



<https://doi.org/10.15407/cryo35.02.068>

УДК 616.5-001.17-003.93-092.9:611.018.013.395

Т.М. Гуріна, Е.О. Нардід, А.А. Селюта, Г.Л. Полякова *, В.П. Марценюк

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,

м. Харків, Україна

*poliakova79ann@gmail.com

ВПЛИВ СТЕРИЛІЗАЦІЇ ТА НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР НА РЕГЕНЕРАТИВНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ

Завдяки своїм фізичним властивостям та фармакологічній активності гіалуронової кислоти (ГК) має неабияку перспективність використання для потреб кріобіології та кріомедицини. Метою дослідження було створення методу стерилізації водяних розчинів ГК, які не призводять до зниження її регенеративних властивостей, та вивчення впливу низьких температур на їх збереженість. Для стерилізації водяних розчинів ГК запропоновано режим щадної стерилізації — тіндалізації, який водночас забезпечує стерильність розчинів та не впливає на її регенеративні властивості. На моделі загоєння ексцизійної рани у тварин досліджено вплив режиму тіндалізації та дії низьких температур на збереженість регенеративних властивостей 1 та 2 % водяних розчинів ГК різної молекулярної маси: низькомолекулярної (НмГК) (<100 кДа) і високомолекулярної (ВмГК) (>2000 кДа). Показано, що низькі температури не змінюють регенеративні властивості ВмГК та НмГК (навіть в режимі термоцикування), що відкриває широкі можливості використання в кріобіології і кріомедицині.

Ключові слова: гіалуронова кислота, вплив низьких температур, збереженість регенеративних властивостей, стерилізація.

Гіалуронова кислота (ГК) — одна з універсальних і унікальних молекул природи, яка присутня у всіх живих організмах, включаючи бактерії [9, 11, 26, 33]. Вона є лінійним глікозаміногліканом, який складається з одиниць, які чергуються, D-глюкуронової кислоти та N-ацетил-D-глюкозаміну, з'єднаних разом β -1,4- та β -1,3-глікозидними зв'язками [2, 9, 11, 23, 26].

У середньому в організмі дорослої людини міститься близько 12—15 г ГК, більша частина якої знаходиться в шкірі, склоподібному тілі ока, пуповині, синовіальній рідині суглобів, міжхребцевих дисках, ембріональних мезенхімальних тканинах, а також у серцевих клапанах, легенях, сухожильних піхвах, бурсі аорти та передміхуровій залозі [2, 9, 11, 26, 28]. Крім

того, ГК відіграє важливу роль у процесі запліднення [22].

Молекула ГК біосумісна, біорозкладна, неімуногенна, нетромбогенна, гідрофільна, бере участь у багатьох фізіологічних і патологічних процесах, володіє широким спектром фармакологічної активності, зокрема антиоксидантною активністю за рахунок реакції з кисневмісними вільними радикалами, надає проти-запальну дію [10, 37, 39—41], має ранозагоювальні властивості завдяки стимуляції запальних сигналів і полегшення рухливості та проліферації клітин [11, 14, 17, 20, 21], запобігає утворенню, спайок, рубців [31, 36]. Молекулі ГК притаманна регенеруюча [4, 7, 9, 15, 31, 35, 43], імуномодулююча [9, 26, 35], протиракова [2, 9,

Цитування: Гуріна ТМ, Нардід ЕО, Селюта АА, Полякова ГЛ, Марценюк ВП. Вплив стерилізації та низьких температур на регенеративний потенціал гіалуронової кислоти. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2025; 35(2): 69–77. <https://doi.org/10.15407/cryo35.02.068>

© Видавець ВД «Академперіодика» НАН України, 2025. Стаття опублікована на умовах відкритого доступу за ліцензією CC BY-NC-ND license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

19, 29], антипроліферативна [9, 16], антидіабетична [13, 30], антивікова [2, 9, 26], відновлювальна [9, 15, 21, 31, 35], антиоксидантна та косметична дія [3, 5, 31, 33].

Вважається, що ГК є переважно позаклітинною молекулою, однак її було виявлено всередині клітин у перинуклеарній ділянці гладком'язових клітин аорти під час премітозу та мітозу, а також у цитоплазматичних структурах [2, 8, 12, 18]. На даний час внутрішньоклітинні функції ГК ще не повністю визначені. Слід зазначити, що існує гіпотеза про контролювання ГК клітинної проліферацією та запаленням [12, 18]. Безумовним лідером використання ГК є галузі естетичної медицини та косметології [3, 42].

Біологічні функції ГК значною мірою залежать від її молекулярної маси [6, 32, 33, 38]. Високомолекулярна ГК (ВмГК, >2000 кДа) володіє депонуючими та антиоксидантними властивостями, довше знаходиться у тканинах, на поверхні шкіри та слизових оболонках, пригнічує поділ клітин та міграцію речовин до локалізації запалення.

Середньомолекулярна ГК (100–1000 кДа) запускає синтез власної ендогенної ГК, прискорює загоєння ран [35], стимулює поділ клітин. Вона має широке використання у виробництві косметичної продукції, очних крапель, засобів для загоєння опіків шкіри та запобігання утворенню післяопераційних спайок.

Низькомолекулярна ГК (НмГК, <100 кДа) легко проникає у глибокі шари шкіри, добре всмоктується у кишечнику, покращує перенос води та речовин, стимулює регенерацію кровоносних капілярів, що з успіхом використовується для лікування запальних процесів у суглобах та органах сечостатевої системи. Крім того, ГК застосовується під час проведення косметичних процедур та контурної пластики, входить до складу продуктів для здоров'я та краси.

Останнім часом ГК все частіше є об'єктом кріобіологічних досліджень, що обумовлює необхідність вивчення впливу низьких температур на збереження її регенеративних властивостей [1, 25, 27].

Відомо, що ГК — природний лінійний полісахарид, який серед інших представників цього класу відрізняється ступенем зв'язування

молекул води. В середньому одна молекула ГК здатна зв'язувати об'єм води, який у 10 000 разів перевищує її об'єм. Здатність ГК утримувати воду обумовлена наявністю великої кількості гідроксильних груп, що приводить до утворення водневих зв'язків. Таким чином, у поєднанні з гарною розчинністю у воді ГК має високий рівень в'язкості, навіть при низьких концентраціях полімеру. Наявність такої властивості ГК спонукає фахівців до дослідження можливості створення на її основі кріозахисних середовищ для кріоконсервування біологічного матеріалу.

Однією з вимог для складових кріозахисних розчинів є забезпечення їхньої початкової стерильності, що особливо важливо у випадках використання кріоконсервованого біологічного матеріалу в практичній медицині як основи для створення ранових покриттів з підсиленими регенеративними властивостями.

Метою дослідження було створення способу стерилізації водяних розчинів ГК та вивчення впливу низьких температур на збереження її регенеративних властивостей.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дизайн досліджень схвалено комітетом із біоетики (Протокол №5 від 22.11.2022) Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (ІПКіК НАН України, м. Харків). Експерименти проводили відповідно до положень Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№3447-IV від 21.02.2006) і «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Експерименти були проведені на білих мишах-самцях лінії Balb/C одного віку (6 місяців) та приблизно однакової маси тіла 25—30 г. Тварини утримувалися за стандартних умов віварію ІПКіК НАН України. Збереження регенеративних властивостей досліджуваних розчинів ГК вивчали на моделі загоєння ексцизійної рани у тварин. Метою моделі загоєння ексцизійної рани тварини є відтворення фізіології людини та прогнозування терапевтичних результатів. У гризунів основним механізмом закриття рани є її скорочення, тоді як у людей — реепітелізація та утворення грануляційної тканини. З огляду на цей факт у мишей на

моделі ексцизійної рани застосовують шинування для мінімізації її скорочення, що приводить до загоєння через процеси грануляції та реепітелізації. Модель шинування ексцизійної рани відрізняється від ексцизійної моделі тим, що кільце шини щільно накладають на шкіру навколо ранової поверхні для запобігання закриття дефекту за рахунок скорочення шкіри. Таким чином, за допомогою використаної моделі рани у мишей загоюються подібно до загоєння ран у людей. В експерименті для шинування використовували силіконові кільця товщиною 1 мм і внутрішнім діаметром, що відповідає діаметру рани. До шкіри тварин кільця фіксували за допомогою медичного клею.

Для анестезії мишам внутрішньочеревно вводили препарат «Ксилазин» (Alfasan, Нідерланди) та «Золетил-100» (Virbac, Франція) із розрахунку 0,1125 та 0,375 мг на одну тварину відповідно. Для премедикації за 15 хв до наркозу вводили підшкірно атропіну сульфат (ОЗ ГНЦЛС ООО, Україна) з розрахунку 0,0025 мг на одну мишу. Після цього у міжлопатковій ділянці спини збривали шерстяний покрив і обробляли поверхню шкіри антисептиком. Скальпелем для біопсії шкіри одночасно наносили дві круглі рани діаметром 5 мм. Динаміку загоєння ран у експериментальних тварин спостерігали протягом 10 діб із щоденною фотофіксацією процесу загоєння. Контролем були тварини з ранами, які самостійно загоювалися. Площу поверхні ран обчислювали за допомогою програмного забезпечення з відкритим кодом «ImageJ 1.54» (National Institutes of Health, США). Для зручності та наочності отримані результати представляли у вигляді графіків, які демонструють залежність доби повного загоєння рани від досліджуваного параметра. З експерименту мишей виводили в нормальному фізіологічному стані.

У роботі використовували 1 та 2%-вий водянні розчини ГК різної молекулярної маси (Bang& Bonsomer, Фінляндія): низькомолекулярної (НмГК) (10—100 кДа) і високомолекулярної (ВмГК) (>2000 кДа). Розчини розливали в кріопробірки об'ємом 5 мл (Nunc, США).

Миші були розділені на п'ять груп:

- самостійне загоєння (контроль);
- нанесення на рану 1%-вого розчину ВмГК;
- нанесення на рану 2%-вого розчину ВмГК;

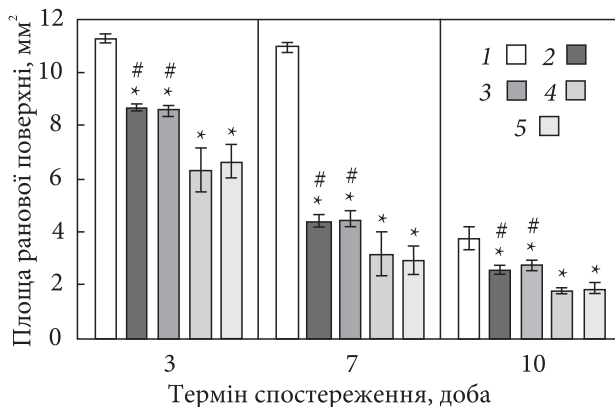


Рис. 1. Вплив водяних розчинів ГК на динаміку загоєння ранових поверхонь: 1 — контроль, 2 — 1%-й розчин ВмГК, 3 — 2%-й розчин ВмГК, 4 — 1%-й розчин НмГК, 5 — 2%-й розчин НмГК. * — відмінності значущі відносно показників контролю, $p < 0,05$; # — відмінності значущі відносно показників НмГК з відповідною концентрацією, $p < 0,05$

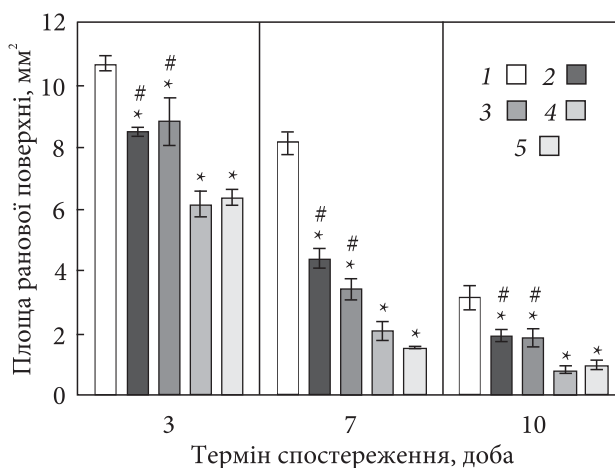


Рис. 2. Динаміка загоєння ранової поверхні після обробки водяним розчином ГК, стерилізованим за режимом 1 тіндалізації: 1 — контроль, 2 — 1%-й розчин ВмГК, 3 — 2%-й розчин ВмГК, 4 — 1%-й розчин НмГК, 5 — 2%-й розчин НмГК. * — відмінності значущі відносно показників контролю, $p < 0,05$; # — відмінності значущі відносно показників НмГК з відповідною концентрацією, $p < 0,05$

- нанесення на рану 1%-вого розчину НмГК;
- нанесення на рану 2%-вого розчину НмГК.

У кожній експериментальній групі було 5 мишей. Всього в роботі було використано 150 тварин.

Для стерилізації водяних розчинів ГК використовували тіндалізацію — найбільш щадний вид теплової роздрібної стерилізації, який було запропоновано англійським ученим Дж. Тіндалем для стерилізації поживних середовищ, компоненти яких розкладаються при температурі вищій за 100 °С, розчинів вітамінів,

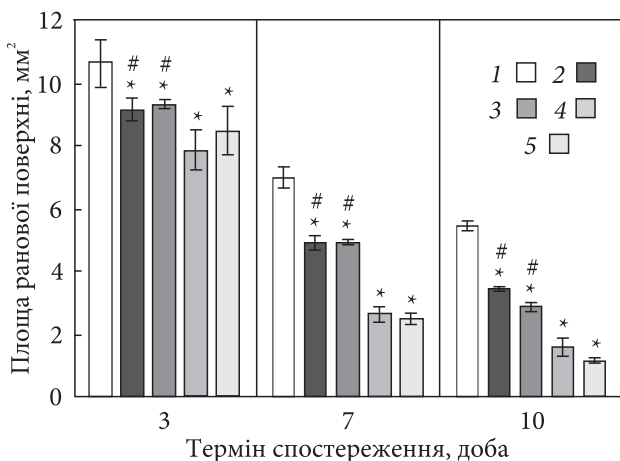


Рис. 3. Динаміка загоювання ранової поверхні після обробки водяним розчином ГК, стерилізованим за режимом 2 тіндалізації: 1 — контроль, 2 — 1%-й розчин ВмГК, 3 — 2%-й розчин ВмГК, 4 — 1%-й розчин НмГК, 5 — 2%-й розчин НмГК. * — відмінності значущі відносно показників контролю, $p < 0,05$; # — відмінності значущі відносно показників НмГК з відповідною концентрацією, $p < 0,05$

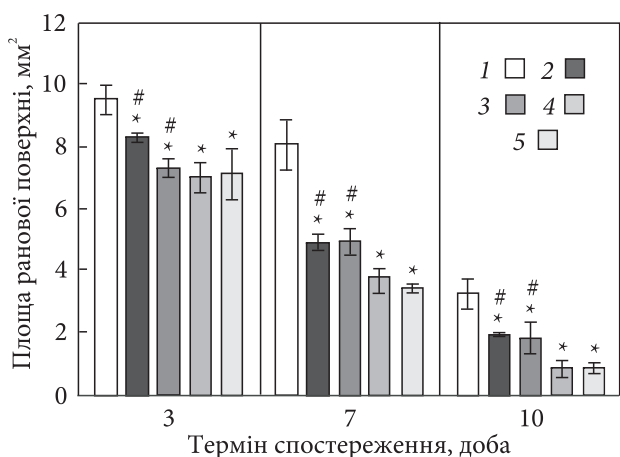


Рис. 4. Динаміка загоювання ранової поверхні після обробки водяним розчином ГК, стерилізованим за режимом 3 тіндалізації: 1 — контроль, 2 — 1%-й розчин ВмГК, 3 — 2%-й розчин ВмГК, 4 — 1%-й розчин НмГК, 5 — 2%-й розчин НмГК. * — відмінності значущі відносно показників контролю, $p < 0,05$; # — відмінності значущі відносно показників НмГК з відповідною концентрацією, $p < 0,05$

амінокислот, тощо. Тіндалізація полягає в нагріванні рідин до температури 70—100 °С (як правило, протягом години) від трьох до п'яти разів із 24-годинними проміжками. Така температура викликає загибель лише вегетативних клітин, при цьому спори залишаються життєздатними. Підтримання температури субстрату на оптимальному рівні впродовж доби призводить до проростання спор, і вони гинуть

під час подальшого нагрівання. У роботі досліджували три режими:

- режим 1 — зразок прогрівали за температури 60 °С впродовж 60 хв, потім впродовж доби термостатували за температури (37 ± 1) °С для проростання спорових форм у вегетативній, процедуру повторювали 5 разів;
- режим 2 — зразок прогрівали за температури 80 °С впродовж 60 хв, потім впродовж доби термостатували за температури (37 ± 1) °С для проростання спорових форм у вегетативній, процедуру повторювали 3 рази;
- режим 3 — зразок прогрівали за температури 100 °С впродовж 30 хв, потім впродовж доби термостатували за температури (37 ± 1) °С для проростання спорових форм у вегетативній, процедуру повторювали 3 рази.

Заморожування водяних розчинів проводили шляхом занурення кріопробірок у рідкий азот з подальшим відтаванням у водяній бані при 37 °С. Для термоцикування кріопробірки з досліджуваними розчинами тричі занурювали у рідкий азот з подальшим відтаванням у водяній бані за температури 60 °С.

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми «Origin 9.1» (OriginLab Corporation, США) з використанням непараметричного критерію Манна-Уїтні. Дані представляли у вигляді $M \pm m$, де M — середнє значення, m — стандартне відхилення, значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Підвищена увага експериментаторів, клініцистів і косметологів до ГК та комплексних препаратів, що містять у своєму складі гіалуронову кислоту, насамперед, пов'язана з притаманними їй потужними регенеративними властивостями. Гіалуронові кислоти використовуються для виробництва ін'єкційних препаратів, сучасних біологічно активних ранових покриттів та в регенеративній медицині за умов стерилізації первинних розчинів ГК.

У подальшому досліджували збереження регенеративних властивостей ГК на прикладі загоювання ран у піддослідних тваринах у порівнянні з контролем (самостійне загоювання) залежно від таких умов: молекулярної маси (ВмГК та НмГК), концентрації (1 та 2%); стерилізації водяних розчинів ГК із використан-

ням зазначених режимів тіндалізації; заморожування-відтавання водяних розчинів ГК, особливо при використанні режиму термоциклування.

На першому етапі дослідження вивчали прояв регенеративних властивостей ГК залежно від її молекулярної маси (ВмГК, НмГК) та концентрації (1, 2 %). Ранову поверхню у тварин із групи спостереження обробляли відповідним водяним розчином ГК. У експерименті використовували 5 груп тварин ($n = 5$ у кожній), які описані вище. Результати спостереження за динамікою загоювання ранової поверхні на 3, 7, 10 доби представлено на рис. 1.

Аналізуючи динаміку загоєння ран у експериментальних тварин, яким на поверхню ексцизійних ран наносили ГК різної молекулярної маси, та у тварин контрольної групи, можна зробити висновок про наявність виражених регенеративних властивостей ГК як з високою, так і з низькою молекулярною масою. Необхідно відзначити, що регенеративні властивості ГК з низькою молекулярною масою є більш вираженими. На нашу думку, це пов'язано з наявністю невеликих ланцюжків ГК, які мають більш розвинуту поверхню взаємодії, що краще сприяє регенерації ранової поверхні.

Таким чином, для забезпечення стійкого терапевтичного ефекту від застосування препаратів з вмістом ГК та гарантування їх регенеративної дії важливо мати ГК з однаковими показниками молекулярної маси, а саме низькомолекулярного діапазону.

Спираючись на експериментальні дані, можна зробити висновок, що водяні розчини ГК 1 та 2%-вий мали відносно однакові регенеративні властивості, однак 2%-вий водяний розчин ГК був більш зручним для нанесення на рану завдяки більш високій густині.

На другому етапі досліджували регенеративні властивості ГК після стерилізації. Основним критерієм вибору режиму стерилізації водяних розчинів ГК було забезпечення збереження початкової структури молекули ГК та регенеративних властивостей ГК, які найбільш затребувані у практичній медицині. Зустрічаються рекомендації щодо запобігання нагрівання таких розчинів вище 40—50 °С, особливо для подальшого використання в регенеративній медицині та косметології [24, 34]. З огляду на цей факт

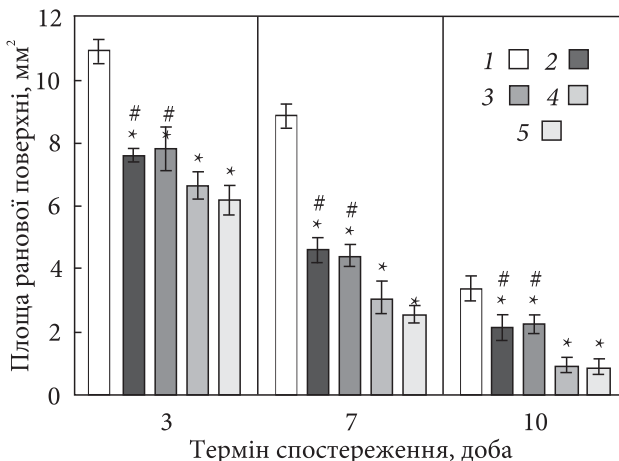


Рис. 5. Динаміка загоювання ранової поверхні, обробленої водяним розчином ГК після заморожування-відтавання: 1 — контроль, 2 — 1%-й розчин ВмГК, 3 — 2%-й розчин ВмГК, 4 — 1%-й розчин НмГК, 5 — 2%-й розчин НмГК. * — відмінності значущі відносно показників контролю, $p < 0,05$; # — відмінності значущі відносно показників НмГК з відповідною концентрацією, $p < 0,05$

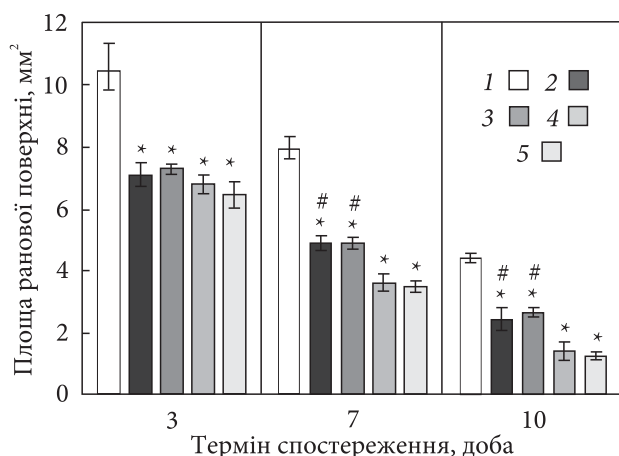


Рис. 6. Динаміка загоювання ранової поверхні, обробленої водяним розчином ГК після термоциклування: 1 — контроль, 2 — 1%-й розчин ВмГК, 3 — 2%-й розчин ВмГК, 4 — 1%-й розчин НмГК, 5 — 2%-й розчин НмГК. * — відмінності значущі відносно показників контролю, $p < 0,05$; # — відмінності значущі відносно показників НмГК з відповідною концентрацією, $p < 0,05$

для стерилізації водяних розчинів ГК застосовували метод тіндалізації, який є найбільш перспективним для стерилізації біологічного матеріалу для подальшого впровадження в промислове виробництво.

Збереження регенеративних властивостей ГК різної молекулярної маси (ВмГК та НмГК) досліджували на прикладі її водяних розчинів різ-

ної концентрації (1 та 2 %) після теплової стерилізації тіндалізацією за зазначеними вище режимами. В експерименті використовували 5 груп тварин ($n = 5$ у кожній). Результати спостереження за динамікою загоювання ранової поверхні після нанесення розчинів ГК, стерилізованих за режимами 1—3 тіндалізації, представлено на рис. 2—4 відповідно.

На підставі отриманих експериментальних даних можна зробити висновок, що тіндалізація водяних розчинів ВмГК та НмГК не знижує їх регенеративних властивостей, однак більш виражене збереження регенеративних властивостей спостерігається у розчинів ГК з низькою молекулярною масою. Окрім того, загоєння ранових поверхонь у групі тварин, яким на рани наносили як ВмГК, так і НмГК після проведеної тіндалізації за режимами 2 та 3, проходило повільніше, ніж за режимом 1, що, вочевидь, пов'язано з дією більш високої температури. Таку закономірність спостерігали в експерименті з 1 та 2%-вим водяними розчинами ГК. Тіндалізація за режимами 2 та 3 незначно знижує регенеративні властивості водяних розчинів ВмГК та НмГК.

Представлені дані підтверджують позитивний вплив водяних розчинів ГК на динаміку загоєння ранової поверхні. Як і у попередньому дослідженні, повне загоєння ранової поверхні за умови використання водяних розчинів ГК відбувалось на 7—8 добу, тоді як у мишей контрольної групи рана не загоювалась навіть на 11-ту добу. Отже, метод тіндалізації для водяних розчинів ГК одночасно гарантує їх стерильність та зберігає притаманні ГК початкові регенеративні властивості.

Особливу увагу в роботі було приділено визначенню впливу низьких температур на зберігання регенеративних властивостей водяних розчинів ГК в залежності від молекулярної маси та концентрації. Окремо досліджували процедуру термоцикування як більш жорсткого режиму впливу низьких температур. Слід зазначити, що прояви термоцикування можуть мати місце впродовж довгострокового зберігання біологічного матеріалу за низьких температур та його транспортування.

У серії експериментів щодо визначення впливу низьких температур миші були розді-

лені на п'ять груп ($n = 5$ у кожній), а розчини ГК для нанесення на рану було використано після заморожування-відтавання. Аналогічні групи тварин було сформовано для дослідження збереження регенеративних властивостей водяних розчинів ГК після термоцикування.

Результати експерименту представлено на рис. 5 і 6, на яких показано позитивну динаміку загоювання ранової поверхні після застосування водяних розчинів ГК у порівнянні з контролем. Отримані результати дають підставу стверджувати, що низькі температури, навіть у режимі циклування, не призводять до втрати регенеративних властивостей ГК. Окрім того, експериментальні дані відповідали тенденціям, що спостерігалися і у попередніх дослідженнях, а саме: виражені регенеративні властивості 1- та 2%-вих водяних розчинів ВмГК та НмГК, особливо НмГК.

Площа ранової поверхні на фоні використання ВмГК після заморожування-відтавання на 10 добу становила ($2,143 \pm 0,377$) та ($2,266 \pm 0,257$) мм^2 для 1- та 2%-вого розчину відповідно (див. рис. 5). Після використання НмГК досліджувані показники дорівнювали ($0,936 \pm 0,181$) та ($0,881 \pm 0,193$) мм^2 для 1- та 2%-вого розчину відповідно, а у контролі — ($3,35 \pm 0,367$) мм^2 .

У ВмГК після термоцикування площа ранової поверхні для розчинів 1 та 2% на 10 добу становила ($2,438 \pm 0,343$) та ($2,66 \pm 0,111$) мм^2 відповідно (див. рис. 6), у НмГК — ($1,39 \pm 0,25$) та ($1,23 \pm 0,063$) мм^2 відповідно. У контролі такі показники склали ($4,431 \pm 0,1$) мм^2 .

Отже, використання в експерименті режиму охолодження шляхом занурення зразків у рідкий азот є підґрунтям для ствердження про збереженість регенеративних властивостей ГК після застосування більш щадних режимів заморожування-відтавання.

Завдяки зв'язуванню великої кількості вільної води, що зменшує пошкодження клітин за рахунок дії механічного фактора, ГК може бути використана в якості перспективної складової кріозахисного розчину для кріоконсервування.

ВИСНОВКИ

1. Гіалуронова кислота є перспективною основою для створення ранових покриттів. Для

прискорення регенеративних процесів під час лікування ранових поверхонь рекомендовано використання НмГК.

2. Спосіб тіндалізації забезпечує стерильність водяних розчинів ГК, що є обов'язковою умовою для їх подальшого клінічного використання. З трьох розглянутих нами режимів оп-

тимальним є режим 2 (прогрівання зразка за температури 80 °С).

3. Дія низьких температур не впливає на регенеративні властивості ВмГК та НмГК (навіть у режимі термоциклування), що відкриває широкі можливості для її використання в кріобіології та кріомедицині.

ЛІТЕРАТУРА

1. Asadpour R, Aminirad M, Rahbar M, et al. Effects of hyaluronic acid on sperm parameters, mitochondrial function and apoptosis of spermatozoa in Simmental bulls with good and poor freezing ability. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2024; 108(2): 383–94.
2. Bohaumilitzky L, Huber AK, Stork EM, et al. Trickster in disguise: Hyaluronan's ambivalent roles in the matrix. *Front Oncol* [Internet]. 2017 Oct 9 [cited 2024 Jul 2]; 7: 242. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2017.00242/full>
3. Bukhari SNA, Roswandi NL, Waqas M, et al. Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. *Int J Biol Macromol*. 2018; 120(Pt B): 1682–95.
4. Collins MN, Birkinshaw C. Comparison of the effectiveness of four different crosslinking agents with hyaluronic acid hydrogel films for tissue-culture applications. *J Appl Polym Sci*. 2007; 104(5): 3183–91.
5. Cui N, Qian J, Liu T, et al. Hyaluronic acid hydrogel scaffolds with a triple degradation behavior for bone tissue engineering. *Carbohydr Polym*. 2015; 126: 192–8.
6. Cyphert JM, Trempus CS, Garantziotis S. Size matters: molecular weight specificity of hyaluronan effects in cell biology. *Int J Cell Biol* [Internet]. 2015 Sep 10 [cited 2024 Aug 4]; 2015: 563818. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1155/2015/563818>
7. Dong Y, Cui M, Qu J, et al. Conformable hyaluronic acid hydrogel delivers adipose-derived stem cells and promotes regeneration of burn injury. *Acta Biomater*. 2020; 108: 56–66.
8. Evanko SP, Wight TN. Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells. *J Histochem Cytochem*. 1999; 47(10): 1331–42.
9. Fallacara A, Baldini E, Manfredini S, Vertuani S. Hyaluronic acid in the third millennium. *Polymers* [Internet]. 2018 Jun 25 [cited 2024 Jul 4]; 10: 701. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4360/10/7/701>
10. Gallorini M, Antonetti Lamorgese Passeri C, Cataldi A, et al. Hyaluronic acid alleviates oxidative stress and apoptosis in human tenocytes via Caspase 3 and 7. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Aug 8 [cited 2024 Jul 2]; 23(15): 8817. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/15/8817>
11. Gupta RC, Lall R, Srivastava A, Sinha A. Hyaluronic acid: molecular mechanisms and therapeutic trajectory. *Front Vet Sci* [Internet]. 2019 Jun 25 [cited 2024 Jul 12]; 6: 192. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/veterinary-science/articles/10.3389/fvets.2019.00192/full>
12. Hascall VC, Majors AK, De La Motte CA, et al. Intracellular hyaluronan: a new frontier for inflammation? *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1673(1-2): 3–12.
13. Hauck S, Zager P, Halfter N, et al. Collagen/hyaluronan based hydrogels releasing sulfated hyaluronan improve dermal wound healing in diabetic mice via reducing inflammatory macrophage activity. *Bioact Mater*. 2021; 6(12): 4342–59.
14. Huang G, Huang H. Application of hyaluronic acid as carriers in drug delivery. *Drug Deliv*. 2018; 25(1): 766–72.
15. Hwang HS, Lee CS. Recent progress in hyaluronic-acid-based hydrogels for bone tissue engineering. *Gels* [Internet]. 2023 Jul 21 [cited 2024 Aug 12]; 9(7): 588. Available from: <https://www.mdpi.com/2310-2861/9/7/588>
16. Knudson W, Ishizuka S, Terabe K, et al. The pericellular hyaluronan of articular chondrocytes. *Matrix Biol*. 2019; 78–79: 32–46.
17. Kwon MY, Wang C, Galarraga JH, et al. Influence of hyaluronic acid modification on CD44 binding towards the design of hydrogel biomaterials. *Biomaterials* [Internet]. 2019 Nov [cited 2024 Sep 2]; 222: 119451. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0142961219305502>
18. Litwiniuk M, Krejner A, Speyrer MS, et al. Hyaluronic acid in inflammation and tissue regeneration. *Wounds*. 2016; 28(3): 78–88.
19. Long C, Peng H, Yang W, et al. Targeted delivery of gemcitabine for precision therapy of cholangiocarcinoma using hyaluronic acid-modified metal-organic framework nanoparticles. *ACS Omega*. 2024; 9(10): 11998–2005.
20. Luo Y, Prestwich GD. Synthesis and selective cytotoxicity of a hyaluronic acid-antitumor bioconjugate. *Bioconjug Chem*. 1999; 10(5): 755–63.

21. Marcotti S, Maki K, Reilly GC, et al. Hyaluronic acid selective anchoring to the cytoskeleton: An atomic force microscopy study. *PLoS One* [Internet]. 2018 Oct 25 [cited 2024 Sep 2]; 13(10): e0206056. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0206056>
22. Marei WFA, Raheem KA, Salavati M, et al. Hyaluronan and hyaluronidase, which is better for embryo development? *Theriogenology*. 2016; 86(4): 940—8.
23. Marinho A, Nunes C, Reis S. Hyaluronic acid: a key ingredient in the therapy of inflammation. *Biomolecules* [Internet]. 2021 Oct 15 [cited 2024 Sep 3]; 11(10): 1518. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-273X/11/10/1518>
24. Mondek J, Kalina M, Simulescu V, et al. Thermal degradation of high molar mass hyaluronan in solution and in powder; comparison with BSA. *Polym Degrad Stabil*. 2015; 120: 107—13.
25. Munesada D, Sakai D, Nakamura Y, et al. Investigation of the mitigation of DMSO-induced cytotoxicity by hyaluronic acid following cryopreservation of human nucleus pulposus cells. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 Jul 31 [cited 2024 Sep 6]; 24(15): 12289. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/15/12289>
26. Papakonstantinou E, Roth M, Karakiulakis G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermatoendocrinol*. 2012; 4(3): 253—8.
27. Pilbauerova N, Schmidt J, Soukup T, et al. Innovative approach in the cryogenic freezing medium for mesenchymal stem cells. *Biomolecules* [Internet]. 2022 Apr 20 [cited 2024 Sep 3]; 12(5): 610. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-273X/12/5/610>
28. Sanchez DC, Ocampo BRY, Chirino CAE. Use of hyaluronic acid as an alternative for reconstruction of interdental papilla. *Rev Odontol Mex*. 2017; 21(3): 199—207.
29. Sapudom J, Müller CD, Nguyen KT, et al. Matrix remodeling and hyaluronan production by myofibroblasts and cancer-associated fibroblasts in 3D collagen matrices. *Gels* [Internet]. 2020 Sep 30 [cited 2024 Sep 4]; 6(4): 33. Available from: <https://www.mdpi.com/2310-2861/6/4/33>
30. Sharma S, Kishen A. Bioarchitectural design of bioactive biopolymers: structure-function paradigm for diabetic wound healing. *Biomimetics (Basel)* [Internet]. 2024 May 4 [cited 2024 Sep 4]; 9(5): 275. Available from: <https://www.mdpi.com/2313-7673/9/5/275>
31. Singampalli KL, Balaji S, Wang X, et al. The Role of an IL-10/hyaluronan axis in dermal wound healing. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2020 Jul 17 [cited 2024 Sep 2]; 8: 636. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2020.00636/full>
32. Snetkov P, Zakharova K, Morozkina S, et al. Hyaluronic acid: the influence of molecular weight on structural, physical, physico-chemical, and degradable properties of biopolymer. *Polymers (Basel)* [Internet]. 2020 Aug 20 [cited 2024 Sep 2]; 12(8): 1800. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4360/12/8/1800>
33. Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol*. 2006; 85(8): 699—715.
34. Stern R, Kogan G, Jędrzejak MJ, et al. The many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnol Adv*. 2007; 25(6): 537—57.
35. Sudhakar K, Ji SM, Kummara MR, Han SS. Recent progress on hyaluronan-based products for wound healing applications. *Pharmaceutics* [Internet]. 2022 Oct 19 [cited 2024 Aug 4]; 14(10): 2235. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/10/2235>
36. Takeo M, Lee W, Ito M. Wound healing and skin regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2015 Jan 5 [cited 2024 Sep 3]; 5(1): a023267. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25561722/>
37. Trabucchi E, Pallotta S, Morini M, et al. Low molecular weight hyaluronic acid prevents oxygen free radical damage to granulation tissue during wound healing. *Int J Tissue React*. 2002; 24(2): 65—71.
38. Yang G, Guo X, Luan Y. The application on different molecular weight of sodium hyaluronate. *Food Drug*. 2005; 12: 1—3.
39. Ye J, Zhang H, Wu H, et al. Cytoprotective effect of hyaluronic acid and hydroxypropyl methylcellulose against DNA damage induced by thimerosal in Chang conjunctival cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2012; 250(10): 1459—66.
40. Yu CJ, Ko CJ, Hsieh CH, et al. Proteomic analysis of osteoarthritic chondrocyte reveals the hyaluronic acid-regulated proteins involved in chondroprotective effect under oxidative stress. *J Proteomics*. 2014; 99: 40—53.
41. Zerbinati N, Sommatitis S, Maccario C, et al. In vitro hair growth promoting effect of a noncrosslinked hyaluronic acid in human dermal papilla cells. *Biomed Res Int* [Internet]. 2021 Oct 21 [cited 2024 Aug 4]; 2021: 5598110. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2021/5598110>
42. Zhai P, Peng X, Li B, et al. The application of hyaluronic acid in bone regeneration. *Int J Biol Macromol*. 2020; 151: 1224—39.
43. Ziegelaar BW, Aigner J, Staudenmaier R, et al. The characterisation of human respiratory epithelial cells cultured on resorbable scaffolds: first steps towards a tissue engineered tracheal replacement. *Biomaterials*. 2002; 23(6): 1425—38.

Отримано 09.10.2024

Прийнято до друку 19.06.2025

T.M. Gurina, E.O. Nardid, A.A. Seliuta, A.L. Polyakova *, V.P. Martsenyuk
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National
Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine
* poliakova79ann@gmail.com

STERILIZATION AND LOW TEMPERATURE EFFECTS ON REGENERATIVE POTENTIAL OF HYALURONIC ACID

Due to its physical properties and pharmacological activity, hyaluronic acid (HA) has considerable potential for use in cryobiology and cryomedicine. The aim of the study was to create a method for sterilizing aqueous solutions of HA that does not reduce its regenerative properties, and to study the effect of low temperatures on their preservation. For the sterilization of aqueous solutions of HA, a gentle sterilization regimen – tyndallization – was proposed, which at the same time ensures the sterility of the solutions and does not affect their regenerative properties. The effect of tyndallization and the effect of low temperatures on the preservation of the regenerative properties of 1 and 2% aqueous solutions of HA of different molecular weights: low molecular weight (LMW HA) (<100 kDa) and high molecular weight (HMW HA) (>2000 kDa) was studied in an animal model of excision wound healing. It has been shown that low temperatures do not change the regenerative properties of HMW HA and LMW HA (even in the thermocycling mode), which opens up wide possibilities for use in cryobiology and cryomedicine.

Key words: hyaluronic acid, low temperature exposure, preservation of regenerative properties, sterilization.