

DOI: 10.15825/1995-1191-2023-2-118-128

# ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВО-ПЕПТИДНОГО БИОРЕГУЛЯТОРА СКЛЕРЫ, ВКЛЮЧЕННОГО В АЛЬБУМИНОВЫЙ КРИОГЕЛЬ, НА СОСТОЯНИЕ СКЛЕРАЛЬНОЙ ОБОЛОЧКИ ПРИ МОДЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ЗАДНЕГО ОТДЕЛА ГЛАЗА

О.В. Ямскова<sup>1</sup>, М.С. Краснов<sup>1</sup>, Е.В. Сидорский<sup>1, 2</sup>, В.И. Лозинский<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт элементоорганических соединений имени А.Н. Несмеянова Российской академии наук», Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Институт проблем биорегуляции, Москва, Российская Федерация

Задача доставки биологически активных веществ в определенные положения в организме человека и животного является актуальной в настоящее время, для ее решения авторами настоящей публикации был разработан носитель биологически активных веществ с замедленным высвобождением вещества, представляющий собой альбуминовый криогель, полученный методом криоструктурирования, и проведено его тестирование на модели органного культивирования заднего отдела глаза тритона. **Цель работы** – изучение эффективности пористого криогеля, полученного путем криоструктурирования из альбумина и нагруженного биорегулятором из склеры глаза быка в различных количествах, в поддержании целостности тканей глаза и сохранности фибробластов тритонов *Pleurodeles waltl* на модели органного культивирования. **Материалы и методы.** Альбуминовые губки получали в присутствии денатурирующего агента при температурах  $-15$ ,  $-17,5$  и  $-20$  °С, концентрациях альбумина 40, 50 и 60 мг/мл в криостате и определяли их модуль упругости. Ткани глаз изолировали у взрослых половозрелых тритонов *Pleurodeles waltl* обоего пола, задний сектор каждого глаза помещали на губчатый образец альбуминового криогеля в пенициллиновые флаконы, закрывали и ставили в термостат. По окончании культивирования образцы фиксировали, промывали, обезвоживали, заливали в парафин и делали парафиновые срезы с последующим окрашиванием. Для просмотра гистологических срезов использовали микроскоп Leica (Германия) с фотокамерой Olympus DP70 (Япония). Оценку количества фибробластов на гистологических срезах осуществляли по программе ImageJ. **Результаты.** Для эксперимента органного культивирования был выбран криогель с концентрацией исходного раствора альбумина 50 мг/мл, полученный при температуре  $-20$  °С с модулем упругости 4,50 кПа. Согласно результатам гистологических исследований, целостность тканей глаза поддерживается в эксперименте при нагрузке альбуминовой подложки биорегулятором в дозах  $2,46 \times 10^{-5}$ ,  $2,46 \times 10^{-7}$ ,  $2,46 \times 10^{-9}$ ,  $2,46 \times 10^{-13}$ ,  $2,46 \times 10^{-15}$  мкг, причем статистически значимая разница для данных по количеству фибробластов на единицу площади в склере частично коррелирует с качественным состоянием самих тканей заднего отдела глаза, наилучший результат по сравнению с контролем показали группы, где доза биорегулятора из склеры составила  $2,46 \times 10^{-7}$ ,  $2,46 \times 10^{-9}$  и  $2,46 \times 10^{-15}$  мкг. **Выводы.** Полученные результаты свидетельствуют об эффективности альбуминовой подложки в качестве носителя с сорбированным на ней биорегулятором (дозы  $2,46 \times 10^{-5}$ ,  $2,46 \times 10^{-7}$ ,  $2,46 \times 10^{-9}$ ,  $2,46 \times 10^{-13}$ ,  $2,46 \times 10^{-15}$  мкг) в поддержании целостности тканей глаза и сохранности фибробластов тритонов *Pleurodeles waltl*, и показывают эффективность применения альбуминового криогеля в качестве носителя для замедленного высвобождения биологически активных веществ.

*Ключевые слова:* системы адресной доставки биологически активных веществ, альбуминовый криогель, модуль упругости, органное культивирование, биорегулятор, протекторные свойства.

Для корреспонденции: Краснов Михаил Сергеевич. Адрес: 119991, Москва, ул. Вавилова, 28.  
Тел. (499) 135-64-92. E-mail: embrmsk@mail.ru

Corresponding author: Mikhail Krasnov. Address: 28, Vavilova str., Moscow, 119991, Russian Federation.  
Phone: (499) 135-64-92. E-mail: embrmsk@mail.ru

# INFLUENCE OF PROTEIN-PEPTIDE BIOREGULATOR ISOLATED FROM BOVINE SCLERA AND INCORPORATED INTO AN ALBUMIN-BASED CRYOGEL ON THE SCLERA IN A MODEL CULTIVATION OF A POSTERIOR EYE SEGMENT

O.V. Yamskova<sup>1</sup>, M.S. Krasnov<sup>1</sup>, E.V. Sidorsky<sup>1, 2</sup>, V.I. Lozinsky<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Institute for Biomedical Problems, Moscow, Russian Federation

Delivering bioactive substances to certain spots in the human and animal body is a crucial task. To address this problem, we have developed a delayed-release bioactive substance carrier – an albumin-based cryogel obtained by cryostructuring. It was tested on an organotypic culture model of the posterior eye segment of a newt.

**Objective:** to study the effectiveness of porous albumin-based cryogel obtained by cryostructuring and loaded with a bioregulator isolated from bovine sclera in different quantities in maintaining eye tissue integrity and preserving Iberian ribbed newt fibroblasts on an organotypic culture model. **Materials and methods.** Albumin sponges were obtained after being denatured at temperatures  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-17.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , with albumin levels 40 mg/mL, 50 mg/mL, and 60 mg/mL in a thermostatic cooler. Their modulus of elasticity was measured. Eye tissues were isolated from adult sexually mature Iberian ribbed newts of both sexes. The posterior segment of each eye was placed on a sponge sample of albumin cryogel in penicillin vials, sealed and placed in a thermostat. At the end of cultivation, the samples were fixed, washed, dehydrated, and embedded in paraffin. Paraffin sections were made, followed by staining. A Leica microscope (Germany) with an Olympus DP70 camera (Japan) was used to view histological sections. Fibroblast count in the histological sections was estimated using the ImageJ program. **Results.** Cryogel with initial albumin solution levels of 50 mg/mL obtained at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  with 4.50 kPa elastic modulus, was chosen for the organ culture experiment. Histological studies showed that eye tissue integrity was maintained in the experiment when albumin-based scaffold was loaded with the bioregulator at doses of  $2.46 \times 10^{-5}$ ,  $2.46 \times 10^{-7}$ ,  $2.46 \times 10^{-9}$ ,  $2.46 \times 10^{-13}$ ,  $2.46 \times 10^{-15}$   $\mu\text{g}$ . Moreover, the statistically significant difference for fibroblast count per unit area in the sclera partially correlates with the qualitative state of the posterior eye tissue itself. Groups where bioregulator isolated from the sclera had a dose of  $2.46 \times 10^{-7}$ ,  $2.46 \times 10^{-9}$  and  $2.46 \times 10^{-15}$   $\mu\text{g}$ , showed the best result as compared with the control group. **Conclusion.** Albumin-based scaffold as a carrier with a bioregulator adsorbed on it (doses of  $2.46 \times 10^{-5}$ ,  $2.46 \times 10^{-7}$ ,  $2.46 \times 10^{-9}$ ,  $2.46 \times 10^{-13}$ ,  $2.46 \times 10^{-15}$   $\mu\text{g}$ ) is effective in maintaining eye tissue integrity and preserving Iberian ribbed newt fibroblasts. Albumin cryogen is an effective carrier for delayed release of bioactive substances.

*Keywords: targeted drug-delivery systems, albumin cryogel, elastic modulus, organ culturing, bioregulator, protective properties.*

## ВВЕДЕНИЕ

Задачи адресной доставки биологически активных веществ (БАВ) в определенные органы и ткани организма человека или животного в настоящее время являются весьма актуальными [1–3]. Такие системы доставки наиболее часто состоят из двух основных компонентов – собственно БАВ и носителя, обеспечивающего транспорт и высвобождение действующего начала в зоне соответствующей мишени [4]. Подобные носители используются в различных формах, например, в виде наночастиц и наноконтейнеров, липосом, полимерных мицелл, гелей и др. [5]. В последние годы все большую популярность среди носителей БАВ приобретают различные биоразлагаемые губки, особенно на основе таких полимеров природного происхождения, как белки и полисахариды [6–12]. Важным достоинством подобных носителей является их хорошая биосовместимость, низкая иммуногенность и нетоксичность

как самих губок, так и продуктов их резорбции или деградации при гидролизе в организме реципиентов. В частности, эффективными носителями и низкомолекулярных, и высокомолекулярных БАВ оказались губки на основе денатурированного сывороточного альбумина [13–15]. Эти биополимерные материалы были получены методом так называемого криоstructuring [16–18], позволяющего формировать макропористые и сверхмакропористые (губчатые) полимерные матрицы при неглубоком замораживании растворов соответствующих предшественников, когда поликристаллы замерзшего растворителя действуют как порообразователи [16, 19, 20]. К достоинствам именно таких альбуминовых губок относится возможность простыми приемами варьировать их размер, форму, пористость и упругость, а также дозу БАВ, которыми носитель нагружен для достижения необходимого терапевтического результата лечения.

Например, было продемонстрировано, что одним из перспективных вариантов биомедицинского применения данных криогенно-структурированных альбуминовых губок является их использование в качестве 3D-носителей для тканеспецифичных белково-пептидных биорегуляторов, активирующих процессы репарации [15, 21–23]. В настоящей работе мы использовали биорегулятор, выделенный из склеры глаза быка, поскольку указанный пептидно-белковый комплекс, добавленный в среду культивирования, обладает, как было показано ранее, протекторным эффектом на состояние тканей заднего отдела глаза [24]. Пептидно-белковый комплекс, выделенный из склеры, состоит из пептидов с молекулярными массами 1054–5080 Да, а также из бычьего сывороточного альбумина с молекулярной массой 66 385 Да. Биологической активностью обладает именно сам комплекс пептидов и указанного белка, поскольку отдельные его компоненты не показали выраженных эффектов на поддержание жизнеспособности клеток и тканей заднего отдела глаза при культивировании [24]. При этом особое внимание теперь было уделено влиянию количества (дозы) такого биорегулятора, включенного в альбуминовую губку, на протекторную активность, проявляемую данной системой доставки БАВ, что и являлось целью этого исследования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Получение криогенно-структурированных альбуминовых носителей

Синтез альбуминовых губок проводили по модифицированной известной методике [25]. Бычий сывороточный альбумин (99%) (ДИА-М, Москва, РФ) растворяли в рассчитанном объеме воды, куда затем вносили мочевины (о. с. ч.) (РЕАХИМ, Москва, РФ), помещали раствор в ледяную баню и добавляли необходимый объем водного раствора L-цистеина (ultra grade) (Fluka, Швейцария). Концентрации компонентов в приготовленных таким образом реакционных растворах были следующими: альбумин – 40, или 50, или 60 мг/мл; мочевины – 1,5 моль/л; цистеин – 0,01 моль/л. Такие растворы порциями в 1,5 мл вносили в стеклянные флаконы (внутренний диаметр 22 мм) либо порциями по 3 мл в ячейки пластикового 24-луночного планшета. Растворы замораживали в течение 24 ч в камере программируемого ультракриостата Proline 1840 (Lauda, Германия): образцы во флаконах – при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , образцы в планшете – или при  $-15$ , или  $-17,5$ , или  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , а затем оттаивали при комнатной температуре. Получившиеся в результате губчатые альбуминовые криогели исчерпывающе промывали простерилизованной водой от растворимых веществ и до дальнейшего использования хранили в закрытой таре при  $4-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### Определение модуля упругости альбуминовых губок

Измерения модуля упругости набухших в воде альбуминовых губок проводили на цилиндрических образцах диаметром 16 мм и высотой 20 мм. Такие измерения были выполнены в соответствии с методикой, ранее применявшейся для случая мягких губчатых криогелей [26]. Набухшую альбуминовую губку помещали в наполненный водой стеклянный стакан, чтобы компенсировать капиллярные силы при выдавливании жидкости из сообщающихся макропор при одноосном сжатии цилиндрического образца. Для минимизации выталкивающей архимедовой силы использовался пуансон «тарельчатого» типа диаметром 10 мм и толщиной 2 мм, подсоединенный к держателю автоматического анализатора текстуры а TA-Plus (Lloyd Instruments, Великобритания). Сжатие выполняли со скоростью 0,3 мм/мин до деформации 50%, а значение компрессионного модуля упругости ( $E$ ) определяли с помощью программного обеспечения прибора. Выборка для определения модуля упругости включала 6–8 образцов на точку. Усреднение полученных величин проводили в программе Excel 2010. Также количественные данные были проанализированы с помощью программного пакета SPSS 26.0 (IBM, США). Значения модуля упругости, имеющие распределение, отличное от нормального, представлены в виде медианы ( $Me$ ) и 25% ( $Q1$ ) и 75% ( $Q3$ ) процентилей. Статистическую значимость различий между двумя независимыми группами оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. При сравнении трех и более независимых групп использовали непараметрический дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса с поправкой Данна для апостериорного анализа. Достоверными считали различия при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### Включение белково-пептидного биорегулятора в альбуминовую губку

Биорегулятор из ткани склеры глаза быка был выделен согласно ранее описанной методике [27]. На основе полученного раствора с концентрацией биорегулятора 0,3 мг/мл с помощью последовательных десятикратных разбавлений готовили рабочие растворы с целевыми концентрациями от  $3 \times 10^{-4}$  до  $3 \times 10^{-20}$  мг/мл. Для включения биорегулятора в альбуминовый носитель набухшую в воде губку, сформированную в стеклянном флаконе, помещали на стеклянный фильтр и в течение 3 мин под вакуумом водоструйного насоса удаляли свободную жидкость, после чего «отжатый» таким образом материал помещали в водный раствор с известной концентрацией биорегулятора, где губка быстро набухала. Образец инкубировали в течение 4 ч при  $4-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ , а затем замораживали при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  и высушивали лиофильно

с помощью сублимационной установки FreeZone<sup>1</sup> (Labconco, США).

Масса (доза в микрограммах) биорегулятора, включенная в губчатый носитель, рассчитывалась в соответствии с концентрацией биорегулятора и объемом жидкости, поглощенной губкой при набухании. Образцы сравнения (2 группы) – губки, которые инкубировали в воде без добавок.

### **Исследование активности нагруженного биорегулятором губчатого альбуминового носителя на модели органного культивирования заднего отдела глаза**

Исследования проводили на препаратах глаз взрослых половозрелых тритонов *Pleurodeles waltl* обоего пола, взятых из аквариальной Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (Россия). В каждом эксперименте использовали не менее 17 животных (34 глаза). Тритоны были наркотизированы в 2% растворе этилуретана в физиологическом растворе для амфибий (0,65% NaCl). После наркотизации головы животных ополаскивали 70% 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%) [28]. Среда для культивирования тканей глаза содержала: 350 мл среды 199, 150 мл бидистиллированной воды, 0,15 мл 1,0 М буфера HEPES и 1 мл 1% гентамицина. Перед внесением во флаконы среду стерилизовали холодным способом, пропуская через мембранные фильтры типа «СА» («Nalgene», США) с размером пор 0,2 мкм. Под бинокулярной линзой изолировали ткани глаз в следующей последовательности: освобождали глаза от кожных покровов, затем разрезали по окружности, проксимальнее лимба. Ростовую область сетчатки 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.

Экспериментальные образцы были разделены на 11 групп при культивировании заднего отдела глаза:

1. Контроль – на дне стеклянного флакона в отсутствие альбуминового носителя.
2. Контроль – на альбуминовом носителе без биорегулятора.
3. На альбуминовой губке, нагруженной  $2,46 \times 10^{-1}$  мкг биорегулятора.
4. На альбуминовой губке, нагруженной  $2,46 \times 10^{-3}$  мкг биорегулятора.
5. На альбуминовой губке, нагруженной  $2,46 \times 10^{-5}$  мкг биорегулятора.
6. На альбуминовой губке, нагруженной  $2,46 \times 10^{-7}$  мкг биорегулятора.
7. На альбуминовой губке, нагруженной  $2,46 \times 10^{-9}$  мкг биорегулятора.
8. На альбуминовой губке, нагруженной  $2,46 \times 10^{-11}$  мкг биорегулятора.
9. На альбуминовой губке, нагруженной  $2,46 \times 10^{-13}$  мкг биорегулятора.
10. На альбуминовой губке, нагруженной  $2,46 \times 10^{-15}$  мкг биорегулятора.
11. На альбуминовой губке, нагруженной  $2,46 \times 10^{-17}$  мкг биорегулятора.

В опытных экспериментальных группах (3–11) задний отдел глаза тритона помещали на нагруженный биорегулятором в соответствующей концентрации губчатый образец, находящийся в пенициллиновом флаконе, промытом стерильной культуральной средой и затем заполненный бессывороточной средой (среда 199 без добавления сыворотки). Все флаконы закрывали стерильными крышками, затем пленкой ParafilmM (США) и помещали 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% этанолом, далее обезвоживали и заливали в парафин. Делали парафиновые срезы толщиной 7 мкм, используя микротом ERM 4000 (Hestion, Австралия), которые после депарафинирования и гидратирования окрашивали гематоксилином, эозином и заключали под покровное стекло с добавлением адгезирующей жидкости. Для просмотра гистологических срезов использовали микроскоп Leica (Германия) с фотокамерой Olympus DP70 (Япония). Оценку количества фибробластов на гистологических срезах осуществляли по программе ImageJ, оценивая количество фибробластов склеры на 1 мм<sup>2</sup> ткани. Для каждой экспериментальной точки было исследовано не менее 50 срезов. Полученные результаты обрабатывали по критерию Манна–Уитни и критерию Стьюдента.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Получение губчатых альбуминовых носителей и их физико-механические свойства**

Физико-механические характеристики носителей БАВ важны с точки зрения эксплуатационных свойств систем доставки, поскольку во многом определяют операционные возможности соответствующих препаратов, особенно в условиях их применения *in vivo*. Так как полученные в данной работе криогенно-структурированные альбуминовые губки далее

тестировались в качестве носителей пептидно-белкового биорегулятора в модельных экспериментах по культивированию заднего отдела глаза, когда губка находилась в гидратированном состоянии, то важно было оценить механические показатели носителя в применяемых условиях, т. е. в водной среде. При этом мы еще проварьировали концентрацию альбумина в использованных для получения губчатых носителей исходных растворах, а также температуру криогенной обработки этих растворов, что, как из-

вестно [16, 19, 20], влияет на пористую морфологию полимерных криогелей.

Измерения значений компрессионного модуля упругости полученных губчатых материалов проводились с помощью автоматического текстурометра (см. Экспериментальную часть) с использованием пуансона «тарельчатого» типа (рис. 1), а результаты этих измерений суммированы в таблице.

Полученные результаты наглядно свидетельствуют, что повышение концентрации белка в исходных растворах приводило к формированию, по крайней

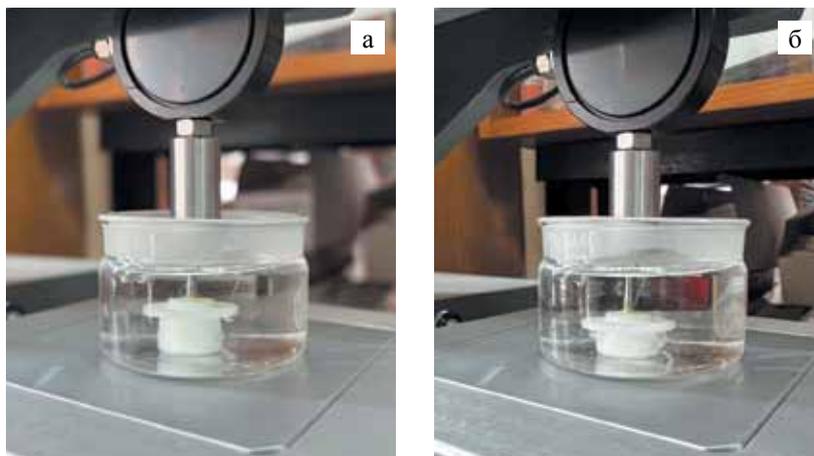


Рис. 1. Фотографии образца набухшей в воде криогенно-структурированной альбуминовой губки: а – до начала действия компрессионной нагрузки; б – во время деформации при действии приложенной нагрузки

Fig. 1. Photographs of a sample of water-swollen cryo-structured albumin sponge: а – before the onset of the effect of compression load; б – during deformation under the applied load

Таблица

**Значения компрессионного модуля упругости (*E*) набухших в воде альбуминовых криогелей, сформированных из исходных растворов с разным содержанием альбумина их замораживанием при трех отрицательных температурах**

**Compression modulus of elasticity (*E*) of water-swollen albumin-based cryogels formed from initial solutions with different albumin content by freezing at three negative temperatures**

Концентрация альбумина в исходном растворе (мг/мл)	<i>E</i> (кПа) альбуминовых губок, сформированных замораживанием при температуре:					
	–15,0 °С		–17,5 °С		–20,0 °С	
(А) Значения <i>E</i> , усредненные с помощью программы Excel 2010						
40	4,16 ± 0,46		4,07 ± 1,07		2,98 ± 0,45	
50	5,24 ± 0,22		5,03 ± 0,45		4,50 ± 0,76	
60	7,31 ± 0,82		5,71 ± 0,93		4,91 ± 1,08	
(Б) Значения <i>E</i> , найденные при статистической обработке экспериментальных величин с помощью программного пакета SPSS 26.0						
	Me [Q1–Q3]	p	Me [Q1–Q3]	p	Me [Q1–Q3]	p
40	3,93 [3,74–4,77]	0,001* p <sub>40–50</sub> = 0,088*	4,25 [3,43–4,89]	0,014* p <sub>40–50</sub> = 0,105	2,97 [2,57–3,18]	0,005* p <sub>40–50</sub> = 0,006*
50	5,20 [5,08–5,43]	0,001* p <sub>40–60</sub> = 0,001*	4,96 [4,78–5,22]	0,014* p <sub>40–60</sub> = 0,004*	4,94 [3,64–5,05]	0,005* p <sub>40–60</sub> = 0,004*
60	7,42 [6,06–8,44]	0,001* p <sub>50–60</sub> = 0,031*	5,58 [4,98–6,17]	0,014* p <sub>50–60</sub> = 0,194	4,86 [3,49–5,78]	0,005* p <sub>50–60</sub> = 0,092

\* – различия показателей статистически значимы (p < 0,05).

\* – differences are statistically significant (p < 0.05).

мере, в интервале отрицательных температур от  $-15$  до  $-20$  °С, криогенно-структурированных альбуминовых губок с более высокими значениями компрессионного модуля упругости (с достоверностью  $p < 0,001$  в случае образцов, синтезированных при  $-15$  °С;  $p = 0,014$  для криогелей, сформированных при  $-17,5$  °С; и  $p = 0,005$  для образцов, полученных при  $-20$  °С). При этом по абсолютной величине усредненные значения  $E$  (табл., А) и соответствующие модули упругости, найденные при статистической обработке экспериментальных данных (табл., Б), почти не отличались, тем самым подчеркивая надежность полученной информации.

При одинаковой концентрации белка в исходной гелеобразующей системе более упругие губчатые образцы получались в случае температуры криогенной обработки  $-15$  °С. Однако, учитывая литературные данные [25] об эффективности криотропного гелеобразования альбумина в зависимости от условий замораживания его начальных растворов при тех же минусовых температурах ( $-15,0$ ;  $-17,5$  и  $-20$  °С), а также информацию, полученную в предварительных опытах по оценке удобства работы с полученными губчатыми носителями при органном культивировании биологической модели, для дальнейшего использования в нашем исследовании были выбраны альбуминовые губки, синтезированные замораживанием при  $-20$  °С реакционных растворов с концентрацией белка 50 мг/мл.

### Результаты органного культивирования заднего отдела глаза тритона с использованием губчатых альбуминовых носителей, нагруженных биорегулятором

При подсчете количества клеток (фибробласты) в склеральной оболочке после культивирования заднего отдела глаза тритона *Pl. waltil* на альбуминовой губке без биорегулятора, а также содержащей биорегулятор в разных дозах (см. Экспериментальную часть), были получены результаты, приведенные в виде диаграмм на рис. 2.

При культивировании заднего отдела глаза на альбуминовых губках в экспериментальных группах 5, 6, 7, 9 и 10, когда доза биорегулятора в носителе была соответственно  $2,46 \times 10^{-5}$ ,  $2,46 \times 10^{-7}$ ,  $2,46 \times 10^{-9}$ ,  $2,46 \times 10^{-13}$  и  $2,46 \times 10^{-15}$  мкг, количество фибробластов в склере оказалось достоверно выше, чем в группе 1, где культивирование заднего отдела глаза проводили без альбуминовой губки, а задний отдел глаза тритона был помещен непосредственно на дно стеклянного флакона для культивирования. Кроме того, в экспериментальных группах 6, 7 и 10, где доза биорегулятора, включенного в губчатый носитель, была соответственно  $2,46 \times 10^{-7}$ ,  $2,46 \times 10^{-9}$  и

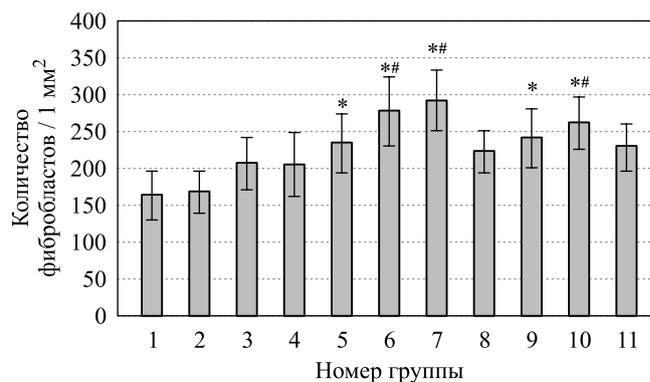


Рис. 2. Количество фибробластов на единицу площади склеры в различных экспериментальных группах после культивирования заднего отдела глаза. \* – достоверные отличия от 1-й группы контроля (без альбуминового носителя),  $p < 0,05$ ; # – достоверные отличия от 2-й группы контроля (альбуминовая губка без включенного в нее биорегулятора),  $p < 0,05$

Fig. 2. Fibroblast count per unit sclera area in different experimental groups after cultivation of the posterior part of the eye. \* – significant differences  $p < 0.05$  from control group 1 (without albumin carrier); # – significant differences  $p < 0.05$  from control group 2 (albumin sponge without bioregulator included)

$2,46 \times 10^{-15}$  мкг, детектировалось достоверно большее количество фибробластов по сравнению с группой 2 (культивирование заднего отдела глаза на альбуминовой губке без включения в нее биорегулятора). Из графика видно, что при добавлении биорегулятора склеры в дозе  $2,46 \times 10^{-11}$  мкг не наблюдали достоверно значимых отличий по количеству фибробластов на единицу площади склеры относительно контроля. Получается полимодальный характер дозовой зависимости действия биорегулятора, включенного в криогель.

Данные по количеству фибробластов на единицу площади в склере частично коррелировали с качественным состоянием самих тканей заднего отдела глаза. В частности, наилучшее их состояние по сравнению с контролем 2-й группы тоже наблюдали в группах 6, 7 и 10 (рис. 3, а, б, ж, к), где доза биорегулятора из склеры была соответственно  $2,46 \times 10^{-7}$ ,  $2,46 \times 10^{-9}$  и  $2,46 \times 10^{-15}$  мкг.

Ниже приведено описание гистологического состояния тканей заднего отдела глаза в различных экспериментальных группах.

В контрольной **группе 1** (рис. 3, а) при культивировании заднего отдела глаза тритона на дне стеклянного флакона без альбуминового носителя происходила отслойка сетчатки (1) от слоя пигментного эпителия (2), а также отслойка слоя пигментного эпителия от сосудистой оболочки. В самом слое пигментного эпителия пигмент смещается на апикальную сторону, что говорит о нестабильности клеток данного слоя и

их дедифференцировке. В сетчатке наблюдали признаки дегенерации и повреждения нейронов. В склеральной оболочке наблюдаются признаки начала дегенерации ткани, которые выражаются в расслоении коллагеновых волокон с образованием полостей (3) между ними, а также незначительном количестве фибробластов (4) на единицу площади (рис. 2).

В контрольной *группе 2* (рис. 3, б) при культивировании заднего отдела глаза тритона на альбуминовой губке без добавления каких-либо факторов наблюдалась несколько лучшая картина, чем в контроле 1. Отслойка сетчатки (1) от слоя пигментного эпителия (2) была частичной, отростки фоторецепторных клеток и другие нейроны сетчатки были менее повреждены, чем в контроле 1, но при этом происходила гибель нейронов сетчатки. Пигмент в слое пигментного эпителия также имел тенденцию к смещению на апикальную сторону, но это было не так выражено, как в случае контроля 1. Сосудистая оболочка оставалась плотной. В склеральной оболочке также наблюдались элементы дегенерации ткани, выражающиеся в расслоении коллагеновых волокон и образовании незначительных полостей (3), а также в незначительном количестве фибробластов (4) на единицу площади (рис. 2).

В *группе 3* (содержание биорегулятора в носителе –  $2,46 \times 10^{-1}$  мкг) тоже наблюдалось отслоение сетчатки (1) от пигментного эпителия (2), пигмент смещался в слое пигментного эпителия на апикальную сторону, сосудистая оболочка плотная, без признаков повреждения (рис. 3, в). В склеральной оболочке выявлены элементы дегенерации ткани, выражающиеся в виде полостей (3) между коллагеновыми волокнами и недостоверным отличием от контрольных групп по количеству фибробластов (4) (рис. 2).

В *группе 4* (содержание биорегулятора в носителе –  $2,46 \times 10^{-3}$  мкг) (рис. 3, г) также местами обнаруживается отслойка сетчатки (1) от пигментного эпителия (2). Пигмент в слое пигментного эпителия смещен на апикальную сторону, как и в предыдущей группе. Сосудистая оболочка в хорошем состоянии, плотная, без признаков дегенерации. Наблюдалась гибель нейронов сетчатки. В склеральной оболочке видны элементы дегенерации ткани, выражающиеся в расслоении коллагеновых волокон и образовании больших полостей (3), а также в незначительном количестве фибробластов (4) на единицу площади, недостоверно отличных от контрольных групп (рис. 2).

В *группе 5* (содержание биорегулятора в носителе –  $2,46 \times 10^{-5}$  мкг) (рис. 3, б, д) наблюдалась выраженная гибель нейронов сетчатки (1). Пигмент в слое пигментного эпителия (2) смещен на апикальную сторону, как и в предыдущей группе. Сосудистая оболочка в хорошем состоянии, плотная, без признаков дегенерации. В склеральной оболочке также обнаруживаются элементы дегенерации ткани, вы-

ражающиеся в расслоении коллагеновых волокон и образовании крупных полостей (3), и кроме того, количество фибробластов (4) на единицу площади недостоверно отличимо от контроля группы 2 (рис. 2).

На гистологических срезах препаратов *группы 6* (содержание биорегулятора в носителе –  $2,46 \times 10^{-7}$  мкг) (рис. 3, а, б, е) наблюдалась заметно лучшая картина, чем в других группах. В частности, в меньшей степени отслаивалась сетчатка (1) (частичная отслойка только с краев), более равномерно был распределен пигмент в клетках пигментного эпителия (2), что говорит о стабильном дифференцированном состоянии данных клеток, а гибели нейронов практически не наблюдалось. В склеральной оболочке было меньше признаков дегенерации, заключающейся в меньшем количестве и размере полостей (3) между коллагеновыми волокнами и в большем количестве фибробластов (4) на единицу площади склеры, достоверно отличном от контрольных групп 1 и 2 примерно в 1,6 раза (рис. 2).

На срезах образцов *группы 7* (содержание биорегулятора в носителе –  $2,46 \times 10^{-9}$  мкг) (рис. 3, а, б, ж) детектировалась частичная отслойка сетчатки (1) от пигментного эпителия (2) с краев, пигмент был немного смещен на апикальную сторону, полости (3) в склере немного больше, чем у препаратов группы 6, но меньше, чем в других группах, гибель нейронов сетчатки незначительная. Количество фибробластов (4) в склере достоверно отличалось от обеих контрольных групп примерно в 1,7 раза (рис. 2).

В *группе 8* (содержание биорегулятора в носителе –  $2,46 \times 10^{-11}$  мкг) (рис. 3, з) наблюдалась частичная отслойка сетчатки (1) с краев, тогда как смещения пигмента в клетках пигментного эпителия (2) практически не наблюдали, но при этом были значительные полости (3) в склере. Количество фибробластов (4) в склере достоверно не отличалось от обеих контрольных групп (рис. 2).

На гистологических срезах препаратов *группы 9* (содержание биорегулятора в носителе –  $2,46 \times 10^{-13}$  мкг) (рис. 3, б, и) обнаруживались отслойка сетчатки (1) от пигментного эпителия (2), смещение пигмента на апикальную сторону, а также незначительные полости (3) в склере. Количество фибробластов (4) в склере достоверно отличалось только от 1-й контрольной группы, от 2-й контрольной группы не отличалось (рис. 2).

На срезах образцов *группы 10* (содержание биорегулятора в носителе –  $2,46 \times 10^{-15}$  мкг) (рис. 3, а, б, к) наблюдалась лучшая картина состояния тканей заднего отдела глаза по сравнению с образцами из всех других групп. Склера была плотная, без разрывов, полостей практически не было. Пигмент незначительно выделялся из клеток пигментного эпителия (2), а смещения на апикальную сторону не обнаруживались, что свидетельствует о стабильном дифференцирован-

ном состоянии данных клеток. Отслойка сетчатки (1) от пигментного эпителия наблюдалась только с краев. Гибель нейронов не была выражена, сосудистая оболочка компактная. Количество фибробластов (4) в

склере достоверно отличается от обеих контрольных групп примерно в 1,5 раза (рис. 2).

В *группе II* (содержание биорегулятора в носителе –  $2,46 \times 10^{-17}$  мкг) (рис. 3, а, б, л) детектировалась

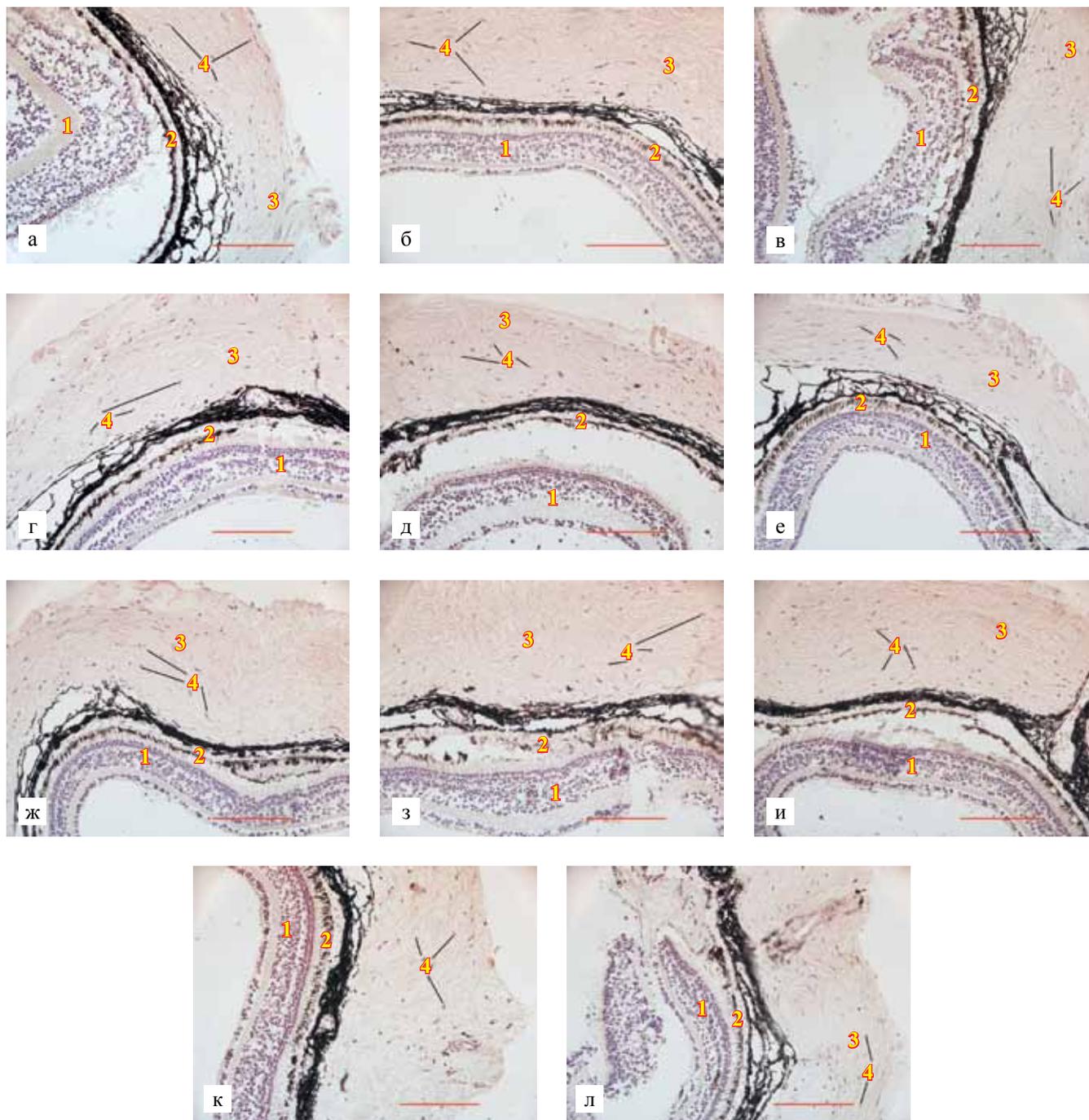


Рис. 3. Гистологическая картина тканей заднего отдела глаза тритона *Pl. waltl* после 3 дней культивирования: а – без подложки; б – на подложке из альбуминового криогеля без включения в него биорегулятора; в–л – на подложке из альбуминового криогеля с включенным в него биорегулятором склеры в количестве: в –  $2,46 \times 10^{-1}$  мкг; г –  $2,46 \times 10^{-3}$  мкг; д –  $2,46 \times 10^{-5}$  мкг; е –  $2,46 \times 10^{-7}$  мкг; ж –  $2,46 \times 10^{-9}$  мкг; з –  $2,46 \times 10^{-11}$  мкг; и –  $2,46 \times 10^{-13}$  мкг; к –  $2,46 \times 10^{-15}$  мкг; л –  $2,46 \times 10^{-17}$  мкг. Окраска гематоксилином-эозином. Метрическая шкала 200 мкм (красная линия)

Fig. 3. Histological images of tissues of the posterior segment of the eye of an Iberian ribbed newt, after 3 days of cultivation: а – without scaffold; б – on an albumin-based cryogel scaffold without a bioregulator included therein; в–л – on an albumin-based cryogel scaffold with a sclera-derived bioregulator included in it at a dose: в – of  $2.46 \times 10^{-1}$   $\mu\text{g}$ ; г – of  $2.46 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g}$ ; д – of  $2.46 \times 10^{-5}$   $\mu\text{g}$ ; е – of  $2.46 \times 10^{-7}$   $\mu\text{g}$ ; ж – of  $2.46 \times 10^{-9}$   $\mu\text{g}$ ; з – of  $2.46 \times 10^{-11}$   $\mu\text{g}$ ; и – of  $2.46 \times 10^{-13}$   $\mu\text{g}$ ; к – of  $2.46 \times 10^{-15}$   $\mu\text{g}$ ; л – of  $2.46 \times 10^{-17}$   $\mu\text{g}$ . H&E stain. Metric scale = 200  $\mu\text{m}$  (red line)

гибель нейронов сетчатки (1) и незначительная отслойка сетчатки от пигментного эпителия (2) в краевых областях. Смещение пигмента на апикальную сторону практически не наблюдали, что говорит о стабильном дифференцированном состоянии данных клеток, при этом обнаруживались незначительные разрывы в склере (3). Количество фибробластов (4) в склере достоверно не отличается от обеих контрольных групп (рис. 2).

Обнаруженные различия в состоянии тканей и сохранности фибробластов в процессе культивирования говорят о том, что биорегулятор склеры, включенный в альбуминовый криогель, только в определенных количествах обладает выраженным протекторным действием на состояние тканей заднего отдела глаза, а именно наиболее заметный протекторный эффект наблюдался при культивировании заднего отдела глаза тритона на альбуминовой подложке с включенным в нее биорегулятором в количестве  $2,46 \times 10^{-7}$ ,  $2,46 \times 10^{-9}$  и  $2,46 \times 10^{-15}$  мкг. Ранее было показано, что протекторный эффект в отношении состояния тканей заднего отдела глаза наблюдался при включении данного биорегулятора в криогелевый носитель в количестве  $2,46 \times 10^{-7}$  мкг [22]. Биорегулятор, введенный в криогенно-структурированную альбуминовую губку, проявлял наиболее выраженное протекторное действие на состояние тканей и клеток заднего отдела глаза также и в количестве  $2,46 \times 10^{-9}$  и  $2,46 \times 10^{-15}$  мкг, а в других дозах действовал слабо (рис. 2). Этот выявленный в настоящей работе факт также свидетельствовал о непрямолинейной дозовой зависимости действия биорегулятора. В данном случае мы не наблюдали классической зависимости – чем выше доза, тем больше эффект. Иными словами, для активности этого биорегулятора характерна сложная полимодальная дозовая зависимость. Эти результаты согласуются с данными, полученными по полимодальному действию биорегулятора склеры в водном растворе, которые были получены ранее [24].

Такой результат коррелирует также с ранее полученной информацией о подобной полимодальной зависимости и для белково-пептидных биорегуляторов, выделенных из других тканей глаза, например, из пигментного эпителия [29], когда наиболее выраженное биологическое действие на состояние заднего отдела глаза наблюдалось при концентрациях биорегулятора в среде культивирования в  $10^{-9}$  и  $10^{-17}$  мг/мл, что в пересчете на его содержание в альбуминовой губке соответствует дозам  $2,46 \times 10^{-7}$  и  $2,46 \times 10^{-15}$  мкг. Таким образом, уровень протекторной активности биорегулятора определяется той концентрацией данного агента в растворе, который использовался при включении биорегулятора в губчатый альбуминовый носитель.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Белково-пептидный биорегулятор, выделенный из склеры глаз быка, был включен в дозах от  $2,46 \times 10^{-1}$  до  $2,46 \times 10^{-17}$  мкг в губчатый криогенно-структурированный носитель, синтезированный на основе растворов сывороточного альбумина с добавками денатуранта (мочевина) и тиольного восстановителя (цистеин). Функциональные возможности полученных таким образом систем доставки БАВ были протестированы в экспериментах по модельному органному культивированию заднего отдела глаз тритонов *Pleurodeles waltl* с целью выяснения влияния разных доз такого биорегулятора на состояние склеральной оболочки, поддержание целостности тканей глаза (сетчатки и пигментного эпителия, сосудистой оболочки) и сохранности фибробластов. Согласно данным гистологии, показано, что наиболее выраженный протекторный эффект на состояние тканей заднего отдела глаза при культивировании наблюдался на альбуминовой подложке с включенным в нее биорегулятором в количестве  $2,46 \times 10^{-7}$ ,  $2,46 \times 10^{-9}$  и  $2,46 \times 10^{-15}$  мкг. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности применения криогенно-структурированного губчатого альбуминового криогеля в качестве носителя для высвобождения биологически активных веществ.

*Работа выполнена в рамках Государственного задания № 075-03-2023-642 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Авторы выражают искреннюю признательность д. б. н. Ю.Б. Басок (НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова) за помощь в статистической обработке экспериментальных данных.*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Langer R, Peppas NA. Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology. *AIChE Journal*. 2003; 49 (12): 2990–3006. doi: 10.1002/aic.690491202.
2. Yun YH, Lee BK, Park K. Controlled drug delivery: historical perspective for the next generation. *J Controlled Release*. 2015; 219 (1): 2–7. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.10.005.
3. Benoit DSW, Overby CT, Sims KR, Ackun-Farmmer MA. Drug delivery systems. *Biomaterials Science* (4<sup>th</sup> Edn.). W.R. Wagner, S.E. Sakiyama-Elbert, G. Zhang, M.J. Yaszemski (Eds.). Academic Press, 2020: 1237–1266. ISBN: 978-0-12-816137-1.
4. Tekade RK. Drug Delivery Systems. Academic Press, 2019. 792 p. ISBN: 9780128144879.
5. Svenson S. Carrier-based drug delivery. *ACS Symp. Ser.* 2004; 879 (1): 2–23. doi: 10.1021/bk-2004-0879.ch001.

6. Орехова ЛЮ, Кудрявцева ТВ, Мусаева РС, Полькина СИ, Чупринина АВ, Садулаева ЛА. Обзор систем пролонгированной доставки лекарственных веществ для консервативного лечения воспалительных заболеваний пародонта. *Пародонтология*. 2022; 27 (4): 298–307. Orekhova LYu, Kudryavtseva TV, Musaeva RS, Polkina SI, Chuprinina AV, Sadulaeva LA. Review of extended-release drug delivery systems for non-surgical treatment of inflammatory periodontal diseases. *Parodontologiya*. 2022; 27 (4): 298–307. (In Russ.). doi: 10.33925/1683-3759-2022-27-4-298-307.
7. Cao W, Zhou X, Tu C, Wang Z, Liu X, Kang Y et al. A broad-spectrum antibacterial and tough hydrogel dressing accelerates healing of infected wound in vivo. *Biomaterials Advances*. 2023; 145 (1): article 213244. doi: 10.1016/j.bioadv.2022.213244.
8. Platon IV, Ghiorghita CA, Lazar MM, Raschip EE, Dinu MV. Chitosan sponges with instantaneous shape recovery and multistrain antibacterial activity for controlled release of plant-derived polyphenols. *Int J Molec Sci*. 2023; 24 (5): article 4452. doi: 10.3390/ijms24054452.
9. Jugur-Grodzinski J. Polymers for tissue engineering, medical devices, and regenerative medicine: Concise general review of recent studies. *Polym Adv Technol*. 2006; 17 (3): 395–418. doi: 10.1002/pat.729.
10. Bakhshpour M, Idil N, Percin I, Denizli A. Biomedical applications of polymeric cryogels. *Appl Sci*. 2019; 9 (3): article 553. doi: 10.3390/9030553.
11. Troy E. Nature-based biomaterials and their application in biomedicine. *Polymers*. 2021; 13 (19): article 3321. doi: 10.3390/polym13193321.
12. He Y, Wang C, Wang C, Xiao Y, Lin W. An overview on collagen and gelatin-based cryogels: Fabrication, classification, properties and biomedical applications. *Polymers*. 2021; 13 (14): article 2299. doi: 10.3390/polym13142299.
13. Лозинский ВИ, Родионов ИА, Цискарашвили АВ, Ескин НА. Антибактериальная белковая губка для химиотерапии инфицированных ран и способ ее получения. Пат. РФ № 2637634 (2016); Б.И. № 34 (2017). Lozinsky VI, Rodionov IA, Ciskaraschvili AV, Eskin NA. Antibakterialnaya belkovaya gubka dlya chemioterapii inficirovannih ran i sposob yeye polucheniya. Pat. RF № 2637634 (2016); B.I. № 34 (2017).
14. Lozinsky VI, Shchekoltsova AO, Sinitskaya ES, Vernaya OI, Nuzhdina AV, Bakeeva IV et al. Influence of succinylation of a wide-pore albumin cryogels on their properties, structure, biodegradability, and release dynamics of dioxidine loaded in such spongy carriers. *Int J Biol Macromol*. 2020; 160 (1): 583–592. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.05.251.
15. Шайхалиев АИ, Краснов МС, Сидорский ЕВ, Ямскова ВП, Лозинский ВИ. Индукция остеогенеза костной ткани нижней челюсти кролика с использованием криогенно-структурированного губчатого альбуминового 3D-носителя, нагруженного биорегулятором. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2022; 24 (1): 56–63. Shaikhaliev AI, Krasnov MS, Sidorskii EV, Yamskova VP, Lozinsky VI. Induction of osteogenesis in rabbit mandibular bone tissue using an albumin-based cryogenically structured porous 3D carrier loaded with a bioregulator. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2022; 24 (1): 56–63. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2022-1-56-63.
16. Лозинский ВИ. Принципы и методы криоструктурирования полимерных систем для создания инновационных материалов биомедицинского назначения. *Гибридные наноформы биоактивных и лекарственных веществ*. Под ред. М.Я. Мельникова и Л.И. Трахтенберга. М.: Техносфера, 2020. Глава 3: 69–101. Lozinsky VI. Principy i metody kriostrukturirovaniya polimernyh system dlya sozdaniya innovacionnyh materialov biomedicinskogo naznacheniya. *Gibridnye nanoformy bioaktivnyh i lekarstvennyh veshchestv*. Pod red. M.Ya. Melnikova i L.I. Trachtenberga. M.: Technosfera, 2020. Glava 3: 69–101.
17. Reichelt S. Introduction to macroporous cryogels. *Meth Molec Biol*. 2015; 1286: 173–181. doi: 10.1007/978-1-4939-2447-9\_14.
18. Tripathi A, Melo JS. Cryostructurization of polymeric systems for developing macroporous cryogel as a foundational framework in bioengineering applications. *J Chem Sci*. 2019; 131 (1): article 92. doi: 10.1007/s12039-019-1670-1.
19. Kirsebom H, Mattiasson B. Cryostructuration as a tool for preparing highly porous polymer materials. *Polym Chem*. 2011; 2 (5): 1059–1062. doi: 10.1039/c1py00014d.
20. Lozinsky VI. 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; 6 (3): article 29. doi: 10.3390/gels6030029.
21. Краснов МС, Шайхалиев АИ, Коршаков ЕВ, Ефименко МВ, Солошенко ПП, Давыдова ТР и др. Индукция остеогенеза костной ткани крысы с использованием криогенно-структурированных пористых 3D-материалов с содержанием биорегулятора. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019; 168 (7): 113–117. Krasnov MS, Shaikhaliev AI, Korshakov EV, Efimenko MV, Soloshenkov PP, Davydova TR et al. Induction of Osteogenesis in Rat Bone Tissue Using Cryogenically Structured Porous 3D Materials Containing a Bioregulator. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2019; 168 (7): 113–117. [In Russ, English abstract]. doi: 10.1007/s10517-019-04657-z.
22. Sidorskii EV, Krasnov MS, Yamskova VP, Lozinsky VI. Cryostructuring of polymeric systems: 57 Spongy wide-porous cryogels based on the proteins of blood serum: preparation, properties and application as the carriers of peptide bioregulators. *Gels*. 2020; 6 (4): article 50. doi: 10.3390/gels6040050.
23. Краснов МС, Шайхалиев АИ, Коршаков ЕВ, Гасбанов ГА, Корголов РС, Синицкая ЕС и др. Изменение состояния костной ткани крысы в зоне дефекта *in vivo* под действием криогенно-структурированной альбуминовой губки, содержащей биорегулятор.

- Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2020; 170 (12): 800–804. Krasnov MS, Shaikhaliyev AI, Korshakov EV, Gasbanov GA, Korgoloev RS, Sinitskaya ES et al. The change in the condition of the bone tissue of the rat at the site of the defect in vivo under the action of a cryogenically structured albumin sponge containing a bioregulator. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2020; 170 (12): 800–804. [In Russ, English abstract]. doi: 10.47056/0365-9615-2020-170-12-800-804.
24. Сидорский ЕВ, Ильина АП, Краснов МС, Ямскова ВП, Буряк АК, Ямсков ИА. Физико-химические свойства и биологическая активность пептидно-белкового комплекса из ткани склеры глаза быка. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2018; 54 (1): 82–88. Sidorskii EV, Il'ina AP, Krasnov MS, Yamskova VP, Buryak AK, Yamskov IA. Physicochemical properties and biological activity of a peptide-protein complex from bovine sclera tissue. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2018; 54 (1): 82–88. [In Russ, English abstract]. doi: 10.7868/S0555109918010117.
25. Rodionov IA, Grinberg NV, Burova TV, Grinberg VYa, Lozinsky VI. Cryostructuring of polymeric systems. 40. Proteinaceous wide-pore cryogels generated by the action of denaturant/reductant mixtures on bovine serum albumin in moderately-frozen aqueous media. *Soft Matter*. 2015; 11 (24): 4921–4931. doi: 10.1039/c4sm02814g.
26. Lozinsky VI, Kulakova VK, Grigoriev AM, Podorozhko EA, Kirsanova LA, Kirillova AD et al. 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. doi: 10.3390/gels8110695.
27. Скрипникова ВС, Краснов МС, Березин ББ, Бабушкина ТА, Борисенко АВ, Измаилов БА и др. Биологически активный в сверхмалых дозах низкомолекулярный белок склеры. *Доклады академии наук*. 2007; 417 (5): 697–699. Skripnikova VS, Krasnov MS, Beresin BB, Babushkina TA, Borisenko AV, Izmailov BA et al. Low-molecular-weight Sclera Protein Biologically Active at Ultralow Doses. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2007; 417 (5): 697–699. [In Russ, English abstract].
28. Краснов МС, Григорян ЭН, Ямскова ВП. Модель органотипического культивирования сетчатки вместе с тканями заднего сектора глаза тритона для изучения действия адгезивных гликопротеинов. *Известия РАН, Серия «Биология»*. 2003; (1): 22–36. Krasnov MS, Grigoryan EN, Yamskova VP. An Organotypic Culture of the Newt Retina together with Other Tissues of the Posterior Eye Segment as a Model for Studying the Effects of Cell Adhesion Glycoproteins. *Biology Bulletin*. 2003; (1): 22–36. [In Russ, English abstract].
29. Ямскова ВП, Скрипникова ВС, Молявка АА, Ильина АП, Краснов МС, Маргасюк ДВ и др. Структурно-функциональные особенности нового биорегулятора, выделенного из ткани пигментного эпителия глаза быка. *Биохимия*. 2009; 74 (9): 1195–1203. Yamskova VP, Skripnikova VS, Molyavka AA, Il'ina AP, Krasnov MS, Margasyuk DV et al. Structural-Functional Characteristics of a New Bioregulator Isolated from Bovine Pigmented Epithelium Tissue. *Biochemistry*. 2009; 74 (9): 1195–1203. [In Russ, English abstract].

Статья поступила в редакцию 12.04.2023 г.  
The article was submitted to the journal on 12.04.2023