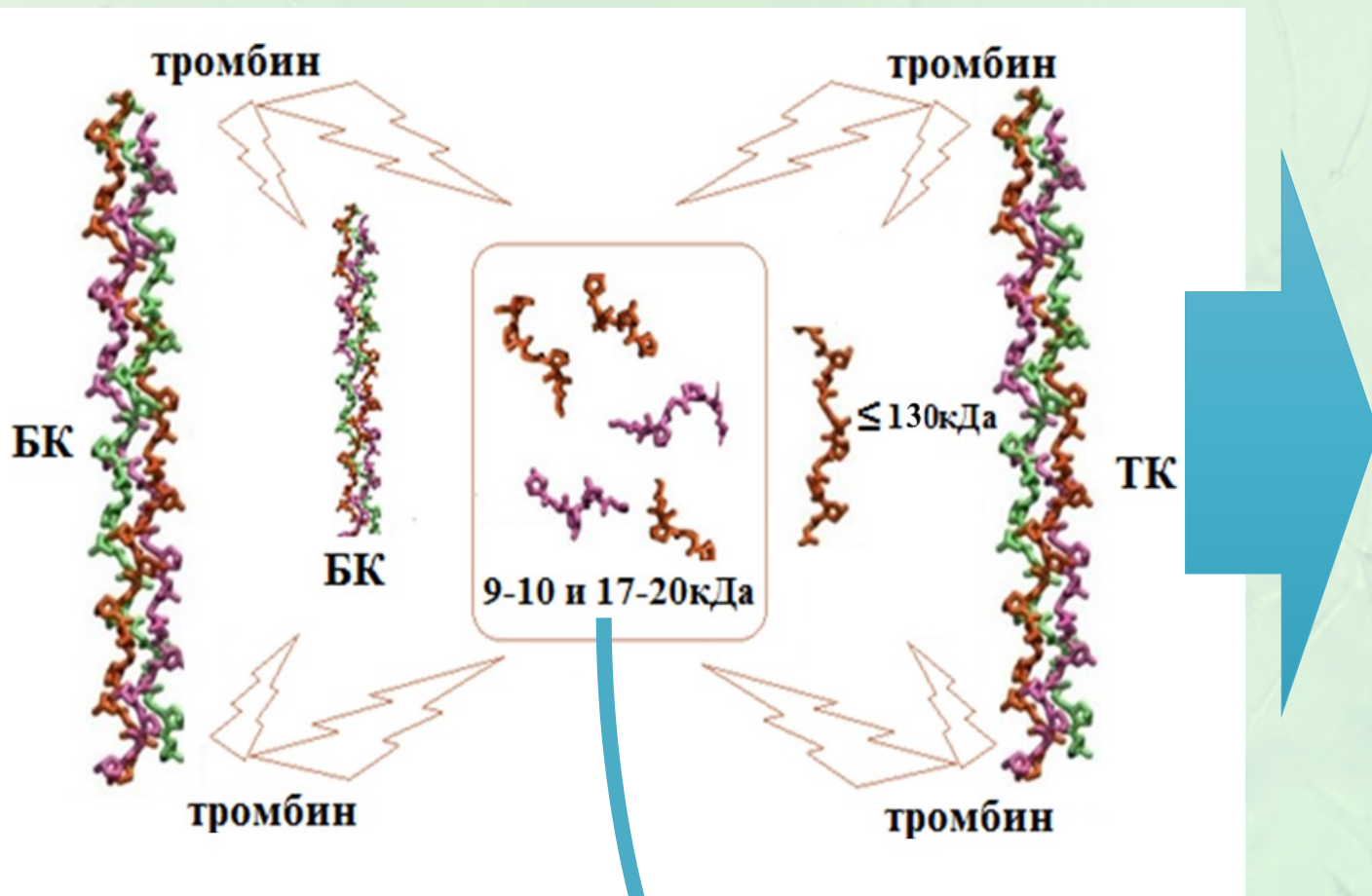
— After 3 days

— Native

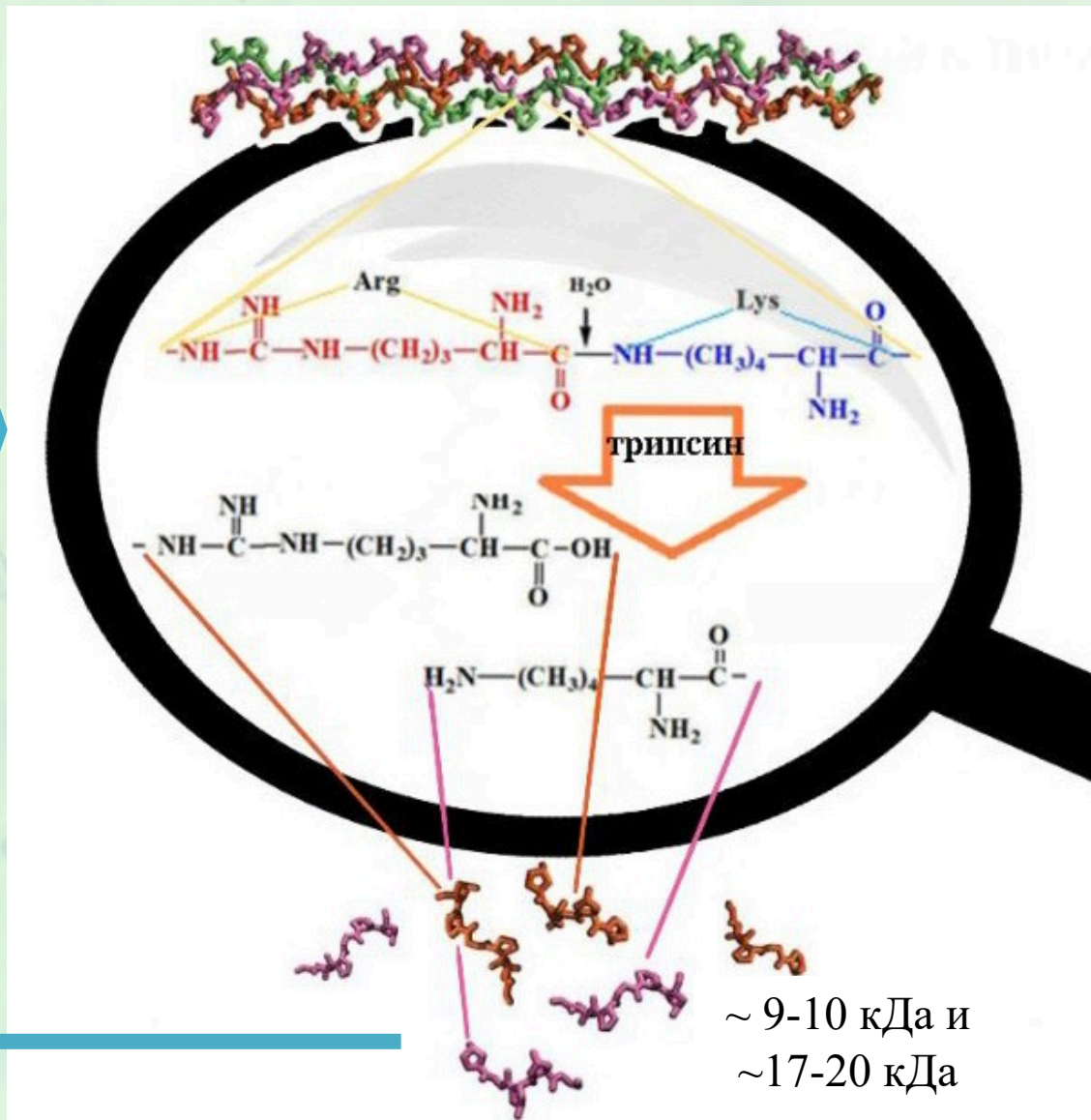




# Схема гидролиза коллагена в присутствии ферментов



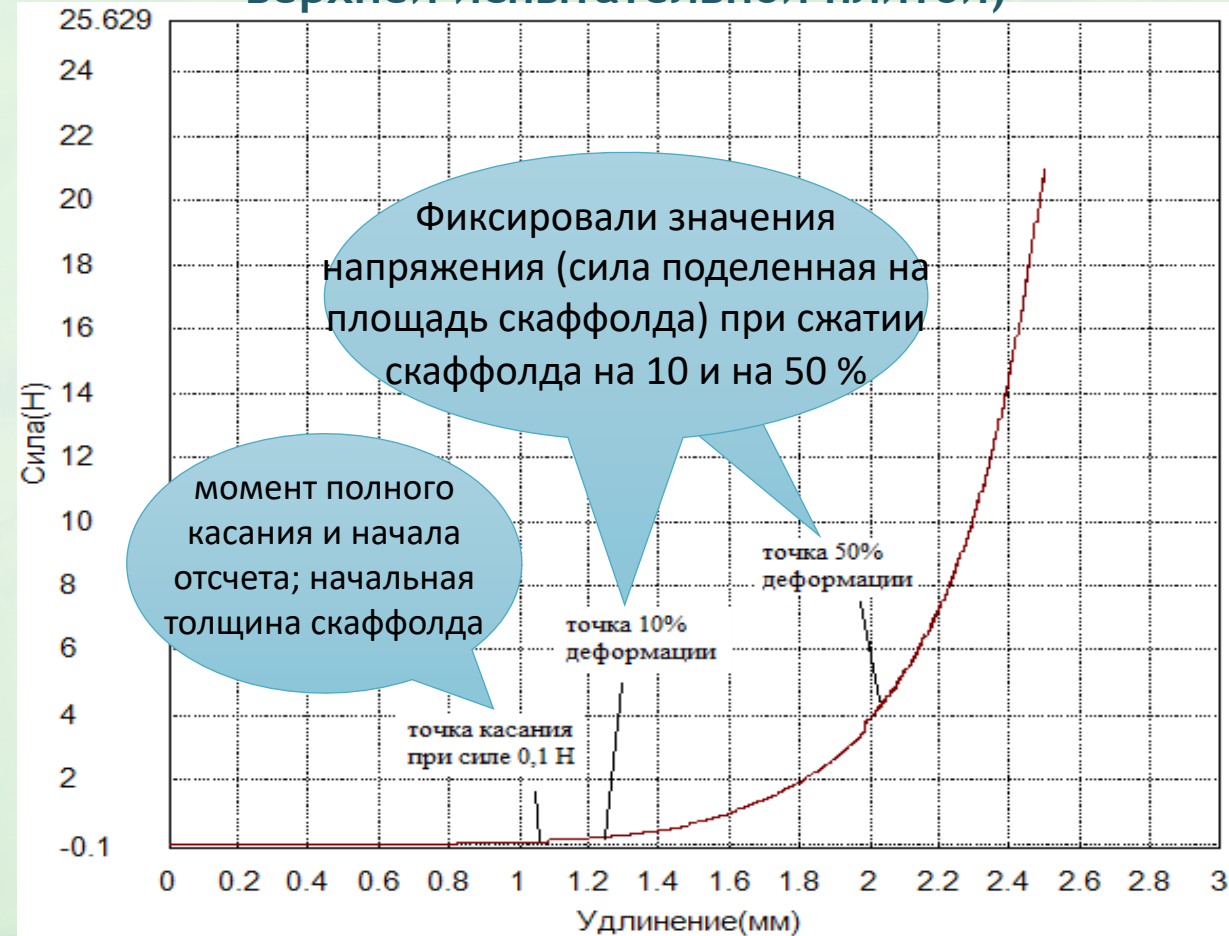
# Схема образования гидролизатов коллагена - фрагментов скаффолда



Характерны и для фибриногена!!!

# Характеристика механических свойств скаффолдов

Деформационная кривая (зависимости силы сжатия от расстояния пройденного верхней испытательной плитой)



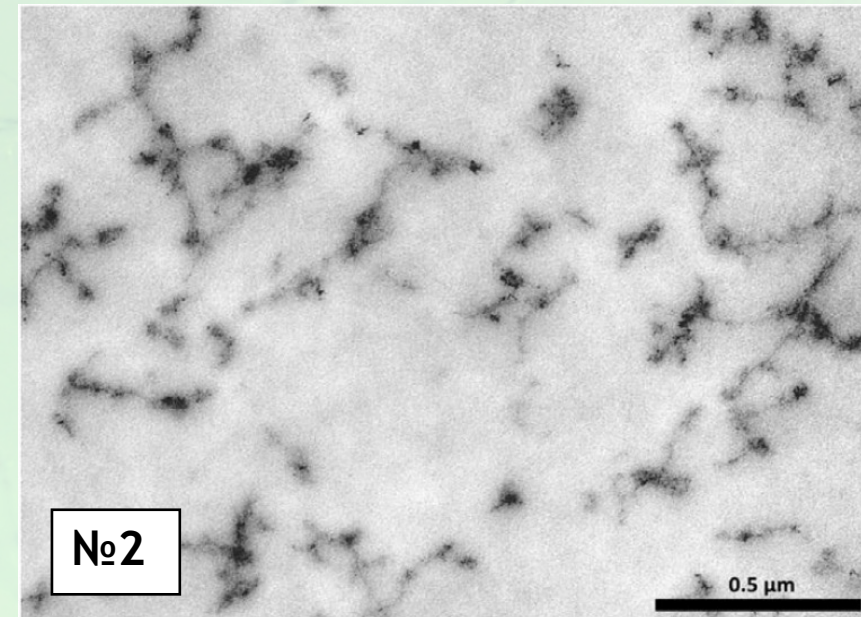
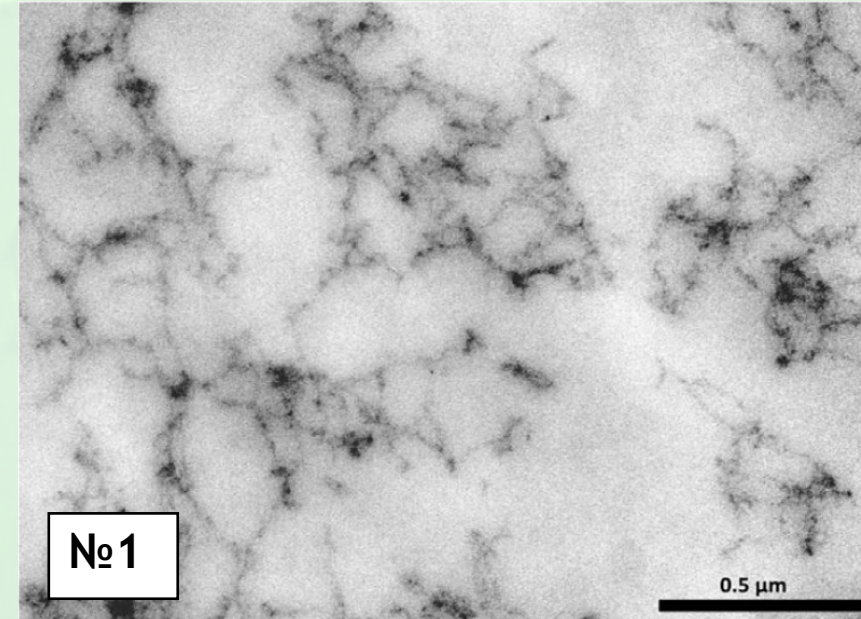
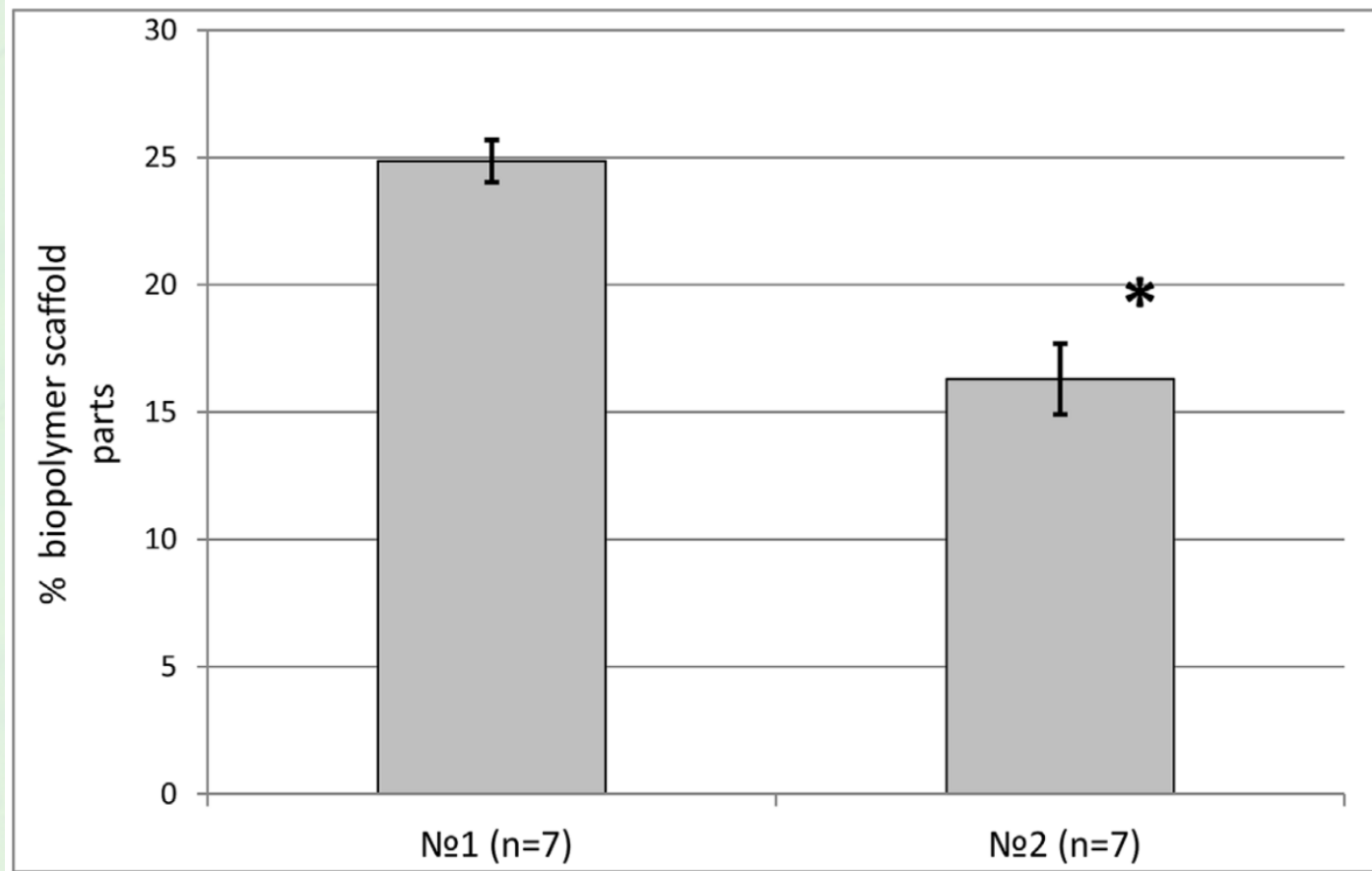
Вид коллагена в составе скаффолда	Напряжение при 10% деформации, кПа	Напряжение при 50% деформации, кПа	Толщина скаффолда при силе 0,1Н, мм
коллаген №1 (бычий)	0,50±0,06	9,18±0,90	1,86±0,09
коллаген №2 (рыбный)	0,49±0,05	5,61±0,26*	1,75±0,05*

Примечание: \* –  $p < 0.05$  – критерий Вилкоксона



# Характеристика пористости скаффолдов

(Пат.№2695061 РФ... от 25.04.2019)

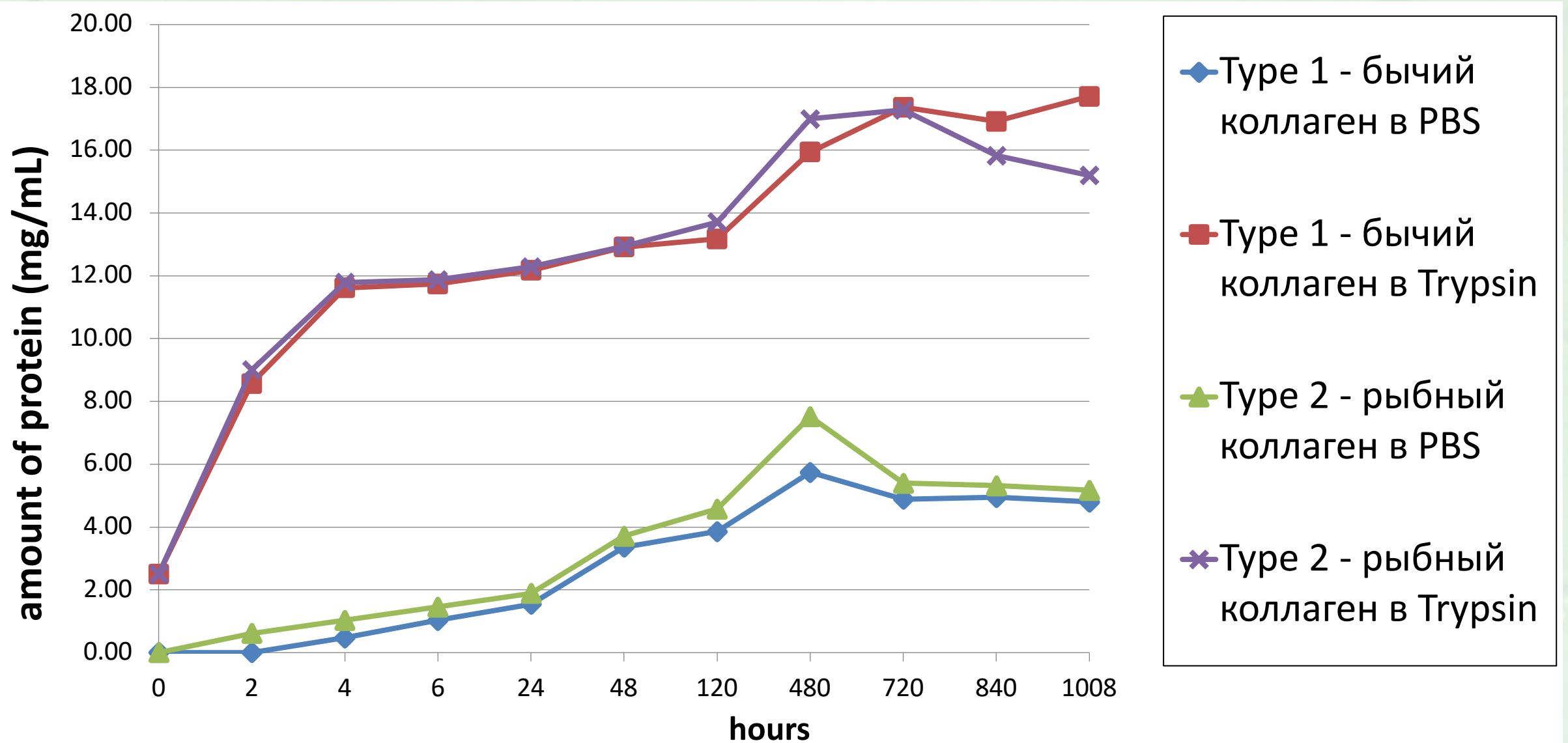


**Электронная трансмиссионная микроскопия**

**Примечание:** в составе скаффолдов №1 – бычий коллаген,  
№2 – рыбный коллаген;

\* –  $p < 0.05$  – критерий Вилкоксона.

# Биодеградация скаффолдов



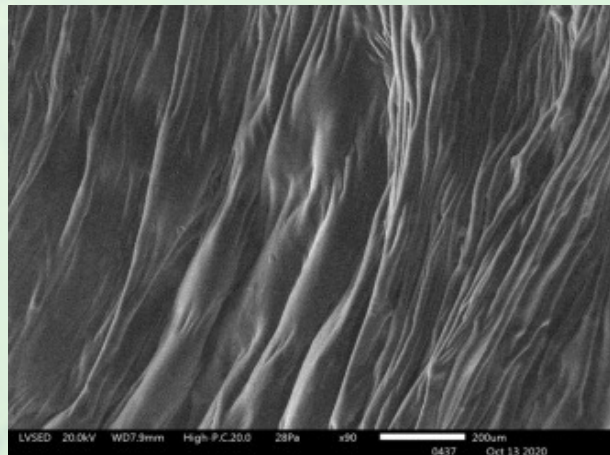
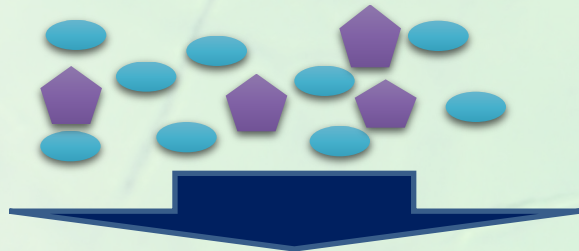


# природа коллагена

Бычий коллаген



фибриноген



определяет

- молекулярно-массовые характеристики коллагена
- молекулярно-массовые характеристики гидролизатов

опосредует

формирование структурных элементов

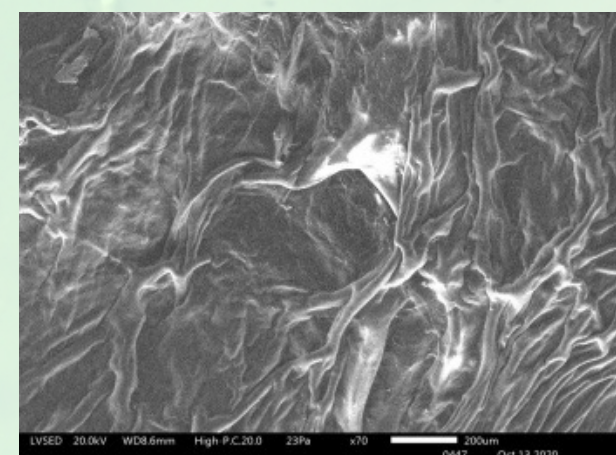
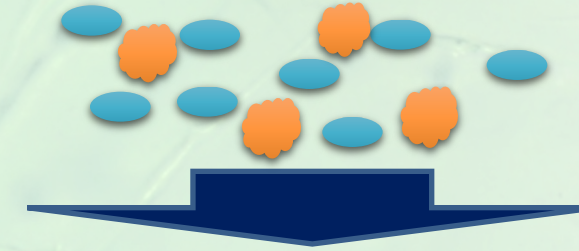
влияет

микроархитектоника скаффолдов и их свойства

Рыбный коллаген



фибриноген



# Спасибо за внимание!



Article

## Aspects of In Vitro Biodegradation of Hybrid Fibrin–Collagen Scaffolds

Marfa N. Egorikhina <sup>a,\*</sup>, Irina I. Bronnikova, Yulia P. Rubtsova <sup>b</sup>, Irina N. Charykova, Marina L. Bugrova <sup>b</sup>, Daria D. Linkova <sup>b</sup> and Diana Ya. Aleynik

Bioactive Materials 4 (2019) 334–345

Contents lists available at ScienceDirect



Bioactive Materials

journal homepage: <http://www.keaipublishing.com/biomat>



Hydrogel scaffolds based on blood plasma cryoprecipitate and collagen derived from various sources: Structural, mechanical and biological characteristics



Marfa N. Egorikhina <sup>a,\*</sup>, Diana Ya Aleynik <sup>a</sup>, Yulia P. Rubtsova <sup>a</sup>, Grigory Ya Levin <sup>a</sup>, Irina N. Charykova <sup>a</sup>, Ludmila L. Semenycheva <sup>b</sup>, Marina L. Bugrova <sup>a</sup>, Evgeniy A. Zakharychev <sup>b</sup>



marine drugs



Article

## Changes in the Molecular Characteristics of Bovine and Marine Collagen in the Presence of Proteolytic Enzymes as a Stage Used in Scaffold Formation

Marfa N. Egorikhina <sup>1,\*</sup>, Ludmila L. Semenycheva <sup>2</sup>, Victoria O. Chasova <sup>2</sup>, Irina I. Bronnikova <sup>1</sup>, Yulia P. Rubtsova <sup>1</sup>, Evgeniy A. Zakharychev <sup>2</sup> and Diana Ya. Aleynik <sup>1</sup>

Дарья Линькова,  
Биолог Лаборатории биотехнологий  
ФГБОУ ВО "ПИМУ" Минздрава России  
[linckovadaria@yandex.ru](mailto:linckovadaria@yandex.ru)



# Сравнительный анализ пассивной и ферментативной биодеградации скаффолдов

с бычьим  
коллагеном  
бесклеточные

с рыбным  
коллагеном  
бесклеточные

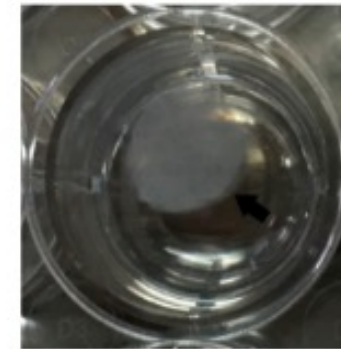
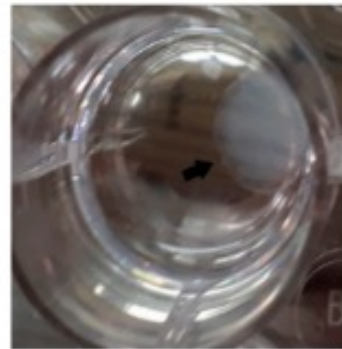
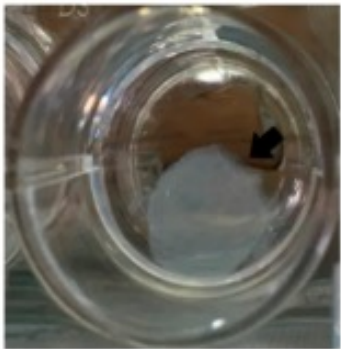
клеточные  
с бычьим  
коллагеном  
(24 часа)

клеточные  
с рыбным  
коллагеном  
(24 часа)

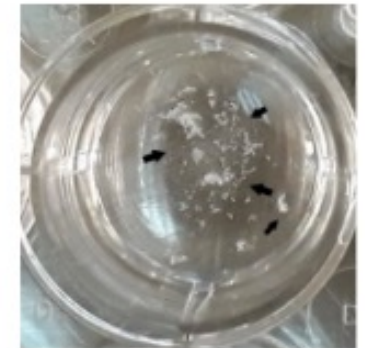
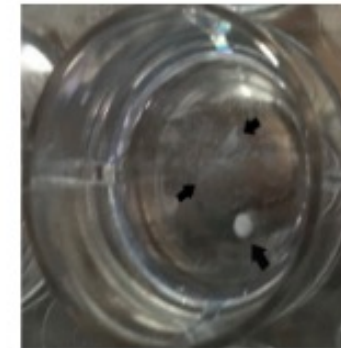
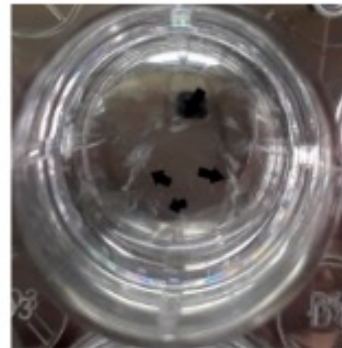
клеточные  
с бычьим  
коллагеном  
(6 суток)

клеточные  
с рыбным  
коллагеном  
(6 суток)

PBS

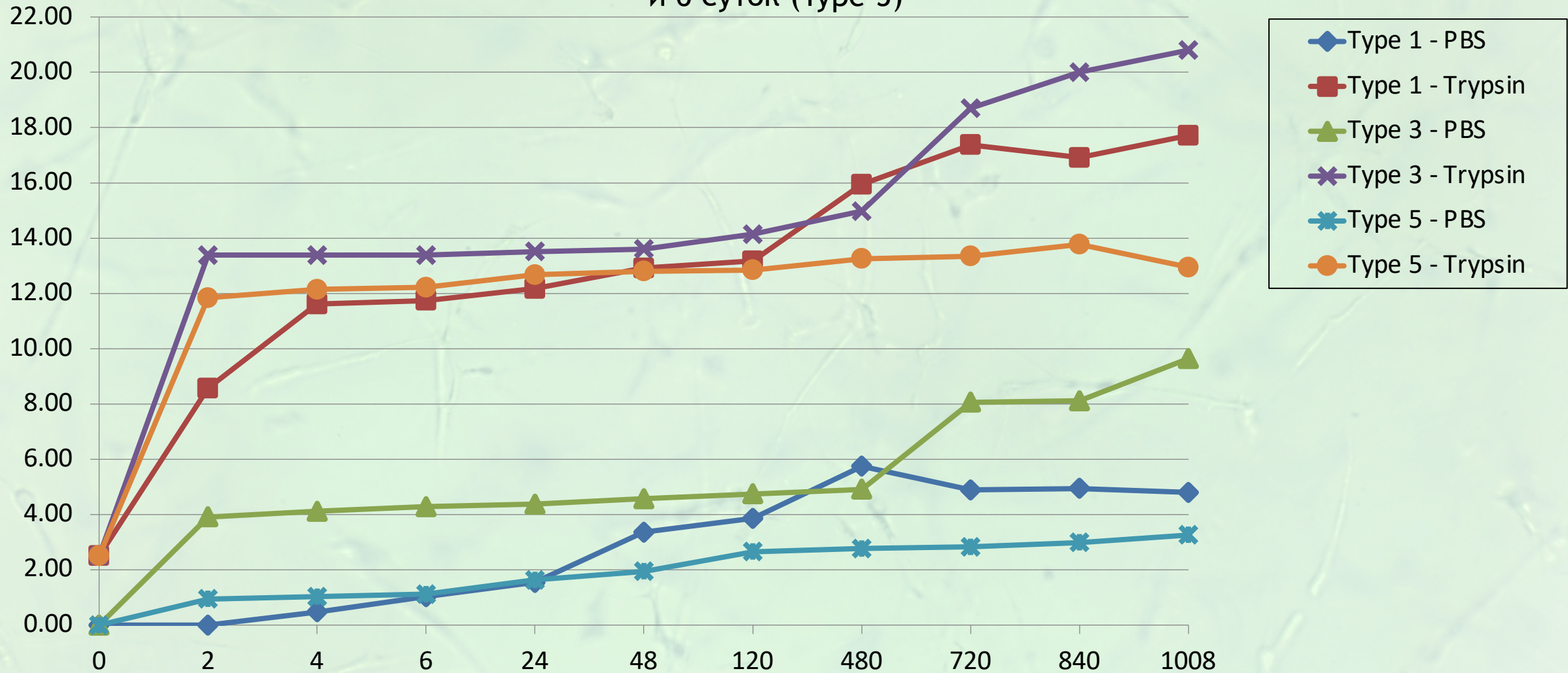


TRYP-  
SIN



# Сравнительный анализ пассивной и ферментативной биодеградации скаффолдов с бычьим коллагеном

бесклеточных (Type 1),  
скаффолдов с инкапсулированными ASCs, предварительно культивируемыми 24 часа (Type 3)  
и 6 суток (Type 5)





# Сравнительный анализ пассивной и ферментативной биодеградации скаффолдов с рыбным коллагеном

бесклеточных (Type 2),  
скаффолдов с инкапсулированными ASCs, предварительно культивируемыми 24 часа (Type 4)  
и 6 суток (Type 6)

