

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ КОЛЛАГЕНА ИЗ ТЕЛЯЧЬЕЙ ШКУРЫ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ И КЛЕТОЧНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

© Л. В. Кухарева,¹ И. И. Шамолина,² Е. В. Полевая¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ² Лаборатория экологической химии и биотехнологии С.-Петербургского государственного университета технологии и дизайна;

¹ электронный адрес: kochka-0734@mail.ru

Проведено сравнение семи методов получения цельного коллагена с телопептидами для применения в клеточном культивировании и тканевой инженерии. Коллаген получали из предварительно обезвоженной телячьей шкуры с применением протеазы из *Bacillus licheniformis*. Из измельченной дермы вначале извлекали различными растворами неколлагеновые белки и протеогликанов, а затем экстрагировали коллаген кислыми растворителями. Следили за динамикой извлечения неколлагеновых белков и кислых протеогликанов, анализируя промывные экстракты на белки и гексуроновые кислоты. Контролировали гелеобразующую способность полученных коллагенов. Чистоту продукта проверяли по результатам электрофореза в полиакриламидном геле и по действию на смешанную культуру фибробластов и кардиомиоцитов новорожденных крыс. Ни один из полученных коллагенов не оказался цитотоксичным, но наилучшим по выходу продукта и действию его на клетки оказался способ получения, в котором предварительную отмывку производили 0.02 М Na₂PO₄, а экстракцию коллагена — 0.5 М уксусной кислотой с добавкой 5 мМ ЭДТА. Таким образом, разработан оптимальный метод получения из телячьей шкуры цельного коллагена для применения в клеточном культивировании и тканевой инженерии. На основании разработанной рецептуры авторами получен патент РФ.

К л ю ч е в ы е с л о в а: тканевая инженерия, коллаген, получение коллагена, фибриллярная структура коллагена, клетки в коллагеновых гелях.

Тканевая инженерия — бурно развивающаяся отрасль медицины, заключающаяся в лечении различных патологий введением в место поражения живых ауто- или аллогенных клеток на поверхности или внутри какого-либо носителя, которым чаще всего являются белки внеклеточного матрикса и среди них прежде всего коллаген.

Коллаген — фибриллярный белок, являющийся основной соединительной тканью и составляющий 30 % всех белков организма млекопитающих (Истранов, Бондарева, 1969). Коллаген имеет уникальный аминокислотный состав — 33 % глицина и около 20 % аминокислот пролина и оксипролина; молекула его состоит из трех полипептидных цепей, свернутых в тройную, так называемую коллагеновую спираль, имеющую в растворе жесткую, практически палочкообразную структуру (Engel, Vachinger, 2005). Сейчас известно 27 генетически различных типов коллагена (Ricard-Blum et al., 2005). У млекопитающих 95 % приходится на коллаген I типа (Истранов, Бондарева, 1969), который главным образом и используется в тканевой инженерии. В дальнейшем под названием коллаген будет подразумеваться коллаген I типа. *In vivo* или *in vitro* в физиологических условиях (ионной силе, pH и температуре) и при достаточной концентрации палочкообразные молекулы агрегируют боковыми поверхностями с определенным сдвигом, образуя фибриллы с правильной специфической структурой, одинаковой для образованных *in vivo* и *in vitro* фибрилл (Birk, Bruckner, 2005). При этом из фибрилл образуются гель-осадки, в которые можно вклю-

чить клетки (Bell et al., 1979), и практически все клетки организма прекрасно себя чувствуют в этих гелях, перестраивают их и размножаются в них, что и является основой так называемых тканевых эквивалентов и в большой степени всей тканевой инженерии (Bell, 2000). По краям тройной спирали коллагена находятся небольшие неколлагеновые последовательности, так называемые телопептиды, содержащие лизин и аргинин, участвующие в образовании межмолекулярных сшивок, обеспечивающих прочность фибриллы и коллагеновых гелей (Eyre, Wu, 2005).

Широкому медицинскому и биотехнологическому применению коллагена способствует его слабая (благодаря уникальному и почти одинаковому для всех организмов аминокислотному составу) иммуногенность (Chvapil et al., 1973); при подкожном введении коллаген практически не вызывает иммунного ответа (De Lusto et al., 1986). Часто иммуногенность коллагеновых препаратов объясняется примесью неколлагеновых белков (Timpl, 1982), и поэтому необходима очень тщательная очистка коллагена для тканевой инженерии.

Коллаген для технологических, медицинских и иных целей получают экстракцией его из богатых им тканей, обычно кожи или сухожилий. Наиболее распространены три способа экстракции коллагена: экстракция кислыми растворителями после предварительного удаления примесей (неколлагеновых белков и кислых протеогликанов), ферментативная и щелочно-солевая экстракции (Истранов, Бондарева, 1969).

Кислая экстракция дает нативную, т. е. трехспиральную, молекулу коллагена с неповрежденными телопептидами, образующую прочные гели. Ферментативная экстракция производится протеазами пепсином, трипсином, проназой, действие которых не затрагивает тройную спираль, а только неколлагеновые домены и неколлагеновые белки; она дает нативную молекулу коллагена с поврежденными или отсутствующими телопептидами, образующую непрочные гели; для образования достаточно прочных гелей требуются концентрации такого коллагена 30—40 мг/мл.

Щелочно-солевая экстракция (обработка коллагена щелочью в присутствии насыщенного раствора сернокислого натрия и затем экстракция кислотой) дает высокий выход растворимого коллагена с сохраненной тройной спиралью, но с дезамидированием аспарагиновых и глутаминовых остатков до соответствующих кислот, вследствие чего распределение зарядов вдоль трехспиральной молекулы коллагена нарушается и коллаген теряет способность к фибриллообразованию; следовательно, такой коллаген не образует гелей.

Для биотехнологического и тканеинженерного использования годится, таким образом, только коллаген кислой экстракции. Задачей данной работы являлось сравнение ряда методик получения коллагена кислой экстракцией с различной предварительной обработкой для извлечения неколлагеновых белков и кислых протеогликанов. Цель — выбрать методику, оптимальную по выходу и качеству продукта.

Удобным сырьем для получения коллагена являются шкуры и сухожилия животных, состоящие в основном из коллагена I (в сухих сухожилиях его 85 %, в сухих шкурах — от 60 до 80 %) (Истранов, Бондарева, 1969). Сухожилие крысиного хвоста является наиболее распространенным источником коллагена при его лабораторном получении (Chandrakasan et al., 1976). Кислой экстракцией можно извлечь коллаген только из шкур молодых животных, так что оптимальным сырьем являются телячьи шкуры. При использовании шкур животных первой стадией обработки является обезволивание — ослабление связи волоса со шкурой и удаление волос и эпидермиса. В отечественной кожевенной промышленности применяли преимущественно восстановительное или ферментативное обезволивание (Шестакова и др., 1990). Ферментативное обезволивание является наиболее мягким. Нами разработан мягкий, но достаточно эффективный способ ферментативного обезволивания телячьих шкур с использованием протеазы *Bacillus licheniformis* (Шамолина и др., 2008), которой мы и воспользовались. Сравнив различные существующие методы кислой экстракции коллагена из телячьих шкур, мы предложили свою оптимальную методику.

Материал и методика

Использовали шкуру телят в возрасте нескольких месяцев, полученную с Лужского мясокомбината. Привезенную с комбината охлажденную шкуру разрезали на небольшие куски и хранили при $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Для обезволивания использовали щелочную протеазу из *B. licheniformis*, полученную из культуральной жидкости после ультрафильтрации, оптимум ферментативной активности при pH 8.0. Фермент был любезно предоставлен проф. А. П. Сеницыным (кафедра инженерной энзимологии МГУ им. М. В. Ломоносова).

При кислой экстракции коллагенов использовали соли и кислоты отечественного производства квалификации не ниже х. ч.; рис, ордин и Coomassie Brilliant Blue G от фирмы Sigma (США). Все растворы готовили на деионизованной воде, очищенной на установке Super Q; такая вода используется для приготовления сред для клеточного культивирования. Все процедуры проводили в холодной комнате при $4\text{--}7\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Методика обезволивания. Размороженную телячью шкуру отмывали холодной дистиллированной водой от крови, срезали рыхлую соединительную ткань, отжимали и взвешивали. Шкуру разрезали на кусочки площадью $10\text{--}15\text{ см}^2$, погружали в раствор 0.125 % по массе от массы шкуры обезволивающего фермента в 0.1 М растворе Триса, pH 8.0, в концентрации 0.5 мг/мл и оставляли в холодной комнате до завершения процесса, т. е. до момента легкого снятия волоса пинцетом (в среднем на 48 ч). Каждый день раствор 2—3 раза перемешивали стеклянной палочкой. После окончания обезволивания волос снимали пинцетом и дерму отмывали от фермента 30 раз в $100\text{--}200\text{ мл}$ вначале дистиллированной, затем деионизованной воды и отжимали. После обезволивания и промывки дерму грубо измельчали, гомогенизировали в воде, отжимали в марле, делили на семь порций (по 12 г) и каждую обрабатывали по отдельной методике.

Экстракция коллагена. Методика 1 (Gallop, Seifter, 1963). Измельченную дерму экстрагировали 6 раз по 18 ч при постоянном встряхивании 10-кратным объемом 0.5 М уксуснокислого натрия. После каждой экстракции осадок отделяли центрифугированием при 4000 об/мин в течение 40 мин, объем супернатанта измеряли и определяли в нем содержание неколлагеновых белков и гексуроновых кислот, а осадок гомогенизировали в следующей порции ацетата натрия и продолжали встряхивание. После этого осадок диализовали против воды (три перемены) для удаления ацетата натрия. Затем коллаген 6 раз экстрагировали таким же образом 0.075 М цитратным буфером, pH 3.7; экстракты объединяли и диализовали против большого объема 0.02 М Na_2HPO_4 , сменив раствор не менее 4 раз. Осадок растворяли в 0.5 М уксусной кислоте и осаждали 0.9 М NaCl, затем осадок промывали 0.95 М NaCl на 0.5 М уксусной кислоте, диализовали против воды для удаления NaCl, растворяли в 0.5 М уксусной кислоте и стерилизовали диализом против 0.5 М уксусной кислоты с 0.5 % хлороформа, после чего переводили в 0.017 М уксусную кислоту диализом против 0.1 М уксусной кислоты и двумя диализами против 0.017 М (1 : 1000) уксусной кислоты. Коллаген стерильно разливали и хранили в холодильнике для последующей проверки действия его на клетки.

Методика 2 (Highberger, Whitmore, 1960). Дерму 6 раз экстрагировали 10%-ным незабуференным раствором NaCl, диализовали против воды и извлекали коллаген таким же цитратным буфером, как в методике 1. Дальнейшую обработку вели так же, по методике 1.

Методика 3 (Dumitru, Garrett, 1957). Экстракцию неколлагеновых белков вели 0.5 М NaH_2PO_4 , экстракцию коллагена — 0.5 М уксусной кислотой, содержащей 5 мМ ЭДТА. Коллаген вначале осаждали из уксуснокислого раствора 0.9 М NaCl, затем 2 раза диализовали против воды для удаления NaCl, растворяли осадок в 0.5 М уксусной кислоте и диализовали раствор против 0.02 М Na_2HPO_4 . Осадок растворяли в 0.5 М уксусной кислоте и стерилизовали, как указано выше.

Методика 4 (Gross et al., 1955). Экстракцию неколлагеновых белков вели 0.3 М Na_2HPO_4 , экстракцию коллагена — 0.5 М уксусной кислотой, содержащей 5 мМ ЭДТА. Дальнейшая обработка — по методике 3.

Методика 5 (Kemp et al., 1992). Экстракцию неколлагеновых белков вели физиологическим буферным раствором (0.003 М KCl , 0.0015 М KH_2PO_4 , 0.137 М NaCl , 0.056 М Na_2HPO_4 , pH 7.4), разбавленным водой 1 : 2; экстракцию коллагена — 0.5 М уксусной кислотой, содержащей 5 мМ ЭДТА. Дальнейшая обработка, как по методике 3.

Методика 6 (предлагаемая рецептура). Экстракцию неколлагеновых белков вели 0.02 М Na_2HPO_4 , экстракцию коллагена и дальнейшую обработку — по методике 3.

Методика 7 (щелочно-солевой коллаген) (Истранов, Бондарева, 1969). Измельченную дерму обрабатывали 10-кратным количеством раствора, содержащего 3 М NaOH и 1 М Na_2SO_4 , в течение 2 сут, затем отделяли центрифугированием осадок белка (он всплывает наверх), суспендировали его в 5-кратном количестве 1 М Na_2SO_4 , нейтрализовали HCl до pH 6—7 при охлаждении льдом и диализовали смесь против воды до отсутствия иона SO_4^- во внешнем растворе. Полученную суспензию доводили ледяной уксусной кислотой до концентрации 0.5 М и осаждали коллаген твердым NaCl до концентрации 0.9 М. Осадок диализовали против воды для удаления NaCl (три перемены), растворяли в 0.5 М уксусной кислоте и еще раз таким же образом пересаждали NaCl . NaCl снова удаляли диализом, растворяли коллаген в 0.5 М уксусной кислоте и стерилизовали, как указано выше.

Анализы промывных супернатантов и полученных коллагенов. Содержание неколлагеновых белков в промывных растворах определяли по одной из модификаций метода Бредфорд (определение интенсивности окраски белка красителем Кумасси G-250) (Досон и др., 1991); коллаген по этой методике окраски не дает и не мешает определению неколлагеновых белков. Содержание кислых полисахаридов определяли по содержанию гексуроновых кислот, которые в свою очередь определяли орциновым методом; калибровку производили по глюконовой кислоте (Слуцкий, 1969). В качестве контроля везде брали соответствующий буфер. Концентрацию коллагена в растворе конечного продукта определяли по одной из модификаций метода Лоури (Дарбре, 1989); калибровку производили по образцовому коллагену, полученному из сухожилий крысиного хвоста (Chandrakasan et al., 1976), концентрация которого предварительно была определена сжиганием на оксипролин. Чистоту полученных коллагенов проверяли электрофорезом в полиакриламидном геле с 4 М мочевиной по методу, позволяющему разделить и увидеть примеси как неколлагеновых белков, так и коллагенов других типов, если они присутствуют в образце (Lillie et al., 1987).

Проверка коллагенов на гелеобразование. Гели готовили по методу Белл и соавторов (Bell et al., 1979). Растворы коллагенов в количестве около 1 г разбавляли во льду деионизованной водой и 10-кратным физиологическим буферным раствором (PBS) до общей концентрации коллагена 2 мг/мл, так чтобы объем буферного раствора составлял 1/10 от общего объема, перемешивали палочкой и нейтрализовали 1.5 М NaOH (контролировали по цвету фенолового красного), затем помещали на 20 мин в термостат при 37 °С. Образовавшийся гель без затруднений извлекали целиком из сосуда.

Оценку качества полученных коллагенов как матриц для клеточного культивирования проводили на смешанной культуре кардиомиоцитов и фибробластов из сердец новорожденных (2—5 сут) крысят. Культуры клеток были получены по методу Моисеевой с сотрудниками (1998). Культивирование клеток вели на коллагеновых гелях (1 мг/мл); смесь для образования геля намазывали на культуральную чашку, выдерживали при 37 °С в течение 20 мин, затем 1 ч в PBS, ополаскивали средой и сеяли клетки. Щелочно-солевой коллаген, не образующий геля (методика 7) наносили в качестве покрытия. Далее за культурами клеток наблюдали, используя инвертированный микроскоп. Наблюдение продолжали в течение 2 нед. Были проведены 2 серии опытов.

Результаты и обсуждение

Коллаген кожи впервые был растворен Ореховичем и Шпикитером (1962) в кислом цитратном буфере. С тех пор были предложены различные модификации рецептуры растворения коллагена в кислых буферных растворах. Коллаген извлекают из богатых им тканей, в основном сухожилий и кожи, а так как там помимо коллагена содержатся и другие компоненты, в основном неколлагеновые белки, эластин и кислые протеогликаны, требуется их отделение от коллагена. Наиболее известен и чаще всего употребляется метод, при котором неколлагеновые белки и кислые протеогликаны экстрагируются 0.5 М уксуснокислым натрием, а сам коллаген после этого — кислым цитратным буфером, который благодаря хелатному действию цитрата нейтрализует кальций, могущий помешать растворению коллагена (Gallop, Seifter, 1963). В другой методике примеси экстрагировали 10%-ным (1.7 М) незабуференным NaCl , а коллаген 0.1 М — кислым фосфат-цитратным буфером или разбавленной уксусной кислотой (Highberger, Whitmore, 1960). При этом авторы сообщают, что при очень тщательном измельчении материала и многократной экстракции им удалось перевести в раствор или в состояние вязкой суспензии практически весь коллаген телячьей кожи. После обработки 0.5 М NaN_2PO_4 (Dumitru, Garrett, 1957) удалось полностью растворить в воде сухожилие крысиного хвоста. При рассмотрении действия различных фосфатных буферов и растворов NaCl на измельченную телячью дерму (Gross et al., 1955) 0.45 М фосфатный буфер, pH 8.0, извлекал из раствора больше всего белков при сравнительно небольшом количестве извлеченного коллагена. Наконец, при получении коллагена из сухожилий сгибателей копыт крупного рогатого скота применяли предварительную экстракцию примесей физиологическим раствором PBS, разбавленным водой 1 : 2 (суммарная ионная сила 0.052 М, pH 7.6—8.5) и после этого экстракцию коллагена 0.5 М уксусной кислотой (Kemp et al., 1992); авторы сообщают, что выход коллагена из телячьей кожи составляет 2.3 % от массы сырой дермы. При получении биотехнологического коллагена из кожи зародышей свиней (Fofonoff, Bell, 1991) кожу также предварительно обрабатывали PBS, разведенным 1 : 2.

Мы решили проверить все упомянутые методы получения коллагена, учитывая выход и качество получаемого продукта. Мы также решили попытаться осуществить предварительную промывку дермы щелочным буфером низкой ионной силы — 0.02 М Na_2HPO_4 , применяемым

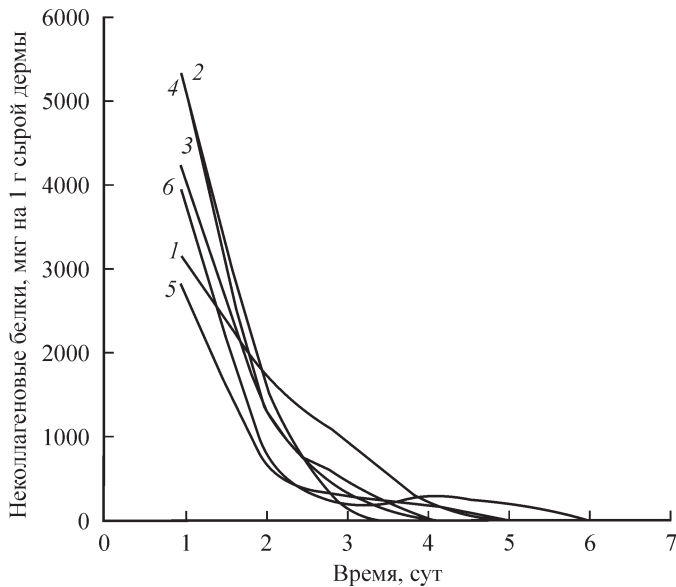


Рис. 1. Динамика экстракции из дермы неколлагеновых белков. Номера кривых соответствуют номерам использованных методик обработки (1—6) (см. раздел «Материал и методика»).

для осаждения фибриллярного коллагена диализом. Коллаген растворять он не должен, а pH 9.5 предполагает возможность хотя бы частичного удаления неколлагеновых белков и кислых протеогликанов. Для экстракции коллагена мы применили, как обычно, 0.5 М уксусную кислоту с добавкой ЭДТА.

На рис. 1 и 2 показана динамика экстракции неколлагеновых белков и кислых протеогликанов (по гексуроновым кислотам), в таблице — суммарное количество извлеченных примесей и выход конечного продукта. Видно, что лучше всего извлечение примесей и по динамике, и по общему их количеству происходит при использовании методики 4 — при обработке 0.5 М Na_2HPO_4 . Суммарно примеси лучше всего извлекаются с помощью методик 3 и 4 — при экстракции достаточно концентрированными растворами фосфатов. Остальные методики не слишком различаются по общему количеству извлеченных неколлагеновых белков, но по количеству извлеченных гексуроновых кислот методики 5 и 6, по которым обработка велась растворами сравнительно низкой ионной силы, сильно отстают. По выходу продукта выигрывают методики 3, 4 и 6, причем методика 6, предложенная нами, лучше всех по выходу коллагена. Мы считаем, что это объясняется разрыхлением структуры дермы в растворе низкой ионной силы — 0.02 М и щелочного pH. Полученные данные по выходу коллагенов носят сравнительный характер; аб-

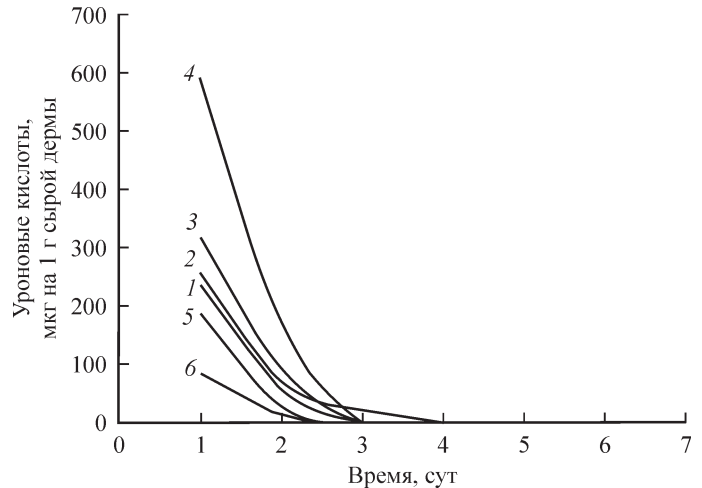


Рис. 2. Динамика экстракции из дермы протеогликанов (гексуроновых кислот). Номера кривых соответствуют номерам использованных методик обработки (1—6) (см. раздел «Материал и методика»).

солютные цифры могут, по-видимому, меняться в зависимости от интенсивности диспергирования ткани.

Чистоту полученного коллагена проверяли электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии 4 М мочевины (Lillie et al., 1987). На рис. 3 приведены электрофореграммы для всех полученных вариантов коллагена; в качестве контроля (К) использован чистый коллаген I типа, полученный из сухожилий крысиного хвоста по известной методике (Chandrakasan et al., 1976). Видно, что все варианты коллагенов идентичны, кроме варианта 7 (щелочно-солевого), и содержат только α -, β - и γ -цепи коллагена I типа, а других типов коллагена и неколлагеновых белков нет. В варианте 7 все полосы расположены выше, по-видимому вследствие изменения общего заряда и гидрофобности молекулы при дезамидировании при действии щелочи; это отмечалось и ранее (Hattori et al., 1999). Таким образом, посторонних белковых примесей и коллагенов других типов полученные коллагены не содержат. Разница между вариантами в количестве извлеченных неколлагеновых примесей, по-видимому, нивелируется в процессе дальнейшей очистки коллагена.

Проба на желирование, как и следовало ожидать, показала, что хорошо желируют все коллагены, кроме щелочно-солевого; он и не должен желировать, так как вследствие изменения распределения зарядов вдоль тройной спирали коллагена не образуется фибрилл нативного типа (Hattori et al., 1999).

Полученные коллагены тестировали по их способности поддерживать функциональную активность кардио-

Предварительная экстракция примесей из дермы и выход конечного продукта (коллагена)

Продукты	Методика выделения						
	1	2	3	4	5	6	7
Неколлагеновые белки, мкг на 1 г сырой дермы	6300	6900	6400	7100	6300	5700	
Гексуроновые кислоты, мкг на 1 г сырой дермы	290	340	400	750	110	100	
Коллаген, % от массы сырой дермы	1.5	1.15	3.56	4.1	0.93	5.97	11

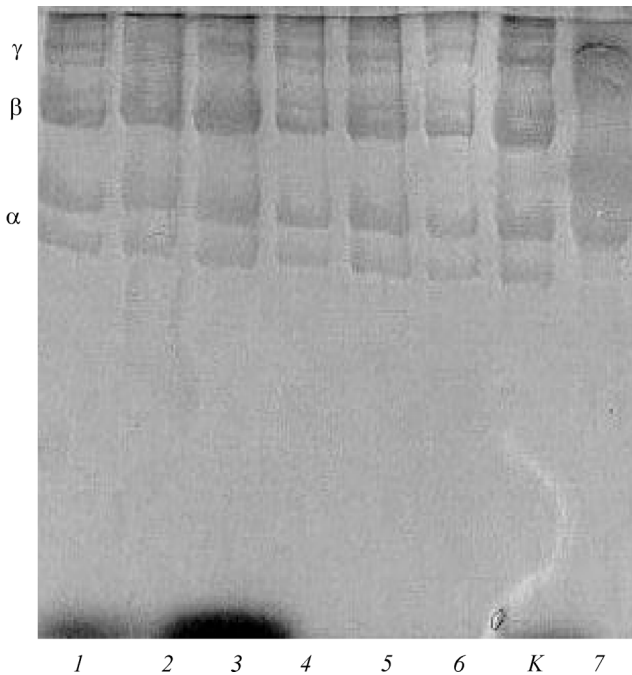


Рис. 3. Электрофореграмма коллагенов, полученных с помощью различных методик (1—7).

К — контроль; α, β, γ — субъединицы коллагена I.

миоцитов в смешанной культуре кардиомиоцитов и фибробластов, полученных из сердец новорожденных (2—5 сут) крыс (Моисеева и др., 1998). Тест основан на способности кардиомиоцитов в условиях культивирования образовывать колонии; колонии различаются по размеру, количеству, скорости образования и характеру сокращения (синхронное и асинхронное). При последующем культивировании колонии способны объединяться в единую сократительную сеть. Критериями возможности использования коллагенов при культивировании клеток является их способность обеспечивать: 1) адгезию, 2) распластывание, 3) перемещение клеток по субстрату, 4) образование и сокращение колоний. В результате тестирования были получены следующие результаты.

Методика 1 и 2. Адгезия клеток на 4-е сут невелика, много неосевших клеток. На 7-е сут редкие несокращающиеся колонии и небольшие участки клеточного монослоя.

Методика 3. Редкие несокращающиеся колонии на 4-е сут, на 7-е сут число колоний увеличивается; сокращающихся колоний очень мало.

Методика 4. На 4-е сут адгезия клеток невелика, но через 7 сут отмечается образование нескольких сокращающихся колоний, разделенных монослойными участками из фибробластов.

Методика 5. Адгезия клеток на 4-е сут средняя, на 7-е сут на геле из коллагена, полученного по этой методике, отмечаются одиночные сокращающиеся колонии и одна огромная монослойная колония кардиомиоцитов, в пределах которой клетки сокращаются асинхронно (подрагивают).

Методика 6. На 4-е сут отмечается образование колоний, на 7-е сут многие колонии сокращаются. Колонии объединяются между собой, наблюдается синхронное сокращение колоний.

Методика 7 (покрытие). На 4-е сут почти вся поверхность покрытия занята клетками (адгезия высокая,

многочисленные монослойные участки). На 7-е сут практически все поле покрыто сплошным монослоем клеток. Колонии редкие, сокращающиеся.

Таким образом, все полученные коллагены оказались нетоксичными для клеток и адгезивными, хотя и в разной степени. Наилучшими следует признать варианты 5, 7 и 6; в варианте 6 наблюдалось даже синхронное сокращение кардиомиоцитов. Варианты 6 и 7 были проверены вторично; для сравнения был проверен образцовый коллаген, полученный из сухожилий крысиного хвоста (по методике: Chandrakasan et al., 1976), о котором известно, что он благоприятен для большинства клеток (Grinnell, 1982). На 2-е сут везде было много адгезированных клеток и были распластанные. На 5-е сут везде наблюдали синхронно сокращающиеся колонии с характерными структурами из слившихся кардиомиоцитов, соединенных тяжами. Варианты 6 и 7, таким образом, найдены идеально подходящими для клеточного культивирования, первый в качестве геля, т. е. структурообразующего носителя, второй — в качестве покрытия.

Таким образом, нами проверен ряд способов получения коллагена из телячьей кожи с предварительным ферментативным обезвоживанием по выходу и качеству конечного продукта и его пригодности для использования в тканевой инженерии и клеточном культивировании. Наилучшим оказался метод, в котором используются 0.02 М Na_2HPO_4 для предварительного удаления примесей и 0.5 М уксусная кислота с добавкой 5 мМ ЭДТА для экстракции коллагена. На основании этой рецептуры нами получен патент (Кухарева и др., 2003) на получение коллагена тканеинженерного и медицинского применения.

Список литературы

- Дарбре А. (Ред.). 1989. Практическая химия белка. М.: Мир. 621 с.
- Досон Р. и др. (Ред.). 1991. Справочник биохимика. М.: Мир. 543 с.
- Истранов Л. П., Бондарева Л. Н. 1969. Использование коллагенсодержащего сырья для медицинских и микробиологических целей. Лекарства, средства, экономика, технология и перспективы получения. 4 : 1—43.
- Кухарева Л. В., Парамонов Б. А., Шамолина И. И., Семенова Е. Г. 2003. Способ получения коллагена для лечения патологий тканей организма. Патент Российской Федерации № 2214827.
- Моисеева О. М., Семенова Е. Г., Полевая Е. В., Селиванова Т. В., Власова Т. Д., Хирманов В. Н., Пинаев Г. П. 1998. Моделирование гипертрофии миокарда *in vitro* для решения вопросов медикаментозной коррекции. Цитология. 40 (12) : 1025—1030.
- Орехович В. Н., Шпикитер В. О. 1962. Биологическое значение, свойства и строение растворимых коллагеновых белков (проколлагенов). М.: Изд-во АН СССР. 29 с.
- Слуцкий Л. И. 1969. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. Л.: Медицина. 375 с.
- Шамолина И. И., Кухарева Л. В., Полевая Е. В., Цурикова Н. В. 2008. Обезволашивание телячьих шкур с целью получения из них коллагена биотехнологического назначения. Изв. вузов. Технология легкой промышленности. 1 (1) : 86—89.
- Шестакова И. С., Моисеева Л. В., Миронова Т. Ф. 1990. Ферменты в кожевенном и меховом производстве. М.: Легпромбытиздат. 275 с.
- Bell E. 2000. Organotypic and hystotypic models of engineered tissues. In: Principles of tissue engineering. San-Diego: Academic. Press. 181—193.
- Bell E., Ivarsson B., Merrill C. 1979. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts

of different proliferative potential *in vitro*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 76 : 1274—1278.

Birk D. E., Bruckner P. 2005. Collagen suprastructures. Top. Curr. Chem. 247 : 185—205.

Chandrakasan G., Torchia D. A., Piez K. A. 1976. Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution. J. Biol. Chem. 251 : 6062—6067.

Chvapil M., Kronental R. I., van Winkle W. 1973. Medical and surgical applications of collagen. Int. Rev. Connect. Tis. Res. 6 : 1—60.

De Lusto F., Smith S. T., Sundsmo J., Nguyen M. A., McPherson G. M. 1986. Reaction to injectable collagen: results in animal models and clinical use. Plastic and Reconstruction Surgery. 79 : 581—592.

Dumitru E. T., Garrett R. R. 1957. Solubilization of rat tail tendon collagen. Arch. Biochem. Biophys. 66 : 245—247.

Engel J., Bachinger H. P. 2005. Structure, stability and folding of the collagen triple helix. Top. Curr. Chem. 247 : 7—33.

Eyre D. R., Wu J. J. 2005. Collagen cross-links. Top. Curr. Chem. 247 : 207—209.

Fofonoff T. W., Bell E. 1991. Apparatus and method for spinning and processing collagen fibers. USA pat. № 5562946.

Gallop P. M., Seifter S. 1963. Preparation and properties of soluble collagens. Meth. Enzymol. 6 : 635—641.

Grinnell F. 1982. Cell-collagen interactions. Meth. Enzymol. 82 : 499—508.

Hattori S., Adachi E., Ebihara T., Shirai T., Someki I., Irie S. 1999. Alkali-treated collagen retained the triple-helical conformation and the ligand activity for the cell adhesion via $\alpha_2\beta_1$ integrin. J. Biochem. 125 : 676—684.

Highberger J. A., Whitmore R. A. 1960. Collagen fiber masses and methods of making the same. USA pat. no. 2934446.

Kemp P. D., Falco L., Regan K., Bell E. 1992. Collagen compositions and methods for preparation thereof. USA pat. № 5106949.

Lillie J. H., Wootton J. A. M., McCallum D. K., McKelvey S. W., Minor R. R. 1987. Electrophoretic isolation and peptide mapping of collagen types with microsamples of tissue. Meth. Enzymol. 145 : 171—183.

Ricard-Blum S., Ruggiero F., van der Rest M. 2005. The collagen superfamily. Top. Curr. Chem. 247 : 35—4.

Timpl R. 1982. Antibodies to collagen and procollagen. Meth. Enzymol. 82 : 482—98.

Поступила 18 II 2010

METHOD OF PREPARATION OF TISSUE ENGINEERING AND CELL CULTIVATION COLLAGEN BY ACID EXTRACTION OF CALF SKIN

L. V. Kukhareva,¹ I. I. Shamolina,² E. V. Polevaya¹

¹ Institute of Cytology RAS and ² Laboratory of Ecological Chemistry and Biotechnology, State University of Technology and Design, St. Petersburg; e-mail: kochka-0734@mail.ru

Seven methods of preparation of intact native collagen with telopeptides by acid extraction of calf skin have been compared; the hide was first dehaired by original mild enzymatical method using *Bacillus licheniformis* protease. The noncollagenous proteins and proteoglycans were previously removed by different ways and collagen was extracted by acid solvents and purified by salt precipitation. The dynamic of noncollagen impurities removing was followed by noncollagen proteins and hexuronic acids analysis in extracts. The purity of the resulting collagen was determined by polyacrilamide gel electrophoresis. The gel-forming capacity of the collagen was determined and the suitability of the product for tissue engineering was estimated by cultivation of fibroblasts and cardiomyocytes of new-born rats on collagen gells. All collagens obtained were not cytotoxic and had good gel-forming capacity. The preparation method with noncollagen impurities removing with 0.02 M K_2HPO_4 and collagen solution with 0.5 M acetic acid and 5 mM EDTA proved to be the best by final yield of the product and cell reaction to it. Hence, the optimal variant of collagen preparation method has been developed. The Russian Federation patent on this method was taken out.

Key words: tissue engineering, collagen, collagen preparation, collagen fibril structure, cells in collagen gels.