

Криогенно-структурированный миметик внеклеточного матрикса на основе концентрированного коллагенсодержащего раствора

**Ю. Б. Басок, А. М. Григорьев, В. И. Лозинский, Л. А. Кирсанова,
В. К. Кулакова, Е. А. Подорожко, И. А. Новиков, В. И. Севастьянов**

Получен новый макропористый криогенно-структурированный биомиметик внеклеточного матрикса (ВКМ) на основе коммерчески доступного концентрированного коллагенсодержащего раствора и оценена возможность его применения в тканевой инженерии. Губчатый коллагенсодержащий материал получали последовательным замораживанием концентрированного коллагенсодержащего раствора, его последующей лиофилизацией и химическим дублением — обработкой спиртовым раствором карбодиимида. Морфология криоструктурированного многокомпонентного коллагенсодержащего материала была изучена методами оптической и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с использованием лантаноидного контрастирования. Цитотоксичность матрицы исследовали на культуре мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека (МСК ЖТч). Адгезию и пролиферацию МСК ЖТч на поверхности матрикса изучали на 7 сутки культивирования. Компрессионный модуль упругости полученного коллагенсодержащего материала в набухом в воде состоянии составил $35,3 \pm 2,2$ кПа, общая водоудерживающая способность материала — $45,80 \pm 0,46$ мл/г полимера, а степень набухания стенок макропор — $3,99 \pm 0,31$ мл/г. При СЭМ исследовании и гистологическом окрашивании гематоксилином и эозином на поверхности и поперечном срезе диска наблюдали широкопористую структуру. Поры в верхней части крупнее (средний диаметр не менее ~ 30 мкм), чем поры в нижней части губки (средний диаметр не более ~ 30 мкм) в связи с возникновением вертикального градиента температуры. Матрица не обладала цитотоксичностью относительно МСК ЖТч. В образце наблюдали активную пролиферацию МСК ЖТч на поверхности матрикса. Отсутствие цитотоксичности и способность поддерживать адгезию и пролиферацию МСК ЖТч указывают на возможность использования криогенно-структурированного биомиметика внеклеточного матрикса в тканевой инженерии и регенеративной медицине.

Ключевые слова: коллагенсодержащий раствор, криоструктурирование, внеклеточный матрикс, миметик, клеточный носитель, тканевая инженерия, регенеративная медицина.

DOI: 10.30791/1028-978X-2023-11-16-27

Введение

В последнее время широкое распространение получили технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины — междисциплинарной области исследований, которая включает разработку биоискусственных тканей и органов — систем, наделенных структурой и функцией биологических тканей [1]. Подобные системы позволяют частично

или полностью восстанавливать утраченные функции органов, что ранее было возможно лишь путем их трансплантации [2]. Другой областью применения клеточно-инженерных конструкций (КИК) является создание *in vitro* моделей заболеваний для изучения патогенеза, механизмов и возможных способов терапии патологий [3, 4]. Основными компонентами КИК являются матрица (matrix, scaffold), временно выполняющая функции природного

внеклеточного матрикса (ВКМ), клетки и культуральная среда, содержащая факторы роста, стимулирующие процессы миграции, пролиферации и дифференцировки клеток (Трансплантология и искусственные органы. Под ред. С.В. Готье. Москва, изд-во “Лаборатория знаний”, 2018 г., с. 286 – 313). К одним наиболее перспективным материалам при создании матриц для КИК относятся инъекционные формы вязкоупругих многокомпонентных гидрогелей — биомиметики ВКМ в той или иной степени воспроизводящие его состав, получаемые путем экстракции [5] или солиubilизации [6] тканей животных.

Однако отсутствие у инъекционных форм гидрогелей макропористой структуры и низкая механическая прочность затрудняет равномерное распределение клеток в составе КИК и требует дополнительной армирующей конструкции для поддержания 3D- структуры.

Вместе с тем, одним из эффективных подходов к приданию полимерным матрицам макропористости является так называемое криоструктурирование (или криогенное структурообразование) [7]. Обычно процесс такого криоструктурирования включает три основные стадии: 1) замораживание исходного молекулярного или коллоидного раствора предшественников, 2) выдерживание образца в замороженном состоянии; 3) наконец, в зависимости от конкретного случая, либо оттаивание, либо удаление замороженного растворителя сублимацией или криоэкстракцией. Когда в замороженной системе происходит формирование ковалентных или нековалентных узлов трехмерной сетки, то такой процесс называют криотропным гелеобразованием, а получающиеся полимерные объекты — криогелями, а если гелеобразование отсутствует, то конечными продуктами (обычно после удаления замороженного растворителя) являются полимерные объекты, называемые криоструктуратами [8]. Именно макропористость и криогелей, и криоструктуратов является их характерной морфологической особенностью; она индуцируется поликристаллами замороженного растворителя, выполняющих функцию порогена. При этом большинство макропор взаимосвязаны. Их форма и размеры зависят от многих факторов, в частности, от природы исходного растворителя, свойств и концентрации растворенных в нем веществ, режимов криогенной обработки, способа удаления порогена. Как раз особая макропористость в сочетании во многих случаях с хорошими механическими свойствами различных криогелей и криоструктуратов на основе биосовместимых полимеров делает та-

кие полимерные матрицы перспективными материалами биомедицинского назначения [9 – 11]. При этом актуальными являются исследования и разработки, связанные не только с совершенствованием уже известных криогенно-структурированных биоматериалов, но и с поиском новых вариантов, обладающих характеристиками, необходимыми для решения конкретных задач по созданию эффективных КИК.

Цель настоящей работы — получение нового макропористого криогенно-структурированного биомиметика ВКМ на основе коммерчески доступного концентрированного коллагенсодержащего раствора и оценка возможностей его применению в тканевой инженерии.

Материалы и методы

Экстракт коллагенсодержащий

В качестве исходного препарата для получения криогенно-структурированного биомиметика ВКМ использовали многокомпонентный концентрированный коллагенсодержащий раствор (МККР), получаемый путем уксуснокислой экстракции мягких тканей животного происхождения (“Экстракт коллагенсодержащий”, ТУ 9389-008-54969743-2016, АО “БИОМИР сервис”, г. Краснознаменск). Концентрация МККР — 40 мг/мл, суммарное содержание белков в МККР — 96%, pH = 5,8 ± 0,3.

Получение криогенно-структурированного широкопористого миметика ВКМ

Биополимерный носитель на основе МККР получали согласно модифицированной методике, защищенной патентом [12]. Для этого коммерческий препарат МККР сначала прогревали в течение 1 ч при 42 °С, затем разбавляли в 1,5 раза деионизованной водой и разливали слоем толщиной 2 мм в пластиковые чашки Петри (внутренний диаметр — 35 мм). Чашки помещали на горизонтальную металлическую плиту, охлаждаемую проточной системой ультракриостата K2 (Huber, Германия) и замораживали при –20 °С в течение 3 ч, а затем переносили в камеру сублимационной установки FreeZone¹ (Labconco, США), где замороженные препараты высушивали лиофильно. Далее диски полученных макропористых криоструктуратов погружали в 0,1 М этанольный раствор гидрохлорида N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодимида (Sigma-Aldrich, США), в котором образцы инкубировали при комнатной температуре и перио-

дическом перемешивании в течение 24 ч. Далее задубленный таким образом биополимерный материал промывали этанолом от избытка карбодимида и хранили в среде 96 %-го этанола до использования в качестве носителя для культивирования клеток.

Физико-химические свойства криоструктурированного миметика ВКМ

Параметры набухания криоструктурированного МККР оценивали с помощью гравиметрического метода. Для этого этанол из биополимерных дисков удаляли многократным промыванием их водой, набухший губчатый образец извлекали и осторожно удаляли свободную влагу с его поверхностей промокания фильтровальной бумагой. Образец взвешивали, тем самым определяя общую массу ($m_{\text{наб}}$) набухшего материала. После этого образец помещали на стеклянный фильтр, на губку устанавливали пластиковую чашку Петри, содержащую 100-граммовую гирию, и под этой нагрузкой удаляли из губки капиллярную жидкость в вакууме (~ 15 мм рт. ст.) в течение 5 мин. Полученный отжатый влажный диск взвешивали, определяя таким образом массу влажного препарата ($m_{\text{вл}}$), далее его высушивали при 105 °С до постоянной массы в воздушном термостате SNOL 24/200 (AB Utenos Elektrotechnika, Литва) и вновь взвешивали, определяя массу полимера в образце ($m_{\text{сух}}$). Используя найденные значения масс, вычисляли общую вододерживающую способность губчатого материала, то есть его набухаемость (swelling) — $S_{\text{общ}}$, и набухаемость его полимерной фазы ($S_{\text{пол}}$), то есть степень набухания стенок макропор:

$$S_{\text{общ}} = m_{\text{наб}} : m_{\text{сух}} \text{ (г H}_2\text{O (связанная + капиллярная) / г сухого полимера),}$$

$$S_{\text{пол}} = (m_{\text{вл}} - m_{\text{сух}}) : m_{\text{сух}} \text{ (г связанной H}_2\text{O / г сухого полимера).}$$

Для измерения физико-механических характеристик губчатых носителей их отдельно формировали в виде цилиндрических образцов, которые после промывки водой имели диаметр 15 мм и высоту 10 мм. Определение модуля упругости проводили в соответствии с ранее описанной методикой [13]. Набухшую губку помещали в наполненный водой стеклянный стакан, чтобы компенсировать капиллярное давление при одноосном сжатии макропористого образца. При измерениях для минимизации выталкивающей силы Архимеда использовали пуансон “тарельчатого” типа диаметром 10 мм и толщиной 2 мм, установленный в держателе автоматического анализатора тексту-

ры TA-Plus (Lloyd Instruments, Великобритания). Сжатие проводили со скоростью 0,3 мм/мин до 50 %-й деформации губки, а значение компрессионного модуля упругости (E) определяли с помощью встроенного программного обеспечения прибора.

Значения параметров набухаемости и упругости биополимерных губок были измерены для 3 – 5 параллельных образцов в трех независимых экспериментах. Полученные результаты усредняли.

Сканирующая электронная микроскопия

Морфологию поверхности и ближайшего подповерхностного слоя образцов изучали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с использованием лантаноидного контрастирования. Пробоподготовка водосодержащих образцов для СЭМ с напылением токопроводящего слоя требует их обезвоживания, что приводит не только к структурным изменениям таких объектов, но и плохой визуализации клеточных элементов. Метод лантаноидного контрастирования позволяет наблюдать нефиксированные биологические образцы в режиме низкого вакуума после выдержки их в насыщенном растворе редкоземельного металла. При этом сохраняется максимально нативное состояние исследуемого объекта, а изображение, полученное в режиме детекции обратно рассеянных электронов, несет расширенную информацию о клеточных структурах.

Протокол обработки включал первичную промывку, выдержку 45 мин в контрастирующем растворе BioREE (ООО “Глаукон”, Россия) и финальную промывку дистиллированной водой. После контрастирования с поверхности образца удаляли избыток влаги воздушной кистью и размещали его на предметном столике микроскопа EVO LS10 (Zeiss, Германия). Наблюдения проводили в режиме низкого вакуума (EP, 70 Па), при ускоряющем напряжении 20 кВ.

Размер пор криоструктурированного носителя определяли путем измерения 90 случайно выбранных пор на изображениях гистологических срезов с использованием программного обеспечения Image J (National Institutes of Health, USA).

Гистологические исследования

Образцы матрицы и КИК фиксировали в 10 % растворе формалина на фосфатно-солевом буфере, промывали в течение 15 мин в проточной воде и обезвоживали в спиртах восходящей концентрации

(70, 80 и 96 %; по 5 мин в каждой смене спиртового раствора), выдерживали по 5 – 7 минут в смеси этанола и хлороформа, затем в хлороформе, а далее заливали в парафин.

Срезы толщиной 4 – 5 мкм, полученные с помощью микротомы Leica RM3255 (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Германия), депарафинировали, дегидратировали и окрашивали гематоксилином и эозином.

Описание клеточной культуры

Культура мезенхимальных стромальных клеток, изолированных из жировой ткани человека (МСК ЖТч), была получена в ФГБУ “НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова” Минздрава России по ранее разработанной методике [14]. Перед использованием МСК ЖТч хранили в жидком азоте при температуре –196 °С. После разморозки МСК ЖТч высевали в культуральные флаконы площадью 25 см² (CELLSTAR® Greiner Bio-One, Германия) и культивировали в полной ростовой среде DMEM/F12 (ПанЭко, Россия) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 10 мкг/мл основного фактора роста фибробластов человека (FGF-2, Reprotech, AF-100-18B, США), антибиотика и антимикотика Anti-Anti (Gibco® by Life Technologies™, СК), 1 мМ HEPES (Gibco® by Life Technologies™, СК) и 2 мМ аланил-глутамин (ПанЭко, Россия) в CO₂ инкубаторе при стандартных условиях: 37 °С, во влажной атмосфере, содержащей 5 ± 1 % CO₂. В экспериментах использовали МСК ЖТч IV пассажа.

Перед экспериментом клетки удаляли с поверхности культурального пластика с помощью диссоциирующего реагента TrypLE™ Express Enzyme (Gibco® by Life Technologies™, СК) и готовили суспензию с необходимой концентрацией клеток.

Исходное количество клеток в суспензии определяли на автоматическом счетчике клеток (TC20™ Automated Cell Counter, BIORAD, Сингапур) с одновременным анализом жизнеспособности по исключению красителя трипанового синего (BIORAD, # 145-0013, Сингапур).

Оценка цитотоксичности

Для определения цитотоксичности криоструктурата на основе коллагенсодержащего гидролизата МСК ЖТч высевали в культуральные плоскодонные 6-луночные планшеты (CELLSTAR® Greiner Bio-One, Германия) в концентрации 5·10⁵ клеток на лунку и инкубировали в течение 24 ч при 37 °С

во влажной атмосфере, содержащей 5 ± 1 % CO₂, до образования 80 ± 10 % монослоя, после чего на поверхность клеточного монослоя помещали исследуемые образцы, которые предварительно подвергали тщательной отмывке от остатков этанола двумя порциями стерильной дистиллированной воды и оставляли на 1 сутки в полной ростовой среде при 37 °С. Отрицательным контрольным образцом служила полная ростовая среда, положительным контрольным образцом — стандарт цинка одноэлементный водный 10 мг/мл (Sigma-Aldrich, США).

Через 24 ± 2 ч инкубации проводили оценку культуры микроскопически по стандартной методике с использованием автоматизированной системы наблюдения за клетками IncuCyteZOOM (EssenBioscience, США) на наличие морфологических изменений и/или уменьшение плотности клеток.

Формирование клеточно-инженерной конструкции

Для создания КИК на основе макропористых губок и МСК ЖТч готовили суспензию клеток с концентрацией 1·10⁶ кл/мл. Образцы губки в виде дисков площадью 1 см² и толщиной 2 мм погружали в суспензию и обрабатывали в течение 1 ч с применением лабораторного шейкера в орбитальном режиме перемешивания при частоте вращения 40 об/мин для улучшения проникновения клеток вглубь губчатой структуры образца. Полученные КИК культивировали в стандартных условиях в течение 3 суток.

Морфологию поверхности КИК исследовали методом СЭМ и гистологического окрашивания. Для оценки жизнеспособности клеток на культивирования КИК окрашивали флуоресцентным красителем Calcein AM (Invitrogen, США). Зеленая флуоресценция, регистрируемая при длине волны 515 нм, позволяет определить живые клетки на поверхности носителя. Далее образцы изучали с помощью инвертированного микроскопа Nikon Ti (Nikon Corp, Japan).

Результаты и обсуждение

Получение, физико-химические свойства и широкопористая морфология криоструктурированного МККР

Схема получения рассматриваемых в данном исследовании биополимерных криоструктуратов,

предназначенных для использования в качестве носителей для культивирования клеток для создания КИК, включала четыре основные стадии:

1. Приготовление исходного раствора на основе коммерческого концентрированного коллагенсодержащего раствора МККР, для чего в предварительных экспериментах была найдена оптимальная концентрация компонентов (см. Экспериментальную часть), обеспечивающая необходимые осмотические и физико-механические показатели формируемого материала, наиболее удобного для последующего биотехнологического применения.

2. Замораживание помещенного в формы раствора биополимерных предшественников при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, что также было оптимизовано в предварительных экспериментах, поскольку хорошо известно, что температурный режим криогенной обработки исходного раствора в определяющей степени влияет на макропористую морфологию получаемых продуктов криоструктурирования, то есть криогелей и криоструктуратов [7, 15, 16].

3. Высушивание замороженных образцов сублимацией из них льда в вакууме, что приводит к получению первичного криоструктурата с макропористой текстурой, характерной для лиофильно-высушенных полимерных матриц [17]. Однако, если поместить этот материал в водную среду, то в конце концов он растворится, так как макромолекулы его биополимеров связаны друг с другом лишь слабыми адгезионными контактами. Поэтому, для придания такому первичному криоструктурату устойчивости к солюбилизации, необходимо объединить его компоненты в трехмерную надмолекулярную сетку прочными химическими связями, то есть сшить (или задубить) ковалентно.

4. Химическая фиксация криогенно-структурированного губчатого материала его обработкой этанольным раствором карбодиимида (см. Экспериментальную часть). В ходе данной стадии под действием этого конденсирующего агента происходит образование межмолекулярных амидных связей между карбоксильными и аминными группировками [18] боковых цепей белков, пептидов, олиго- и полисахаридов, входящих в состав КГТЖ, а присоединивший в этой реакции воду конденсирующий агент переходит в раствор в виде производного мочевины и удаляется окончательной промывкой этанолом полученного таким образом “вторичного” криоструктурата – целевого продукта всего процесса в целом. При этом этанол, используемый в 4-й стадии в качестве реакционной среды, хорошо пропитывает макропористую губку

и полностью смачивает ее полимерную фазу, то есть материал стенок макропор, что обеспечивает эффективный контакт реагирующих группировок. Кроме того, этанол выполняет антимикробную функцию, то есть стерилизует получаемый материал.

В результате такой последовательности технических простых операций получены криогенно-структурированные биополимерные губки, которые были охарактеризованы по следующим показателям:

а) общая водоудерживающая способность материала ($S_{\text{общ}}$) составила $45,80 \pm 0,46$ г воды на 1 г сухого полимера, что находится примерно в области значений $S_{\text{общ}}$, свойственных ряду других биополимерных криоструктуратов, близких по концентрациям структурообразователя, например, подобным губчатым матрицам на основе желатина [13, 19], сывороточного альбумина [20, 21] или гиалуроновой кислоты [22];

б) степень набухания материала стенок макропор ($S_{\text{пол}}$) оказалась равной $3,99 \pm 0,31$ г сольватной воды на 1 г сухого полимера, что того же порядка величин, которые характерны для вышеуказанных криогенно-структурированных биополимерных губок. Сравнение значений $S_{\text{общ}}$ и $S_{\text{пол}}$ для полученных в настоящей работе криоструктуратов на основе МККР свидетельствует, что большая часть поглощаемой ими воды приходится на жидкость внутри системы взаимосвязанных макропор капиллярного сечения;

в) компрессионный модуль упругости (E) равновесно-набухших в воде вторичных криоструктуратов составил $35,3 \pm 2,2$ кПа, что примерно втрое выше значений аналогичного показателя для задубленных карбодиимидом желатиновых криоструктуратов, уже положительно себя зарекомендовавших при использовании в качестве носителей для культивирования различных линий клеток [13]. Поэтому можно без опасения нарушить целостность полученных в настоящей работе губчатых биополимерных носителей, подвергать и более высоким механическим напряжениям, например, когда это необходимо на стадиях интенсивной промывки, чем вышеуказанные желатиновые матрицы;

г) широкопористая морфология криоструктурированного МККР была изучена с помощью оптической и сканирующей электронной микроскопии (рис. 1). В частности, на рис. 1а показан внешний вид образца такого криоструктурированного МККР (диаметр 10 мм, толщина 2 мм), а на рис. 1б – 1д приведены изображения его микроструктуры.

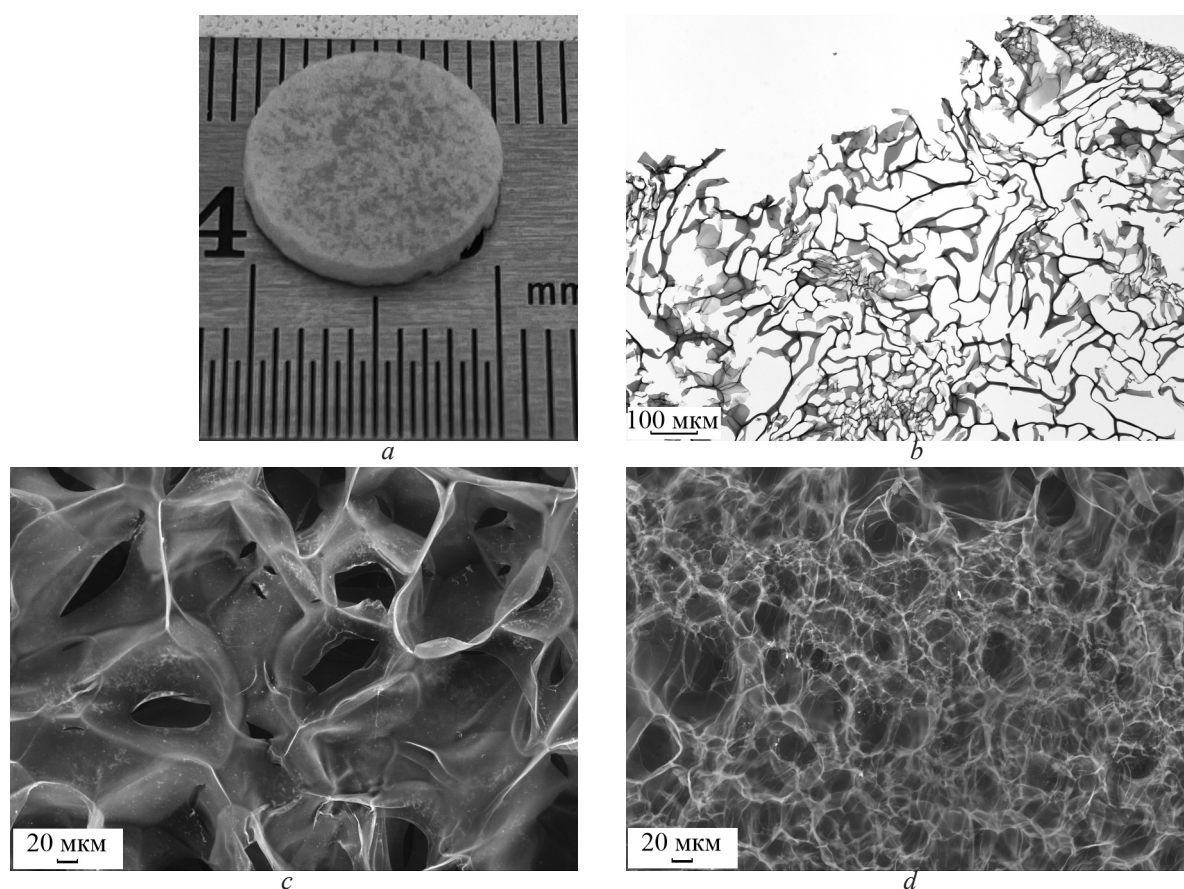


Рис. 1. Морфология широкопористого криоструктурированного МККР: *a* — вид носителя; *b* — гистологическая картина поперечного среза диска, окрашивание гематоксилином и эозином; *c, d* — СЭМ-изображение структуры поверхности носителя с использованием лантаноидного контрастирования BioREE; *c* — сторона 1; *d* — сторона 2.

Fig. 1. Morphology of broad-pore cryostructured multicomponent concentrated collagen-based solution (MCCS): *a* — carrier type; *b* — histological picture of the transverse section of the disc, hematoxylin and eosin staining; *c, d* — SEM image of the support structure using BioREE lanthanide contrasting, *c* — side 1; *d* — side 2.

При гистологическом окрашивании гематоксилином и эозином на поперечный срезе диска были выявлены многочисленные макропоры (рис. 1*c*). Макропоры обеспечивают беспрепятственное проникновение клеток, транспорт кислорода, продуктов жизнедеятельности и питательных веществ вглубь губки [23].

Отметим заметные различия макропористой морфологии верхней (рис. 1*b*) и нижней (рис. 1*d*) части поверхности губки. Поры в верхней части крупнее (средний диаметр не менее ~ 30 мкм), чем поры в нижней части губки (средний диаметр не более ~ 30 мкм). Это связано с прямым контактом нижней поверхности образца с дном охлажденной чашки Петри в процессе образования криоструктурированного носителя, что ведет к возникновению вертикального градиента температуры. Подобная

картина наблюдалась у криоструктуратов на основе желатина [13, 24].

Исследование цитотоксичности

Оценка цитотоксичности криоструктурированного МККР методом прямого контакта показала отсутствие какого-либо негативного действия на развитие клеток NIH 3T3 (рис. 2).

В течение 72 ч носитель не индуцировал изменений морфологии клеток и снижения их пролиферации (рис. 2*a, 2b*). Полученные данные подтверждают кривые роста клеток при культивировании на культуральном пластике в присутствии криоструктурированного МККР, демонстрирующие увеличение конfluenceности монослоя клеток с динамикой, характерной для данной клеточной

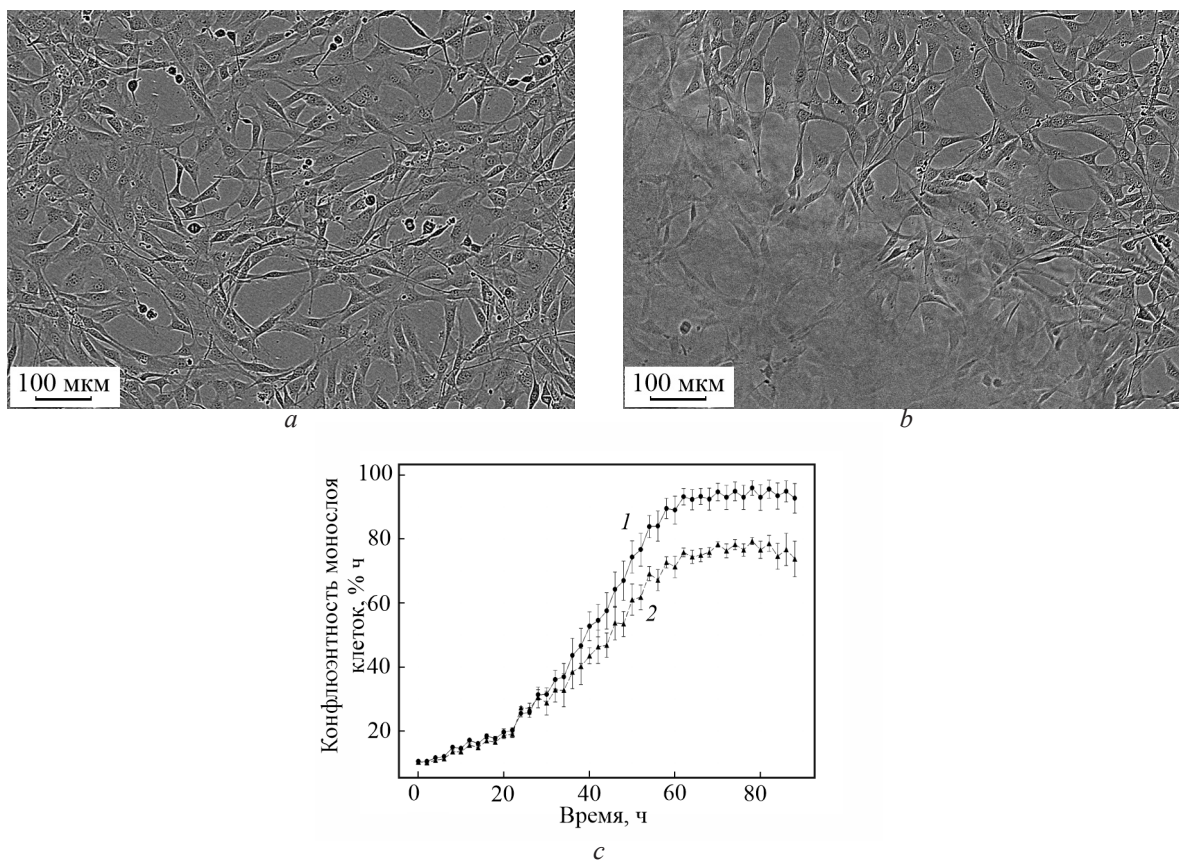


Рис. 2. Цитотоксичность криоструктурированного МККР: *a* — рост фибробластов мыши NIH 3T3 без внесения криогенно-структурированного на основе МККР, 72 ч; *b* — рост фибробластов мыши NIH 3T3 с внесением криогенно-структурированного на основе МККР, 1 сутки; *c* — кривая роста фибробластов мыши NIH 3T3 при культивировании без внесения криоструктурированного МККР (1) и с внесением криоструктурированного МККР (2).

Fig. 2. Cytotoxicity of cryostructured MCCS: *a* — growth of mouse fibroblasts NIH 3T3 without cryogenic-structured MCCS, 72 h; *b* — growth of mouse fibroblasts NIH 3T3 with MCCS, 1 day; *c* — growth curve of mouse fibroblasts NIH 3T3 cultured without MCCS (1) and with cryostructured MCCS (2).

культуры (рис. 2с). Отметим, что для корректного сопоставления данных двух представленных на рис. 2 кривых необходимо введение поправочного коэффициента для опытного варианта 1,12, учитывающего площадь лунки (9,6 см²), занятую образцом (1 см²) и исключаемую при автоматическом анализе изображений. С учетом поправки значимых различий в конfluентности клеточного монослоя на плато в эксперименте выявлено не было (без образца конfluентность монослоя составила $94 \pm 5\%$, а с образцом — $85 \pm 6\%$). Подтвержденная на клетках линии фибробластов мыши NIH 3T3 способность криоструктурированного МККР поддерживать клеточную адгезию и пролиферацию позволила перейти к созданию КИК — культивированию МСК ЖТч на криоструктурированного МККР.

Исследование клеточно-инженерной конструкции

МСК являются терапевтическим инструментом широкого спектра действия благодаря своему секретому, обладающему противовоспалительной, иммуномодулирующей, антиапоптотической и регенеративной активностью [25, 26]. Было показано, что 3D культивирование способствует выработке антиапоптотических, противоопухолевых и противовоспалительных факторов в сравнении с монослойной культурой [27, 28].

Методом прижизненной флуоресцентной микроскопии было показано, что хотя некоторое количество клеток находилось в суспензионном состоянии в культуральной среде, большая часть живых МСК ЖТч успешно прикрепилась и равно-

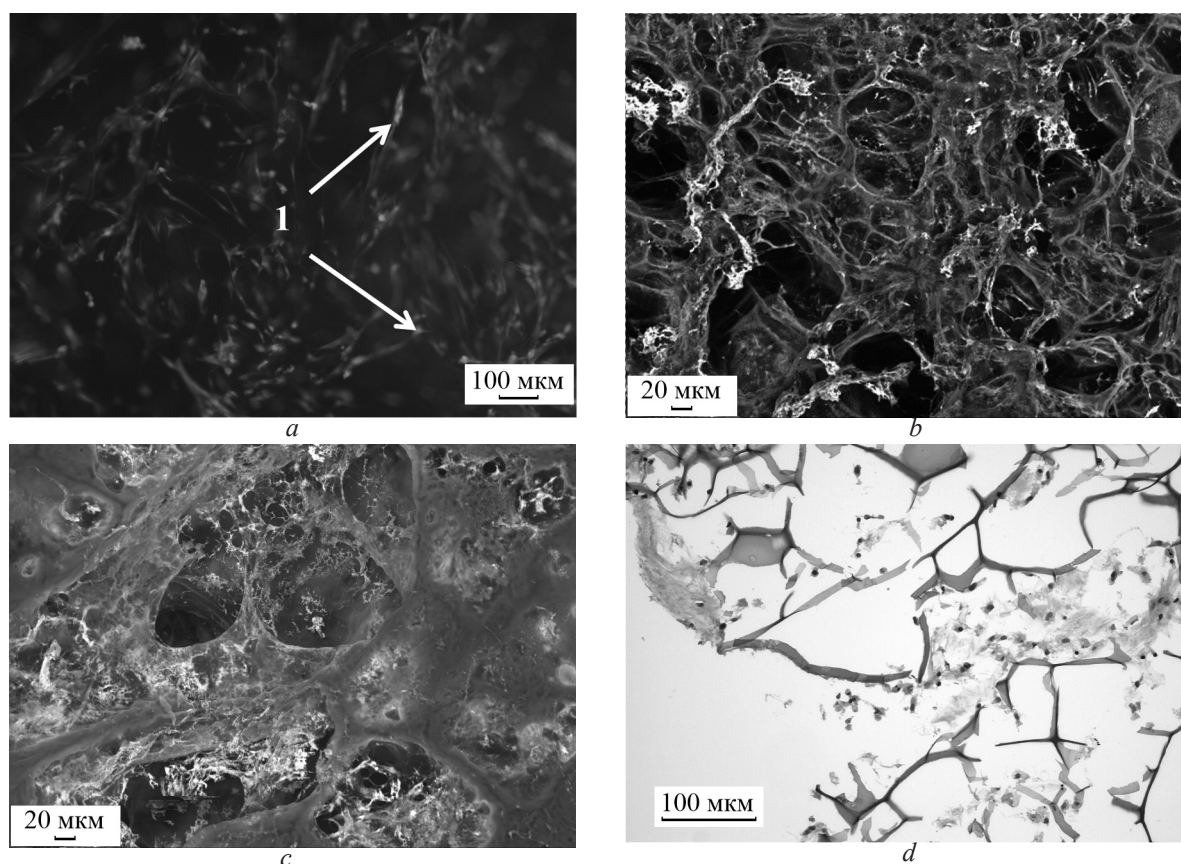


Рис. 3. Морфология КИК на основе криоструктурированного МККР и МСК ЖТч: *a* — жизнеспособность МСК ЖТч при культивировании на криоструктурированном МККР, срок культивирования 7 суток, флуоресцентное окрашивание Calcein AM; *b, c* — СЭМ изображение структуры поверхности с использованием лантоноидного контрастирования BioREE, *b* — сторона 1; *c* — сторона 2; *d* — гистологическая картина поперечного среза диска, окрашивание гематоксилином и эозином.

Fig. 3. Morphology of cell-engineered constructs based on cryostructured MCCS and human adipose-derived stem cells (hADSC): *a* — the viability of hADSC when cultured on cryostructured MCCS, the cultivation period is 7 days, fluorescent staining Calcein AM; *b, c* — SEM images of the surface structure using lantanoide contrasting BioREE, *b* — side 1; *c* — side 2; *d* — histological picture of the cross-section of the disk, staining with hematoxylin and eosin.

мерно распределилась по поверхности матрицы на 7 сутки эксперимента (рис. 3*a*).

Адгезию клеток на поверхности также изучали методом СЭМ. На обеих сторонах диска визуализировали присутствие распластанных клеток, выраженное в виде покрывающей большинство пор пленки, хорошо различимой при сравнении с носителем без клеток (рис. 1*c, 1d, 3b, 3c*). Важно отметить, что клеточная адгезия для большинства клеток млекопитающих играет решающую роль в развитии и поддержании тканей, обуславливая сигналы, которые регулируют клеточный цикл, миграцию, дифференцировку и выживание [29]. При этом на одной стороне носителя пористая поверхность криоструктурата покрыта клетками в большей степени, чем другая, что можно объяс-

нить разницей в диаметре пор или особенностями культивирования. Интересно, что клетки располагались не только на поверхности носителя, но и мигрировали в объем, формируя многоклеточные группы (рис. 3*d*). Заметим, что неравномерность распределения клеток в КИК можно устранить путем культивирования клеток в динамических условиях перфузионного биореактора [30].

Выводы

Показано, что разработанный криоструктурат, полученный на основе концентрированного многокомпонентного коллагенсодержащего раствора, обладает широкопористой структурой, общей водоудерживающей способностью материала

45,80 ± 0,46 г воды на 1 г сухого полимера, степенью набухания материала стенок макропор 3,99 ± 0,31 г сольватной воды на 1 г сухого полимера и компрессионным модулем упругости 35,3 ± 2,2 кПа.

Отсутствие цитотоксичности и способность поддерживать адгезию и пролиферацию МСК ЖТч указывают на возможность использования изученного биомиметика внеклеточного матрикса в тканевой инженерии и регенеративной медицине.

Работы, проводимые в части получения и характеристики образцов криогенно-структурированного материала на основе концентрированного коллагенсодержащего раствора, выполнены при частичном финансировании Министерства науки и образования РФ в рамках Государственного задания №075-03-2023-642 и Академической программы “Приоритет-2030”.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Socci M.C., Rodríguez G., Oliva E. Polymeric materials, advances and applications in tissue engineering: a review. *Bioengineering (Basel)*, 2023, v. 10, no. 2, p. 218. DOI:10.3390/bioengineering10020218.
2. Mazloomnejad R., Babajani A., Kasravi M., Ahmadi A., Shariatzadeh S., Bahrami S., Niknejad H. Angiogenesis and re-endothelialization in decellularized scaffolds: recent advances and current challenges in tissue engineering. *Front Bioeng Biotechnol.*, 2023, v. 11, art. 1103727. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1103727.
3. Peneda Pacheco D., Suárez Vargas N., Visentin S., Petrini P. From tissue engineering to engineering tissues: the role and application of in vitro models. *Biomater Sci.*, 2021, v. 9, no. 1, pp. 70 – 83.
4. Huskin G., Chen J., Davis T., Jun H.W. Tissue-engineered 3D in vitro disease models for high-throughput drug screening. *Tissue Eng. Regen. Med.*, 2023, v. 20, pp. 523 – 538. DOI: 10.1007/s13770-023-00522-3.
5. Sevastianov V.I., Basok Y.B., Kirsanova L.A. et al. A comparison of the capacity of mesenchymal stromal cells for cartilage regeneration depending on collagen-based injectable biomimetic scaffold type. *Life (Basel)*, 2021, v. 11, no. 8, p. 756. doi:10.3390/life11080756.
6. Saldin L.T., Cramer M.C., Velankar S.S., White L.J., Badylak S.F. Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: structure and function. *Acta Biomater.*, 2017, v. 49, pp. 1 – 15.
7. Lozinsky V.I., Okay O. Basic principles of cryotropic gelation. *Adv. Polym. Sci.*, 2014, v. 263, 49 – 101.
8. Lozinsky V.I. Cryostructuring of polymer systems. 50. Cryogels and cryotropic gel-formation: terms and definitions. *Gels*, 2018, v. 4, art. 77.
9. Henderson T.M.A., Ladewig K., Haylock D.N., McLean K.M., O'Connor A.J. Cryogels for biomedical applications. *J. Mater. Chem. B*, 2013, v. 1, pp. 2682 – 2695.
10. Bakhshpour M., Idil M., Perçin I., Denizli A. Biomedical applications of polymeric cryogels. *Appl. Sci.*, 2019, v. 9, art. 553.
11. Perez-Puyana V., Jimenez-Rosado M., Romero A., Guerrero A. Polymer-based scaffolds for soft-tissue engineering. *Polymers*, 2020, v. 12, article 1566.
12. Лозинский В.И., Кулакова В.К., Колосова О.Ю., Басок Ю.Б., Григорьев А.М., Перова Н.В., Севастьянов В.И. Биополимерный материал для клеточно-инженерных и/или тканеинженерных конструкций и способ его получения. Патент РФ № 2774947, 2021, Бюлл. № 18, 2022.
- Lozinsky V.I., Kulakova V.K., Kolosova O.Yu., Basok Y.B., Grigoriev A.M., Perova N.V., Sevastianov V.I. Biopolimernyj material dlya kletочно-inzhenernyh i/ili tkaneinzhenernyh konstrukcij i sposob ego polucheniya [Biopolymer material for cellular engineering and/or tissue engineering structures and a method for its preparation]. RF Patent No. 2774947 (2021); Bull. no. 18, 2022. (In Russ.).
13. 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, v. 8, no. 11, article 695. DOI: 10.3390/gels8110695.
14. Tsvetkova A.V., Vakhrushev I.V., Basok Y.B. et al. Chondrogenic potential of MSC from different sources in spheroid culture. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2021, v. 170, no. 4, pp. 528 – 536. DOI:10.1007/s10517-021-05101-x.
15. Cheng Q., Huang C., Antoni P., Tomsia A.P. Freeze casting for assembling bioinspired structural materials. *Adv. Mater.*, 2017, v. 29, article 1703155.
16. Lozinsky V.I. Cryostructuring of polymeric systems. 55. Retrospective view on the more than 40-years studies performed in the A.N.Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds with respect of the cryostructuring processes in polymeric systems. *Gels*, 2020, v. 6, article 29.
17. Qian L., Zhang H. Controlled freezing and freeze drying: a versatile route for porous and micro-/nano-structured materials. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2011, v. 86, pp. 172 – 184.
18. Преображенский Н.А., Евстигнеева Р.П. Химия биологически активных природных соединений. М.: Химия, 1970, 512 с.
- Preobrazhenskii N.A., Evstigneeva R.P. Himiya biologicheski aktivnyh prirodnyh soedinenij [Chemistry of biologically active natural compounds]. Moscow, Chemistry Publ., 1970, 512 p. (In Russ.).
19. Van Vierberghe S., Dubruel P., Schacht E. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering

- applications: a review. *Biomacromolecules*, 2011, v. 12, pp. 1387 – 1408.
20. Papageorgiou G.C., Lagoyanni T. Immobilization of photosynthetically active cyanobacteria in glutaraldehyde-crosslinked albumin matrix. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1986, v. 23, pp. 417 – 423.
 21. Rodionov I.A., Grinberg N.V., Burova T.V., Grinberg V.Ya., Lozinsky V.I. Cryostructuring of polymeric systems. Proteinaceous wide-pore cryogels generated by the action of denaturant/reductant mixtures on bovine serum albumin in moderately-frozen aqueous media. *Soft Matter*, 2015, v. 11, 4921 – 4931.
 22. Oelschlaeger C., Bossler F., Willenbacher N. Synthesis, structural and micromechanical properties of 3D hyaluronic acid-based cryogel scaffolds. *Biomacromolecules*, 2016, v. 17, pp. 580 – 589.
 23. Chung C., Burdick J.A. Engineering cartilage tissue. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2008, v. 60, no. 2, pp. 243 – 262. DOI: 10.1016/j.addr.2007.08.027.
 24. Razavi M., Qiao Y., Thakor A.S. Three-dimensional cryogels for biomedical applications. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2019, v. 107, no. 12, pp. 2736 – 2755. DOI: 10.1002/jbm.a.36777.
 25. Madrigal M., Rao K.S., Riordan N.H. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J. Transl. Med.*, 2014, v. 12, p. 260. DOI: 10.1186/s12967-014-0260-8
 26. Han Y., Yang J., Fang J. et al. The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases. *Sig. Transduct. Target. Ther.*, 2022, v. 7, no. 1, p. 92. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00932-0>.
 27. Bartosh T.J., Ylöstalo J.H., Mohammadipoor A. et al. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, v. 107 (31), pp. 13724 – 13729. DOI:10.1073/pnas.1008117107.
 28. Bartosh T.J., Ylöstalo J.H., Bazhanov N., Kuhlman J., Prockop D.J. Dynamic compaction of human mesenchymal stem/precursor cells into spheres self-activates caspase-dependent IL1 signaling to enhance secretion of modulators of inflammation and immunity (PGE2, TSG6, and STC1). *Stem Cells*, 2013, v. 31, no. 11, pp. 2443 – 2456. DOI:10.1002/stem.1499.
 29. Khalili A.A., Ahmad M.R. A review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, v. 16, pp. 18149 – 18184. DOI: 10.3390/ijms160818149.
 30. Севастьянов В.И., Григорьев А.М., Басок Ю.Б. и др. Биосовместимые и матриксные свойства полилактидных губок. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*, 2018, т. 20, № 2, с. 82 – 90. DOI:10.15825/1995-1191-2018-2-82-90.
 - Sevastianov V.I., Grigoriev A.M., Basok Y.B. et al. Biosovmestimye i matriksnye svojstva polilaktidnyh губок [Biocompatible and matrix properties of polylactide sponges]. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov [Bulletin of Transplantology and artificial Organs]*, 2018, v. 20, no. 2, pp. 82 – 90. (In Russ.).

*Статья поступила в редакцию — 22.05.2023 г.
после доработки — 06.06.2023 г.
принята к публикации — 07.06.2023 г.*

Басок Юлия Борисовна — Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова, Министерства Здравоохранения Российской Федерации (123182, Москва, ул. Щукинская, 1), доктор биологических наук, заведующий отделом биомедицинских технологий и тканевой инженерии специалист в области биоматериаловедения, тканевой инженерии, регенеративной медицины и систем доставки лекарственных веществ. E-mail: bjb2005@mail.ru.

Григорьев Алексей Михайлович — Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова, Министерства Здравоохранения Российской Федерации (123182, Москва, ул. Щукинская, 1), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, специалист в области тканевой инженерии и регенеративной медицины. E-mail: bear-38@yandex.ru.

Лозинский Владимир Иосифович — Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (119991, Москва, ул. Вавилова, д. 28, стр. 1), доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией криохимии (био)полимеров; Казанский (Приволжский) Федеральный Университет (420008, Казань, ул. Кремлёвская, 18), ведущий научный сотрудник кафедры микробиологии. E-mail: loz@ineos.ac.ru.

Кирсанова Людмила Анфилофьевна — Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова, Министерства Здравоохранения Российской Федерации (123182, Москва, ул. Щукинская, 1), старший научный сотрудник, специалист в области в области тканевой инженерии и регенеративной медицины. E-mail: lyudochkakirsanova@mail.ru.

Кулакова Валентина Кирилловна — Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (119991, Москва, ул. Вавилова, 28, стр. 1), младший научный сотрудник лаборатории криохимии (био)полимеров. E-mail: kulakova@ineos.ac.ru.

Подорожко Елена Анатольевна — Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (119991, Москва, ул. Вавилова, 28, стр. 1), кандидат технических наук, старший научный сотрудник лаборатории криохимии (био)полимеров. E-mail: erodorozhko@mail.ru.

Новиков Иван Александрович — Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова (119021, Москва, ул. Россолимо 11А, Б), старший научный сотрудник лаборатории фундаментальных исследований в офтальмологии, специалист в области сканирующей электронной микроскопии. E-mail: ivan.a.novikov@gmail.com.

Севастьянов Виктор Иванович — АНО Институт медико-биологических исследований и технологий (123557, Москва, Б. Тишинский пер., 43/29, стр. 2), директор; Национальный медицинский исследовательских центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова, Министерства Здравоохранения Российской Федерации (Москва, 123182, ул. Щукинская, 1), доктор биологических наук, профессор, главный специалист отдела подготовки научных и медицинских кадров; специалист в области биоматериаловедения, тканевой инженерии, регенеративной медицины, систем доставки лекарственных веществ. E-mail: viksev@yandex.ru.

Cryogenically structured mimetic of extracellular matrix based on a concentrated collagen-containing solution

**Yu. B. Basok, A. M. Grigoriev, V. I. Lozinsky, L. A. Kirsanova, V. K. Kulakova,
E. A. Podorozhko, I. A. Novikov, V. I. Sevastianov**

Viscoelastic hydrogels based on animal tissue extracts are considered promising biomimetics of the extracellular matrix (ECM) due to their proven effectiveness for stimulating the regeneration of the liver, pancreas and articular cartilage. Cryostructuring is an approach that makes it possible to give polymer scaffolds macroporosity and provide mechanical strength. Preparation of a new macroporous cryogenically structured biomimetic of ECM based on a commercially available concentrated collagen-containing solution and evaluation of the possibilities of its application in tissue engineering. The target spongy collagen-containing material was obtained by sequential freezing of a concentrated collagen-containing solution, its subsequent lyophilization and chemical tanning by treatment with an alcohol solution of carbodiimide. The morphology of the cryostructured multicomponent collagen-containing material was studied using optical and scanning electron microscopy (SEM) using lanthanide contrast. The cytotoxicity of the scaffold was studied on the culture of human adipose-derived stem cells (hADSCs). Adhesion and proliferation of hADSCs on the scaffold surface were studied on the 7th day of cultivation. The compression modulus of elasticity of the obtained collagen-containing material in the swollen state in water was 35.3 ± 2.2 kPa, the total water-holding capacity of the material was 45.80 ± 0.46 ml/g of polymer, and the degree of swelling of the walls of macropores was 3.99 ± 0.31 ml/g. During SEM examination and histological staining with hematoxylin and eosin, a broad-pored structure was observed on the surface and cross-section of the disc. The pores in the upper part are larger (the average diameter is not less than ~ 30 μm) than the pores in the lower part of the sponge (the average diameter is not more than ~ 30 μm) due to the occurrence of a vertical temperature gradient. The matrix did not have cytotoxicity relative to the hADSCs. In the sample, active proliferation of hADSCs was observed on the surface of the scaffold. It was shown that the developed cryostructures based on a concentrated collagen-containing solution had supermacroporosity and a compression modulus of elasticity of 35.3 ± 2.2 kPa. The absence of cytotoxicity and the ability to maintain adhesion and proliferation of hADSCs indicate the possibility of using cryogenically structured biomimetic of the extracellular matrix in tissue engineering and regenerative medicine.

Keywords: cryostructuring, extracellular matrix, biomimetic, cell carrier, tissue engineering, regenerative medicine.

Basok Yulia — V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (123182, Moscow, Schukinskaya street, 1), Doctor of Science in Biology, the Head of the Department for Biomedical Technology and Tissue Engineering, specialist in biomaterials, tissue engineering, regenerative medicine and drug delivery systems. E-mail: bjb2005@mail.ru.

Grigoriev Alexey — V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (123182, Moscow, Schukinskaya street, 1), PhD (Biology), senior researcher fellow of Department for biomedical technology and tissue engineering, specialist in tissue engineering and regenerative medicine. E-mail: bear-38@yandex.ru.

Lozinsky Vladimir — A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences (119991, Moscow, Vavilova str., 28, building 1), Doctor of Science in chemistry, professor, the Head of the laboratory of cryochemistry of (bio) polymers. E-mail: loz@ineos.ac.ru.

Kirsanova Ludmila — V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (123182, Moscow, Schukinskaya street, 1), PhD (Biology), senior researcher fellow of the Department for biomedical technology and tissue engineering, specialist in tissue engineering and regenerative medicine. E-mail: lyudochkakirsanova@mail.ru.

Kulakova Valentina — A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences (119991, Moscow, Vavilova str., 28, building 1), junior researcher fellow of the laboratory of cryochemistry of (bio) polymers. E-mail: kulakova@ineos.ac.ru.

Podorozhko Elena — A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences (119991, Moscow, Vavilova str., 28, building 1), PhD (Engineering), senior research fellow of the laboratory of cryochemistry of (bio) polymers. E-mail: epodorozhko@mail.ru.

Novikov Ivan — Scientific Research Institute of Eye Diseases (119021, Moscow, Rossolimo str., 11A, B), senior research fellow of the laboratory of fundamental research in ophthalmology, specialist in scanning electron microscopy. E-mail: ivan.a.novikov@gmail.com.

Sevastianov Viktor — The Institute of Biomedical Research and Technology (123557, Moscow, B. Tishinsky lane, 43/20, building 2), Head; V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (123182, Moscow, Schukinskaya street, 1), Main Expert of Department of scientific and medical personnel training, professor, Doctor of Science in Biology; specialist in biomaterials, tissue engineering, regenerative medicine and drug delivery systems. E-mail: viksev@yandex.ru.