

УДК 691.175.5.8

КРИОГЕННО-СТРУКТУРИРОВАННЫЙ ШИРОКОПОРИСТЫЙ ЖЕЛАТИН-ГИАЛУРОНАТНЫЙ НОСИТЕЛЬ ПЕПТИДНОГО БИОРЕГУЛЯТОРА

© 2024 г. Е. В. Сидорский^{1, 2}, М. С. Краснов^{1, *}, В. И. Лозинский¹

¹ФГБУН “Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова
Российской академии наук”, Москва, 119991 Россия

²Институт проблем биорегуляции, Москва, 119991 Россия

*e-mail: embmsk@mail.ru

Поступила в редакцию 29.03.2024 г.

После доработки 16.04.2024 г.

Принята к публикации 22.04.2024 г.

Приемами криоструктурирования получен новый биосовместимый широкопористый желатин-гиалуронатный материал, успешно протестированный в качестве носителя белково-пептидного биорегулятора. Определены физико-химические параметры синтезированного носителя: его общая водоудерживающая способность, степень набухания полимера стенок макропор губчатого материала и компрессионный модуль упругости. Показано наличие в материале системы сообщающихся макропор сечением от 20 до 210 мкм. Полученный носитель был нагружен выделенным из склеры быка белково-пептидным биорегулятором и использован в экспериментах по органному культивированию биологической модели — заднего отдела глаза тритона. В результате экспериментов выявлено значительное протективное влияние биорегулятора склеры, включенного в губчатый носитель, на жизнеспособность тканей и клеток биологической модели и показана перспективность нового биосовместимого криогенно-структурированного материала для дозированного высвобождения из него биорегулятора в среду культивирования.

Ключевые слова: желатин, гиалуронат, криоструктурат, носитель биорегулятора, биологическая модель, органное культивирование

DOI: 10.56304/S0234275824030050

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в биотехнологической и биомедицинской практике широкое применение находят различные полимерные материалы, используемые в качестве хроматографических сорбентов, гелевых сред для электрофореза, носителей иммобилизованных аффинных лигандов, ферментов и клеток, гелевой основы плотных питательных сред, подложек для клеточно- и тканеинженерных конструкций, компонентов медпрепаратов, носителей для адресной доставки лекарственных веществ и др. [1–7]. Когда “изделие” на основе соответствующего полимерного материала предназначено для прямого контакта с живыми клетками, органами и, тем более, с целыми организмами, к таким материалам предъявляется определенный набор требований, обязательно включающих биосовместимость, неиммуногенность, нетоксичность как самого полимера, так и возможных продуктов его биodeградации в условиях эксплуатации, и т.д. [1, 2, 8]. В связи с этим, более предпочтительным для получения подобных материалов является

использование полимеров природного происхождения, чаще всего — это макромолекулярные соединения белкового и полисахаридного типов [1, 3, 8]. Важным свойством полимерных матриц, которые применяются в качестве носителей/подложек (англоязычный термин — scaffolds) при создании клеточно- и тканеинженерных конструкций, считается пористость материала в целом и величина поперечного сечения крупных пор, необходимых для незатрудненной миграции клеток в объем носителя и их адгезии к внутренней поверхности стенок таких пор [9]. Кроме того, сеть взаимосвязанных макропор размерами от 100 до 350 мкм обеспечивает эффективный транспорт питательных веществ, кислорода и продуктов жизнедеятельности [10, 11]. Одним из перспективных подходов придания такой макропористости используемым в биотехнологической практике полимерным носителям является так называемое криоструктурирование, позволяющее получать различные макро- и сверхмакропористые криогели и криоструктураты, базирующиеся как на природ-

ных, так и синтетических полимерах [12–15]. Криогели образуются, когда в объеме замороженной системы происходит формирование узлов трехмерной полимерной сетки (этот процесс называют криотропным гелеобразованием), если же собственно гелеобразования нет, то после удаления замороженного растворителя, например, сублимацией или криоэкстракцией, получают полимерные материалы, называемые криоструктуратами [16]. При формировании и криогелей, и криоструктуратов поликристаллы замороженного растворителя выполняют функцию порообразователей, а большинство самих макропор взаимосвязано [12–15, 17–20]. Благодаря удачному сочетанию хороших физико-химических свойств и вышеуказанной макропористой морфологии подобные криогенно-структурированные полимерные матрицы, в том числе их биоразлагаемые варианты на основе белков и полисахаридов, нашли широкое применение в качестве материалов биомедицинского и биотехнологического назначения [8, 9, 12–14, 21–30].

Одним из примеров таких матриц являются носители биологически-активных веществ, тем или иным путем вводимые в организм пациентов или используемые при культивировании клеточных или тканеинженерных конструкций. В частности, ранее нами было показано, что губчатые альбуминовые криогели и желатиновые криоструктураты весьма эффективны в качестве носителей белково-пептидных биорегуляторов [31–33]. В этой связи интерес представляла оценка возможности объединения белкового и полисахаридного компонентов в рамках одного криогенно-структурированного носителя для сочетания в нем положительных качеств биополимеров данных двух типов. Для решения указанной задачи нами был синтезирован желатин-гиалуронатный комплексный криоструктурат. С использованием положительно себя зарекомендовавшей в предыдущих исследованиях [31, 32] методологии органного культивирования препаратов заднего сектора глаза притонов проведено тестирование применимости полученного биополимерного материала в качестве носителя белково-пептидного биорегулятора, что и являлось целью настоящей работы.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Следующие вещества были использованы в экспериментах без дополнительной очистки: натриевая соль гиалуроновой кислоты (ММ 100 кДа, AMNWA Biopharm Co., КНР), желатин (тип А, 300 Bloom), мочевины и N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодимид (ЭДК) (Sigma, США), краситель метиленовый синий (Merck GmbH, Германия), ксилитол и ацетон (Panreac, Испания), эозин и гематоксилин (“Диаэм”, Россия), этанол (“Хим-

мед”, Россия). Водные растворы готовили с использованием воды качества Milli-Q.

Синтез криогенно-структурированных желатин-гиалуронатных носителей проводили по схеме, ранее использованной нами для получения криоструктуратов на основе желатина без добавок других биополимеров [33]. Готовили водный раствор натриевой соли гиалуроновой кислоты с концентрацией 20 мг/мл, к нему прибавляли желатин в количестве 40 мг/мл и перемешивали смесь при 60°C до полного растворения этого белкового компонента, после чего добавляли мочевины до ее конечной концентрации в растворе 60 мг/мл, т.е. 1 моль/л. Полученный раствор дозировали по 1.5 мл в пластиковые чашки Петри с внутренним диаметром 35 мм (ОАО “Медполимер”, Россия), которые помещали в камеру программируемого криостата F-32 ME (Julabo, Германия), где образцы замораживали и выдерживали 24 ч при –25°C, а затем лиофильно высушивали с помощью сублимационной установки FreeZone¹ (Labconco, США). Мочевину из полученных в результате макропористых дисков экстрагировали этанолом и далее их помещали в 0.05 М раствор ЭДК в этаноле, где инкубировали 48 ч при комнатной температуре с периодическим перемешиванием. Затем диски сформированных таким образом желатин-гиалуронатных криоструктуратов промывали этанолом от растворимых компонентов и хранили до использования под слоем этанола при 4°C.

В качестве осмотических характеристик полученных криогенно-структурированных матриц определяли их общую водоудерживающую емкость и степень набухания собственно полимерной фазы, т.е. стенок макропор этих губчатых материалов. Для этого каждый образец биополимерной губки отмывали водой от спирта и взвешивали, чтобы знать массу набухшего препарата ($m_{\text{наб.}}$). Далее его помещали на стеклянный фильтр и удаляли свободную жидкость под вакуумом (водоструйный насос) под нагрузкой 200 г. Образец, отжатый таким образом, взвешивали, определяя массу гидратированных стенок макропор ($m_{\text{гемп}}$), и далее высушивали до постоянного веса ($m_{\text{сух.}}$) при 105°C в печи SNOL 24/200 (AB UtenosElektrotechnika, Литва).

Общую водоудерживающую емкость (общую степень набухания материала в воде – $S_{\text{общ.}}$) рассчитывали по формуле:

$$S_{\text{общ.}} = m_{\text{наб.}}/m_{\text{сух.}} \cdot (\text{г H}_2\text{O}(\text{свободная} + \text{гидратная})/\text{г сухого полимера}). \quad (1)$$

Значение степени набухания полимера стенок макропор губчатых криоструктуратов вычисляли по формуле:

$$S_{\text{пол.}} = (m_{\text{гемп}} - m_{\text{сух.}})/m_{\text{сух.}} \cdot (\text{г H}_2\text{O}(\text{гидратная})/\text{г сухого полимера}). \quad (2)$$

Для характеристики физико-механических свойств синтезированных в работе желатин-гиалуронатных носителей определяли величину их модуля упругости. Для исследований формировали цилиндрические образцы набухших в воде губок диаметром 16 мм и высотой 20 мм. Измерения выполняли с помощью автоматического анализатора текстуры TA-Plus (Lloyd Instruments, Великобритания), используя пуансон “тарельчатого” типа диаметром 10 мм и толщиной 2 мм в соответствии с методикой, ранее описанной для упоминавшихся выше криогенно-структурированных желатиновых и альбуминовых губок [31–33]. Сжатие осуществляли со скоростью 0.3 мм/мин до достижения 50%-ной деформации образца, после чего значение компрессионного модуля упругости (E) определяли с помощью программного обеспечения прибора. Выборка для определения модуля упругости включала 4–6 образцов для каждой точки. Усреднение полученных величин проводили в программе Excel 2010. Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0.05$.

Для изучения микроструктуры губчатых желатин-гиалуронатных криоструктуратов их формировали в виде дисков толщиной 1 мм, которые окрашивали 0.250 мМ водным раствором красителя метиленового синего в течение 5 мин с последующим тщательным промыванием водой. Морфологию образцов исследовали с помощью оптического стереомикроскопа SMZ1000 (Nikon, Япония), оснащенного системой MMC-50C-M (MMCSoft, РФ) для цифровой записи изображений.

Исследования активности нагруженных биорегулятором носителей проводили на моделях органного культивирования препаратов заднего сектора глаза взрослых половозрелых тритонов *Pleurodeles waltl* обоего пола из аквариальной Института биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН (Россия). В каждом эксперименте использовали не менее 9 животных (18 глаз). Тритоны были наркотизированы в 2%-ном растворе этилуретана в физиологическом растворе для амфибий (0.65% NaCl). После наркотизации головы животных ополаскивали 70%-ным этиловым спиртом и проводили энуклеацию глаз при стандартном лабораторном освещении. Изолированные глаза помещали в стерильные 35 мм чашки Петри с питательной средой для амфибий (среда 199 – 70%, вода дистиллированная – 30%). Среда для культивирования тканей глаза содержала: 350 мл 199 среды, 150 мл бидистиллированной воды, 0.15 мл 1М буфера HEPES, 0.5 мл антибиотик/антимикотик. Перед внесением во флаконы среду стерилизовали холодным способом, пропуская через мембранные фильтры типа “CA” (Nalgene, США) с размером пор 0.2 мкм. Под биноклярной линзой изолировали ткани глаз в следующей последовательности: освобождали глаза от кожных покровов, затем разрезали по окружности, проксимальнее лимба. Ростовую область сет-

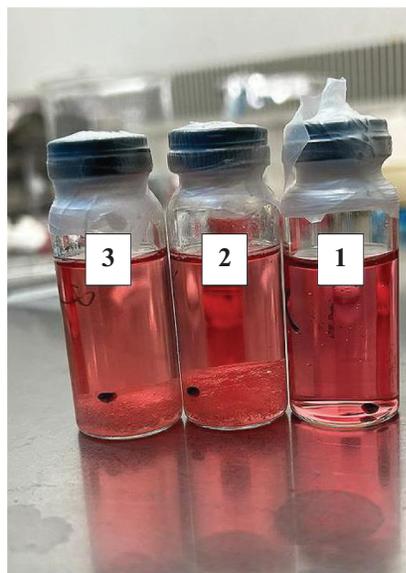


Рис. 1. Культивирование заднего сектора глаза тритона *Pl. waltl*: 1 – в стеклянном флаконе без губчатого носителя; 2 – на губчатом носителе без включенного в него биорегулятора; 3 – на губчатом носителе, с включенным в него биорегулятором склеры.

Fig. 1. Cultivation of the posterior sector of the eyes of newt *Pl. waltl*: 1 – in a glass bottle without a sponge carrier; 2 – on a sponge carrier without a bioregulator included in it; 3 – on a sponge carrier, with a scleral bioregulator included in it.

чатки вместе с радужкой, роговицей и хрусталиком отбрасывали. Задний сектор каждого глаза, в состав которого входили сетчатка, пигментный эпителий, сосудистая оболочка и склера использовали для последующего культивирования.

Биорегулятор из ткани склеры быка был выделен согласно ранее описанной методике [34]. В данной работе исследовали коммерческий препарат Биофтан 5 (ООО “Институт проблем биорегуляции”, Россия), полученный на основе биорегулятора склеры. Для насыщения носителя раствором биорегулятора желатин-гиалуронатный криоструктурат после хранения отмывали от спирта большим избытком воды, замораживали при -20°C и высушивали лиофильно. Далее полимерную губку помещали в водный раствор биорегулятора (концентрация веществ белково-пептидной природы 1×10^{-8} мг/мл), где инкубировали в течение 24 ч при 6°C , а затем набухший носитель вновь замораживали и высушивали лиофильно.

Экспериментальные образцы в опытах по органному культивированию биологической модели были разделены на 3 группы (рис. 1):

1. Контроль – во флакон с 10 мл культуральной среды 199 вводили 0.1 мл физиологического раствора и помещали задний отдел глаза тритона (1, рис. 1).

2. На поверхность губчатого носителя без биорегулятора помещали задний отдел глаза тритона и вносили 10 мл культуральной среды 199 (2, рис. 1).

3. На поверхность напитанного биорегулятором губчатого носителя помещали задний отдел глаза тритона и вносили 10 мл культуральной среды (среда 199 без добавления сыворотки) (3, рис. 1).

Все флаконы закрывали стерильными крышками, затем пленкой ParafilmM (США) и устанавливали в термостат. Культивирование проводили стационарно в темноте при 20–22°С в течение 72 ч без смены культуральной среды. Изучение состояния эксплантатов, после культивирования проводили на сериях парафиновых срезов. Ткани глаза фиксировали в растворе Буэна, после фиксации в течение 12 ч трижды отмывали 70%-ным этанолом, далее обезвоживали и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 7 мкм готовили, используя микротом ERM 4000 (Hestion, Австралия), которые после депарафинирования и гидратирования окрашивали гематоксилином и эозином, а затем заключали под покровное стекло. Для просмотра гистологических срезов использовали микроскоп Eclipse 55i (Nikon, Japan). Оценку количества жизнеспособных фибробластов осуществляли по программе ImageJ, определяя количество фибробластов ткани склеры относительно площади всего среза и затем вычисляли удельное значение в расчете на 1 мм² изображения. Для каждой экспериментальной точки было исследовано не менее 30 срезов. Полученные результаты обрабатывали по критерию Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Схема формирования биополимерного криогенно-структурированного материала, полученного в данной работе для применения в качестве носителя пептидного биорегулятора, включала следующие этапы:

(а) приготовление исходного раствора предшественников;

(б) замораживание этого раствора;

(в) сублимационное высушивание замороженных образцов;

(г) экстракцию мочевины из губчатого криоструктурата в среде этанола, не растворяющего полимерные компоненты;

(д) химическое сшивание макромолекул белка и полисахарида с помощью карбодиимида в среде этанола;

(е) промывку сшитой надмолекулярной сетки этанолом от избытка реагента и других растворимых веществ.

В предварительных экспериментах были установлены значения концентраций гиалуроната (20 мг/мл), желатина (40 мг/мл) и мочевины

(60 мг/мл) в исходном растворе, оптимальные для получения носителей, обладающих удобными для дальнейшего использования эксплуатационными свойствами. Как было показано ранее [33], введение мочевины в желатин-содержащий раствор необходимо, чтобы ингибировать гелеобразование этого белка до начала заморозки системы при ее охлаждении, поскольку для формирования губчатого криоструктуратов с хорошо воспроизводимыми свойствами требуется обеспечить протекание кристаллизации растворителя в исходно жидкой среде, а не в массе желатинового гидрогеля, что обычно происходит, если не вводить мочевины. Температурно-временной режим (–25°С/24 ч) криогенной обработки раствора смеси желатина, гиалуроната и мочевины, а также сублимационной сушки замороженных образцов, был аналогичен условиям, применявшимся в работе [33] при получении желатиновых криоструктуратов. При этом осуществление стадий (г)–(е) в среде этанола обеспечивало стерильность получаемого биополимерного материала.

Использование карбодиимидного конденсирующего реагента (ЭДК) на стадии (д) схемы получения целевого носителя обеспечивало ковалентное сшивание цепей желатина и гиалуроната в узлах единой надмолекулярной сетки за счет образования амидных связей между аминогруппами белка и карбоксильными группировками [35] обоих биополимеров. При этом, образовавшееся за счет присоединения к карбодиимиду молекулы воды производное мочевины растворимо и легко удаляется из полимерной фазы при ее последующей промывке на стадии (е).

В результате выдерживания оптимальных режимов процессов по указанным выше пунктам (а)–(е) были получены губчатые желатин-гиалуронатные криоструктураты, которые после отмывки от этанола и заменой его на воду впитывали ее в количестве 51.2 ± 5.8 г H₂O (свободная + гидратная) в расчете на 1 г сухого полимера. Общая водоудерживающая емкость ($S_{\text{общ}}$ – формула (1) в разделе “Условия эксперимента”) полученных образцов была примерно в 1.3 раза выше аналогичного показателя для желатиновых криоструктуратов без гиалуронатного компонента [33]. В свою очередь, степень набухания полимера стенок макропор ($S_{\text{пол}}$ – формула (2) в разделе “Условия эксперимента”) синтезированных в настоящей работе губчатых желатин-гиалуронатных криоструктуратов составила 7.03 ± 0.65 г H₂O (гидратная) в расчете на 1 г сухого полимера, что примерно в 2.8 раза превышало тот же показатель для желатиновых криоструктуратов без гиалуронатного компонента [33]. Отсюда следует, что именно наличие такого полисахарида в полученных нами криогенно-структурированных биополимерных носителях определяло их большую водоудерживающую

способность по сравнению с желатиновыми губками, что, собственно говоря, и ожидалось, принимая во внимание хорошо известную очень высокую гидрофильность гиалуроновой кислоты и ее солей [36].

Физико-механические свойства различных полимерных материалов во многом обуславливают их применимость для тех или иных биотехнологических и биомедицинских целей [1–5]. Учитывая это, в отношении полученного в данном исследовании криогенно-структурированного носителя, мы определили модуль упругости этого биополимерного материала. Измерения проводили для набухших в водной среде губок, что на качественном уровне моделировало условия их функционирования в последующих биологических экспериментах. Было найдено, что значение такого модуля составляло 12.3 ± 1.5 кПа, т.е. примерно того же уровня, что и измеренные по аналогичной методике значения для только желатиновых криоструктуратов, также сшитых с помощью карбодиимида [33].

Кроме того, с помощью оптического стереомикроскопа нами были изучены особенности губчатой морфологии желатин-гиалуронатного носителя. В частности, на рис. 2 в качестве примера приведены черно-белые микрофотографии верхней и нижней поверхностей диска толщиной 1 мм. Эти изображения наглядно показывают характерную для таких материалов довольно гетерогенную крупнопористую текстуру. Размеры пор в верхней (а) и нижней (b) областях носителя различаются: 30–210 мкм и 20–130 мкм, соответственно. Это обусловлено градиентом температуры в образце снизу – вверх во время его заморозания в чашке Петри, контактирующей с охлажденной поверхностью металлической подставки в камере криостата. Такого рода анизотропия пористой морфологии криогенно-структурированных полимерных матриц на основе разных биополимеров и ее причины хорошо известны [33, 37–41], т.е. обычно характерны для этих систем.

Далее синтезированные и охарактеризованные желатин-гиалуронатные криоструктураты были нагружены выделенным из склеры быка белково-пептидным биорегулятором и протестированы в опытах по органному культивированию препаратов заднего сектора глаза тритонов (см. раздел “Условия эксперимента”). Данный биорегулятор обладал протективным действием в отношении склеры, которое выражалось в увеличении жизнеспособности фибробластов, а также поддержании упорядоченной пространственной организации коллагеновых волокон в данной ткани [42]. Была показана способность данного биорегулятора поддерживать адгезию между тканями заднего отдела глаза и статус клеточной дифференцировки в клетках пигментного эпителия.

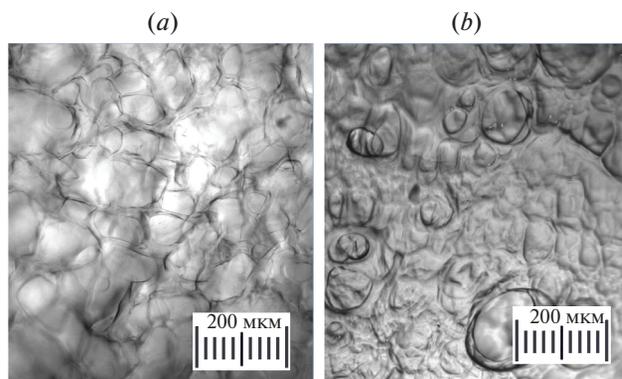


Рис. 2. Микроструктура желатин-гиалуронатного криоструктурата: (а) – верхняя поверхность губчатого диска, (b) – нижняя поверхность губчатого диска; (контрастирование 0.125 мМ водным раствором метиленового синего; оптический стереомикроскоп SMZ1000 (Nikon, Япония), снабженный цифровой системой MMC-50C-M (MMCSofT, РФ) записи изображений).
Fig. 2. Microstructure of gelatin-hyaluronate cryostructure: (a) – upper surface of the spongy disk, (b) – lower surface of the spongy disk; (contrast with 0.125 mM aqueous solution of methylene blue; optical stereomicroscope SMZ1000 (Nikon, Japan), equipped with a digital system MMC-50C-M (MMCSofT, RF) image recording).

Анализ полученных при органном культивировании результатов базировался на изучении гистологических препаратов, приготовленных из соответствующих биологических образцов.

В контрольных образцах (рис. 1, группа 1) при культивировании заднего отдела глаза тритона в отсутствие биополимерной губки и биорегулятора были обнаружены определенные изменения в состоянии тканей и клеток данного отдела. В частности, происходило отслоение сетчатки от слоя пигментного эпителия, а также отслойка слоя пигментного эпителия от сосудистой оболочки. В самом слое пигментного эпителия пигмент смещался на апикальную сторону, что говорит о нестабильности клеток данного слоя и их дедифференцировке. В сетчатке наблюдались признаки дегенерации и повреждения нейронов. В склеральной оболочке детектировались признаки начала дегенерации ткани, которые выражались в расслоении коллагеновых волокон с образованием крупных полостей между ними, а также в уменьшении количества фибробластов на единицу площади (рис. 3 и б).

При органном культивировании заднего отдела глаза тритона, помещенного на желатин-гиалуронатный носитель без биорегулятора (рис. 1, группа 2), не было обнаружено тотальной отслойки сетчатки, отростки фоторецепторных клеток и другие нейроны сетчатки были менее повреждены, чем в контрольном образце (рис 1 группа 1). Пигмент в слое пигментного эпителия также имел тенденцию к смещению на апикальную сторону, но не так выражено, как в контрольной группе.

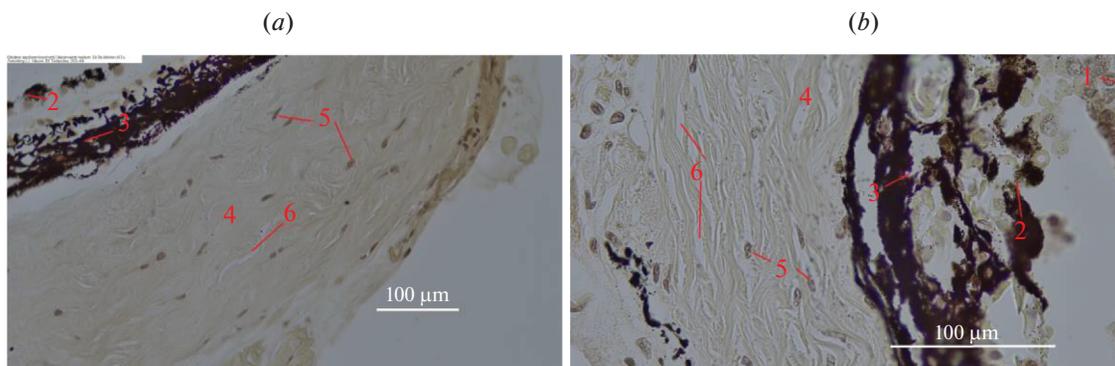


Рис. 3. Микрофотографии поперечного среза заднего сектора глаза тритона *Pl. waltl* после 72 ч культивирования в среде без добавления каких-либо факторов (контроль, группа 1). *a* – увеличение $\times 100$, *b* – увеличение $\times 200$. Масштабная линейка – 100 мкм. 1 – сетчатка, 2 – пигментный эпителий, 3 – сосудистая оболочка, 4 – склеральная оболочка, 5 – фибробласты, 6 – полости в склере.

Fig. 3. Microphotographs of a cross section of the posterior sector of the eye of a newt *Pl. waltl* after 72 hours of cultivation in a medium without the addition of any factors (control, group 1). *a* – magnification $\times 100$, *b* – magnification $\times 200$. Scale bar: 100 μm . 1 – retina, 2 – pigment epithelium, 3 – choroid, 4 – sclera, 5 – fibroblasts, 6 – cavities in the sclera.

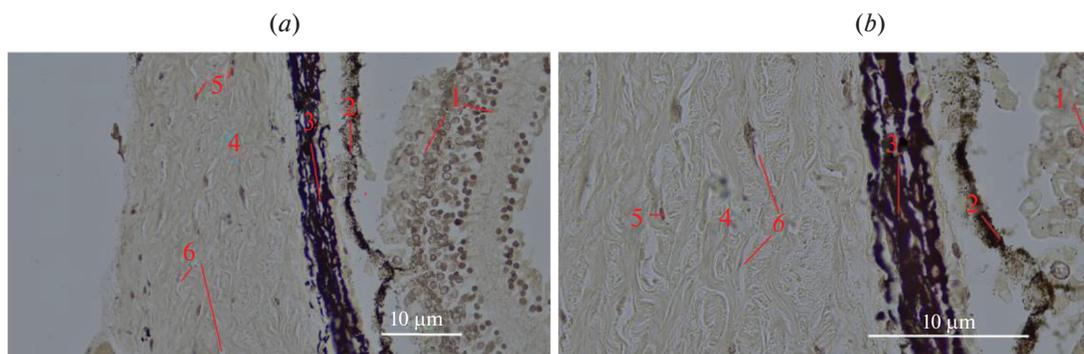


Рис. 4. Микрофотографии поперечного среза заднего сектора глаза тритона *Pl. waltl* после 72 ч культивирования на губчатом носителе в среде без добавления каких-либо факторов (группа 2). (*a*) – увеличение $\times 100$, (*b*) – увеличение $\times 200$. Масштабная линейка – 100 мкм. 1 – сетчатка, 2 – пигментный эпителий, 3 – сосудистая оболочка, 4 – склеральная оболочка, 5 – фибробласты, 6 – полости в склере.

Fig. 4. Microphotographs of a cross section of the posterior sector of the eye of a newt *Pl. waltl* after 72 hours of cultivation on a sponge carrier in a medium without the addition of any factors (group 2). (*a*) – magnification $\times 100$, (*b*) – magnification $\times 200$. Scale bar – 100 μm . 1 – retina, 2 – pigment epithelium, 3 – choroid, 4 – sclera, 5 – fibroblasts, 6 – cavities in the sclera.

Сосудистая оболочка в группе 2 была более плотной, чем в группе 1. В склеральной оболочке также наблюдались элементы дегградации ткани, выражающиеся в расслоении коллагеновых волокон и образования полостей, а также в уменьшении количества фибробластов на единицу площади, однако их количество было достоверно выше, чем в контрольной группе 1 (рис. 4 и 6).

В образцах, где задний отдел глаза тритона культивировали на желатин-гиалуронатной губке, насыщеннанной биорегулятором склеры (рис. 1, опытная группа 3), гистологическая картина свидетельствовала о выраженном ингибировании дегградационных процессов в этих тканях. Практически не наблюдалось отслоения сетчатки от слоя пигментного эпителия, а сам этот слой не был отслоен от сосудистой оболочки. Смещение пигмента в слое

пигментного эпителия практически отсутствовало, что говорит о стабилизации дифференцированного состояния клеток в данном слое. Склеральная оболочка содержала минорные элементы дегградации, которые выражались в образовании незначительных полостей и расслоении коллагеновых волокон, менее выраженном, чем в контрольных группах 1 и 2. Сосудистая оболочка была плотной, без выраженных элементов дегградации тканей. Количество фибробластов в склере на единицу площади было достоверно выше, чем в обеих контрольных группах, что свидетельствует о значительном протективном эффекте на жизнеспособность тканей и клеток биорегулятора склеры, включенного в губчатый носитель (рис. 5 и 6).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о перспективности применения губ-

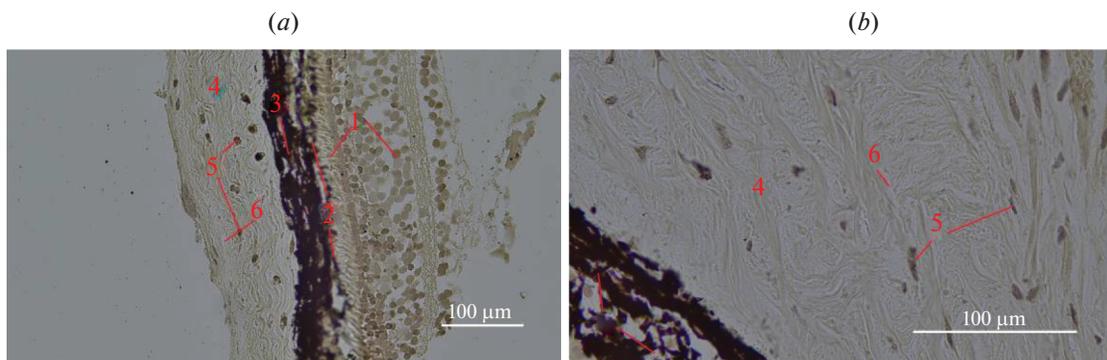


Рис. 5. Микрофотографии поперечного среза заднего сектора глаза тритона *Pl. waltil* после 72 ч культивирования на губчатом носителе в среде с добавлением биорегулятора склеры (группа 3). (a) – увеличение $\times 100$, (b) – увеличение $\times 200$. Масштабная линейка – 100 мкм. 1 – сетчатка, 2 – пигментный эпителий, 3 – сосудистая оболочка, 4 – склеральная оболочка, 5 – фибробласты, 6 – полости в склере.

Fig. 5. Microphotographs of a cross section of the posterior sector of the eye of a newt *Pl. waltil* after 72 hours of cultivation on a sponge carrier in a medium with the addition of a scleral bioregulator (group 3). (a) – magnification $\times 100$, (b) – magnification $\times 200$. Scale bar – 100 μm . 1 – retina, 2 – pigment epithelium, 3 – choroid, 4 – sclera, 5 – fibroblasts, 6 – cavities in the sclera.

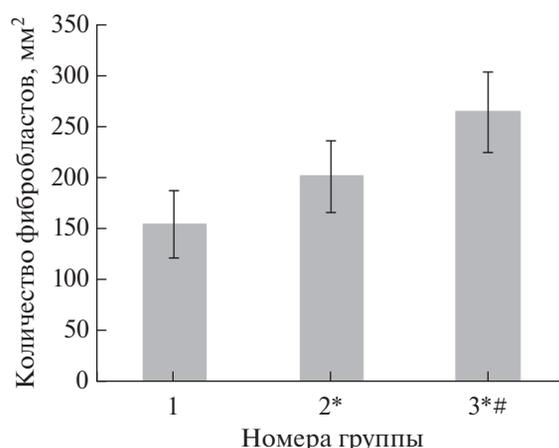


Рис. 6. Количество фибробластов на единицу площади склеры глаза тритона *Pl. waltil* после 72 ч. * – достоверные отличия от контрольной группы 1. # – достоверные отличия $p < 0.05$ между 2 и 3 группами.

Fig. 6. The number of fibroblasts per unit area of the sclera of the newt eye *Pl. waltil* after 72 hours * – significant differences from control group 1. # – significant differences $p < 0.05$ between groups 2 and 3.

чатого желатин-гиалуронатного криогеля в качестве носителя для дозированного выхода из него в среду культивирования биорегулятора склеры, который оказывает поддерживающее действие на ткани заднего отдела глаза тритона в условиях органного культивирования *in vitro*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 075-00277-24-00 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shtilman M.I.* Polymeric Biomaterials. VSP BV: Utrecht, The Netherlands, 2003, 293 p.
2. *Хенч Л., Джонс Д.* Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей. пер. с англ. Москва, РФ: Техносфера, 2007, 303 с.
3. *Temenoff J.S., Mikos A.G.* Biomaterials: The Intersection of Biology and Materials Science. Pearson/Pren-tice Hall: New-York, USA, 2008, 504 p.
4. *Narayan R.* Biomedical Materials: Springer: Boston, USA, 2009, 589 p.
5. Биосовместимые материалы. Под ред. *Севостьянова В.И. и Курпичникова М.П.*, Медицинское ин-формационное агентство, Москва, РФ, 2011. 544 с.
6. Гибридные наноструктуры биоактивных и лекарственных веществ. Под. ред. *Мельникова М.Я. и Трахтен-берга Л.И.*, Москва, РФ: Техносфера, 2020, 408 с.

7. Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. Eds. *Wagner W., Sakiyama-Elbert S., Zhang G., Yaszemski M.* London, UK: Elsevier, 2020, 1616 p.
8. Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. From Basic Concepts to State of the Art Approaches. *Bhaskar B., Rao P.S., Kasoju N., Nagarjuna V., Baadhe R.R.* (Eds.). Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2021, 1039 p.
9. *Lutzweiler G., Ndreu H.A., Engin V.N.* The overview of porous, bioactive scaffolds as instructive biomaterials for tissue regeneration and their clinical translation. *Pharmaceutics*, 2020, 12(7), article:602. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070602>
10. *Lien S.M., Ko L.Y., Huang T.J.* Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomater.*, 2009, 5(2), 670–879. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.09.020>
11. *Murphy C.M., Haugh M.G., O'Brien F.J.* The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2010, 31(3), 461–466. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.063>
12. *Лозинский В.И.* Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и области применения. *Успехи химии*, 2002, 71(6), 559–585. <https://doi.org/10.1070/RC2002V071N06ABEH000720>
13. *Gun'ko V.M., Savina I.N., Mikhalovsky S.V.* Cryogels: Morphological, structural and adsorption characterization. *Adv. Coll. Interface Sci.*, 2013, 187–188, 1–46. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.11.001>
14. *Лозинский В.И.* Принципы и методы криоструктурирования полимерных систем для создания инновационных материалов биомедицинского назначения. в кн. “Гибридные наноформы биоактивных и лекарственных веществ”. Под ред. Мельникова М.Я. и Трахтенберга Л.И., М.: изд-во “Техносфера”, 2020, глава 3, 69–101.
15. *Okay O.* Cryogelation reactions and cryogels: principles and challenges. *Turkish J. Chem.*, 2023, 47, 910–926. <https://doi.org/10.55730/1300-0527.3586>
16. *Lozinsky V.I.* Cryostructuring of polymer systems. 50. Cryogels and cryotropic gel-formation: terms and definitions. *Gels*, 2018, 4(3), article 77. <https://doi.org/10.3390/gels4030077>
17. *Gutiérrez M.C., Ferrer M.L., del Monte F.* Ice-templated materials: Sophisticated structures exhibiting enhanced functionalities obtained after unidirectional freezing and ice-segregation-induced self-assembly. *Chem. Mater.*, 2008, 20(3), 634–648. <https://doi.org/10.1021/cm702028z>
18. *Qian L., Zhang H.* Controlled freezing and freeze drying: A versatile route for porous and micro-/nano-structured materials. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2011, 86(2), 172–184. <https://doi.org/10.1002/jctb.2495>
19. *Okay O., Lozinsky V.I.* Synthesis, structure-property relationships of cryogels. *Adv. Polym. Sci.*, 2014, 263, 103–157. https://doi.org/10.1007/978-3-319-05846-7_3
20. *Shiekh P.A., Andrabia S.M., Singh A., Majumder S., Kumar A.* Designing cryogels through cryostructuring of polymeric matrices for biomedical applications. *Eur. Polym. J.*, 2021, 144, article 110234. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110234>
21. *Лозинский В.И., Вакула А.С., Зубов А.Л.* Применение криогелей поливинилового спирта в биотехнологии. IV. Обзор литературных данных. *Биотехнология*, 1992, 4, 5–14.
22. *Lozinsky V.I., Galaev I.Yu., Plieva F.M., Savina I.N., Jungvid H., Mattiasson B.* Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends Biotechnol.*, 2003, 21(10), 445–451. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.08.002>
23. *Plieva F.M., Galaev I.Y., Mattiasson B.* Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications. *J. Separ. Sci.*, 2007, 30(11), 1657–1671. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700127>
24. *Лозинский В.И.* Новое семейство макропористых и сверхмакропористых материалов биотехнологического назначения — полимерные криогели. *Известия РАН, Сер. хим.*, 2008, 5, 996–1013. <https://doi.org/10.1007/s11172-008-0131-7>
25. *Mattiasson B.* Cryogels for biotechnological applications. *Adv. Polym. Sci.*, 2014, 263, 245–282. https://doi.org/10.1007/978-3-319-05846-7_7
26. *Supermacroporous Cryogels: Biomedical and Biotechnological Applications.* Ed. *Ashok Kumar.* Boca Raton, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC. 2016, 480 p.
27. *Baimenov A., Berillo D.A., Pouloupoulos S.G., Inglezakis V.J.* A review of cryogels synthesis, characterization and applications on the removal of heavy metals from aqueous solutions. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2020, 276, article 102088. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102088>
28. *Klivenko A.N., Mussabaeva B.Kh., Gaisina B.S., Sabitova A.N.* Biocompatible cryogels: preparation and application. *Bulletin of the University of Karaganda — Chemistry*, 2021, 103(1), 4–20. <https://doi.org/10.31489/2021Ch3/4-20>
29. *Ямскова О.В., Шуклина О.А., Романова В.С., Курилов Д.В., Лозинский В.И.* Оценка функциональности криогенно-структурированных крахмальных матриц при их использовании в качестве гелевых подложек для проращивания семян и определения активности стимуляторов роста растений. *Биотехнология*, 2023, 39(6), 119–126. <https://doi.org/10.56304/S0234275823060145>
30. *Ghiorghita C.-A., Platon I.-V., Lazar M.M., Dinu M.V., Aprotosoae A.C.* Trends in polysaccharide-based hydrogels and their role in enhancing the bioavailability and bioactivity of phytochemicals. *Carbohydr. Polym.*, 2024, 334, article 122033. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122033>
31. *Sidorski E.V., Krasnov M.S., Yamskova V.P., Lozinsky V.I.* Cryostructuring of polymeric systems. 57. Spongy wide-porous cryogels based on the proteins of blood serum: preparation, properties and application as the carrier of peptide bioregulators. *Gels*, 2020, 6(4), article 50. <https://doi.org/10.3390/gels6040050>

32. Ямскова О.В., Краснов М.С., Сидорский Е.В., Лозинский В.И. Влияние белково-пептидного биорегулятора, выделенного из склеры и в разных дозах включенного в альбуминовый криогель, на состояние склеральной оболочки при модельном культивировании заднего отдела глаза. *Вестник трансплатологии и искусственных органов*, 2023, 25(2), 189–128. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2023-2-118-128>
33. Lozinsky V.I., Kulakova V.K., Grigoriev A.M., Podorozhko E.A., Kirsanova L.A., Kirillova A.D., Novikov I.A., Basok Y.B., Sevastianov V.I. Cryostructuring of polymeric systems: 63. Synthesis of two chemically tanned gelatin-based cryostructures and evaluation of their potential as scaffolds for culturing of mammalian cells. *Gels*, 2022, 8(11), article 695. <https://doi.org/10.3390/gels8110695>
34. Скрипникова В.С., Краснов М.С., Березин Б.Б., Бабушкина Т.А., Борисенко А.В., Измайлов Б.А., Ямскова В.П., Ямсков И.А. Биологически активный в сверхмалых дозах низкомолекулярный белок склеры. *Доклады академии наук*, 2007, 417(5), 697–699. <https://doi.org/10.1134/S1607672907060166>
35. Преображенский Н.А., Евстигнеева Р.П. Химия биологически активных природных соединений. М.: Химия. 1970, 512 с.
36. Hargittai M., Hargittai I., Endre A. Balazs E.A. History of Hyaluronan Science (Hyaluronan: From Basic Science to Clinical Applications, Volume 2). Pub Matrix Inc. 2011. 454 p.
37. Yokoyama F., Achife E.C., Momoda J., Shimamura R., Monobe K. Morphology of optically anisotropic agarose hydrogel prepared by directional freezing. *Coll. Polym. Sci.*, 1990, 268(6), 552–558.
38. Rodionov I.A., Grinberg N.V., Burova T.V., Grinberg V.Ya., Shabatina T.I., Lozinsky V.I. Cryostructuring of polymer systems. 44. Freeze-dried and then chemically cross-linked wide porous cryostructures based on serum albumin. *e-Polymers*, 2017, 17(4) 263–274. <https://doi.org/10.1515/epoly-2016-0317>
39. Cheng Q., Huang C., Tomsia A.P. Freeze casting for assembling bioinspired structural materials. *Adv. Mater.*, 2017, 29, article 1703155. <https://doi.org/10.1002/adma.201703155>
40. Zvukova N.D., Klimova T.P., Ivanov R.V., Ryabev A.N., Tsiskarashvili A.V., Lozinsky V.I. Cryostructuring of polymeric systems. 52. Properties, microstructure and an example of a potential biomedical use of the wide-pore alginate cryostructures. *Gels*, 2019, 5(2), article 25. <https://doi.org/10.3390/gels5020025>
41. Savina I.N., Zoughaib M., Yergeshov A.A. Design and assessment of biodegradable macroporous cryogels as advanced tissue engineering and drug carrying materials. *Gels*, 2021, 7(3), article 79. <https://doi.org/10.3390/gels7030079>
42. Ямскова В.П., Краснов М.С., Скрипникова В.С., Ямсков И.А. Экспериментальные модели культивирования тканей глаза тритона *Pleurodeles waltl* для исследования специфического действия активного в сверхмалых дозах биорегулятора склеры. БЭБМ, 2010, 4, 393–395. <https://doi.org/10.1007/s10517-010-0957-5>

Cryogenically-Structured Wide-Porous Gelatin-Hyaluronate Carrier of Peptide Bioregulator

E. V. Sidorskii^{a, b}, M. S. Krasnov^{a, #}, and V. I. Lozinsky^a

^aA.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^bInstitute of Bioregulation Problems, Moscow, 119991 Russia

[#]e-mail: embrmsk@mail.ru

Abstract—Using cryostructuring techniques, a new biocompatible, wide-porous gelatin-hyaluronate material was prepared, which was successfully tested as a carrier of a protein-peptide bioregulator. The following physicochemical parameters of the synthesized carrier were determined: its total water-holding capacity (51.2 ± 5.8 g H₂O/g polymer), the degree of swelling (7.03 ± 0.65 g H₂O/g polymer) of the polymer inside the macropore walls of the spongy material and the compression modulus elasticity (12.3 ± 1.5 kPa). The presence of a system of interconnected macropores with a cross section from 20 to 210 μm in the material is shown. Next, the resulting carrier was loaded with a protein-peptide bioregulator isolated from bovine sclera and used in the experiments on organ cultivation of a biological model—the posterior section of the newt eye. As a result, a significant protective effect of the scleral bioregulator included in the sponge carrier on the viability of tissues and cells of a biological model was revealed and the promise of a new biocompatible cryogenically structured material for dosed release of the bioregulator into the culture medium was shown.

Keywords: Gelatin, hyaluronate, cryostructure, bioregulator carrier, biological model, organ cultivation