

DOI: 10.15825/1995-1191-2023-4-109-120

# БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МАКРОПОРИСТОГО КРИОСТРУКТУРАТА НА ОСНОВЕ КОМПОНЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

А.М. Григорьев<sup>1</sup>, Ю.Б. Басок<sup>1</sup>, А.Д. Белова<sup>1</sup>, Н.П. Шмерко<sup>1</sup>, А.М. Суббот<sup>5</sup>,  
В.К. Кулакова<sup>3</sup>, В.И. Лозинский<sup>3, 4</sup>, В.И. Севастьянов<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> АНО «Институт медико-биологических исследований», Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБУН «Институт элементоорганических соединений имени А.Н. Несмеянова Российской академии наук», Москва, Российская Федерация

<sup>4</sup> ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет», Казань, Российская Федерация

<sup>5</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней», Москва, Российская Федерация

**Цель работы:** исследование биологических свойств макропористого криоструктурата из концентрированного коллагенсодержащего раствора в качестве перспективной матрицы для формирования клеточно- и тканеинженерных конструкций. **Материалы и методы.** Макропористый губчатый носитель получали методом криоструктурирования коллагенсодержащего экстракта, приготовленного путем уксуснокислого гидролиза соединительной ткани цыплят (АО «БИОМИР сервис», РФ). Для придания водонерастворимости криоструктурату использовали N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид (Sigma-Aldrich, США). Исследование микроморфологии поверхности губки проводили с использованием сканирующей электронной микроскопии. Цитотоксичность носителя оценивали по реакции клеточной культуры фибробластов мыши NIH 3T3 с использованием автоматического микроскопа IncuCyte ZOOM (EssenBioscience, США). Биосовместимость макропористого носителя изучали на культурах мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека (МСК ЖТч), линейных клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 и линейных клетках эндотелия пупочной вены человека EA.hy926. Определяли метаболическую активность клеток с использованием реагентов PrestoBlue™ (Invitrogen™, США). Развитие клеточной популяции при долговременном культивировании клеточно-инженерной конструкции (КИК) оценивали с помощью прижизненной флуоресцентной микроскопии по всей поверхности образца с использованием инвертированного микроскопа Leica Dmi8 с программным обеспечением Leica Thunder (Leica Microsystems, ФРГ). **Результаты.** Оптическая микроскопия и сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) показали наличие в полученном биополимерном материале пор разного размера: крупных, диаметром  $237 \pm 32$  мкм, средних –  $169 \pm 23$  мкм и малых –  $70 \pm 20$  мкм; преимущественно наблюдали поры крупных и средних размеров. Исследуемые носители не проявляли цитотоксичности. Наблюдали адгезию и пролиферацию клеток на поверхности материала и их проникновение в подлежащие слои при долговременном культивировании. Наибольшая метаболическая активность клеток наблюдалась для МСК ЖТч на 14-е сутки, что соответствует нормальной динамике развития популяции клеток данного типа. В модели КИК печени была показана функциональная активность клеток HepG2 – продуцирование альбумина и мочевины. **Заключение.** Хорошая адгезия и активная пролиферация, показанная для трех типов клеток, свидетельствует о биосовместимости полученного биополимерного носителя, а распространение клеток во внутренний объем губки и ее активное заселение при долговременном культивировании указывает на целесообразность использования данного материала для создания клеточно- и тканеинженерных конструкций.

*Ключевые слова:* криогенное структурирование, коллаген, тканевая инженерия.

**Для корреспонденции:** Григорьев Алексей Михайлович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (499) 193-86-62. E-mail: Bear-38@yandex.ru

**Corresponding author:** Alexei Grigoriev. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (499) 193-86-62. E-mail: Bear-38@yandex.ru

# BIOLOGICAL PROPERTIES OF MACROPOROUS CRYOSTRUCTURATE BASED ON EXTRACELLULAR MATRIX COMPONENTS

*A.M. Grigoriev<sup>1</sup>, Yu.B. Basok<sup>1</sup>, A.D. Belova<sup>1</sup>, N.P. Shmerko<sup>1</sup>, A.M. Subbot<sup>5</sup>, V.K. Kulakova<sup>3</sup>, V.I. Lozinsky<sup>3, 4</sup>, V.I. Sevastianov<sup>1, 2</sup>*

<sup>1</sup> Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

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

<sup>3</sup> Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Moscow, Russian Federation

<sup>4</sup> Kazan Federal University, Kazan, Russian Federation

<sup>5</sup> Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

**Objective:** to study the biological properties of macroporous cryostructure from multicomponent concentrated collagen-containing solution (MCCS) as a promising matrix for the formation of cell- and tissue-engineered constructs. **Materials and methods.** A macroporous spongy carrier was obtained by cryostructuring of collagen-containing extract, prepared by acetic acid hydrolysis of chicken connective tissue (BIOMIR Service, Russian Federation). N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (Sigma-Aldrich, USA) was used to make the cryostructure water insoluble. The micromorphology of the sponge surface was studied using scanning electron microscopy. The cytotoxicity of the carrier was evaluated by reaction of the mouse NIH 3T3 fibroblast cell culture using automated microscope IncuCyte ZOOM (EssenBioscience, USA). Biocompatibility of the macroporous carrier was studied on cultures of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (AD-MSC), human hepatocellular carcinoma cell line *HepG2* and human umbilical vein endothelial cell line *EA.hy926*. The metabolic activity of cells was determined using PrestoBlue™ reagents (Invitrogen™, USA). Cell population development during long-term cultivation of the cell-engineered construct (CEC) was assessed by fluorescence-lifetime imaging microscopy over the entire surface of the sample using a Leica Dmi8 inverted microscope with Leica Thunder software (Leica Microsystems, Germany). **Results.** Optical microscopy and scanning electron microscopy (SEM) showed the presence of pores of different sizes in the resulting biopolymer material: large pores with  $237 \pm 32 \mu\text{m}$  diameter, medium-sized pores with  $169 \pm 23 \mu\text{m}$  diameter, and small-sized pores with  $70 \pm 20 \mu\text{m}$  diameter; large and medium-sized pores were predominant. The studied media did not exhibit cytotoxicity. Cell adhesion and proliferation on the surface of the material and their penetration into the underlying layers during long-term cultivation were observed. The highest metabolic activity of the cells was observed for human AD-MSC on day 14, which corresponds to the normal dynamics of development of a population of cells of this type. The functional activity of HepG2 cells – albumin and urea production – was shown in the liver CEC model. **Conclusion.** The good adhesion and active proliferation that were shown for the three cell types indicate that the resulting biopolymer carrier is biocompatible, and that the spread of the cells into the inner volume of the sponge and active population of the sponge under prolonged culturing indicates that this material can be used to create cell- and tissue-engineered constructs.

*Keywords: cryogenic structuring, collagen, tissue engineering.*

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших аспектов создания клеточных (КИК) и тканеинженерных (ТИК) конструкций является подбор подходящего носителя или подложки (англоязычное название – scaffold), с одной стороны выполняющего структурообразующую функцию, а с другой – оказывающего влияние на процессы пролиферации и дифференцировки клеток. Показано, что внутренняя архитектура ТИК и КИК имеет фундаментальное значение для их структурных и биологических функций [1]. Так, использование носителя с упорядоченной структурой микроволокон, задающих направление роста мезенхимальных стромальных клеток (МСК), в ТИК хрящевой ткани приводило к

увеличению синтеза гликозаминогликанов при дифференцировке клеток по сравнению с неструктурированной подложкой [2]. Еще большее значение ее структура имеет для создания ТИК и КИК печени, где нормальное функционирование клеток разных типов возможно лишь при наличии определенной микроархитектуры конструкции [3, 4].

Для создания структурированных клеточных носителей используют различные подходы, такие как электроспиннинг [5], а также различные виды биопечати [6]. Большое внимание уделяется поиску новых материалов для биопринтинга, имитирующих внеклеточный матрикс, и методам придания структуры, сходной с нативной тканью [7].

Отметим, что несмотря на многочисленные преимущества данных техник, они сложны в исполнении и требуют дорогостоящего оборудования. В свою очередь, методология криоструктурирования позволяет с меньшими затратами создавать эффективные носители с порами разного размера, обеспечивающими как массоперенос питательных веществ и газов, так и экспансию клеток с поверхности во внутренний объем материала подложки [8].

С помощью приемов криоструктурирования получают такие макропористые полимерные материалы, как различные криогели и криоструктураты [9]. Первые из них образуются, когда в объеме незамерзшей микрофазы макроскопически замороженной системы происходит формирование узлов трехмерной полимерной сетки (этот процесс называют криотропным гелеобразованием). Если же собственно гелеобразования нет, то после удаления замороженного растворителя, например, сублимацией или криоэкстракцией, получают полимерные объекты, называемые *криоструктуратами*. Принципиальной особенностью и криогелей, и криоструктуратов является их макропористость, формируемая поликристаллами замороженного растворителя. При этом большинство макропор взаимосвязаны, а их морфология и размеры зависят от условий всех последовательных стадий криогенного структурирования. Именно особая макропористость в сочетании во многих случаях с хорошими механическими свойствами различных криогелей и криоструктуратов, особенно на основе биосовместимых полимеров, делает их перспективными материалами биомедицинского назначения [10–15].

Важным преимуществом данной технологии является то, что на физические свойства криогенно-структурированных материалов, особенно на размер пор, можно достаточно просто влиять, регулируя параметры приготовления, включая содержание полимера, механизм сшивки, температуру, время замораживания, скорость и циклы замораживания/оттаивания [8,16].

При выборе материалов для изготовления матриц для КИК и ТИК помимо синтетических резорбируемых полимеров, например полилактидов [17], наиболее часто используют биополимерные гидрогели. Для стимуляции регенеративного потенциала поврежденных тканей путем малоинвазивного инъекционного введения разработано множество гидрогелей, основанных на одном из компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) [18]. При этом среди обычно используемых биополимеров предпочтение отдается таким полимерам природного происхождения, как коллаген, желатин, хитозан, гиалуроновая кислота, альгинаты, полиэферы бактериального происхождения [18].

Учитывая многофункциональные свойства ВКМ, внимание исследователей в последние годы привлекли многокомпонентные биополимерные гидрогели – биомиметики ВКМ, в состав которых входят все его основные компоненты (белки и полисахариды), а также факторы роста и другие сигнальные молекулы, необходимые для адгезии, пролиферации и дифференцировки клеток [19, 20]. Показано, что такие биополимерные гидрогели обеспечивают большую клеточную пролиферацию по сравнению с гелями из одного компонента ВКМ [21]. Однако наряду с выраженными преимуществами гидрогелей существует и ряд сложностей, связанных с невозможностью выполнения функции каркаса для клеток и отсутствием достаточного порового пространства, что не позволяет протекать ангиогенезу по всему объему КИК, затрудняет миграцию клеток в объем гидрогеля, транспорт к ним питательных веществ и удаление метаболитов [10].

Вследствие этого представляется перспективной идея создания биоактивной макропористой криогенно-структурированной матрицы [22] на основе многокомпонентного концентрированного коллаген-содержащего раствора (МККР), получаемого путем уксуснокислой экстракции из тканей животного происхождения [20].

Данное исследование является продолжением проведенных нами ранее работ по получению и изучению физико-химических и биологических свойств макропористого криоструктурата из желатина [23, 24]. Положительные результаты, полученные при создании КИК на основе матриц из желатинового криоструктурата, позволили нам использовать их в данной работе в качестве образцов сравнения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Получение криогенно-структурированной матрицы на основе МККР

В качестве исходного сырья был использован коммерчески доступный продукт – «Экстракт коллагенсодержащий» (ТУ 9389-008-54969743-2016, АО «БИОМИР сервис», г. Краснознаменск). Концентрация МККР – 40 мг/мл, суммарное содержание белков в МККР – 96%, pH –  $5,8 \pm 0,3$ . Образцы криоструктурата на основе МККР были изготовлены в Институте элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН согласно модифицированной методике [22]. МККР сначала прогревали в течение 1 ч при 42 °С, затем разбавляли в 1,5 раза деионизованной водой и разливали в пластиковые чашки Петри диаметром 35 мм тонким слоем (2 мм). Чашки помещали в ультракриостат К2 (Huber, Германия) и замораживали при –20 °С в течение 3 часов. Затем подвергали лиофильной сушке в установке FreeZone<sup>1</sup> (Labconco, США). Далее полученные макропористые губки

криоструктуратов инкубировали в 0,1 М этанольном растворе гидрохлорида N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида (Sigma-Aldrich, США) при комнатной температуре в течение 24 ч, после чего промывали этанолом от избытка карбодиимида и хранили в среде 96% этанола до использования в качестве матрицы для культивирования клеток. Для экспериментов из макропористых губок вырезали диски площадью 1 см<sup>2</sup> и толщиной 2 мм.

### Исследование микроморфологии поверхности криоструктуратов

Морфологию поверхности образцов изучали с помощью фазово-контрастной микроскопии, выполненной с использованием системы сверхвысокого разрешения Leica DMi8 Thunder с программным обеспечением LAS X.

Микроморфологию поверхности коллагенсодержащей матрицы исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с лантанидным контрастированием образца, что позволяло использовать ее в условиях низкого вакуума, максимально сохраняя нативную структуру материала [25]. Подготовка образца включала первичную промывку, выдержку 45 мин в контрастирующем растворе BioREE-A (ООО «Глаукон», Россия) и финальную промывку дистиллированной водой. Далее 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 20–25 кВ. Изображения захватывались с помощью детектора обратно-рассеянных электронов (режим BSE).

### Культуры клеток

Для оценки цитотоксичности исследуемых матриц использовали клетки фибробластов мыши линии NIH 3T3 (ATCC®CRL-1658™) из коллекции ATCC (American Type Culture Collection). Для исследования адгезии и пролиферации клеток использовали культуру МСК жировой ткани человека (МСК ЖТч), полученную в ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России по ранее разработанной методике [23]. Для создания на основе губок КИК использовали эндотелиальные клетки пупочной вены человека линии EA.hy926 (The human umbilical vein cell line EA.hy926, ATCC®CRL-2922™) из коллекции ATCC (American Type Culture Collection) и клетки гепатоцеллюлярной карциномы линии HepG2 из коллекции клеточных культур ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России.

Клеточные культуры хранили в жидком азоте при температуре –196 °С. После разморозки клетки высевали в стандартные культуральные флаконы площадью 25 см<sup>2</sup> (CELLSTAR® Greiner Bio-One, Гер-

мания) и культивировали в соответствующей полной ростовой среде. Для фибробластов NIH 3T3 и ЭК EA.hy926 использовали DMEM с высоким содержанием глюкозы («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% телячьей сыворотки (ТС, Biosera, Германия) или эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США) соответственно, антибиотика и антимикотика Anti-Anti (Gibco® by Life Technologies™, СК) и 2 мМ аланил-глутамин («ПанЭко», Россия). Культивирование МСК ЖТч и HepG2 проводили в среде DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 10 мкг/мл основного фактора роста фибробластов человека (FGF-2, Peprotech, 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). Флаконы с клетками культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при стандартных условиях: 37 °С, влажная атмосфера, содержащая 5 ± 1% CO<sub>2</sub>.

Для проведения экспериментов клетки смывали с культурального пластика с помощью диссоциирующего реагента TrypLE™ Express Enzyme (Gibco® by Life Technologies™, СК) и готовили суспензию с необходимой концентрацией клеток.

Количество клеток в суспензии определяли на автоматическом счетчике клеток (TC20™ Automated Cell Counter, BIORAD, Сингапур) с одновременным тестом на жизнеспособность с трипановым синим (BIORAD, # 145-0013, Сингапур) согласно методике производителя оборудования.

### Оценка цитотоксичности матрицы

Цитотоксичность образцов, полученных на основе МККР-носителей, определяли методом прямого контакта согласно ГОСТ ISO 10993-5-2011 [26]. Фибробласты мыши линии NIH 3T3 высевали в культуральные плоскодонные 6-луночные планшеты (CELLSTAR® Greiner Bio-One, Германия) в концентрации 5 × 10<sup>5</sup> клеток на лунку и инкубировали в течение 24 ч при 37 °С в стандартных условиях до образования 80 ± 10%. Далее на поверхность клеточного монослоя помещали исследуемые образцы криоструктуратов в виде дисков диаметром 6 мм и толщиной 2 мм. Образцами сравнения были макропористые губки в виде дисков криоструктурата из желатина того же размера, что и образцы коллагенсодержащего криоструктурата, с доказанным отсутствием цитотоксического эффекта [23]. Диски предварительно подвергали тщательной отмывке от остатков этанола двумя порциями стерильной дистиллированной воды и оставляли на сутки в полной ростовой среде при 37 °С. Отрицательным контрольным образцом для клеточной культуры служила полная ростовая среда, положительным контрольным

образцом – стандарт цинка одноэлементный водный 10 мг/мл (Sigma-Aldrich, США).

Для более детальной оценки динамики роста и выявления возможного цитостатического эффекта был проведен дополнительный тест, в котором планшеты с клетками инкубировали в присутствии образцов с использованием системы IncuCyte ZOOM (EssenBioscience, США). Система IncuCyte ZOOM позволяла оценивать плотность монослоя в автоматическом режиме каждые 2 ч на протяжении всего эксперимента с одновременным построением кривых роста. Длительность эксперимента составила немногим более 50 часов.

### **Оценка способности губчатого носителя поддерживать адгезию и пролиферацию клеток**

Способность криоструктурата из МККР поддерживать адгезию и пролиферацию клеток проводили также в сравнении с образцами криоструктурата из желатина. Для постановки эксперимента образцы криоструктуратов тщательно отмывали от этанола и на 1 сутки помещали в полную ростовую среду (ПРС) до насыщения. В культуральных флаконах наращивали необходимое количество клеток и готовили клеточную суспензию с рабочей концентрацией  $1 \times 10^5$  кл/мл. Далее на поверхность образца капельно наносили по 1 мл клеточной суспензии. Образцы помещали в центрифужные пробирки объемом 50 мл и оставляли в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе на 1 ч для прикрепления клеток, после чего уровень полной ростовой среды в пробирках доводили до 5 мл и продолжали культивирование при стандартных условиях. На 1, 3, 6, 9 и 14-е сутки культивирования отбирали по три порции полной ростовой среды для проведения теста на метаболическую активность с реагентом PrestoBlue™ HS Cell Viability Reagent (Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя реактива. Спектрофотометрический анализ выполняли на планшетном ридере Spark 10M (Tecan, Австрия) с программным обеспечением Spark Control™ Magellan V1.2.20 на двух длинах волн – 570 и 600 нм. Данные измерения оптического поглощения использовали для расчета коэффициента метаболической активности (K) по формуле:

$$K = \frac{117,216 \cdot \text{Abs}_{570} - 80,586 \cdot \text{Abs}_{600}}{155,677 \cdot \text{Abs}_{600} - 14,652 \cdot \text{Abs}_{570}} \times 100\%,$$

где  $\text{Abs}_{570}$  – оптическое поглощение при длине волны 570 нм;  $\text{Abs}_{600}$  – оптическое поглощение при длине волны 600 нм.

Количество клеток, соответствующее значению полученного коэффициента K, определяли во вспомогательном эксперименте, где в лунки планшета сеяли определенные количества клеток и через 1 сутки измеряли их метаболическую активность. По резуль-

татам измерения строили калибровочный график, позволяющий привести значение коэффициента K к количеству МСК ЖТч.

### **Клеточно-инженерные конструкции на основе коллагенсодержащего криоструктурата и разных типов клеток**

Для создания КИК на основе макропористой губки из МККР готовили суспензии соответствующих культур с концентрацией  $1 \times 10^5$  кл/мл. В качестве контроля также использовали образцы криоструктурата из желатина. Матрицы из криоструктуратов погружали в суспензию и обрабатывали в течение 1 ч на лабораторном шейкере в орбитальном режиме перемешивания при частоте вращения 40 об/мин для равномерного распределения клеток по поверхности и проникновения во внутренний объем образца. Полученные КИК культивировали в стандартных условиях в течение 7 и 10 суток в случае использования HerG2, и в течение 7 и 15 суток для эндотелиальных клеток пупочной вены человека линии EA.hy926.

Адгезию клеток на поверхности, характер распределения клеток по объему образца, жизнеспособность, морфологию и пролиферативную активность оценивали методами прижизненной микроскопии с флуоресцентными красителями комплекса Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes® by Life Technologies™, США) с использованием возможностей микроскопа Leica DMi8 Thunder с программным обеспечением LAS X для анализа 3d-структуры образца.

### **Функциональные свойства клеток гепатоцеллюлярной карциномы HerG2 при их культивировании на макропористой матрице на основе МККР**

Клетки в количестве  $5 \times 10^5$  наносили на фрагменты  $10 \times 10 \times 2$  мм образцов из МККР ( $n = 10$ ) и желатина ( $n = 10$ ). Полученные КИК культивировали в полной ростовой среде в стандартных условиях в течение 10 суток. На 10-е сутки определяли содержание альбумина в культуральной среде методом иммуноферментного анализа с использованием Human Albumin ELISA Kit (Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific, США). В качестве контроля использовали культуральную среду от клеток, которые в таком же количестве культивировали на пластике.

Скорость метаболизма аммиака определяли после 90 минут инкубации с 1 ммоль хлоридом аммония (Sigma-Aldrich, США), разведенным в культуральной среде, на 10-е сутки эксперимента. Количество мочевины в среде оценивали на биохимическом анализаторе KonelabPrime 60i (ThermoFisher Scientific, Финляндия).

Достоверность различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента (SPSS 26). Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Исследование микроморфологии поверхности макропористых матриц

Микроскопия образцов выявила пористую структуру материала с многочисленными порами разного размера. Условно поры по размеру можно распределить на три группы: крупные –  $237 \pm 32$  мкм, средние –  $169 \pm 23$  мкм и малые –  $70 \pm 20$  мкм. Таким образом, в криогенно-структурированном материале на основе МККР преобладают поры крупного размера (рис. 1, а). В желатиновом криоструктурате в основном присутствовали только средние –  $125 \pm 29$  мкм и малые –  $52 \pm 20$  мкм поры (рис. 1, б). Полученные с помощью СЭМ изображения поверхности обеих губок показывают, что поры образуют взаимосвязанные каналы, проходящие через весь объем материала (рис. 2).

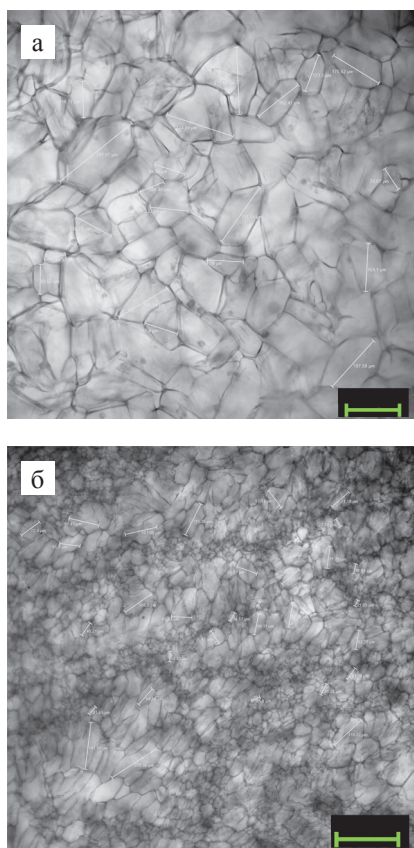


Рис. 1. Морфология поверхности криоструктуратов, фазово-контрастная микроскопия: а – криоструктурат на основе МККР; б – криоструктурат на основе желатина.  $\times 50$ . Размер масштабной линейки 200 мкм

Fig. 1. Surface morphology of cryostructure, Phase-contrast microscopy: а – MCCS-based cryostructure; б – gelatin-based cryostructure.  $\times 50$ . Scale bar: 200  $\mu\text{m}$

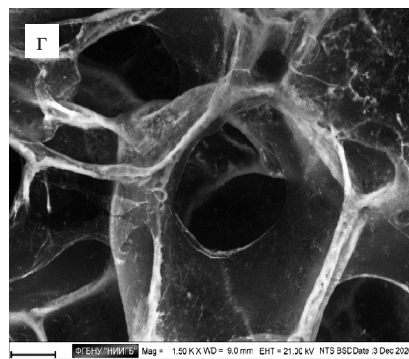
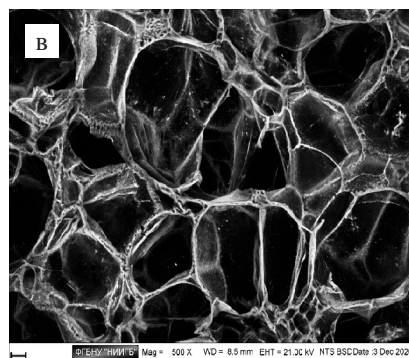
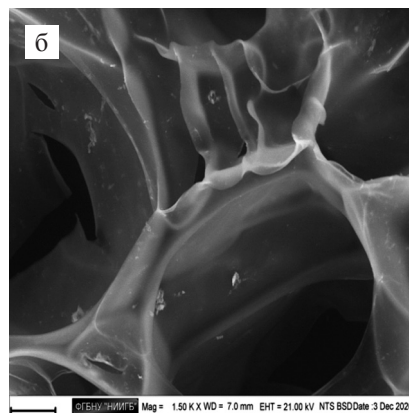
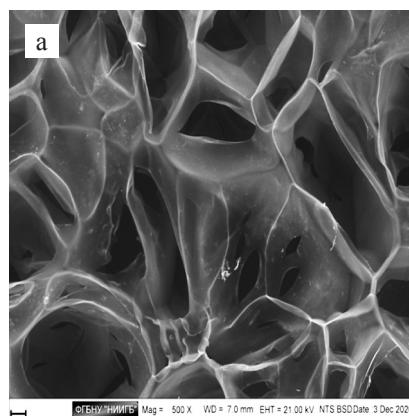


Рис. 2. Макропористая морфология криоструктуратов, СЭМ с лантаноидным контрастированием: а, б – криоструктурат на основе МККР; в, г – криоструктурат на основе желатина; а, в –  $\times 500$ ; б, г –  $\times 1500$ . Размер масштабной линейки 20 мкм

Fig. 2. Macroporous morphology of cryostructure, SEM with lanthanide contrasting: а, б – MCCS-based cryostructure; в, г – gelatin-based cryostructure; а, в –  $\times 500$ ; б, г –  $\times 1500$ . Scale bar: 20  $\mu\text{m}$

## Цитотоксичность полученных криоструктуратов

Оценка цитотоксичности криоструктурата на основе МККР показала отсутствие негативного эффекта при культивировании клеток NIH 3T3 в присутствии фрагментов макропористых матриц – полученного на основе МККР и желатина. Клетки активно пролиферируют по всей площади лунки планшета, включая зону контакта с образцом (рис. 3). Ошаренных клеток или клеток с нарушенной морфологией не наблюдали.

Определение степени конfluenceности монослоя в автоматическом режиме показало, что наиболее активный рост клеток начинается после 20 часов эксперимента и к концу опыта этот показатель достигает значений более 70%, что соответствует нормальному развитию клеточной популяции NIH 3T3. Значимых отличий от образца сравнения отмечено не было (рис. 3, в).

## Биосовместимость, адгезия и пролиферация клеток

Изучение биосовместимости, т. е. способности клеток к адгезии на поверхности, и дальнейшей пролиферации клеток проводили с использованием культуры МСК ЖТч. Параллельно в качестве контроля в опыте использовали криоструктурат из желатина. На фрагмент губки наносили  $1 \times 10^5$  клеток. Прижизненная микроскопия с витальным красителем показала, что на 3-и сутки клетки адгезированы на поверхности обоих вариантов носителей. Распределение МСК ЖТч по поверхности достаточно равномерное, клетки распластаны и имеют нормальную морфологию. Мертвые клетки практически отсутствуют. К 12-м суткам культивирования наблюдали значительное увеличение клеточной массы в образцах с формированием крупных клеточных скоплений. Также отмечено заселение клетками не только

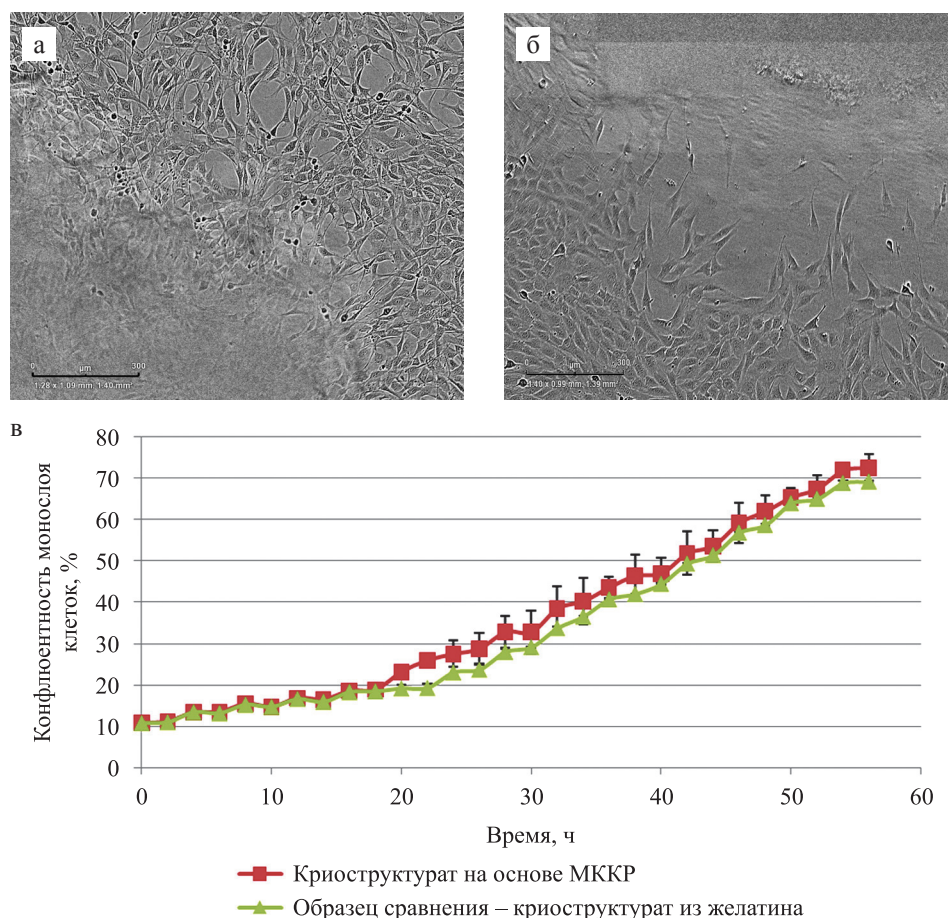


Рис. 3. Рост фибробластов мыши линии NIH 3T3 в присутствии фрагмента макропористой матрицы: а – криоструктурат на основе МККР; б – криоструктурат из желатина (образец сравнения), фазовый контраст,  $\times 100$ , размер масштабной линейки 300 мкм; в – кривая роста клеток NIH 3T3 на культуральном пластике в присутствии фрагмента макропористого носителя на основе МККР

Fig. 3. Growth of mouse NIH 3T3 fibroblasts in the presence of macroporous matrix fragment: а – MCCS-based cryostructure; б – gelatin-based cryostructure (comparison sample), phase-contrast microscopy,  $\times 100$ , scale bar: 300  $\mu\text{m}$ ; в – growth curve of NIH 3T3 cells on culture plastic in the presence of a fragment of MCCS-based macroporous carrier

поверхности криоструктуратов, но и проникновение вглубь губки. При этом вследствие наличия в губке на основе МККР крупных сообщающихся пор в данном случае этот эффект был значительно более выражен (рис. 4).

Данные теста на метаболическую активность клеток с реактивом PrestoBlue™ полностью соответ-

ствуют микроскопической картине и позволяют количественно оценить их пролиферативную активность.

Как показано на графике (рис. 5), после лаг-фазы, необходимой клеткам для адаптации, к 4-м суткам культивирования, начинается фаза логарифмического роста, которая продолжается, с некоторым замедлением в период 6–9-е сутки, вплоть до конца

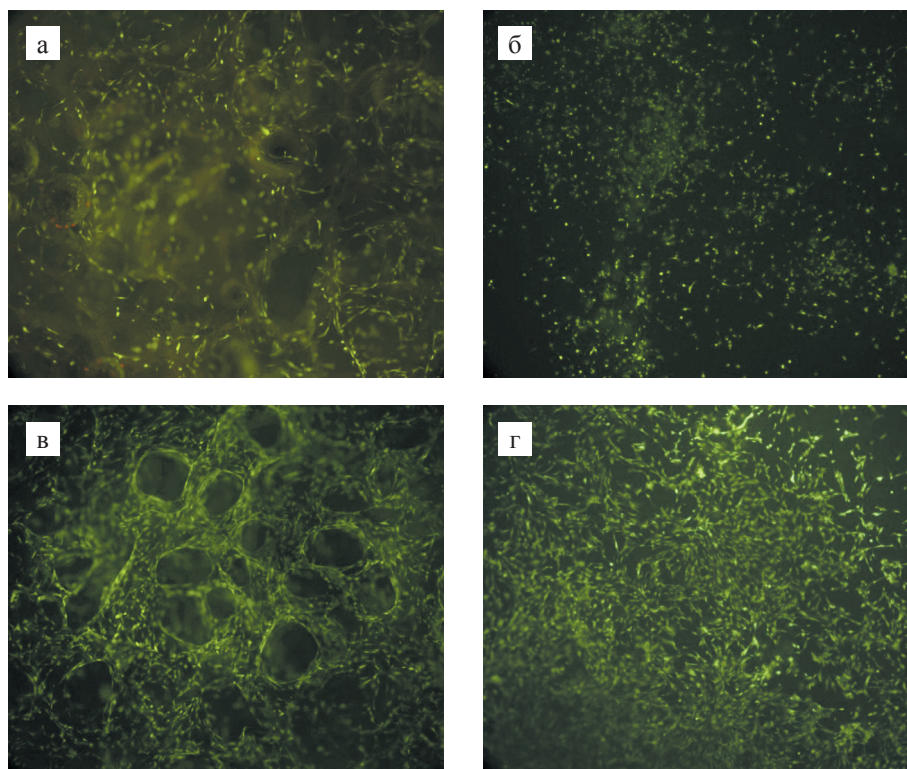


Рис. 4. Рост культуры МСК ЖТч на матрице на основе МККР (а, в) и желатина (б, г); а, б – 3-и сутки; в, г – 12-е сутки культивирования. Окрашивание Live/Dead™. Размер масштабной линейки 100 мкм. ×100

Fig. 4. Growth of human AD-MSC culture on MCCS-based matrix (а, в) and gelatin-based matrix (б, г); а, б – 3 days, в, г – 12 days of culture. Live/Dead™ stain. Scale bar: 100 μm. ×100

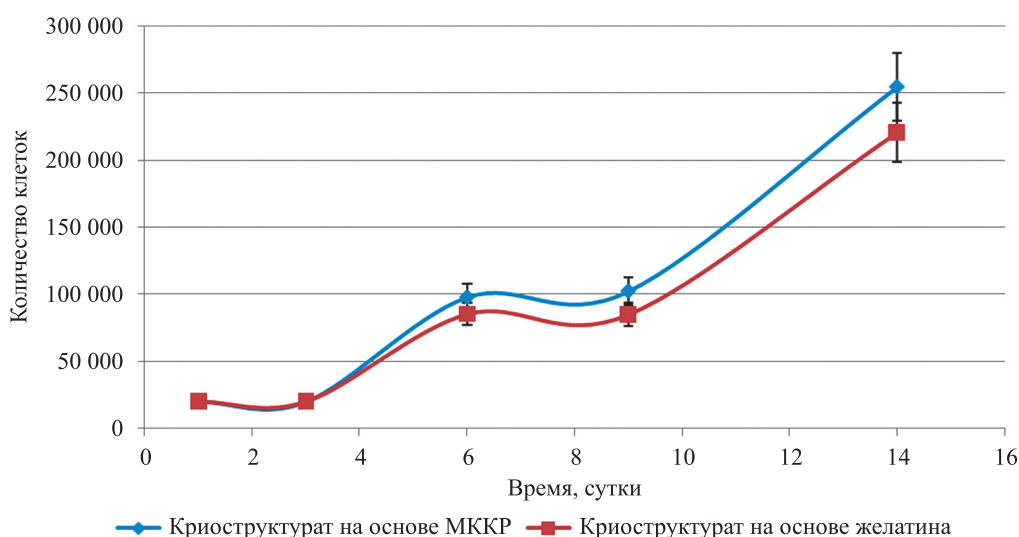


Рис. 5. Метаболическая кривая роста МСК ЖТч на исследуемых матрицах (тест с PrestoBlue™)

Fig. 5. Metabolic growth curve of human AD-MSCs on the tested matrices (Test with PrestoBlue™)



эксперимента на 14-е сутки. Замедление роста в указанный период, на наш взгляд, связано с заполнением клетками доступной поверхности макропористой матрицы и переходом к колонизации подлежащих слоев криоструктурата. Для обоих типов образцов наблюдали сходную динамику нарастания клеточной массы, но МСК ЖТч при культивировании на матрице из МККР пролиферировали на поздних сроках наблюдения (9 и 14 суток) более активно.

### Создание КИК из клеток разных типов на криоструктурате из МККР

При заселении большим количеством клеток –  $5 \times 10^5$  на образец – было показано, что как для культуры НерG2 (рис. 6), так и для EA.hy926 (рис. 7) практически все клетки адгезируются на поверхность образца и активно пролиферируют, образуя к концу эксперимента (для НерG2 – на 10-е сутки, для EA.hy926 – на 15-е сутки) значительные скопления.

Адгезированные клетки на криоструктурате из желатина также активно пролиферировали, но

в случае с НерG2 погибших клеток было больше (рис. 6, г). Отметим, что значимые различия отмечали в локализации клеточных скоплений. Если в случае с желатиновым диском наблюдали преимущественно распространение клеток по поверхности образца, то для диска из МККР выражена тенденция активной колонизации стенок крупных пор и каналов с заселением внутреннего объема макропористого носителя. Особенно четко это прослеживалось для эндотелиальных клеток на позднем сроке культивирования (рис. 7, б).

Использование технологии стекинга, т. е. смещения точки фокуса объектива микроскопа вглубь образца на глубину более 100 мкм с последующей программной обработкой изображения, показало, что клетки распространяются и во внутренний объем макропористого диска на глубину до 60 мкм (рис. 7, д).

Для криоструктуратов из желатина этот показатель был меньше и не превышал 50 мкм (рис. 7, е).

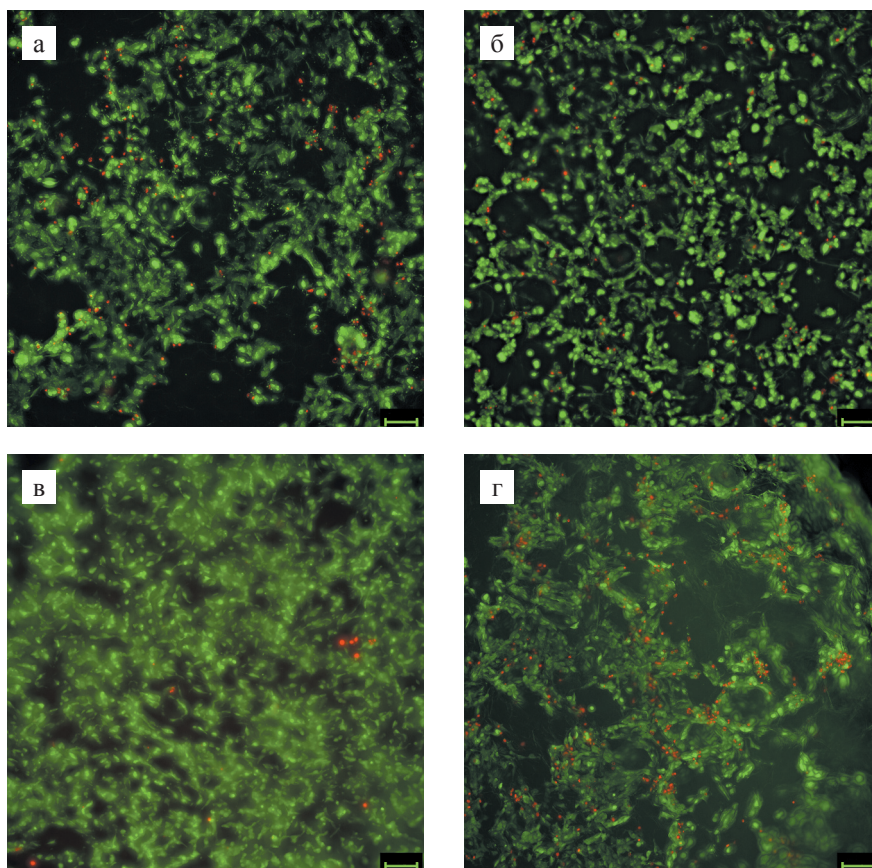


Рис. 6. Рост НерG2 на криоструктурированной матрице: а – 3 суток культивирования, б – 7 суток, криоструктурат из МККР; в – 3 суток культивирования, г – 7 суток, криоструктурат из желатина. Окрашивание Live/Dead™, зеленым цветом окрашены живые клетки, красным цветом окрашены мертвые клетки.  $\times 100$ . Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 6. HepG2 growth on a cryostructured matrix: а – 3 days of culture; б – 7 days, MCCS-based cryostructure; в – 3 days of culture; г – 7 days, gelatin-based cryostructure. Live/Dead™ stain, live cells are stained in green, dead cells are stained in red.  $\times 100$ . Scale bar: 100  $\mu\text{m}$

### Оценка функциональных свойств клеток HerG2 при культивировании на криоструктурате из МККР

Функциональную активность клеток HerG2 в КИК анализировали по синтезу альбумина и продук-

ции мочевины (табл. 1). В качестве контроля использовали культуральную среду такого же количества клеток на культуральном пластике.

В отдельном тесте сравнивали уровень продукции альбумина для КИК с различными количествами клеток (табл. 2).

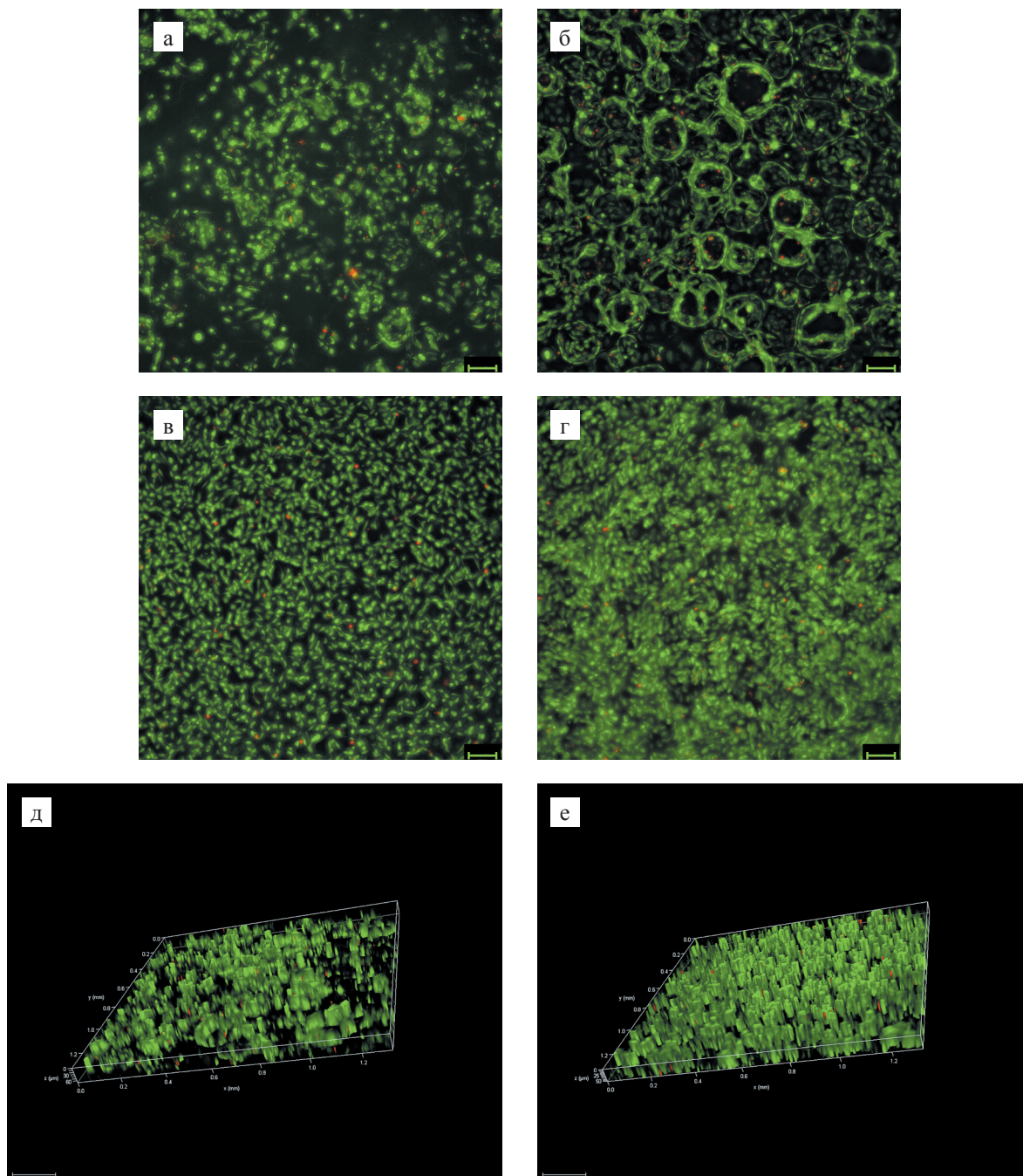


Рис. 7. Рост эндотелиальных клеток линии EA.hy926 на криоструктурированной матрице: а – 7 суток культивирования, б – 15 суток, криоструктурат из МККР; в – 7 суток культивирования, г – 15 суток, криоструктурат из желатина; д – 15 суток, распределение клеток в объеме криоструктурата из МККР; е – 15 суток, распределение клеток в объеме криоструктурата из желатина. Окрашивание Live/Dead™, зеленым цветом окрашены живые клетки, красным цветом окрашены мертвые клетки. Размер масштабной линейки: а-г – 100 мкм; д, е – 200 мкм

Fig. 7. EA.hy926 endothelial cell growth on cryostructured matrix: а – 7 days of culture; б – 15 days, MCCS-based cryostructure; в – 7 days of culture; г – 15 days, gelatin-based cryostructure; д – 15 days, cell distribution in the MCCS-based cryostructure; е – 15 days, cell distribution in the gelatin-based cryostructure. Live/Dead™ stain, live cells are stained in green, dead cells are stained in red. Scale bar: а-г – 100 μm; д, е – 200 μm

Таблица 1

**Содержание альбумина и уровень мочевины в образцах культуральной среды на 10-е сутки культивирования клеток HepG2 на культуральном пластике (контроль)**  
**Albumin content and urea level in culture medium on day 10 of culturing HepG2 cells on culture plastic (control)**

	Альбумин, ммоль/мл	Мочевина, ммоль/л
Культивирование на пластике (контроль)	960 ± 102	1,2 ± 0,2
Культивирование на криоструктурате из МККР	1413 ± 183	1,7 ± 0,3
p	<0,050*	0,051

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

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

Таблица 2

**Содержание альбумина в образцах культуральной среды на 10-е сутки культивирования КИК с разными количествами внесенных клеток HepG2**  
**Albumin content in culture medium on day 10 of CEC cultivation with different amounts of HepG2 cells**

Количество клеток в КИК	Альбумин, ммоль/мл
100 000	1323 ± 164
500 000	1413 ± 183
1 000 000	1963 ± 293

Отметим, что содержание альбумина и мочевины в образцах коррелировало с количеством клеток в КИК.

Полученные данные свидетельствуют о способности HepG2, посеянных на криоструктурате из МККР, поддерживать свою секреторную функцию на 10-е сутки культивирования на более высоком уровне по сравнению с культивированием клеток на пластике.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показывают, что макропористый носитель клеток на основе криоструктурированного многокомпонентного концентрированного коллагенсодержащего раствора обладает большим пространством пор, где преобладают крупные и средние поры, образующие в толще матрикса сеть разветвленных каналов. Данная макропористая структура существенно улучшает экспансию клеток вглубь криоструктура на основе МККР по сравнению с криоструктуратами из желатина. Изученный в работе носитель клеток не цитотоксичен, поддерживает адгезию и пролиферацию разных типов клеток и фор-

мирование клеточно-инженерной конструкции, в которой клетки способны нормально функционировать.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Трансплантология и искусственные органы: учебник / Под ред. акад. РАН С.В. Готье. М.: Лаборатория знаний, 2018; 319 с.: ил. Transplantologija i iskusstvennye organy: uchebnik / Pod red. akad. RAN S.V. Gautier. M.: Laboratorija znaniy, 2018; 319: il. (In Russ.).
2. Yamamoto T, Randriantsilefisoa R, Sprecher CM, D'Este M. Fabrication of collagen-hyaluronic acid cryogels by directional freezing mimicking cartilage arcade-like structure. *Biomolecules*. 2022 Dec 3; 12 (12): 1809. doi: 10.3390/biom12121809.
3. Mirdamadi ES, Kalhori D, Zakeri N, Azarpira N, Solati-Hashjin M. Liver tissue engineering as an emerging alternative for liver disease treatment. *Tissue Eng Part B Rev*. 2020 Apr; 26 (2): 145–163. doi: 10.1089/ten.teb.2019.0233.
4. Zhang L, Guan Z, Ye JS, Yin YF, Stoltz JF, de Isla N. Research progress in liver tissue engineering. *Biomed Mater Eng*. 2017; 28 (s1): S113–S119. doi: 10.3233/BME-171632.
5. Wise JK, Yarin AL, Megaridis CM, Cho M. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on oriented nanofibrous scaffolds: engineering the superficial zone of articular cartilage. *Tissue Eng Part A*. 2009 Apr; 15 (4): 913–921. doi: 10.1089/ten.tea.2008.0109.
6. Daly AC, Kelly DJ. Biofabrication of spatially organized tissues by directing the growth of cellular spheroids within 3D printed polymeric microchambers. *Biomaterials*. 2019 Mar; 197: 194–206. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.12.028.
7. Schwab A, H elary C, Richards RG, Alini M, Eglin D, D'Este M. Tissue mimetic hyaluronan bioink containing collagen fibers with controlled orientation modulating cell migration and alignment. *Mater Today Bio*. 2020 Jun 1; 7: 100058. doi: 10.1016/j.mtbio.2020.100058.
8. Лозинский ВИ. Новое семейство макропористых и сверхмакропористых материалов биотехнологического назначения – полимерные криогели. *Известия РАН. Серия химическая*. 2008; (5): 996–1014. Lozinsky VI. Polymeric cryogels as a new family of macroporous and supermacroporous materials for biotechnological purposes. *Russ Chem Bull*. 2008; 57 (5): 1015–1032. doi: 10.1007/s11172-008-0131-7.
9. Lozinsky VI. Cryostructuring of polymer systems. 50.† Cryogels and cryotropic gel-formation: terms and definitions. *Gels*. 2018; 4 (3): 77. doi: 10.3390/gels4030077.
10. Henderson TMA, Ladewig K, Haylock DN, McLean KM, O'Connor AJ. Cryogels for biomedical applications. *J Mater Chem B*. 2013; 1 (21): 2682–2695. doi: 10.1039/c3tb20280a.
11. Memic A, Colombani T, Eggermont LJ, Rezaeeyazdi M, Steingold J, Rogers ZJ et al. Latest advances in cryogel

- technology for biomedical applications. *Adv Ther.* 2019; 2 (4): 1800114. doi: 10.1002/adtp.201800114.
12. *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): 29. doi: 10.3390/gels6030029.
  13. *Shiekh PA, Andrabi SV, Singh A, Majumder S, Kumar A.* Designing cryogels through cryostructuring of polymeric matrices for biomedical applications. *Eur Polym J.* 2021; 144; 110234. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2020.110234.
  14. *Ma Y, Wang X, Su T, Lu F, Chang Q, Gao J.* Recent advances in macroporous hydrogels for cell behavior and tissue engineering. *Gels.* 2022 Sep 21; 8 (10): 606. doi: 10.3390/gels8100606.
  15. *Omidian H, Chowdhury SD, Babanejad N.* Cryogels: advancing biomaterials for transformative biomedical applications. *Pharmaceutics.* 2023 Jun 27; 15 (7): 1836. doi: 10.3390/pharmaceutics15071836.
  16. *Lozinsky VI, Okay O.* Basic principles of cryotropic gelation. *Adv Polym Sci.* 2014; 263: 49–102. doi: 10.1007/978-3-319-05846-7\_2.
  17. *Севастьянов ВИ, Григорьев АМ, Басок ЮБ, Кирсанова ЛА, Василец ВН, Малкова АП и др.* Биосовместимые и матричные свойства полилактидных губок. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2018; 20 (2): 82–90. *Sevastianov VI, Grigoriev AM, Basok YuB, Kirsanova LA, Vasilets VN, Malkova AP et al.* Biocompatible and matrix properties of polylactide scaffolds. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs.* 2018; 20 (2): 82–90. (In Russ.). <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2018-2-82-90>.
  18. *Bhaskar B, Rao PS, Kasoju N, Nagarjuna V, Baadhe RR (Eds.).* Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. From Basic Concepts to State of the Art Approaches. Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2021; 1039. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-0002-9>.
  19. *Sevastianov VI, Basok YB, Kirsanova LA, Grigoriev AM, Kirillova AD, Nemets EA 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 Jul 27; 11 (8): 756. doi: 10.3390/life11080756.
  20. *Севастьянов ВИ, Перова НВ.* Биополимерный гетерогенный гидрогель Сферо®ГЕЛЬ – инъекционный биодеградируемый имплантат для заместительной и регенеративной медицины. *Практическая медицина.* 2014; 8 (84): 120–126. *Sevast'yanov VI, Perova NV.* Biopolimernyyu geterogennyu gidrogel' Sfero®GEL' – in'ektsionnyu biodegradiruemyu implantat dlya zamestitel'noy i regenerativnoy meditsiny. *Prakticheskaya meditsina.* 2014; 8 (84): 120–126.
  21. *DeQuach JA, Mezzano V, Miglani A, Lange S, Keller GM, Sheikh F, Christman KL.* Simple and high yielding method for preparing tissue specific extracellular matrix coatings for cell culture. *PLoS ONE.* 2010; 5 (9): e13039. doi: 10.1371/journal.pone.0013039.
  22. *Лозинский ВИ, Кулакова ВК, Колосова ОЮ, Басок ЮБ, Григорьев АМ, Перова НВ, Севастьянов ВИ.* Биополимерный материал для клеточно-инженерных и/или тканеинженерных конструкций и способ его получения. Пат. РФ № 2774947 (2021); Б.И. № 18 (2022). *Lozinskiy VI, Kulakova VK, Kolosova OYu, Basok YuB, Grigor'ev AM, Perova NV, Sevast'yanov VI.* Biopolimernyyu material dlya kletочно-inzhenernykh i/ili tkaneinzhenernykh konstruksiy i sposob ego polucheniya. Pat. RF № 2774947 (2021); В.И. № 18 (2022).
  23. *Григорьев АМ, Басок ЮБ, Кириллова АД, Сургученко ВА, Шмерко НП, Кулакова ВК и др.* Криогенно-структурированный гидрогель на основе желатина как резорбируемая макропористая матрица для биомедицинских технологий. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2022; 24 (2): 83–93. *Grigoriev AM, Basok YuB, Kirillova AD, Surguchenko VA, Shmerko NP, Kulakova VK et al.* Cryogenically structured gelatin-based hydrogel as a resorbable macroporous matrix for biomedical technologies. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs.* 2022; 24 (2): 83–93. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2022-2-83-93>.
  24. *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 Oct 28; 8 (11): 695. doi: 10.3390/gels8110695.
  25. *Novikov I, Subbot A, Turenok A, Mayanskiy N, Chebotar I.* A rapid method of whole cell sample preparation for scanning electron microscopy using neodymium chloride. *Micron.* 2019; 124: 102687. doi: 10.1016/j.micron.2019.102687.
  26. Межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 10993-5-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы *in vitro*». *Mezhgosudarstvennyj standart GOST ISO 10993-5-2011 «Izdeliya medicinskie. Ocenka biologicheskogo dejstviya medicinskih izdelij. Chast' 5. Issledovanie na citotoksichnost': metody in vitro».*

Статья поступила в редакцию 21.09.2023 г.

The article was submitted to the journal on 21.09.2023