Оригинальная статья / Original article
DOI: https://doi.org/10.38025/2078-1962-2025-24-3-29-37

Модификация и характеристика биофункциональных свойств коллагенсодержащих ксерогелей медицинского назначения: результаты экспериментального исследования

Ерёмин П.С., Рожкова Е.А., Марков П.А.*

Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии Минздрава России, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Разработка и усовершенствование методов и материалов, применяемых в регенеративной медицине для немедикаментозной стимуляции восстановления тканей, позволит решить ряд клинических проблем, связанных с заболеваниями, препятствующими нормальному процессу репаративной регенерации, такими как диабет, сердечно-сосудистые заболевания и метаболические нарушения. Коллаген и его производные уже используются в качестве компонентов биоматериалов медицинского назначения. Однако низкая механическая прочность, быстрая биодеградация в физиологических средах и слабая устойчивость к ферментам ограничивают область и эффективность их медико-биологического применения.

ЦЕЛЬ. Оценить влияние карбоновых кислот на прочность, биодеградируемость и биосовместимость коллагенового ксерогеля в условиях *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Механические характеристики материалов оценивали с использованием текстурного анализатора TA.XTplus. Биосовместимость материалов оценивали методами световой и люминесцентной микроскопии с использованием флюоресцентных красителей (DAPI, Rhodamine) и набора для оценки жизнеспособности клеток Calcein AM (CCK-F).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Создан ксерогель на основе денатурированного коллагена с высокими прочностными характеристиками. Подобраны параметры термической обработки и концентрации карбоновых кислот для стабилизации механических свойств гидрогеля. Выявлено, что внесение в гидрогель из денатурированного коллагена лимонной кислоты и последующая высокотемпературная обработка позволяют повысить механическую прочность ксерогеля с 59 ± 3 до 82 ± 13 кПа. Кроме того, внесение лимонной кислоты в состав ксерогеля повышает его устойчивость к биодеградации более чем в три раза. Микросреда, создаваемая ксерогелем, содержащим лимонную кислоту, не оказывает цитотоксического действия, но приэтом препятствует пролиферации фибробластов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Результаты исследования *in vitro* показали, что полученный материал может стать перспективной платформой для применения как в качестве внеклеточного скаффолда, так и в качестве самостоятельного биоматериала для заполнения объема утраченной ткани в результате оперативного вмешательства или ранения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: биомиметики, гидрогель, ксерогель, коллаген, желатин, прочность, Модуль Юнга

Для цитирования / For citation: Ерёмин П.С., Рожкова Е.А., Марков П.А. Модификация и характеристика биофункциональных свойств коллагенсодержащих ксерогелей медицинского назначения: результаты экспериментального исследования. Вестник восстановительной медицины. 2025; 24(3):29–37. https://doi.org/10.38025/2078-1962-2025-24-3-29-37 [Eremin P.S., Rozhkova E.A., Markov P.A. Modification and Characteristics of Biofunctional Properties of Collagen-Containing Xerogels for Medical Purposes: an Experimental Study Results. Bulletin of Rehabilitation Medicine. 2025; 24(3):29–37. https://doi.org/10.38025/2078-1962-2025-24-3-29-37 (In Russ.).]

* **Для корреспонденции:** Марков Павел Александрович, E-mail: markovpa@nmicrk.ru, p.a.markov@mail.ru

Статья получена: 04.04.2025
Статья принята к печати: 11.04.2025
Статья опубликована: 16.06.2025

©2025, Ерёмин П.С., Рожкова Е.А., Марков П.А.
Petr S. Eremin, Elena A. Rozhkova, Pavel A. Markov
Эта статья открытого доступа по лицензии CC BY 4.0. Издательство: ФГБУ «НМИЦ РК» Минздрава России.
This is an open article under the CC BY 4.0 license. Published by the National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology.

Modification and Characteristics of Biofunctional Properties of Collagen-Containing Xerogels for Medical Purposes: Results of the Experimental Study

Petr S. Eremin, Elena A. Rozhkova, Pavel A. Markov*

National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology, Moscow, Russia

ABSTRACT

INTRODUCTION. Development and improvement of methods and materials used in regenerative medicine for non-drug stimulation of tissue repair will solve a number of clinical problems associated with diseases that impede the normal process of reparative regeneration, such as diabetes, cardiovascular diseases and metabolic disorders. Collagen and its derivatives are already used as components of biomaterials for medical purposes. However, low mechanical strength, rapid biodegradation in physiological environments and weak resistance to enzymes limit the scope and effectiveness of their medical and biological applications.

AIM. The aim of the study is to evaluate the effect of carboxylic acids on the strength, biodegradability and biocompatibility of collagen xerogel, *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS. The mechanical characteristics of the materials were assessed using a TA.XTplus texture analyzer. The biocompatibility of the materials was assessed by light and fluorescence microscopy using fluorescent dyes (DAPI, Rhodamine) and a Calcein AM (CCK-F) cell viability kit.

RESULTS AND DISCUSSION. A xerogel based on denatured collagen with high strength characteristics was created. The parameters of heat treatment and concentrations of carboxylic acids were selected to stabilize the mechanical properties of the hydrogel. It was found that the introduction of citric acid into the hydrogel from denatured collagen and subsequent high-temperature treatment allows to increase the mechanical strength of the xerogel from 59 ± 3 to 82 ± 13 kPa. In addition, the introduction of citric acid into the composition of the xerogel increases its resistance to biodegradation by more than three times. The microenvironment created by the xerogel containing citric acid does not have a cytotoxic effect, but it does inhibit proliferation of fibroblasts.

CONCLUSION. The results of the in vitro study showed that the obtained material can become a promising platform for use both as an extracellular scaffold and as an independent biomaterial for filling the volume of tissue lost as a result of surgery or injury.

KEYWORDS: biomimetics, hydrogel, xerogel, collagen, gelatin, strength, Young's modulus

For citation: Eremin P.S., Rozhkova E.A., Markov P.A. Modification and Characteristics of Biofunctional Properties of Collagen-Containing Xerogels for Medical Purposes: an Experimental Study Results. Bulletin of Rehabilitation Medicine. 2025; 24(3):29–37. https://doi.org/10.38025/2078-1962-2025-24-3-29-37 (In Russ.).

* **For correspondence:** Pavel A. Markov, E-mail: markovpa@nmicrk.ru, p.a.markov@mail.ru

Received: 04.04.2025
Accepted: 11.04.2025
Published: 16.06.2025

ВВЕДЕНИЕ

Повреждение кожных покровов в результате воздействия механических, физических или химических факторов, а также хронические раны трудно поддаются терапии. Текущие стандарты лечения полнослойных и хронических ран, такие как хирургическое лечение ран, аутологичная пересадка кожи, системное и местное введение антибиотиков и иммунодепрессантов, гормональных противовоспалительных средств часто сопровождаются нежелательными эффектами и осложнениями (например, болезненность процедуры, риск возникновения сопутствующих инфекционных заболеваний и т. д.) [1]. В связи с этим сохраняется актуальность поиска новых методов и технологий лечения сложных ран.

Одним из таких подходов является использование многофункциональных биоматериалов в качестве каркасов, в которых биоматериалы выполняют функцию внеклеточного матрикса, обеспечивающего инфильтрацию клеток и условия для поддержки роста новой ткани [2].

Биомиметические каркасы могут изготавливаться из материалов природного и синтетического происхождения, а также их композиций [3]. Наиболее популярным и перспективным ингредиентом биоматериалов медицинского назначения является коллаген, а также его денатурированные формы с различной молекулярной массой [4, 5]. Выбор коллагена и его производных обусловлен наиболее близкой имитацией нативного внеклеточного матрикса, а также за счет их высокой биосовместимости и способности поддерживать клеточный рост и пролиферативную активность клеток. Однако эффективное и масштабное применение биоматериалов на основе коллагена и его производных ограничено в первую очередь из-за их низкой механической прочности, быстрой биодеградации в физиологических средах и слабой устойчивости к ферментам [6].

Для усиления физических свойств коллагеновых биоматериалов используются различные методы сшивки, т. е. введение дополнительных химических связей между полипептидными цепями коллагена. Одним из методов усиления физических свойств коллагеновых биоматериалов может быть использование в качестве сшивающих агентов карбоновых кислот. Карбоновые кислоты представляют собой органические соединения, содержащие карбоксильную группу (-COOH). В основе этого типа сшивки лежит образование дополни-

тельных ковалентных связей между карбоксильными группами кислот и аминогруппами полипептидных цепей коллагена [7, 8]. При этом наиболее широкое распространение в качестве сшивающего агента получила лимонная кислота [9], что, по всей видимости, обусловлено наличием трех карбоксильных групп, которые могут образовывать стабильные амидные связи [8, 10]. Применение в качестве сшивающего агента дикарбоновых кислот, содержащих две карбоксильные группы, как например, винной (тартаровая) кислоты, используется главным образом для сшивки гидроколлоидов растительного происхождения и слабо изучено в отношении гидроколлоидов животного происхождения [11, 12]. Монокарбоновые кислоты, например, молочная, применяются главным образом в виде продуктов поликонденсации — полимолочных кислот [13–15]. Однако применение таких биоматериалов в качестве имплантируемых конструкций или раневых покрытий имеет ряд ограничений, в первую очередь это токсичность продуктов биодеградации и чрезмерно интенсивный местный провоспалительный ответ [16].

Ранее было показано, что, комбинируя химический метод сшивки денатурированного коллагена с использованием лимонной кислоты и последующей высокотемпературной обработкой, можно повысить эффективность сшивки цепей коллагена и улучшить прочность коллагеновых электропрядных нановолокон. Считается, что использование цитратного метода сшивки достаточно безопасно для изделий медицинского назначения [11]. Тем не менее пока недостаточно изучена возможность применения такого комбинированного подхода в сочетании с использованием моно-, ди- и трикарбоновых кислот для получения многофункциональных биоматериалов медицинского назначения.

ЦЕЛЬ

Оценить влияние карбоновых кислот на прочность, биодеградируемость и биосовместимость коллагенового ксерогеля в условиях *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В работе использованы следующие реактивы и материалы: денатурированный коллагена I типа компании «First Alive Collagen» (Россия), общая химическая характеристика представлена в таблице 1; растворы карбоновых кислот; набор для определения жизнеспособности клеток Calcein AM (Servicebio); 0,02% раствор Версена (ПанЭко, Россия); 0,25% раствор Try-EDTA (StemCell, США); FBS, эмбриональная телячья сыворотка (Gibco, США); антибиотик пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, Россия); фосфатно-солевой буфер 1xD-PBS (StemCell, США); культуральная среда DMEM-F12 (Gibco, США); культура клеток фибробластов кожи человека HdFb d281 (Россия).

Методы

Для получения гидрогелей 120 г денатурированного коллагена растворяли в 400 мл дистиллированной воды при температуре 80 °C. Полученный раствор аликвотировали по 25 мл. К 25 мл полученного раствора приливали 25 мл одного из следующих растворов: дистиллированная вода (контроль, ДК), 80 мМ молочной кислоты (Мк), 80 мМ винной кислоты (Вк), 80 мМ лимонной кислоты (Лк). После помешивания растворы заливали в силиконовые формы (12 см длина, 8 см ширина) и высушивали при 80 °C в течение 12 часов. Полученные сухие пленки выдерживали при 150 °C в течение 2 или 16 часов. В результате были получены образцы ксерогелей ДК, ДК+Мк, ДК+Вк и ГК+Лк. В дальнейшем для оценки структурно-механических свойств ксерогели регидратировали в растворе солей Хенкса (pH = 7,4) в течение 12 часов при 4 °C. Объем раствора солей Хенкса для регидратации использовали из расчета 1 мл раствора на 1 см^2 пленки.

Таблица 1. Физико-химическая характеристика коллагенового гидрогеля
Table 1. Physical and chemical characteristics of the collagen hydrogel

Показатель / Parameter	Значение / Value
Гидролизат коллаген / Collagen hydrolyzate	8,5–9,5 %
Триглицериды / Triglycerides	0,2–0,6 %
Зола сульфатная / Sulphated ash	1,6–2 %
Вода / Water	35,2–51,1 %
Молекулярная масса коллагена / Molecular weight of collagen	12–270 кДа
Плотность (20 °C) / Density (20 °C)	2,00–2,10 г/мл
pH	4,5–6,0
Соли / Salt	3–5 %

Анализ структурно-механических свойств образцов проводился с помощью анализатора текстуры TA.XTplus (Stable Micro Systems Ltd, Великобритания) с использованием тензодатчика весом 5000 г и прикладной программы, поставляемой с устройством (Texture Expert for WindowsTM, версия 2.61). Испытания проводились при комнатной температуре.

Регидратированные образцы ксерогелей средней толщиной 1,5 мм прокалывали плоским алюминиевым зондом диаметром 2 мм (SMS P/2). Для каждого теста были выбраны следующие экспериментальные условия: скорость пре-теста и пост-теста — 5 мм/с, скорость деформации — 1 мм/с, расстояние движения зонда — 4 мм. Твердость определяли по следующей формуле:

$$P = F / S,$$

где F — максимум кривой сила-расстояние в ньютонах, а S — площадь поперечного сечения образца геля в м^2.

Модуль Юнга просчитывали по следующей формуле:

$$E = (F / S) / (\Delta h / h),$$

где F — значение силы в ньютонах на кривой сила-расстояние при 4 % деформации высоты образца, а S — площадь поперечного сечения образца геля в м^2, Δh / h — 4 % деформация при проколе образца.

Для оценки интенсивности биодеградации ксерогелей в условиях *in vitro* образцы помещали в лунки 6-луночных планшетов и добавляли 7 мл инкубационной среды. В качестве инкубационной среды использовали раствор соли Хенкса (HBSS), содержащий соли Ca, Mg,

без бикарбоната Na, без фенолового красного, содержащий 25 мМ HEPES. Исходный раствор Хенкса имел pH 7.

При оценке биологических свойств материалов руководствовались положениями стандартов, изложенных в ГОСТ ISO 10993-5-2011 «Изделия медицинские: оценка биологического действия медицинских изделий. Исследования на цитотоксичность: методы in vitro». Оценку биосовместимости проводили методом прямого контакта с использованием фибробластов человека (HdFb d281), полученных из банка клеточных культур УНУ «Коллекция клеточных культур» ЦКП ИБР РАН.

Предварительно простерилизованные спиртом и УФ-облучением образцы (10 × 10 мм) помещали в лунки 6-луночных планшетов из расчета один образец на лунку, общее количество повторов для каждого образца — 5 шт. Оценку влияния ксерогелей на пролиферативную активность фибробластов человека проводили при совместной инкубации. Для этого ксерогели помещали в лунки с предварительно адгезированными клетками и инкубировали при стандартных условиях культивирования (37 °C, 5 % CO_2). Через 24 часа оценивали морфометрические характеристики фибробластов и их жизнеспособность с использованием набора для определения жизнеспособности клеток Calcein AM. Обработку образцов Calcein AM проводили согласно протоколу производителя (Calcein AM Cell Viability Assay Kit, Servicebio). Морфометрические характеристики клеток оценивали методом световой и люминесцентной микроскопии (Leica Microsystems). Жизнеспособность клеток оценивали с использованием набора Calcein AM, согласно протоколу производителя (Calcein AM Cell Viability Assay Kit, Servicebio).

Статистическая обработка результатов

Полученные данные были обработаны программами Statistica 10, SPSS версия 20 (SPSS, Inc., Chicago, IL, США) и Microsoft Excel 2007. Данные представляли в виде среднего арифметического ± стандартное отклонение. Значимость различий была определена при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и парного сравнения (post hoc) критерия Тьюки. При сравнении выборочных средних, имеющих нормальное распределение, использовали *t*-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Внешний вид ксерогелей из денатурированного коллагена (ДК), а также его модифицированных форм, содержащих 40 мМ молочной (ДК + Мк), винной (ДК + Вк) и лимонной кислоты (ДК + Лк), представлен на рисунке 1.

Оценку текстурных свойств образцов проводили после предварительной регидратации ксерогелей в растворе Хенкса в течение 12 часов при 4 °C. Установлено, что внесение в состав раствора коллагена молочной и винной кислот не влияет на механическую прочность полученных ксерогелей ДК + Мк и ДК + Вк. Выявлено, что внесение лимонной кислоты повышает механическую прочность ксерогеля ДК + Лк до 82 ± 13 кПа (рис. 2А). При этом модуль продольной упругости всех исследованных образцов не изменяется и в среднем составляет 26 ± 6 кПа (рис. 2В).

На следующем этапе исследования оценивали влияние продолжительности термической обработки на механические свойства ксерогелей. Установлено, что уменьшение продолжительности термообработки до 2 часов приводит к снижению механической прочности у всех исследуемых образцов (табл. 2). Наиболее значимое снижение прочности наблюдаются у ксерогеля ДК + $Вк_2$, его прочность ниже не только по сравнению с ДК + $Лк_2$ и ДК + $Мк_2$, но и даже по сравнению с исходным ксерогелем $ДК_2$. Следует отметить, что, несмотря на снижение прочности ксерогеля ДК + $Лк_2$, в результате сокращения продолжительности термического воздействия его прочность относительно других образцов остается наиболее высокой (табл. 2).

Выявлено, что сокращение продолжительности термообработки не вызывает изменений в способности гидрогелей сопротивляться упругой деформации (табл. 2). Значение модуля Юнга всех гидрогелей, обработанных высокой температурой как в течение 16 часов, так и в течение 2 часов сопоставимы между собой (рис. 2, табл. 2).

Оценка интенсивности биодеградации ксерогелей в условиях *in vitro*, показала, что внесение в состав ДК трикарбоновой (лимонной) кислоты повышает устойчивость ксерогеля к биодеградации. Так, например, прочность ДК через 24 часа инкубации в среде, имитирующей по химическому составу и кислотности межтканевую жидкость, снижается на 80 % и составляет 7 ± 1 кПа. В той же степени происходит снижение прочности ДК+Мк и ДК+Вк (рис. 3). Механическая прочность ксерогеля ДК+Лк также снижается, однако интенсивность биодеградации данного ксерогеля в два раза ниже по сравнению ДК, ДК+Мк и ДК+Вк (рис. 3).

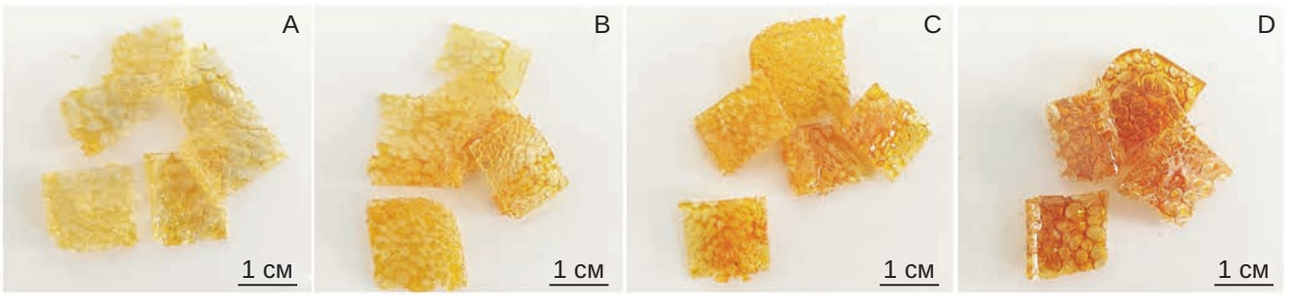

Рис. 1. Ксерогели из денатурированного коллагена (A) и коллагена, обработанного молочной (B), винной (C) и лимонной (D) кислотами с последующим нагреванием до 150 °C в течение 16 часов

Fig. 1. Xerogels from denatured collagen (A) and collagen treated with lactic (B), tartaric (C) and citric (D) acid followed by heating to 150 °C for 16 hours

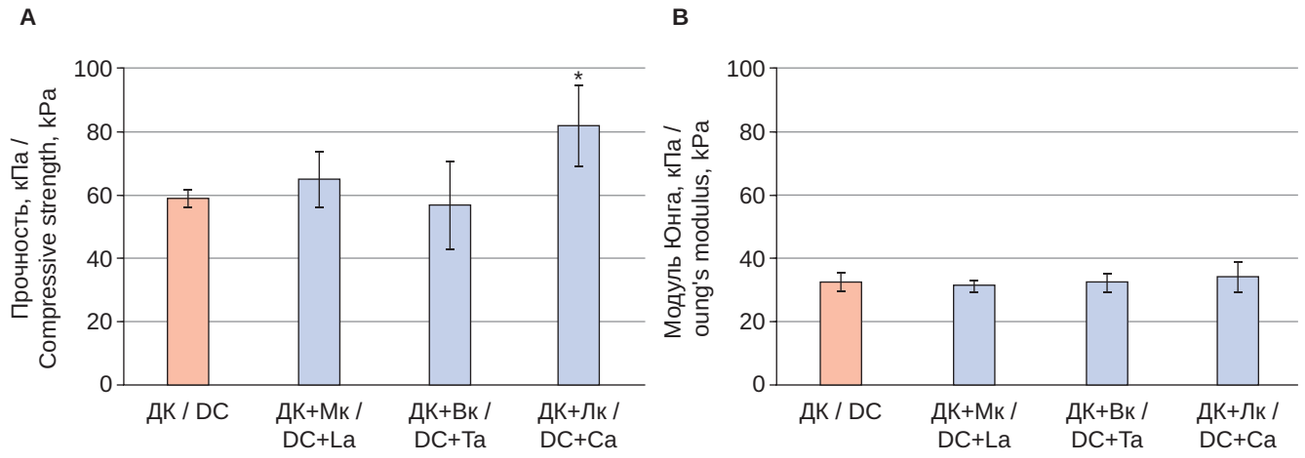

Рис. 2. Характеристика прочности (A) и Модуля Юнга (B) регидратированных ксерогелей денатурированного коллагена (ДК) и коллагена, обработанного молочной (ДК + Мк), винной (ДК + Вк) и лимонной (ДК + Лк) кислотами с последующим нагреванием до 150 °C в течение 16 часов. * — различия достоверны ($p < 0,05$, $n = 10$) по сравнению с ДК

Fig. 2. Compressive strength (A) and Young's modulus (B) of rehydrated xerogels from denatured collagen (DC) and collagen treated with lactic (DC + La), tartaric (DC + Ta) and citric (DC + Ca) acids followed by heating to 150 °C for 16 hours. * — differences are significant ($p < 0.05$, $n = 10$) compared to DC

Таблица 2. Характеристика механических свойств регидратированных ксерогелей, модифицированных карбоновыми кислотами и двухчасовой термической стабилизацией

Table 2. Characterization of mechanical properties of rehydrated xerogels modified with carboxylic acids and a two-hour thermal stabilization

Образец / Sample	Прочность, кПа / Compressive strength, kPa	Модуль Юнга, кПа / Young's modulus, kPa
$ДК_2$ / DC_2	20 ± 2	26 ± 8
ДК + $Мк_2$ / DC + La_2	24 ± 7	26 ± 6
ДК + $Вк_2$ / DC + Ta_2	9 ± 4*	21 ± 2
ДК + $Лк_2$ / DC + Ca_2	47 ± 15*	28 ± 4

Примечание: ** — различия достоверны ($p < 0,05$, $n = 10$); $ДК_2$ — гидрогель из денатурированного коллагена, стабилизированный двухчасовой термической обработкой, ДК + $Мк_2$ — гидрогель из денатурированного коллагена, модифицированный молочной кислотой и стабилизированный двухчасовой термической обработкой, ДК + $Вк_2$ — гидрогель из денатурированного коллагена, модифицированный винной кислотой и стабилизированный двухчасовой термической обработкой, ДК + $Лк_2$ — гидрогель из денатурированного коллагена, модифицированный лимонной кислотой и стабилизированный двухчасовой термической обработкой.*

Note: ** — differences are significant ($p < 0.05$, $n = 10$); DC_2 is a hydrogel made from denatured collagen stabilized by a two-hour heat treatment, DC + La_2 is a hydrogel made from denatured collagen modified with lactic acid and stabilized by a two-hour heat treatment, DC + Ta_2 is a hydrogel made from denatured collagen modified with tartaric acid and stabilized by a two-hour heat treatment, DC + Ca_2 is a hydrogel made from denatured collagen modified with citric acid and stabilized by a two-hour heat treatment.*

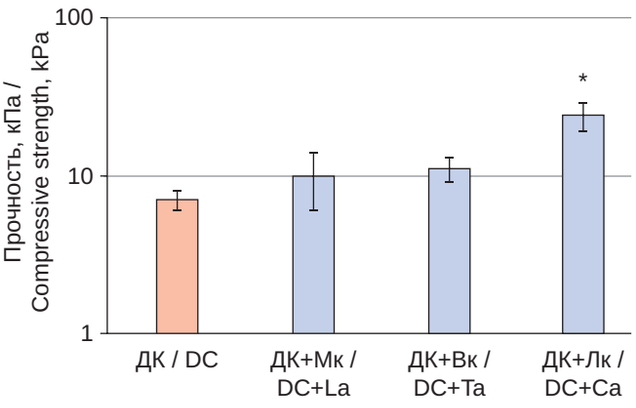

Рис. 3. Биодеградация ксерогелей денатурированного коллагена (ДК) и коллагена, обработанного молочной (ДК + Мк), винной (ДК + Вк) и лимонной (ДК + Лк) кислотами с последующим нагреванием до 150 °C в течение 16 часов. * — различия достоверны ($p < 0,05$, $n = 10$)

Fig. 3. Biodegradation of xerogels of denatured collagen (DC) and collagen treated with lactic (DC + La), tartaric (DC + Ta) and citric (DC + Ca) acids followed by heating to 150 °C for 16 hours. * — differences are significant ($p < 0.05$, $n = 10$)

На следующем этапе исследования оценивали биосовместимость ксерогелей при совместной инкубации с фибробластами человека. Через 24 часа культивирования клетки, инкубированные в стандартных условиях культивирования (контроль), приобретают веретеновидную форму, характерную для фибробластов (рис. 4A). Подобная трансформация происходит и с фибробластами, инкубированными с ДК, ДК + Мк и ДК + Вк (рис. 4B–D). Установлено, что внесение ксерогеля ДК + Лк ингибирует трансформацию фибробластов в нормальный фенотип (рис. 4E).

Анализ жизнеспособности фибробластов с использованием набора Calcein AM показал, что как в контроле (рис. 5A), так и при совместной инкубации с ксерогелями ДК (рис. 5B), ДК + Мк (рис. 5C), ДК + Вк (рис. 5D),

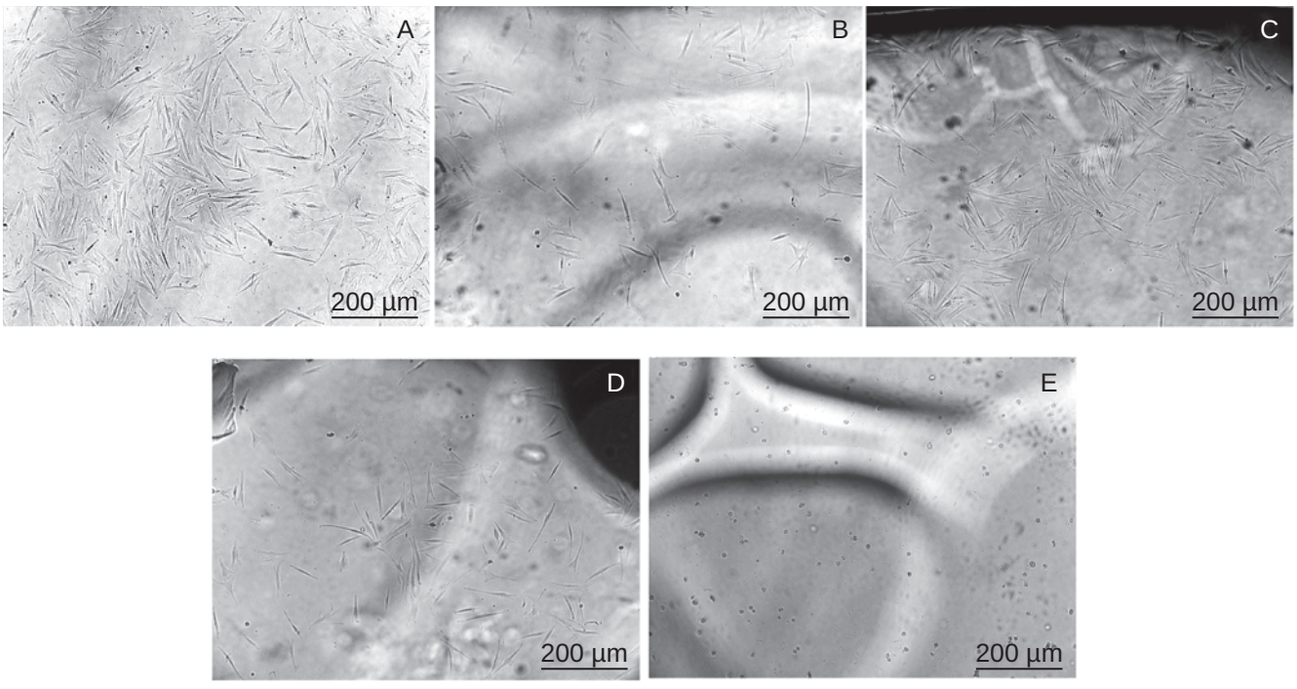

Рис. 4. Морфология фибробластов человека через 24 часа культивирования в стандартных условиях (A), при внесении в культуральную среду гидрогелей ДК (B), ДК + Мк (C), ДК + Вк (D) и ДК + Лк (E); увеличение ×50, размер шкалы 200 мкм, световая микроскопия

Fig. 4. Morphology of human fibroblasts after 24 hours of cultivation under standard conditions (A), with the addition of DK (B), DK + La (C), DK + Ta (D), and DK + Ca (E) hydrogels to the culture medium; magnification ×50, scale size 200 µm, light microscopy

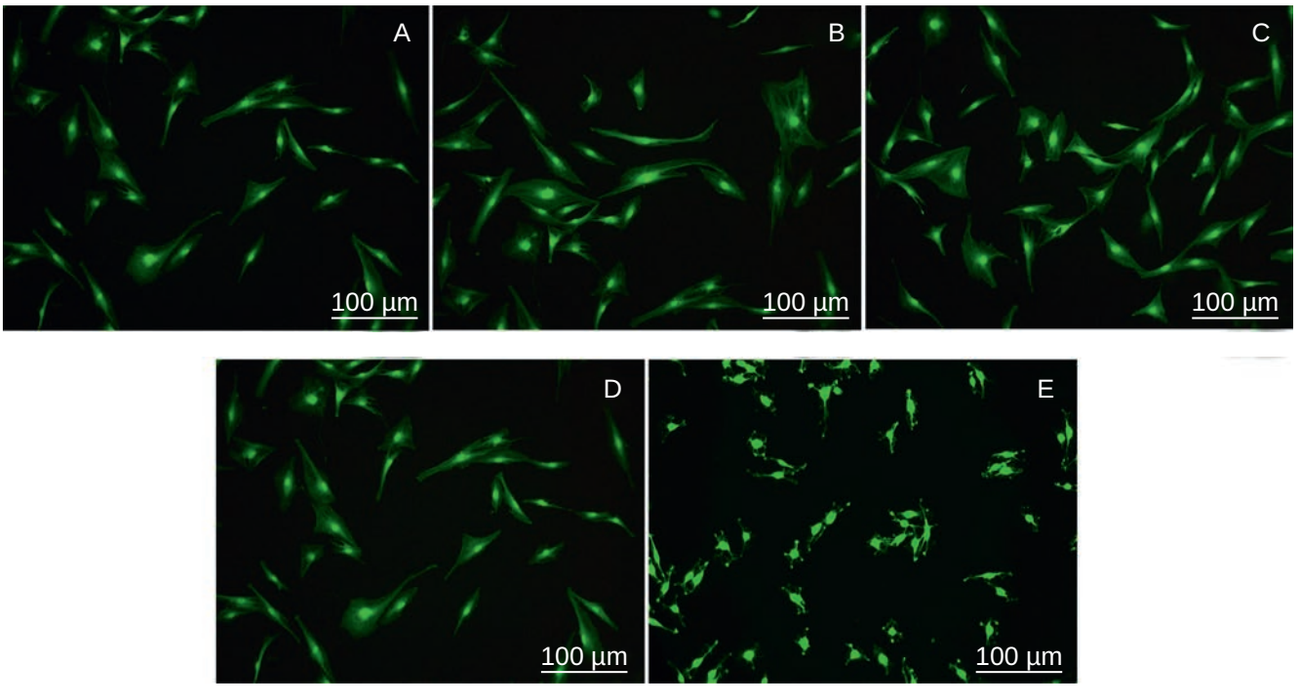

Рис. 5. Жизнеспособность фибробластов через 24 часа культивирования в стандартных условиях (A), при внесении в культуральную среду гидрогелей ДК (B), ДК + Мк (C), ДК + Вк (D) и ДК + Лк (E); увеличение ×100, размер шкалы 100 мкм, окрашивание Calcein AM

Fig. 5. Viability of fibroblasts after 24 hours of cultivation under standard conditions (A); with the addition of hydrogels DK (B), DK + La (C), DK + Ta (D) and DK + Ca (E) to the culture medium; magnification ×100, scale size 100 µm, stained with Calcein AM

а также при инкубации с ДК + Лк (рис. 5E) все клетки находятся в жизнеспособном состоянии. Таким образом, несмотря на задержку в клеточном росте, фибробласты, инкубированные совместно с ксерогелем, содержащим молочную кислоту, сохраняют жизнеспособность.

Таким образом, в проведенном исследовании оценивали возможность комплексного применения высокотемпературного воздействия и химической сшивки с использованием карбоновых кислот для создания биомиметических материалов медицинского назначения. Выявлено, что лимонная кислота, обладающая наибольшим количеством карбоксильных групп, усиливает механическую прочность ксерогеля независимо от продолжительности термического воздействия. Ксерогели, содержащие в своем составе карбоксильные кислоты, являются биодеградируемыми, при этом лимонная кислота повышает устойчивость ксерогеля к биодеградации. Полученные результаты по оценке биосовместимости ксерогелей из денатурированного коллагена, модифицированных карбоновыми кислотами, показывают, что внесение в состав молочной или винной кислот не оказывает влияние на рост и жизнеспособность фибробластов человека. В то же время ксерогели, содержащие в своем составе лимонную кислоту, ингибируют рост клеток, сохраняя при этом клетки в жизнеспособном состоянии.

Одним из основных факторов, ограничивающих применение коллагеновых гидрогелей в тканевой инженерии, являются его слабые механические свойства и высокая скорость биодеградации. В настоящее время ведется поиск методов повышения прочности и устойчивости коллагеновых гелей к биодеградации. Например, проводятся исследования по повышению прочности коллагеновых гидрогелей путем изменения кислотности [17], выравнивания микроструктуры матрицы коллагенового гидрогеля [18]. Сообщалось, что дозы облучения до 500 Гр увеличивают модуль упругости почти на 150 % [19]. С применением различных методов физического или химического воздействия удается увеличить напряжение разрушения до 16 кПа [20]. Включение в состав акрилатов и полиэтиленгликоля позволяет получить гидрогели прочностью до 140 кПа [21].

Таким образом, физико-химический метод стабилизации гидрогелевой матрицы, с использованием лимонной кислоты, позволяет получить ксерогель с механической прочностью и модулем продольной упругости, не уступающим по своим качествам гидрогелевым материалам, изготовленным с использованием сложных и дорогостоящих решений.

Микросреда, создаваемая ксерогелем, содержащим лимонную кислоту, не оказывает цитотоксического действия, но при этом препятствует росту и пролиферации фибробластов. Фибробласты — основные клетки, продуцирующие компоненты внеклеточного матрикса. При нормальных физиологических условиях фибробласты обеспечивают восстановление поврежденных тканей [22]. Однако при нарушениях в клеточном цикле и апоптозе фибробласты и миофибробласты могут вызывать прогрессирование фиброза, патологического состояния, характеризующегося чрезмерным отложением внеклеточного матрикса и рубцеванием тканей [23, 24]. Раскрытие способов регуляции функциональной активности фибробластов и деактивации фиброзных путей позволит разработать эффективные стратегии лечения поврежденных тканей с потенциальным риском фиброза.

В связи с этим изучение влияния ксерогелей, модифицированных трикарбоновыми кислотами, может быть перспективным направлением в области создания биоматериалов на немедикаментозной стимуляции регенерации тканей и профилактики образования келоидных рубцов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Создан ксерогель на основе денатурированного коллагена с высокими прочностными характеристиками. Подобраны параметры термической обработки и концентрации карбоновых кислот для стабилизации механических свойств гидрогеля. Выявлено, что внесение в гидрогель из гидролизата коллагена лимонной кислоты и последующая высокотемпературная обработка позволяют повысить механическую прочность ксерогеля и его устойчивость к биодеструкции. Результаты исследования *in vitro* показали, что полученный материал может стать перспективной платформой для применения как в качестве внеклеточного скаффолда, так и в качестве самостоятельного биоматериала для заполнения объема утраченной ткани в результате оперативного вмешательства или ранения.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Ерёмин Петр Серафимович, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела биомедицинских технологий, Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии Минздрава России.
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8832-8470

Рожкова Елена Анатольевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник отдела биомедицинских технологий, Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии Минздрава России.
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2440-9244

Марков Павел Александрович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела биомедицинских технологий, Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии Минздрава России.
E-mail: markovpa@nmicrk.ru, p.a.markov@mail.ru;
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4803-4803

Вклад авторов. Все авторы подтверждают свое авторство в соответствии с международными критериями ICMJE (все авторы внесли значительный вклад в концепцию, дизайн исследования и подготовку статьи, прочитали и одобрили окончательный вариант до публикации). Наибольший вклад распределен следующим образом: Ерёмин П.С. — анализ данных, верификация данных, написание черновика рукописи, проверка и редактирование рукописи; Рожкова Е.А. — проверка и редактирование рукописи,

руководство проектом; Марков П.А. — научное обоснование, методология, редактирование текста статьи, проверка и редактирование рукописи.

Источники финансирования. Данное исследование не было поддержано никакими внешними источниками финансирования.

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

Доступ к данным. Данные, подтверждающие выводы этого исследования, можно получить по обоснованному запросу у корреспондирующего автора.

ADDITIONAL INFORMATION

Petr S. Eremin, Researcher, Laboratory of Cellular Technologies, Department of Biomedical Technologies, National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology.
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8832-8470

Elena A. Rozhkova, D.Sc. (Biol.), Chief Researcher, Department of Biomedical Technologies, National Medical Research Center of Rehabilitation and Balneology.
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2440-9244

Pavel A. Markov, Ph.D. (Biol.), Leading Researcher, Department of Biomedical Technologies, National Medical Research Center of Rehabilitation and Balneology.
E-mail: markovpa@nmicrk.ru, p.a.markov@mail.ru;
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4803-4803

Author Contributions. All authors confirm their authorship according to the international ICMJE criteria (all authors contributed significantly to the conception, study design and preparation of the article, read and approved the final version before publication). Special contributions: Eremin P.S. — formal analysis, validation, writing — original draft, writing — review & editing; Rozhkova E.A. — writing — review & editing, supervision; Markov P.A. — conceptualization, methodology, writing — review & editing.

Funding. This study was not supported by any external funding sources.

Disclosure. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Data Access Statement. The data that support the findings of this study are available on reasonable request from the corresponding author.

Список литературы / References

1. Amadeh A., Mohebbi N., Amadeh Z., Jamshidbeigi A. Comparative Efficacy of Autolytic and Collagenase-Based Enzymatic Debridement in Chronic Wound Healing: A Comprehensive Systematic Review. Int Wound J. 2025; 22(4): e70177. https://doi.org/10.1111/iwj.70177
2. Марков П.А., Еремин П.С., Падерин Н.М. и др. Влияние биопластического материала на адгезию, рост и пролиферативную активность фибробластов человека в средах, имитирующих кислотность раневого ложа при остром и хроническом воспалении. Вестник восстановительной медицины. 2023; 22(2): 42–51. https://doi.org/10.38025/2078-1962-2023-22-2-42-51 [Markov P.A., Eremin P.S., Paderin N.M. et al. Effect of Bioplastic Material on Adhesion, Growth and Proliferative Activity of Human Fibroblasts when Incubated in Solutions Mimic the Acidity of Wound an Acute and Chronic Inflammation. Bulletin of Rehabilitation Medicine. 2023; 22(2): 42–51. https://doi.org/10.38025/2078-1962-2023-22-2-42-51 (In Russ.).]
3. Кудряшова И.С., Марков П.А., Костромина Е.Ю. и др. Разработка раневых покрытий для регенеративной медицины. Вестник восстановительной медицины. 2021; 20(6): 84–95. https://doi.org/10.38025/2078-1962-2021-20-6-84-95 [Kudryashova I.S., Markov P.A., Kostromina E.Yu. et al. Development of Wound Dressing for Regenerative Medicine. Bulletin of Rehabilitation Medicine. 2021; 20(6): 84–95. https://doi.org/10.38025/2078-1962-2021-20-6-84-95 (In Russ.).]
4. Le Corre-Bordes D., Hofman K., Hall B. Guide to electrospinning denatured whole chain collagen from hoki fish using benign solvents. Int J Biol Macromol. 2018; 112: 1289–1299. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.088
5. Ratnatilaka Na Bhuket P., Li Y., Yu S.M. From Collagen Mimetics to Collagen Hybridization and Back. Acc Chem Res. 2024; 57(12): 1649–1657. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.3c00772
6. Patil V.A., Masters K.S. Engineered Collagen Matrices. Bioengineering (Basel). 2020; 7(4): 163. https://doi.org/10.3390/bioengineering7040163
7. Islam M.M., AbuSamra D.B., Chivu A., et al. Optimization of Collagen Chemical Crosslinking to Restore Biocompatibility of Tissue-Engineered Scaffolds. Pharmaceutics. 2021; 13(6): 832. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060832
8. Cumming M.H., Leonard A.R., LeCorre-Bordes D.S., Hofman K. Intra-fibrillar citric acid crosslinking of marine collagen electrospun nanofibres. Int J Biol Macromol. 2018; 114: 874–881. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.180
9. Jayachandran B., Parvin T.N., Alam M.M., et al. Insights on Chemical Crosslinking Strategies for Proteins. Molecules. 2022; 27(23): 8124. https://doi.org/10.3390/molecules27238124
10. Xu H., Sh. Li, Xu L., Yang Y. Low-temperature crosslinking of proteins using non-toxic citric acid in neutral aqueous medium: Mechanism and kinetic study. Industrial Crops and Products. 2015; 74: 234–240. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.010
11. Singh P., Baisthakur P., Yemul O.S. Synthesis, characterization and application of crosslinked alginate as green packaging material. Heliyon. 2020; 6(1): e03026. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03026
12. Shao Z., Shen D., Fan F., et al. Facile synthesis of chitosan-tartaric acid biosorbents for removal of Cu(II) and Cd(II) from water and tea beverages. Int J Biol Macromol. 2023; 241: 124533. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124533
13. Lu Y., Liu J., Ren B., et al. Room-temperature gelcasting of alumina with tartaric acid and glutaraldehyde. Ceramics International. 2020; 46(8): 11432–11435. https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.01.119
14. Tan T., Zhou J., Gao X., et al. Synthesis, characterization and water-absorption behavior of tartaric acid-modified cellulose gel fromcorn stalk pith. Industrial Crops and Products. 2021; 169: 113641. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113641
15. Zan J., Qian G., Deng F., et al. Dilemma and breakthrough of biodegradable poly-l-lactic acid in bone tissue repair. Journal of Materials Research and Technology. 2022; 17: 2369–2387. https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2022.01.164
16. Salihu R., Abd Razak S.I., Zawawi N.A., et al. Citric acid: A green cross-linker of biomaterials for biomedical applications. European Polymer Journal. 2021; 146: 110271. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110271
17. Antoine E.E., Vlachos P.P., Rylander M.N. Tunable collagen I hydrogels for engineered physiological tissue micro-environments. PLoS One. 2015; 10(3): e0122500. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122500

18. Antman-Passig M., Levy S., Gartenberg C., et al. Mechanically Oriented 3D Collagen Hydrogel for Directing Neurite Growth. Tissue Eng Part A. 2017; 23(9–10): 403–414. https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2016.0185
19. Landfeld A., Houška M., Skočilas J., et al. The Effect of Irradiation on Rheological and Electrical Properties of Collagen. Applied Rheology. 2016; 26(4): 35–41. https://doi.org/10.3933/applrheol-26-43775
20. Sarrigiannidis S.O., Rey J.M., Dobre O., et al. Salmeron-Sanchez M. A tough act to follow: collagen hydrogel modifications to improve mechanical and growth factor loading capabilities. Mater Today Bio. 2021; 10: 100098. https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2021.100098
21. Cosgriff-Hernandez E., Hahn M.S., Russell B. et al. Bioactive hydrogels based on Designer Collagens. Acta Biomater. 2010; 6(10): 3969–3977. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.05.002
22. Tracy L.E., Minasian R.A., Caterson E.J. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. Adv Wound Care (New Rochelle). 2016; 5(3): 119–136. https://doi.org/10.1089/wound.2014.0561
23. Lin H., Wang X., Chung M., Cai S., Pan Y. Direct fibroblast reprogramming: an emerging strategy for treating organic fibrosis. J Transl Med. 2025; 23(1): 240. https://doi.org/10.1186/s12967-024-06060-3
24. Mishra T., Wairkar S. Pathogenesis, attenuation, and treatment strategies for keloid management. Tissue Cell. 2025; 94: 102800. https://doi.org/10.1016/j.tice.2025.102800