

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

ГНЦ ФГБУН ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук

(ИБХ РАН)

На правах рукописи

Толстова Татьяна Викторовна

**Получение и исследование в модели *in vitro* скаффолдов на основе
биodeградируемых полимеров для регенеративной медицины**

Специальность 1.5.6 - Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук

Марквичева Елена Арнольдовна

Москва - 2024

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	9
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Тканевая инженерия и регенеративная медицина	15
1.1.1. Трансплантология и проблема дефицита донорских органов	15
1.1.2. Подходы к решению проблемы дефицита органов.....	17
1.1.2.1. Клеточная терапия	17
1.1.2.2. Ксенотрансплантация.....	18
1.1.2.3. Стратегии рецеллюляции.....	18
1.1.3. Проблемы и ограничения, связанные с тканевой и органной биоинженерией.....	19
1.1.3.1. Картирование.....	19
1.1.3.2. Источники клеток	20
1.1.3.3. Иммуносупрессия	21
1.1.3.4. Интеграция.....	22
1.1.3.5. Васкуляризация	22
1.1.4. Триада тканевой инженерии.....	23
1.1.4.1. Стволовые клетки	23
1.1.4.2. Бесклеточная терапия.....	25
1.1.4.3. Взрослые стволовые клетки.....	25
1.2 Полимерные материалы и матриксы на их основе для тканевой инженерии	27
1.2.1 Основные функции естественного внеклеточного матрикса.....	27
1.2.2 Функции полимерных матриксов и требования к ним	28
1.2.3 Биоразлагаемые матриксы на основе природных и синтетических полимеров	30
1.2.3.1 Матриксы на основе природных материалов	31
1.2.3.2 Матриксы на основе синтетических полимеров.....	35
1.2.3.3 Композитные матриксы	36

1.3	Формы матриксов для тканевой инженерии	38
1.3.1	Гидрогели как матриксы для тканевой инженерии.....	39
1.3.1.1	Общая характеристика гидрогелей	40
1.3.1.2	Классификация гидрогелей по заряду	40
1.3.1.3	Классификация гидрогелей по способу получения	41
1.3.1.4	Физико-химические свойства гидрогелей.....	43
1.4	Свойства хитозана как материала для получения гидрогелей	44
1.4.1	Физико-химические свойства	45
1.4.2	Биологические свойства	45
1.4.3	Механические свойства.....	46
1.5	Свойства полимолочной кислоты и олиголактоидов как материалов для получения гидрогелей.....	47
1.6	Влияние матриксов на дифференцировку стволовых клеток	49
1.6.1	Влияние состава матрикса на стволовые клетки	50
1.6.2	Влияние эластичности матриксов на стволовые клетки.....	51
1.7	Влияние состава среды для культивирования на дифференцировку стволовых клеток.....	52
1.8	Влияние механической стимуляции на дифференцировку стволовых клеток....	52
1.9	Влияние других факторов на дифференцировку стволовых клеток	53
Глава 2.	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	55
2.1.	Используемые реактивы.....	55
2.2.	Подготовка материалов и реактивов к работе с животными клетками.....	56
2.2.1.	Приготовление среды для культивирования клеток животных.....	56
2.2.2.	Приготовление сред для дифференцировки мезенхимальных стромальных клеток	57
2.2.3.	Стерилизация.....	57
2.3.	Работа с клеточными культурами	58
2.3.1.	Выделение мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека.....	58
2.3.2.	Хранение и размораживание клеток	58

2.3.3. Ведение клеточных культур	59
2.3.4. Исследование иммунофенотипа мезенхимальных стромальных клеток...	60
2.3.5. Замораживание клеток	61
2.3.6. Световая микроскопия.....	62
2.3.7. МТТ-тест	62
2.4.Получение гидрогелей и плёночных материалов	62
2.5.Исследование структуры гидрогелей.....	63
2.6.Исследование физико-химических свойств гидрогелей	64
2.6.1. Стерилизация плёночных материалов и гидрогелей.....	64
2.6.2. Изучение набухаемости гидрогелей	64
2.6.3. Изучение биодegradации гидрогелей	65
2.6.4. Оценка механических характеристик матриксов	65
2.7.Исследование цитотоксичности гидрогелей в модели <i>in vitro</i>	66
2.8.Оценка риска воспалительной реакции в модели <i>in vitro</i>	67
2.9.Исследование роста клеток на матриксах	67
2.9.1. Культивирование клеток в гидрогелях	67
2.9.2. Определение количества жизнеспособных клеток после культивирования в гидрогелях.....	68
2.9.3. Изучение морфологии и распределения клеток, растущих в гидрогелях..	69
2.10.Исследование дифференцировки клеток при культивировании на матриксах .	70
2.10.1. Культивирование мезенхимальных стромальных клеток на пленочных материалах	70
2.10.2. Остеогенная дифференцировка мезенхимальных стромальных клеток....	70
2.10.3. Оценка дифференцировки мезенхимальных стромальных клеток по активности щелочной фосфатазы.....	71
2.10.4. Адипогенная дифференцировка мезенхимальных стромальных клеток...	71
2.10.5. Оценка адиподифференцировки мезенхимальных стромальных клеток по наличию жировых накоплений.....	71
2.10.6. Исследование экспрессии генов остео- и адипогенеза мезенхимальных стромальных клеток.....	72
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	73

3.1. Структура и физико-химические свойства матрицков на основе сополимеров хитозана с олиголактидами	73
3.1.1. Структура матрицков	73
3.1.2. Набухаемость матрицков	76
3.1.3. Биодеградация матрицков	79
3.1.4. Исследование механических характеристик матрицков	81
3.2. Исследование цитотоксичности матрицков	87
3.3. Оценка риска воспалительной реакции в модели <i>in vitro</i>	89
3.4. Культивирование клеток на/в матрицках в модели <i>in vitro</i>	91
3.4.1. Характеристика фенотипа мезенхимальных стромальных клеток	92
3.4.2. Морфология клеток, культивируемых на пленках	95
3.4.3. Морфология клеток, культивируемых в макропористых гидрогелях	96
3.4.4. Рост и пролиферация клеток в макропористых гидрогелях	98
3.5. Исследование дифференцировки клеток при культивировании на пленках	101
3.5.1. Остеогенный потенциал мезенхимальных стромальных клеток при культивировании на плёнках	101
3.5.2. Адипогенный потенциал мезенхимальных стромальных клеток при культивировании на пленках	104
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	109
ВЫВОДЫ	111
БЛАГОДАРНОСТИ	113
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	114

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АС – адипогенная среда

ГК – гиалуроновая кислота

ДМСО – диметилсульфоксид

ЕВМ – естественный внеклеточный матрикс

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

ИФА – иммуноферментный анализ

ММ – молекулярная масса

МС – механические свойства

МСК – мезенхимальные стромальные клетки человека

МТТ – 3-(4,5- диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид

ОС – остеоиндуктивная среда

ПВС – поливиниловый спирт

ПО – программное обеспечение

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СД – степень деацелирования

ТИК – тканеинженерные конструкции

ФБ – фосфатно-солевой буфер

ФМА – форбол-12-миристан-13-ацетат

Хит – матрикс на основе хитозана

Хит-LD – матрикс на основе хитозана и олиго(L,D-лактида)

Хит-LL – матрикс на основе хитозана и олиго(L,L-лактида)

ЭДТА – динатриевая соль этилендиамина N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты

CD – кластер дифференцировки (от англ. cluster of differentiation/cluster designation)

CRISPR – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами (от англ. clustered, regularly interspaced, short palindromic repeat)

DMEM – среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко (от англ. Dulbecco Modified Essential Medium)

FBS – эмбриональная телячья сыворотка (от англ. fetal bovine serum)

FDA – управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (англ. Food and Drug Administration)

FGF – фактор роста фибробластов (от англ. fibroblast growth factor)

GNF – гликонуклеолипиды, содержащие фторированную углеродную цепь (от англ. glyco-nucleo-lipids containing a fluorinated carbon chain)

HLA – человеческий лейкоцитарный антиген (от англ. Human Leukocyte Antigen)

IBMX – 3-изобутил-1-метилксантин

IL-6 – интерлейкин 6

ISCT – Международное общество клеточной и генной терапии (от англ. International Society for Cell & Gene Therapy)

MHC – Главный комплекс гистосовместимости (от англ. major histocompatibility complex)

PCL – поликапролактон (от англ. polycaprolactone)

RBC – буфер для лизиса эритроцитов (от англ. Red Blood Cell Lysis Buffer)

TGF- β – трансформирующий фактор роста- β (от англ. Transforming Growth Factor β)

THP-1 – клеточная линия промоноцитов человека

TNF- α – фактор некроза опухоли (от англ. Tumor Necrosis Factor α)

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов (от англ. Vascular Endothelial Growth Factor)

VSEL – очень маленькие эмбрионально-подобные стволовые клетки (от англ. Very Small Embryonic-Like Stem Cells)

α -MEM – Среда Игла, альфа модификация (от англ. Minimum Essential Medium)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Изменения в образе жизни людей и улучшение её качества приводят к увеличению продолжительности жизни и, как следствие, появлению новых заболеваний. Старение населения приводит к увеличению количества хронических расстройств, что увеличивает нагрузку на систему здравоохранения. Хронические заболевания могут в конечном счете привести к органной недостаточности и потребовать замены органов. Списки пациентов в листах ожидания на трансплантацию органов продолжают расти с каждым годом, в то время как поставки органов не отвечают существующему спросу.

Тканевая инженерия представляет собой новую область медицинской биотехнологии, которая в ближайшем будущем может стать альтернативой трансплантации донорских тканей или целых органов [1]. Основной задачей тканевой инженерии является создание биологических заменителей поврежденных тканей и/или органов. В тканевой инженерии используют биоматериалы, сформированные в матриксы/скаффолды (от англ. scaffold – строительные леса) с заданными свойствами, которые могут в какой-то степени имитировать морфологию конкретных тканей и служат подложкой для прикрепления и роста клеток. Эти матриксы получают различными методами из биоразлагающихся синтетических и/или природных материалов, а также их композитов [2]. Поскольку материалы для создания скаффолдов отличаются от компонентов естественного внеклеточного матрикса (ЕВМ) органов-мишеней, дифференцировка клеток, в частности, стволовых, на этих матриксах часто осуществляется лишь частично или неадекватно. В последнее время ведется активный поиск новых биоматериалов, а также методов улучшения их функциональности, например, путем модификации биологически активными соединениями или разработки новых многокомпонентных матриксов [3]. Перспективными представляются матриксы на основе природного полисахарида

хитозана (Хит), которые биосовместимы, не иммуногенны и обладают антибактериальными свойствами. Однако низкий уровень механической прочности и скорости биodeградации таких матриц, а также их высокая гидрофильность ограничивают их применение в тканевой инженерии. Для создания матриц с оптимальными свойствами все чаще используют композитные биоматериалы, например, комбинируют хитозан с другими полимерами или получают сополимеры хитозана.

Цель и задачи работы

Целью работы было получение, изучение структуры и физико-химических свойств матриц на основе сополимеров хитозана с олиголактидами, а также оценка пролиферации и/или дифференцировки различных типов клеток при их культивировании на матрицах в модели *in vitro*.

Для достижения поставленной цели предстояло решить следующие задачи:

1. Получить и охарактеризовать матрицы (плёнки и макропористые гидрогели) на основе хитозана и его сополимеров с олиголактидами. Изучить их структуру (тип и размер пор, распределение пор по размерам), а также некоторые физико-химические свойства (набухаемость, деградация, механические характеристики) в зависимости от состава.
2. Исследовать цитотоксичность и иммуногенность матриц с использованием различных культур клеток в модели *in vitro*.
3. Изучить особенности поведения (адгезия, морфология), роста и пролиферации различных типов животных клеток при их длительном культивировании на/в матрицах в модели *in vitro*.

4. Оценить возможность остеогенной и адипогенной дифференцировки стволовых клеток при их длительном культивировании на/в матриксах в модели *in vitro*.

Научная новизна работы

Впервые макропористые гидрогели на основе хитозана и его сополимеров с олиго(L,L-лактидом) и олиго(L,D-лактидом) (Хит-LL, Хит-LD) были впервые охарактеризованы с точки зрения их физико-химических свойств (структура, средний размер пор и распределение пор по размерам, степень набухания, деградация в модели *in vitro*, механические свойства). Впервые исследована цитотоксичность гидрогелей с использованием линии мышинных фибробластов (L929), а также их иммуногенность по активации клеток линии моноцитов человека (THP-1) в моделях *in vitro*. Впервые показано, что гидрофильно-гидрофобный баланс и кинетика биodeградации гидрогелей на основе сополимеров хитозана с олиголактидами зависят от типа привитого олиголактида. Продемонстрировано, что все матриксы поддерживали прикрепление, рост и пролиферацию различных типов животных клеток (мышинные фибробласты L929, мезенхимальные стромальные клетки (МСК), выделенные из жировой ткани человека). Впервые установлено, что пленки на основе сополимеров Хит с олиголактидами могут влиять на osteo- и/или адипогенный потенциал МСК, причем усиление этого потенциала зависит от типа привитого олиголактида.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в работе результаты позволяют расширить знания о влиянии структуры и физико-химических свойств композитных матриксов (пленок и макропористых гидрогелей) на поведение, а также пролиферацию и/или дифференцировку культивируемых на/в них клеток. Установлено, что варьирование полимерного состава пленок позволяет направлять дифференцировку мезенхимальных стромальных клеток человека, в частности усиливать osteo- и/или адипогенез.

Практическая значимость работы заключается в том, что на основе матриксов из сополимеров хитозана с олиголактидами могут быть созданы новые эффективные скаффолды для регенеративной медицины, в частности для усиления дифференцировочного потенциала МСК при регенерации костной и/или жировой тканей.

Положения, выносимые на защиту

1. Физико-химические свойства матриксов на основе сополимеров хитозана с олиго(L,L-лактидом) или олиго(L,D-лактидом) зависят от типа привитого олиголактида. В частности, использование матриксов (плёнок или макропористых гидрогелей) на основе сополимеров позволяет варьировать их набухаемость, деградацию и механические характеристики в зависимости от их состава.

2. Матриксы из Хит, Хит-LL и Хит-LD не цитотоксичны и не иммуногенны, согласно результатам *in vitro* тестирования их экстрактов с использованием мышинных фибробластов (L929), а также культивирования в их присутствии клеток линии острого моноцитарного лейкоза человека (THP-1).

3. Мышинные фибробласты L929 и мезенхимальные стромальные клетки человека сохраняли свою жизнеспособность и пролиферировали при их длительном культивировании в течение 10-14 дней в гидрогелях Хит, Хит-LL и Хит-LD в модели *in vitro*. Все образцы матриксов поддерживали адгезию, рост и пролиферацию клеток. Кроме того, показано, что эти параметры, а также морфология клеток и их распределение в матриксах зависели от их состава.

4. Матриксы (плёнки) на основе хитозана и сополимеров хитозана с олиголактидами поддерживали дифференцировку МСК в остеогенном и адипогенном направлениях при длительном культивировании клеток в модели *in vitro*. Максимальные уровни экспрессии маркеров остеогенеза (*ALPL*, *Runx2*, *SPP1*) были выявлены методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени после культивирования МСК на пленках Хит-LD в течение 14 дней. Матриксы на основе Хит-LL, напротив, усиливали дифференцировочный потенциал МСК в адипогенном

направлении, что подтверждено результатами ПЦР в реальном времени при оценке экспрессии маркеров адипогенеза (*PPAR γ* , *ADIPOQ*).

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в анализе литературных данных по теме диссертации, планировании и выполнении всей экспериментальной части работы, а также обработке и анализе полученных результатов. Кроме того, автор принимал участие в подготовке и написании статей, а также представлении результатов исследования на российских и международных конференциях.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов определяется использованием в работе современных физико-химических, молекулярно-биологических и статистических методов, а также подтверждается публикациями в рецензируемых отечественных и международных журналах.

Основные результаты работы были представлены на российских и международных конференциях в виде постеров и устных докладов: XXX – XXXIV Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (2018-2022, Москва), Национальный конгресс по регенеративной медицине (20-22 ноября 2019, Москва), IV международной конференции “Физика - наукам о жизни” (11-14 октября 2021, Санкт-Петербург) и Международный конгресс «Биотехнология: Состояние и перспективы развития» (14 апреля 2023, Москва), The 11th Training School on Microencapsulation (9-12 Apr 2019, Лафборо, Великобритания), The 12th International Conference - Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety. Toxicology and Ecology Issues (27 Sep - 4 Oct 2021, Ираклион, Крит-Греция).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 18 печатных работ, в том числе 4 статьи, индексируемые в наукометрических базах данных Scopus и/или Web of

Science и входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций. В статьях, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 134 страницах, включает 18 рисунков и 5 таблиц. В работе представлены следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы. Список цитируемой литературы включает 222 источников.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Тканевая инженерия и регенеративная медицина

Тканевая инженерия – это новая область медицинской биотехнологии, главной задачей которой является создание тканеинженерных конструкций с использованием новых биоматериалов и новых клеточных технологий [1].

Регенеративная медицина – это область медицины, целью которой является восстановление пораженных болезнью, повреждённых (травмированных) тканей или целых органов, которое можно проводить как классическими методами, так и с использованием методов тканевой инженерии.

Отметим, что в настоящее время в регенеративной медицине в основном применяют трансплантаты на основе не биodeградируемых материалов, например, протезы из металлов, их окислов или сплавов (например, титана). Кроме того применяются различные типы так называемой биокерамики (неорганические вещества) для создания искусственных суставов или закрытия костных дефектов [4], [5]. Однако их общим недостатком является то, что все они способны обеспечить только структурные, но не физиологические функции регенерируемых органов и тканей.

Таким образом, продолжаются поиски различных биоинженерных решений, направленных на восстановление или замену повреждённой ткани или восстановление функциональности органа. На данный момент достижения тканевой инженерии еще не получили массового применения, однако уже сегодня можно с уверенностью говорить о том, что этот перспективный подход найдет самое широкое использование в регенеративной медицине уже в ближайшем будущем.

1.1.1. Трансплантология и проблема дефицита донорских органов

Трансплантология – это раздел медицины, изучающий проблемы трансплантации органов, а также перспективы создания искусственных органов.

Несмотря на то, что в настоящее время с помощью трансплантации удается решать некоторые задачи, связанные с регенерацией отдельных тканей и органов, существует большая проблема, связанная с недостатком органов для трансплантации. Так, в США каждые 10 мин новый пациент добавляется в национальный список очереди на трансплантацию органов. Таким образом, 144 пациента добавляются в этот список каждый день. В течение этого же 24-часового периода данные из «сети закупок и трансплантации органов» (от англ. The Organ Procurement and Transplantation Network (OPTN) от 1.8.2022 г. <https://optn.transplant.hrsa.gov>) показывают, что приблизительно 22 человека не смогли дождаться трансплантации (Рисунок 1).

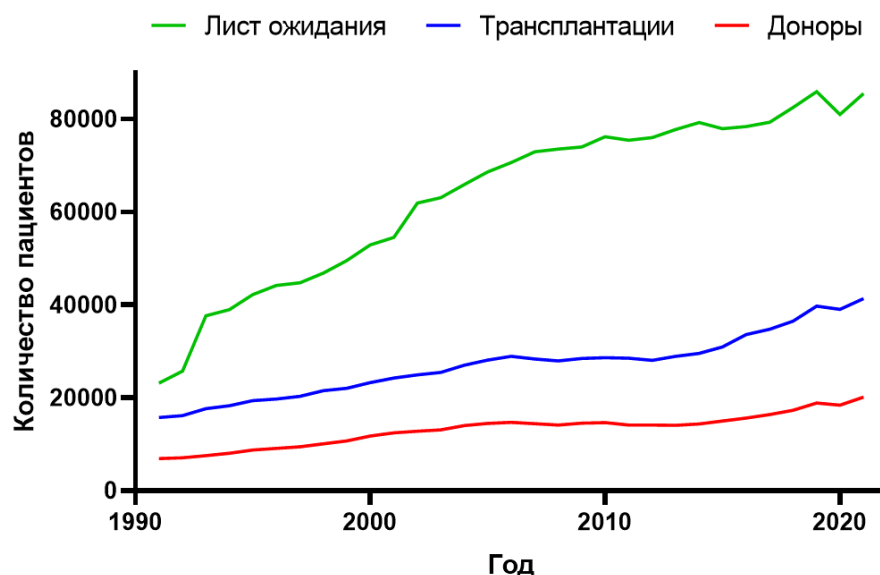


Рисунок 1 – Данные по количеству доноров органов, пациентов, которым требуется трансплантация, и пациентов в списке ожидания за период с 1991 по 2021 год. Данные взяты из The Organ Procurement and Transplantation Network / United Network for Organ Sharing (OPTN/UNOS) по состоянию на 1/8/22 [6]

Спрос на органы неуклонно растет. Если в 1991 году было 6883 доноров для 15756 пациентов, которым требовалась трансплантация и 23176 пациентов из списка ожидания, то в 2021 году количество доноров выросло в 2,4 раза и достигло 20161, трансплантатов – в 2,6 раз (41356), а количество пациентов в списке ожидания

увеличилось в 3,7 раз, то есть стало 85548. Постоянно растущий спрос на трансплантируемые органы усиливает дефицит органов и создает еще большую потребность в решении этой проблемы [6].

1.1.2. Подходы к решению проблемы дефицита органов

Существуют различные биоинженерные решения, направленные на восстановление или замену утраченной ткани или восстановление функциональности органа. Далее подробно рассмотрим основные подходы, применяемые в настоящее время для решения проблемы дефицита органов с помощью биоинженерии: (1) клеточная терапия, (2) ксенотрансплантация, (3) 3D-биопечать и (4) стратегия рецеллюляции.

1.1.2.1. Клеточная терапия

In vivo восстановление поврежденных тканей и органов может быть достигнуто путем доставки к ним факторов роста [7] или стволовых клеток [8]. При таком подходе можно увеличить функциональность ткани через паракринный эффект, а также путем непосредственного дополнения количества функциональных клеток. Кроме того, можно использовать методы редактирования генома для повышения функциональности органа, либо стимулирования регенерации. Например, можно адаптировать технологию редактирования генома CRISPR (от англ. - clustered, regularly interspaced, short palindromic repeat) для терапевтических применений в регенеративной медицине [9]. С помощью CRISPR-Cas9 можно осуществить направленный нокаут антигенов тканевой совместимости (от англ. МНС - Major Histocompatibility Complex), например, человеческого лейкоцитарного антигена (от англ. HLA - Human Leukocyte Antigen) в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК) для улучшения их иммунной совместимости [10]. Ожидается, что в будущем применение CRISPR и других технологий для редактирования генома поможет восстанавливать ткани, которые содержат генетические повреждения как результат болезни, например, онкологического

заболевания или травмы. Таким образом, можно будет избежать замены тканей или целых органов у некоторых пациентов.

1.1.2.2. Ксенотрансплантация

Использование редактированного генома животных для изменения иммунного распознавания и предотвращения отторжения органов является еще одним перспективным подходом, который может быть использован для уменьшения растущего дефицита донорских органов. Соответствующим образом модифицированные животные органы могут быть трансплантированы человеку (ксенотрансплантация). К недостаткам этого подхода следует отнести неопределенность, связанную с соответствующими функциональными и генетическими модификациями и необходимыми мерами безопасности (например, в связи с возможностью кросс-видовой инфекции) [11], [12], а также этические проблемы [13]. Некоторые обнадеживающие успехи достигнуты в компаниях SGI и Lung Biotechnology PBC (дочерняя компания United Therapeutics Corporation) с помощью синтетической геномики. В мае 2014 года SGI и Lung Biotechnology заключили исследовательское соглашение о разработке гуманизированных органов свиньи с использованием достижений генной инженерии [14]. Изначально этот проект был сфокусирован на разработке органов для пациентов с заболеваниями легких, но с 2015 года в это соглашение были включены также заболевания почек. Эта технология рассматривается как перспективный подход, который позволил бы обеспечить пациентов геномно-адаптированными безопасными органами.

1.1.2.3. Стратегии рецеллюляции

В качестве матриц для доставки клеток можно также использовать децеллюлизованные биологические материалы или другие органы пациента. Децеллюляризованный внеклеточный матрикс обеспечивает уникальный нецитотоксичный трехмерный каркас, который поддерживает клеточную адгезию и пролиферацию [15]. Для удаления клеток используют механические, термические,

химические и ферментативные методы, которые после удаления клеток позволяют сохранить микро- и макроанатомию внеклеточного матрикса [16]. В этом подходе целью является персонифицированный орган с низким потенциалом иммунологического отторжения после трансплантации [17]. Последующая рецеллюляция подразумевает посев клеток на децеллюляризованный матрикс, и таким образом обеспечивается создание полностью функционального органа. Данный подход активно исследуется для регенерации легких [18], печени [17], толстой кишки [19] и других органов. Одним из клинически исследованных примеров применения стратегии рецеллюляции является разработка аутологичных уретронов [20]. Однако следует отметить, что существует опасность сохранения специфического поверхностного антигена (например, галактозил- α (1,3)-галактозы) в ксеногенных тканях даже после децеллюляризации, а также принимать во внимание высокие риски возникновения тромбоза после трансплантации таких матриксов [21].

1.1.3. Проблемы и ограничения, связанные с тканевой и органной биоинженерией

Рассмотрим пять основных задач или ограничений биоинженерии: 1) картирование (схемы размещения клеток, типы клеток, функции, организация и интеграция); 2) поиск и наработка клеток; 3) иммуносупрессия; 4) интеграция (связывание новых тканей и органов с биологическими функциями пациента, например, такими как иннервация, сосудистые системы, желчь, лимфатические сосуды и т. д.); 5) васкуляризация.

1.1.3.1. Картирование

Для точной биоинженерии тканей и эффективной замены их утраченной функциональности необходимо досконально изучить организацию клеток и клеточных структур в каждом органе [22]. К настоящему моменту еще не созданы достаточно подробные карты размещения клеток, их фенотипа, функций, а также организации взаимодействия между клетками, чтобы максимально точно

реализовывать восстановление функций органов. Считается, что хотя этих карт еще недостаточно для биоинженерии ткани или органа, но они все же могут внести некоторую ясность в механизмы их репарации. Некоторые органы и ткани изучены лучше, чем другие. Так, довольно простые органы, например, кожа, изучены досконально, в то время как сердце, легкие, печень и почки устроены намного сложнее и, соответственно, их картография недостаточно полная. Создание всеобъемлющего «клеточного атласа» для каждого из органов может внести большой вклад в регенерацию и восстановление функциональности различных органов. Во многих случаях биоинженерные органы, скорее всего, не будут идеальными имитаторами реальных органов, но тем не менее, они смогут выполнять необходимые функции. Например, «островки из гепатоцитов» (от англ. *intrahepatic transplanted islets*) можно применять для лечения диабета первого типа [23]. Также известно, что трансплантаты поджелудочной железы (так называемые «островки Лангерганса») могут какое-то время функционировать в организме, несмотря на то, что они не воссоздают такое микроокружение поджелудочной железы, которое имеет место в реальном органе [24]. Таким образом, остается определить, будут ли эти подходы обеспечивать долгосрочную коррекцию или эти органы могут со временем ухудшиться с пагубными последствиями для пациента. Можно предположить, что успешные методы биоинженерии для замены функции поврежденного или утраченного органа могут не требовать точной репликации существующих структур органов в макромасштабе. Однако понимание детального микроскопического размещения различных типов клеток, их функций и взаимодействий в микроэкологической нише существующих органов, скорее всего, окажется целесообразным при разработке биоадаптивных тканей.

1.1.3.2. Источники клеток

Для воссоздания желаемой функции органа необходимы надежные и воспроизводимые источники различных типов клеток, поиск которых является

актуальной проблемой. Чистота и качество существующих источников клеток также должны быть улучшены для создания биоинженерных тканей и органов, наиболее приближенных к реальным. На сегодняшний день часто используют аутологичные клетки (собственные клетки пациента). Такие клетки более предпочтительны, чем аллогенные, то есть чужеродные для данного организма, например, трансплантируемые от человека человеку. Использование аутологичных клеток минимизирует вероятность отторжения и потребность в иммуносупрессии, так как содержат идентичный набор антигенов. Однако не всегда удается найти родственного донора для конкретного пациента, и в таком случае применяются аллогенные клетки. Таким образом, для развития тканевой инженерии и регенеративной медицины необходимо модифицировать технологические процессы, связанные с получением и использованием аутологичных и аллогенных клеток [25].

1.1.3.3. Иммуносупрессия

Иммуносупрессия имеет решающее значение для снижения риска отторжения трансплантата. Однако долгосрочное использование иммуносупрессии сопровождается рядом побочных эффектов, таких как прогрессирующая почечная недостаточность. Когда клетки или ткани имплантируются пациентам, необходимость в иммуносупрессии может значительно снизить качество жизни, повредить трансплантированный орган, а также увеличить риски возникновения рака, сердечно-сосудистых заболеваний, сахарного диабета *de novo* и др. [26]. Также стоит отметить, что иммуносупрессивные препараты достаточно дорогие. Таким образом, устранение необходимости иммуносупрессии было бы идеальным решением. Это может быть достигнуто при использовании аутологичных клеток, генетической модификации клеток и тканей, а также, возможно, путем разработки новых методов, способных вызвать толерантность к трансплантированным органам. Вопрос иммунной совместимости является главным для международного консорциума в Национальном институте здравоохранения США (от англ. National Institutes of Health

(NIH)) при оказании помощи в разработке методов иммунной толерантности (<http://www.immunetolerance.org>). В NIH продемонстрировали, что соответствующий режим кондиционирования, представляющий собой предтрансплантационную обработку клеток различными препаратами, цитокинами, антителами и т.д., может обеспечить долгосрочное функционирование, например, трансплантированной почки, не требуя долговременной иммуносупрессии [27], [28].

1.1.3.4. Интеграция

Нервная и лимфатическая системы восстанавливаются во время трансплантации органов случайным образом, поэтому остается неясным, будут ли биоинженерные ткани и органы вести себя так же, как и их нативные аналоги, или же потребуются дополнительные соединения для успешной трансплантации. Реализация иннервации и лимфатического дренажа – это сложная задача, которая должна решаться по-разному для разных органов. В качестве примера можно привести исследование, в котором описана регенерация нервов в биосинтетической внеклеточной матрице при трансплантации роговицы глаза [29]. Расширение исследований для более крупных тканей и, в конечном счете, для биоинженерных органов будут иметь решающее значение для обеспечения правильной функции трансплантата.

1.1.3.5. Васкуляризация

Восстановление тканей *in vivo* или *ex vivo* требует развития внутренней сосудистой системы, которая, в свою очередь, обеспечивает необходимыми питательными веществами все клетки. К сожалению, для тканей толщиной более десятков миллиметров этого еще не удалось достичь. При этом для генерирования объемных органов, таких как сердце, печень, легкие или почки, эту проблему необходимо решить. Следует отметить, что определенный прогресс в достижении этой цели уже был достигнут: например, было показано, что совместная трансплантация гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток/клеток-предшественников эндотелиальных прогениторных клеток улучшает

васкуляризацию в модели биоинженерного тканевого трансплантата [30]. Разработка подобных стратегий, направленных на улучшение васкуляризации в биоинженерных тканях и органах, в частности путем добавления клеток, небольших молекул и/или биоматериалов будет способствовать улучшению восстановительных механизмов, а также обеспечит достаточно хорошую диффузию питательных веществ, кислорода и удаление метаболитов.

1.1.4. Триада тканевой инженерии

Согласно всему вышеизложенному, в настоящий момент в тканевой инженерии не существует универсального пути для регенерации различных тканей и тем более органов. Поэтому продолжают исследования как с целью усовершенствования существующих стратегий, так и для разработки новых подходов. На сегодняшний день наиболее продвинутым и перспективным является направление, связанное с тканевой инженерией.

Выделяют три основные компонента в данной области:

1. клетки для облегчения формирования необходимой ткани;
2. факторы роста или биофизические факторы для роста, пролиферации и/или дифференцировки клеток;
3. матрикс, который обеспечивает структуру, и является подложкой для прикрепления, роста и пролиферации/дифференцировки клеток.

В совокупности эти компоненты составляют так называемую “триаду тканевой инженерии” и являются ключевыми для успешной регенерации тканей. Рассмотрим подробно первый пункт, связанный с клетками и источниками их выделения.

1.1.4.1. Стволовые клетки

Для целей тканевой инженерии и клеточной терапии обычно используют стволовые клетки, поскольку они являются предшественниками для большинства

клеток, формирующих различные ткани организма. Мезенхимальные стволовые клетки могут быть выделены из четырех основных источников. К ним относятся: (1) эмбриональная ткань; (2) ткани плода, в частности плацента (амнион и хорион), амниотическая жидкость и пуповина; (3) конкретные ткани во взрослом организме (жир, костный мозг, скелетные мышцы, кожа, кровь); (4) дифференцированные соматические клетки после того, как они были генетически перепрограммированы (в частности, ИПСК). Эти популяции стволовых клеток имеют различную активность, то есть способность к активации соответствующих генов, и, соответственно, они различаются по количеству типов клеток, в которые они могут дифференцироваться. Только эмбриональные стволовые клетки, полученные из морулы, являются тотипотентными, то есть способными дифференцироваться во все типы клеток, присутствующие в организме, включая клетки плаценты [31]. Эмбриональные стволовые клетки, полученные из бластоцисты, то есть более поздней стадии эмбрионального развития, являются плюрипотентными, то есть они могут дифференцироваться в клетки любой ткани, кроме плаценты. Эмбриональные стволовые клетки идентифицируются по экспрессии стадийно-специфического эмбрионального антигена *SSEA* (от англ. stage-specific embryonic antigen), транскрипционных факторов *Nanog* и *Oct-4* [32]. Недавно был также выделен новый тип плюрипотентных стволовых клеток. Это очень маленькие эмбрионально-подобные (от англ. VSEL – very small embryonic-like) стволовые клетки с характерным профилем экспрессии *SSEA*, ядерного *Oct-4A* и *Nanog* [33]. Клетки, полученные непосредственно из плода, обычно являются мультипотентными, то есть способными дифференцироваться только в ограниченное число специализированных типов клеток [34]. Однако следует отметить, что описаны и другие локализации плюрипотентных клеток, например, в легких [35]. Плюрипотентные клетки обычно получают из экстрафетальных тканей, в частности амниона, амниотической жидкости, хориона или пуповины. Маркеры плюрипотентности были обнаружены

также в клетках из амниотической жидкости [36] и в пупочном канатике (от англ. wharton jelly) [37].

1.1.4.2. Бесклеточная терапия

При введении стволовых клеток непосредственно в поврежденные ткани и органы *in vivo* их регенерирующие эффекты связаны, главным образом, с аутокринной продукцией широкого спектра биоактивных молекул, например, таких как факторы роста, цитокины, хемокины, антиапоптотические факторы или иммуномодуляторы [38], [39]. Биоактивные молекулы, синтезированные в стволовых клетках, хранятся во внеклеточных везикулах, которые можно выделить из среды, в которой культивируют стволовые клетки, а затем ввести системно или локально в поврежденные ткани. Этот подход называется бесклеточной терапией на основе стволовых клеток [40], [41]. На сегодняшний день ведутся исследования по применению внеклеточных везикул и/или концентрированных кондиционных сред МСК при повреждениях печени [42], сердечно-сосудистых заболеваниях [43], аутоиммунных заболеваниях [41] и др. Однако терапия на их основе все еще в значительной степени ограничена экспериментальной стадией из-за возможной иммуногенности, различиях в оценке эффективности и высокой стоимости [44].

1.1.4.3. Взрослые стволовые клетки

Взрослые стволовые клетки могут быть обнаружены практически во всех органах и тканях взрослого организма, например, в мозге [45], сердце [46], пульпе зуба [47], скелетных мышцах [48], жировой ткани [49], костном мозге [50]. Подобно стволовым клеткам, полученным из экстрафетальных тканей, взрослые стволовые клетки могут преодолевать мутационные и другие неблагоприятные эффекты, что, в свою очередь, может влиять на их стволовость и мультипотентность. При этом их использование не вызывает этических и юридических вопросов, в отличие от стволовых клеток, полученных из ооцитов человека, эмбрионов и плода [51]. Кроме того, взрослые стволовые клетки могут быть выделены и применены в аутологичной

форме. Так, стволовые клетки, полученные из тканей, могут быть выделены после рождения индивидуума и сохранены для потенциального использования в будущем, если этот человек будет нуждаться в регенеративной терапии позже [52]. Однако в настоящее время даже в высокоразвитых странах этот подход не получил широкого распространения из-за его относительно высокой стоимости, ограниченных емкостей хранилища, возможной потери жизнеспособности клеток за время хранения и т.д. Поэтому эти клетки больше подходят для аллогенных применений, то есть в качестве донорских клеток. И, хотя иммуногенность стволовых клеток (за исключением ИПСК), как правило, считается низкой, иммунная реакция против аллогенного имплантата потенциально возможна. Поэтому нельзя исключать потребность в иммунодепрессантах.

Несмотря на это, взрослые стволовые клетки можно рассматривать как наиболее предпочтительный тип стволовых клеток для клеточной терапии и тканевой инженерии. Взрослые стволовые клетки обычно мультипотентны, хотя среди них также обнаружены клетки, экспрессирующие маркеры плюрипотентности, например, в костном мозге (это и есть упомянутые ранее клетки VSEL) [33]. Некоторые взрослые стволовые клетки являются олигопотентными, бипотентными или даже унипотентными, например, базальные клетки в эпидермисе, сперматогониальные стволовые клетки и сателлитные клетки скелетных мышц [53].

В тканевой инженерии дифференцировка клеток в модели *in vitro* может быть усилена за счет их культивирования в индукционных средах и/или на специальных матриксах с соответствующим составом, архитектурой, физико-химическими и механическими свойствами (МС). В последующих главах будут подробно рассмотрены матриксы, применяемые в качестве подложек для прикрепления, наработки и дифференцировки клеток.

1.2 Полимерные материалы и матрицы на их основе для тканевой инженерии

Одной из задач тканевой инженерии является создание скаффолдов (матриков) из природных и/или синтетических материалов с заданными свойствами, в частности полимеров или сополимеров, которые могут хотя бы частично имитировать свойства собственного естественного внеклеточного матрикса. Далее рассмотрим основные функции ЕВМ.

1.2.1 Основные функции естественного внеклеточного матрикса

За исключением клеток крови, 97% нормальных клеток в тканях человека являются субстрат-зависимыми и находятся в структурированной матрице. Ткани человека состоят не только из клеток, но и все имеют специфичный естественный внеклеточный матрикс, который обычно содержит несколько компонентов, в частности белки (коллагены, ламинины и др.), гликопротеины и т.д. Следует обозначить пять основных функций естественного внеклеточного матрикса:

1) ЕВМ обеспечивает структурную поддержку и физическую среду для клеток, находящихся в этой ткани. Матрикс необходим для прикрепления, роста, миграции клеток и их возможности реагировать на сигналы.

2) ЕВМ обеспечивает структурные и механические свойства ткани, такие как эластичность. Например, толстые сухожильные пучки, образованные коллагеном типа 1, отвечают за высокую прочность сухожилий на растяжение, а случайно распределенные коллагеновые фибриллы и эластические волокна кожи отвечают за её прочность и эластичность [54].

3) ЕВМ может отвечать за доставку биологически активных веществ (сигналов) к клеткам для регулирования их жизнедеятельности.

4) ЕВМ может выступать в качестве резервуара факторов роста и усиливать клеточную активность. К примеру, гепарансульфат протеогликаны облегчают

димеризацию фактора роста фибробластов (от англ. FGF - Fibroblast Growth Factor), запуская механизм действия этого фактора [55].

5) ЕВМ участвует в деградации физической среды, чтобы обеспечить неоваскуляризацию и ремоделирование в ответ на развитие, физиологические и патологические изменения во время динамических процессов ткани, а именно морфогенез, гомеостаз и заживление ран.

Таким образом, принимая во внимание множественность функций, сложного состава и динамического характера ЕВМ в нативных тканях, задача по созданию “идеальных” полимерных матриксов для регенерации различных типов тканей представляется довольно сложной. Далее будут подробно рассмотрены требования к полимерным матриксам.

1.2.2 Функции полимерных матриксов и требования к ним

Рассмотрим требования к полимерным матриксам для тканевой инженерии.

1. Архитектура. Матриксы должны обладать пористой структурой, обеспечивающей васкуляризацию и формирование новой ткани, чтобы облегчить интеграцию клеток хозяина к имплантированной тканеинженерной конструкции. Пористая структура нужна также для эффективного транспорта питательных веществ к клеткам и вывода метаболитов. Матриксы должны постепенно биоразлагаться (резорбировать или биодеградировать) после имплантации со скоростью, соответствующей скорости формирования вновь образующихся тканей.

2. Биосовместимость. Матриксы должны обеспечивать прикрепление клеток, поддерживать их рост, пролиферацию и/или дифференцировку во время культивирования как в модели *in vitro*, так и после имплантации *in vivo*. Биоматериалы, используемые для изготовления подложек, должны быть совместимы также с другими клеточными компонентами тканей пациента.

3. Биоактивность. Матрицы должны активно взаимодействовать с клеточными компонентами регенерируемых тканей и регулировать различные биологические процессы. В биоматериалы можно включать сигнальные молекулы, такие как клеточно-адгезивные лиганды, например, белки или гликопротеины, обеспечивающие межклеточные контакты. Матрикс должен также обеспечивать транспорт или хранение экзогенных соединений, ускоряющих регенерацию, например, факторов роста. В этом отношении материалы матриксов должны быть совместимы с биомолекулами и/или пригодны для инкапсулирования контролируемо-высвобождаемых биомолекул, с сохранением биологической активности включенных соединений. Например, гидрогели на основе хитозана могут быть получены для пролонгированного высвобождения труднорастворимых лекарственных средств, благодаря возможности регулировать гидрофильность этого полимера [56].

4. Механические свойства. Механические свойства матриксов должны соответствовать свойствам нативной ткани. Недавние исследования МС матриксов подтвердили их важность при культивировании клеток. Установлено, что при растяжении подложки, морфология и адгезия различных клеток (например, эпителиальных, мышечных, фибробластов и нейронов) зависели от степени этого растяжения, которое, в свою очередь, определялось эластичностью матриксов [57]. Кроме того, показано, что при дифференцировке МСК жесткость матрикса влияла на внутриклеточную передачу сигналов через механотрансдукторы Rho-киназу и киназу фокальной адгезии [58]. МСК человека дифференцировались в нейроны, клетки мышечной или костной ткани в зависимости от эластичности матрикса. Модуль упругости матриксов в каждом случае приблизительно соответствовал показателям упругости регенерируемых тканей.

Таким образом, матрицы должны удовлетворять всем перечисленным требованиям для их успешного применения в тканевой инженерии.

1.2.3 Биоразлагаемые матриксы на основе природных и синтетических полимеров

Основной проблемой при разработке матриксов для различных хирургических и ортопедических операций является выбор подходящих биоматериалов, которые должны удовлетворять описанным ранее требованиям (см. п. 1.2.1.). Таким образом, в зависимости от материала, матриксы могут быть на основе природных, синтетических полимеров или многокомпонентными.

В настоящее время в биомедицине и косметологии достаточно широко используются природные полимеры (белки, пептиды, полисахариды), а некоторые из них применяются в комбинации с другими материалами в качестве композитов. Они могут быть использованы при регенерации нативной ткани, так как заведомо биосовместимы, то есть способны поддерживать клеточные взаимодействия.

С другой стороны, используются синтетические полимеры, полученные посредством контролируемых химических реакций, что позволяет получать биоматериалы с заданными физико-химическими свойствами. Синтетические полимеры имеют некоторое преимущество перед природными, так как их свойства (например, механическую прочность, скорость деградации и др.) можно не только задавать при получении, но и контролировать. В отличие от синтетических полимеров, свойства природных зависят от источника их получения, их нельзя стандартизировать, а, следовательно, трудно добиться хорошей воспроизводимости результатов. Композитные/гибридные материалы получают путем физического смешивания двух и более веществ (например, двух полимеров или полимера(ов) и неорганических наночастиц), либо путем синтеза сополимеров из двух или более мономеров, что позволяет получать материалы с оптимальными свойствами, объединяя преимущества каждого из компонентов.

1.2.3.1 Матриксy на основе природных материалов

Среди природных материалов, используемых в тканевой инженерии, можно отметить, например, природные полимеры коллагены (белки), на основе которых получают матриксy для регенерации кожи [59], [60], или неорганические керамические материалы, например, гидроксипатит и трикальций фосфат, потенциально применимые для восстановления костной ткани [61], [62]. Однако, несмотря на то, что последние входят в состав неорганической составляющей костной ткани и обладают остеоиндуктивными свойствами [63], они имеют плохие механические характеристики [64], что делает их непригодными для замены мягких тканей, которые характеризуются отличными от твердых тканей рецепторами клеточной адгезии и механическими характеристиками. Следовательно, лучше использовать такие неорганические материалы для получения композитных материалов, например в составе полимерных гидрогелей.

Несмотря на указанные выше недостатки, природные полимеры активно применяются в тканевой инженерии. Можно особо отметить белки, например, коллаген [59] и желатин (денатурированный коллаген) [65], фиброин (белок шелка) [66] и др.; а также полисахариды хитозан [67], гиалуроновую кислоту (ГК) [68], альгинат [69], гликозаминогликаны [70] и другие полисахариды [71]. Природные полимеры, например, белки, имеют высокоорганизованные структуры и различные лиганды, которые могут связываться с клеточными рецепторами. Хотя природные полимеры биосовместимы, их клиническое применение ограничено сложностью получения матриксов на их основе, в основном из-за их физико-химических свойств, которые могут различаться от партии к партии [72]. Кроме того, поскольку деградация этих полимеров зависит от ферментативных процессов, скорость их биоразложения может также варьироваться от пациента к пациенту [73], [74]. Наконец, из-за способности природных полимеров поддерживать рост клеток на различных этапах развития, возможна и нежелательная стимуляция иммунного

ответа. В частности, большинство белков, как известно, иммуногенны, то есть способствуют выработке антител. Иммуногенность также может быть обусловлена присутствующими в природных полимерах антигенами, наличие которых варьируется в зависимости от способа и источника получения [75]. Тем не менее, биосовместимость матриц на основе природных сополимеров определяет их широкое исследование и применение в тканевой инженерии.

Так как в данной работе матрицы получали на основе природного полисахарида хитозана, далее будут рассмотрены некоторые особенности полисахаридов и, в частности, хитозана.

Полисахариды представляют собой углеводные макромолекулы, образованные повторяющимися связанными гликозидными связями моносахаридными звеньями, и играют жизненно важную роль в живых системах [76]. Привлекательность применения полисахаридов в регенеративной медицине обусловлена их свойствами, такими как биосовместимость, способность к биodeградации под действием ферментов (например, лизоцим), наличие функциональных групп, которые облегчают химические модификации для адаптации матриц в конкретных применениях, а также цитосовместимость и организованная макроструктура. В дополнение к химическим и структурным особенностям, биологически моносахаридные звенья играют важную роль в передаче клеточных сигналов, тем самым опосредуя клеточные процессы регенерации на молекулярном уровне. Особенности некоторых природных полимеров с точки зрения их использования для разработки ТИК представлены в таблице 1 [76].

Таблица 1 – Преимущества и недостатки различных полисахаридов, применяемых в тканевой инженерии

Полимер	Свойства		Ссылки
	Достоинства	Недостатки	
Гиалуроновая кислота	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Является компонентом ЕВМ ▪ Поддерживает регенерацию и эластичность тканей ▪ Имеет высокую водоудерживающую способность ▪ Обладает хорошей гелеобразующей способностью ▪ Взаимодействует с клетками и факторами роста 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Низкая механическая прочность ○ быстрая деградация 	[77], [78]
Хитозан	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Гидрофильность ▪ Способность к образованию полиэлектролитных комплексов ▪ Способность к мукоадгезии ▪ Гемостатическое действие ▪ Структурное сходство с нативными внеклеточными протеогликанами ▪ Возможность получения рН-чувствительных матриксов 	Низкая механическая прочность	[71], [79]

Продолжение таблицы 1

Полимер	Свойства		Ссылки
	Достоинства	Недостатки	
Альгинат	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Способность к образованию физически сшитых гидрогелей при взаимодействии с двухвалентными катионами металлов (например, Ca^{2+}) ▪ Способность к образованию полиэлектролитных комплексов при взаимодействии с положительно заряженными полиэлектролитами (например, с хитозаном) ▪ Хорошая набухаемость 	Низкая клеточная адгезия	[80], [81]
Декстран	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Снижает риск тромбоза и воспалительной реакции ▪ Предотвращает реперфузионный синдром при трансплантации органов ▪ Действует как мягкий поглотитель активных форм кислорода ▪ Снижает избыток тромбоцитов ▪ Обладает хорошей клеточной адгезией 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Гепатотоксичность ○ Тромбоцитопения 	[82], [83]

Полисахариды применяются при разработке ТИК как отдельно, так и в сочетании с другими природными или синтетическими полимерами, при изготовлении матриксов, обеспечивающих морфогенез конкретной ткани [84]. Полисахариды могут быть классифицированы на основе химического состава (гомо- и гетерополисахариды), структуры (линейная и разветвленная), функционирования в организме (структурные, запасающие, защитные, гидроосмотические и др. [76]), заряда (катионный, анионный и нейтральный) или источника происхождения (животное, растительное, микробное или из водорослей).

1.2.3.2 Матриксы на основе синтетических полимеров

В отличие от природных, синтетические полимеры обладают особенных свойств, в том числе большей технологичностью, что обеспечивает возможность получения на их основе матриксов необходимого размера, формы и т.д. [85]. Для решения конкретных задач физико-химические свойства синтетических полимеров можно легко модифицировать, а механические характеристики и скорость деградации можно варьировать. Так, в макромолекулы этих полимеров можно включать различные функциональные группы или боковые цепи. В боковые цепи синтетических полимеров можно вводить лиганды, например, пептиды или другие биоактивные молекулы. Кроме того, биоразложение синтетических полимеров обычно осуществляется простым гидролизом. Такой механизм является приоритетным, поскольку скорость их разложения не меняется от пациента к пациенту, за исключением случаев воспаления или разрушения имплантата, которые могут влиять на локальные изменения pH. Среди наиболее широко используемых синтетических полимеров следует отметить полигликолевую кислоту, полимолочную кислоту (ПМК), их различные сополимеры, а также поликапролактон, полиэтиленгликоль, поливиниловый спирт (ПВС) и др. [86].

В настоящее время появляется все больше работ, сфокусированных на разработке композитных/многокомпонентных матриц, которые позволяют сочетать достоинства природных и синтетических полимеров.

1.2.3.3 Композитные матрицы

Композитные матрицы состоят из двух или более компонентов. Использование композитных матриц позволяет минимизировать нежелательные эффекты и получать материалы с необходимыми свойствами для конкретных применений, поскольку объединяют преимущества каждого из составляющих их компонентов [87], [88]. Создание композитных матриц позволяет регулировать механические свойства, адгезионный потенциал и т.д. Так, модуль упругости матрикса на основе гликонуклеолипидов, содержащих фторированную углеродную цепь (от англ. glyco-nucleo-lipids containing a fluorinated carbon chain (GNF)) был ниже, чем в случае матрикса на основе только GNF или только коллагена I типа по отдельности [89]. Было также показано, что МСК, включенные в гидрогели из GNF, не прикреплялись к поверхности матрикса и сохранялись в виде отдельных клеток сферической формы, в то время как в случае композитного матрикса GNF/коллаген клетки не только хорошо прикреплялись, но также распластывались и пролиферировали как *in vitro*, так и *in vivo*. Таким образом, использование именно композитного матрикса GNF/коллаген обеспечивало благоприятные условия для роста МСК.

В качестве другого примера можно привести композитный матрикс, представляющий собой нановолокна на основе смеси ПМК и хитозана [90]. Так, было показано, что волокна на основе ПМК обладали высокой прочностью на растяжение, но имели низкое значение удлинения при разрыве из-за хрупкости. Добавление хитозана значительно улучшило как удлинение, так и прочность на растяжение, при этом модуль Юнга увеличился с 57.38 ± 13.21 МПа до 78.67 ± 14.15 МПа.

Многокомпонентные матрицы можно получать как из смеси отдельных полимеров, так и из сополимеров. В первом случае в состав матрикса входят не

сшитые ионными или химическими связями полимеры, образующие смесь с аддитивными свойствами. Обычно они представляют собой дисперсную систему (эмульсию) или смесь с двумя непрерывными фазами (матричная структура). Механические свойства гетерогенных смесей полимеров зависят от большого числа факторов, но в основном определяются свойствами дисперсионной среды [91]. Таким образом, получение матриксов на основе смеси полимеров не позволяет сильно менять их свойства.

Во втором случае матрикс можно получить из сополимеров, макромолекулы которых представляют собой цепочки сшитых между собой двух или более различных структурных звеньев (мономеров). Сополимеры могут быть подразделены на регулярные и нерегулярные в соответствии с закономерностями связывания дополнительных звеньев с основной цепью полимера. Такие сополимеры называются также статическими и обладают «интенсивными свойствами», то есть после сшивки проявляют новые свойства, не характерные для составляющих их компонентов. Эти свойства достаточно сложно предугадать [91].

Кроме того, выделяют блок-сополимеры, то есть не перемешанные между собой чередующиеся блоки полимеров или мономеров, и привитые сополимеры (или графт-сополимеры), где к основной цепи полимера привиты отличного состава боковые ответвления. Блок- и графт-сополимеры обычно сочетают свойства составляющих компонентов (блоков или основных цепей и привитых цепей). Это позволяет контролировать свойства получаемых сополимеров, изменяя степень полимеризации. Такими способами был получен ряд материалов для тканеинженерных матриксов. Так, например, с использованием гиалуроновой кислоты был получен высокопрочный сополимер гиалуроновой кислоты с этиленом. Этот сополимер был получен реакцией этерификации между ацильными группами малеинового ангидрида, привитыми на цепи полиэтилена, и гидроксильными группами на мономерном блоке ГК [92]. Полученный сополимер обладал всеми свойствами, определяющими возможность его применения в биомедицинских целях. Сополимер

может быть спрессован в различные формы, а его амфифильность позволяет модифицировать его взаимодействием с различными биомакромолекулами.

Также было показано, что сополимеры хитозан-графт-поли(L-лактид), полученные путем прививки предварительно синтезированных цепей поли (L-лактида)-COOH к основной цепи хитозана, могут обладать усиленными остеоиндуктивными свойствами в зависимости от процентного соотношения компонентов (80/20 и 50/50 масс %). В частности, сополимер с более высоким содержанием поли(L-лактида) усиливал пролиферацию преостеобластных клеток (МС3Т3-Е1) при их культивировании на исследуемых матриксах [93]. Известно, что гидрогели на основе поливинилового спирта обладают биосовместимостью, химической стабильностью, низкой адсорбцией белка. Однако незаряженная поверхность гидрогелей на основе ПВС не совсем благоприятна для адгезии и распластывания клеток. После введения в ПВС заряженных групп, таких как отрицательно заряженная акриловая кислота или положительно заряженные мономеры диэтиламиноэтилметакрилата, наблюдали улучшение адгезии мышинных фибробластов и увеличение доли жизнеспособных клеток при культивировании их на таком модифицированном матриксе [94].

1.3 Формы матриксов для тканевой инженерии

При восстановлении тканей необходимо не только подобрать биоматериал, который будет максимально точно имитировать ЕВМ, но и создать из него форму, которая лучше всего подойдет для регенерации той или иной ткани. Биоматериалы могут быть сформованы в двумерные мембраны, микроносители, двумерные пленки (2D), а также в трехмерные (3D) пористые гидрогели, а также в микро- или нановолокна. Форма матрикса также зависит от поставленных задач, будь то непосредственное восстановление ткани или доставка различных лекарств, либо биоактивных факторов. В настоящее время для тканевой инженерии кожи, костей, мышц, хрящей, а также кровеносных сосудов описаны матриксы в форме микро- и

нановолокон [95]–[97]. Микроносители (полимерные микросферы или гранулы с размером 150-300 микрон) хорошо использовать в случаях, когда невозможно или трудно осуществить хирургическую операцию, поскольку они могут быть введены через иглу шприца (неинвазивный метод введения). Например, с использованием микроносителей описан подход для регенерация тканей головного мозга путем стереотаксической имплантации [98]. Широкое применение также получили пористые гидрогели, свойства которых будут более подробно рассмотрены в следующей главе.

1.3.1 Гидрогели как матриксы для тканевой инженерии

В тканевой инженерии гидрогели могут выполнять ряд функций. Они могут использоваться просто для заполнения раневых дефектов (пустот), а также применяться в качестве 3D подложки для прикрепления, распластывания, роста, пролиферации и/или дифференцировки клеток. Одновременно с этим они могут выступать как “депо” для пролонгированной доставки различных лекарств или биоактивных молекул, например, факторов роста или дифференцировки. Кроме того, структура гидрогелей, в частности направленные каналы внутри этого матрикса могут задавать направление миграции клеток и их пролиферации/дифференцировки.

Гидрогели, заполняющие раневые дефекты (пустоты) могут использоваться с целью предотвращения адгезии, спаек или в качестве биологического «клея». При этом в качестве средств доставки биоактивных молекул, например, инициатора (промотора) ангиогенеза [99], применяются гидрогели различной природы. Кроме того, гидрогели можно использовать в качестве 3D подложки для клеток при регенерации ряда тканей. Последние будут интересовать нас в большей степени в этом обзоре, так как в данной работе изучали способность пористых гидрогелей на основе хитозана и его сополимеров с олиголактидами поддерживать рост фибробластов и стволовых клеток, а также дифференцировку стволовых клеток.

1.3.1.1 Общая характеристика гидрогелей

Гидрогели представляют собой структуру, способную набухать и удерживать значительную долю воды (или биологических жидкостей) в своем объеме, не растворяясь в ней. Гидрогели представляют собой поперечно сшитую полимерную сетку, полученную путем простой реакции одного или нескольких компонентов (мономеров или полимеров). Гидрогели можно классифицировать в соответствии с их структурой, зарядом, способами получения и условиями сшивки. По типу структуры гидрогели можно разделить на аморфные и полукристаллические, при этом макромолекулы в них могут быть сшиты водородными, ионными или химическими связями.

1.3.1.2 Классификация гидрогелей по заряду

Гидрогели также называются «гидрофильными полимерами» из-за наличия в их структуре до 97% воды. Гидрогели могут иметь функциональные группы, такие как $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{COOH}$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{OH}$ и $-\text{NH}_2$, которые и обеспечивают гидрофильный характер полимерных цепей. В зависимости от химической и физической структуры существуют три типа гидрогелей: нейтральные, ионные гидрогели и взаимосвязанные «сетевые» структуры. Нейтральными (не ионными) гидрогелями являются гомополимерные или сополимерные гидрогели, которые не имеют заряженных групп в своей структуре. Ионные гидрогели получают из ионно-заряженных мономеров и называют катионными или анионными, в зависимости от заряда мономера [100]. В качестве примера такой полимерной системы можно привести кальций-альгинатные гидрогели. Наличие заряженных групп в основной цепи ионных гидрогелей повышает их восприимчивость к различным внешним факторам. Присутствие ионизируемых функциональных групп, таких как карбоксильная, сульфоновая или аммониевая, увеличивает гидрофильность полимера и, следовательно, увеличивает водопоглощающую способность, которая, в свою очередь, определяет физико-химические свойства гидрогеля в целом. В ионных гидрогелях, содержащих

кислотные группы, набухание увеличивается в основной среде, тогда как у гидрогелей, содержащих основные группы, - в кислых средах [101].

1.3.1.3 Классификация гидрогелей по способу получения

Для создания полимерных сетей и для «защиты» трехмерных структур в водных средах применяются различные способы сшивки, в частности химические и физические. Физически сшитые гидрогели получают путем изменения условий окружающей среды (рН, температура или электростатические взаимодействия), а также с помощью водородных связей и/или белковых взаимодействий. Химически сшитые гидрогели получают путем радикальной полимеризации, химических реакций, энергетического облучения или ферментативной сшивки [102], [103]. В полимерной сетке гидрогеля имеются как гидрофильные группы или области, обеспечивающие гидратированную структуру, так и поперечные связи для предотвращения растворения гидрофильных полимерных цепей в водной фазе. Существует два типа такой поперечной сшивки.

Физически сшитые гидрогели образуются за счет физических взаимодействий, таких как водородные связи, ионные связи, координационные связи или гидрофобные взаимодействия. Эти гидрогели могут быть сформированы путем изменения температуры, рН или состояния растворителя, в результате чего образуется гомогенный раствор. Так, например, физически сшитые альгинатные гидрогели получают при взаимодействии растворимых солей альгината натрия с ионами кальция. Такие гидрогели обратимы: при изменении условий, например, добавлении хелатных агентов (ЭДТА), которые связывают ионы кальция, такие гидрогели легко растворяются [104]. Эти гидрогели часто механически неустойчивы [105]. Однако обратимость, например, в случае термочувствительных гидрогелей, может быть преимуществом при их применении в тканевой инженерии, так как растворы для их последующего формирования непосредственно в теле пациента (при повышении

температуры) можно вводить неинвазивно через иглу, а не путем хирургического вмешательства. Такой подход позволяет заполнять пустоты, так как полимерный раствор легко растекается по всему участку травмы до того, как домены снова собираются, и материал возвращается в состояние гидрогеля [106]. Настоящий ЕВМ представляет собой динамичную среду, постоянно меняющуюся и испытывающую стресс, поэтому материалы, основанные на обратимых и реформируемых физических взаимодействиях, потенциально могут обеспечить более адаптируемые матриксы.

Второй способ сшивки – химический. Гидрогели, полученные таким способом, являются необратимыми, поскольку они сшиты ковалентными связями и не растворяются при изменении температуры, рН или состава растворителя [107]. Химическая сшивка приводит также к улучшению механических свойств гидрогелей. Так, химически сшитые гидрогели на основе желатина, полученные при использовании 3,4-диэтокси-3-циклобутен-1,2-диона или диэтилскварата в качестве гомобифункционального сшивателя, могут быть применены для инженерии хрящевой ткани [108]. Гидрогели на основе гиалуроновой кислоты, сшитой полиэтиленгликолем, представляли собой более механически стабильный и более устойчивый к физиологическому разложению матрикс, который может быть использован в дерматологии, чем не сшитый матрикс [109].

Ковалентные связи между полимерными цепями могут быть получены за счет комплементарной реакционной способности функциональных групп, например, образованием аминокарбоновой кислоты или реакцией OH / NH_3 , в частности с образованием изоцианата или основания Шиффа (реакцией между альдегидной группой сшивающего агента и аминогруппой полимера). Примером матриксов с таким типом связи могут быть гидрогели на основе хитозана, сшитые глутаровым альдегидом или дженипином [77], [110].

Высокоэнергетическое облучение, такое как гамма- или «электронные пучки», может быть использовано для полимеризации ненасыщенных соединений. Это означает, что, например, гидрогели могут быть получены из водорастворимых полимеров, модифицированных фенильными группами, с помощью высокоэнергетического облучения [111]. Гидрогели могут также быть сформированы путем радиационной полимеризации монофункционального акрилата (например, акрилоил-L-пролина метилового эфира) с использованием какого-либо сшивающего агента [112]. Однако, в отличие от полимеров, большинство сшивающих агентов низкомолекулярные и токсичные, и в случае плохой отмывки готового гидрогеля, их постепенное диффундирование из гидрогеля может создавать проблемы при культивировании клеток на таких матриксах. Поэтому химически сшитые гидрогели следует тщательно отмывать от сшивающих агентов перед культивированием на них клеток.

1.3.1.4 Физико-химические свойства гидрогелей

Известно, что гидрогели могут сильно набухать, при этом содержание воды в них может превышать их собственный вес в 20-100 раз [113]. По содержанию воды гидрогели могут быть классифицированы на гидрогели с низким набуханием (20-50%), гидрогели средней степени набухания (50-90%), гидрогели с высокой набухающей способностью (90-99,5%) и суперпоглощающие гидрогели (> 99,5%). Когда полимерная сеть контактирует с водными растворами, происходит набухание до достижения термодинамической стабильности по градиенту концентрации воды [114]. Гидрофильность полимерной цепи и плотность поперечной связи являются параметрами, определяющими степень набухания, так как гидрофильные группы полимерных сетей в гидрогелях представляют собой группы, подобные воде и обладают высоким сродством к ней. Эти группы и позволяют гидрогелям набухать, и таким образом становятся мягкими и приобретать упругие свойства [115]. Структура ковалентно сшитых гидрогелей более жесткая, таким образом, увеличение

количества гидрофобного сшивающего агента приводит к снижению набухаемости гидрогеля [116]. Гидрогели с высоким содержанием воды напоминают естественные (живые) ткани, что также определяет их биосовместимость. Обычно они наиболее интересны для медицинской области, в том числе из-за хорошей проницаемости. Однако получение биodeградируемых гидрогелей с хорошими механическими свойствами и высокой сорбирующей способностью по-прежнему является сложной задачей, поскольку по мере увеличения количества воды механические свойства гидрогеля ослабевают.

1.4 Свойства хитозана как материала для получения гидрогелей

Хитозан представляет собой линейный природный полисахарид, состоящий из глюкозамина и ацетилглюкозамина, связанных β (1-4) гликозидными связями. Для получения хитозана используется хитин, который является одним из широко распространенных природных ресурсов, найденных на Земле. Общими источниками хитина являются скелетные части ракообразных и насекомых, клеточные стенки бактерий и грибов. Хитозан получают деацетилированием хитина путём щелочного гидролиза.

Степень деацетилирования (СД) и молекулярная масса (ММ) определяют уровень чистоты хитозана. Как биоматериал для тканевой инженерии, он обладает такими необходимыми свойствами, как биоразлагаемость, антибактериальная активность и биосовместимость [117], [118]. Физико-химические и биологические свойства хитозана играют определяющую роль при изготовлении матриц для тканевой инженерии. Показано, что матрицы на основе хитозана обеспечивают клеточную адгезию, пролиферацию, дифференциацию остеобластов и минерализации [119]–[121].

1.4.1 Физико-химические свойства

Хитозан представляет собой гетерополисахарид, который состоит из реакционноспособных гидроксильных групп (при С (2), С (3) и С (6)), аминогрупп и линейного полиамина. Перечисленные группы позволяют проводить различные реакции, например, для получения привитых сополимеров на основе хитозана. Это, в свою очередь, используется при производстве различных матриц для тканевой инженерии. Полностью (100%) деацетилированный хитозан является полимером с кристаллической структурой, тогда как хитозан с меньшей степенью деацетилирования - полукристаллическим. Он растворим в органических и неорганических кислотах (рКа 6,5) и нерастворим в нейтральных и основных средах. Растворимость хитозана зависит от количества свободных амино- и N-ацетильных групп [122].

1.4.2 Биологические свойства

Наличие в молекуле хитозана протонируемых аминогрупп и гликозидных связей, по которым могут проходить ферментативный гидролиз, определяет его преимущества перед другими материалами при использовании в биомедицинских целях. Протонируемые аминогруппы, в частности, могут связываться с отрицательно заряженным муцином (клеточной мембраной), что приводит к мукоадгезии [123]. Присутствие положительных зарядов на основной цепи полимера отвечает за гемостатическую активность. Протоны, высвобождаемые в области воспаления, облегчают протонирование аминогрупп остатков D-глюкозамина, что приводит к анальгетическому эффекту. Хитозан содержит гликозидные связи, которые могут разрушаться ферментами. На сегодняшний день обнаружено восемь человеческих хитиназ, например, лизоцим, хитотриозидаза 1 (от англ. СНТ1) и кислая хитиназа млекопитающих (от англ. АМСase), обладающих ферментативной активностью в отношении хитозана [124]. В частности, человеческий лизоцим широко

распространен в различных тканях и жидкостях организма, включая печень, суставной хрящ, плазму, слюну и др. [125]. Степень деацетилирования определяет скорость деградации хитозана, в результате которой образуются нетоксичные олигосахариды различной длины. Эти олигосахариды могут быть включены в метаболические пути или выделены. В настоящее время хитозан широко используется для наружного применения, в частности при создании ранозаживляющих покрытий [123], [126], [127].

1.4.3 Механические свойства

Известно, что ткани существенно различаются по своим свойствам. Так, например, при регенерации костной ткани нужно учитывать различия механических свойств в разных типах кости. Модуль Юнга и прочность на сжатие кортикальной кости составляют 15-20 ГПа и 100-200 МПа, соответственно, тогда как для трабекулярной кости эти значения лежат в интервалах 0,1 - 2 ГПа и 2-20 МПа, соответственно [128]. Следовательно, при разработке матриксов, например для регенерации кости и заживления трещин, следует учитывать их механические свойства. Кроме того, как упоминалось ранее, существует взаимосвязь между жесткостью подложки и поведением клеток. В частности, показано, что дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток зависит от эластичности полимерного матрикса [129]. Для репарации тканей, несущих нагрузку, хитозан в чистом виде не используют в виду его недостаточно высокой механической прочности.

Увеличение механической прочности может быть достигнуто при включении нанокристаллов в матриксы на основе хитозана. Такие наполнители создают армирующий эффект, а также при их внесении возможно структурирование (кристаллизация) самого полимера [130]. Одним из примеров такой модификации являются плёнки на основе хитозана, содержащие нанотрубки галлуазита [131].

Прочность каркасов с наполнителем была значительно выше, чем без него. В результате композитные скаффолды обеспечивали улучшенные механические свойства, такие как прочность на разрыв, относительное удлинение при разрыве и термическую стабильность по сравнению с пленками только из хитозана. В ряде работ хитозан был модифицирован углеродными нанотрубками [132], [133], в результате чего улучшались эластичные свойства матриц и тем самым расширялись возможности его применения.

Механические свойства матриц на основе хитозана могут быть также улучшены и путем включения в хитозановый матрикс других полимеров, в частности противоположно заряженных. Например, хитозан может быть сшит ионами фосфата кальция [134] или на его основе могут быть получены сополимеры с олиголактидами [135], [136], свойства последних подробно будут рассмотрены в следующем разделе.

1.5 Свойства полимолочной кислоты и олиголактидов как материалов для получения гидрогелей

Полимолочная кислота представляет собой альфа-полиэфир, широко используемый в медицине, который был одобрен FDA (от англ. Food and Drug Administration - Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) в начале 80-х годов прошлого века. Полимолочная кислота отвечает большинству требований, предъявляемых к биоматериалам, благодаря своей биосовместимости и возможности формирования матриц с заданной морфологией [137]. Что касается ПМК, гидрофобная природа этого полимера и отсутствие положительного заряда, необходимого для адгезии клеток, ограничивают использование матриц на ее основе в тканевой инженерии [138]. Улучшить адгезию и рост клеток на микроносителях из ПМК или сополимеров молочной и гликолевой кислот можно с помощью модификации их поверхности с использованием различных поликатионов, в частности хитозана [138].

Известно также, что продукты деградации материалов на основе одной ПМК могут локально снижать значение pH и, в результате, ускорять скорость деградации полиэфира и/или вызывать воспалительную реакцию [139].

Перспективным подходом при разработке скаффолдов на основе ПМК является создание композитных матриц. Так, известно об исследованиях гидрогелей на основе ПМК и полисахаридов (например, хитозана, декстрана, пуллулана, гиалуроновой кислоты). Такие матрицы имеют ряд преимуществ: 1) увеличенная способность к набуханию; 2) все реакции проводятся в водных растворах; 3) полисахарид имеет функциональные группы (-COOH, -NH₂, -OH и т.д.), которые можно использовать для сшивки макромолекул. Ранее также описаны композитные матрицы ПМК - полисахарид, например, на основе целлюлозы [140], гиалуроновой кислоты [141], желатина [142]. Гидрогели на основе ПМК - декстрана, в частности, использовали для доставки модельных белков - лизоцима и бычьего сывороточного альбумина [143]. Такие амфифильные матрицы можно применять в качестве скаффолдов с контролируемым высвобождением фармацевтически активных белков [144]. Так, введение ПМК в декстрин повышает пористость гидрогелей и способность к набуханию. Баланс гидрофильно-гидрофобных участков, наряду со сшивающим агентом (в данном случае - N, N'-метилен-бис-акриламидом), позволяет контролировать набухающую способность гидрогелей. Это важно при контролируемом высвобождении лекарств. Такой гидрогель, в частности, использовался для непрерывной доставки ципрофлоксацина и орнидазола [145].

Молочная кислота существует в двух формах стереоизомера, как упоминалось ранее, которые могут быть разделены на морфологически отличных полимера, а именно поли (L-лактид), поли (D-лактид) и поли (DL-лактид). Сообщается о разработке сополимеров полисахаридов и различных олигомеров молочной кислоты для биомедицинских применений [146],[147]. Таким образом, в зависимости от форм, входящих в состав полилактида, определяются и его характеристики. В частности, L,

L-лактиды имеют высокую степень кристалличности, а L, D-лактид представляет собой аморфный материал [148]. Это, в свою очередь, влияет на скорость биодеградации, механические свойства материалов на их основе и, в конечном итоге, возможность применения в регенеративной медицине.

1.6 Влияние матриксов на дифференцировку стволовых клеток

Задачей тканевой инженерии является восстановление поврежденных тканей с использованием нативных или дифференцированных стволовых клеток, полученных методом биопсии, затем размноженных в условиях *in vitro* с использованием биодеградируемых матриксов (скаффолдов) и имплантированных пациенту. Дифференцированные клетки имеют соответствующий фенотип для конкретного применения и выполняют требуемые биологические функции, например, синтезируют правильно организованный ЕВМ, секретируют определенные сигнальные молекулы и «правильно» взаимодействуют с соседними клетками и тканями. Однако использование дифференцированных клеток в тканевой инженерии часто ограничивается небольшим количеством собранных клеток и их ограниченным потенциалом деления в модели *in vitro*. Это особенно заметно в случае пожилых людей и коморбидных пациентов, то есть переносящих сразу несколько заболеваний [149]–[151]. Несмотря на то, что некоторые органы, например, печень, имеют высокую регенеративный потенциал в условиях *in vivo*, культивирование клеток из таких органов в модели *in vitro* может быть затруднительным [152]. Поэтому в регенеративной медицине используют предпочтительно стволовые недифференцированные клетки.

Стволовые клетки могут быть определены как единицы организации биологических систем, которые отвечают за регенерацию и развитие тканей и целых органов. Стволовые клетки являются недифференцированными клетками с клоногенным потенциалом, способными к самообновлению и дифференцировке в

различные типы клеток [153]. Такие клетки могут применяться: (1) для прямого нанесения на поврежденные участки, то есть для клеточной терапии; (2) для формирования ткани с использованием соответствующих матриксов в качестве подложек для прикрепления и роста этих клеток. Применение стволовых клеток считается более выгодным, чем использование дифференцированных клеток, так как первые могут быть относительно легко получены в больших количествах, имеют значительно более высокую пролиферативную способность, выдерживают большее количество пассажей, позже подвергаются старению, могут дифференцироваться в клетки с различными фенотипами, а также поддерживать васкуляризацию [154]. Для обеспечения направленной дифференцировки клеток важная роль отводится и подложкам (матриксам), которые должны максимально точно имитировать физико-химические свойства естественного внеклеточного матрикса регенерируемой ткани.

1.6.1 Влияние состава матрикса на стволовые клетки

Рассмотрим влияние состава матрикса на стволовые клетки, в частности их пролиферацию, а также направление и эффективность их дифференцировки. Так, показано, что подложки на основе ламинина и витронектина, усиливают дифференцировку мышечных клеток-предшественников сердечно-сосудистой системы (то есть клеток, полученных от эмбрионов мыши путем дифференцировки стволовых клеток) к эндотелиальным клеткам сосудов, тогда как матриксы на основе фибронектина способствуют их дифференцировке в клетки гладкой мускулатуры [155]. Трехмерная архитектура матрикса на основе нановолокон из поли(ϵ -капролактона) (от англ. polycaprolactone - PCL) стимулировала дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток (из костного мозга миниатюрной свиньи) в остеобласты более успешно, чем двумерные матриксы из PCL [156]. Хондрогенную дифференцировку стволовых клеток из жировой ткани крыс изучали, варьируя гидрофильность матриксов (нановолокон) путем смешивания PCL с триблок сополимером ϵ -капролактона с тетрагидрофураном [157]. При этом было показано,

что эта дифференцировка была лучше на матриксах, содержащих 10 масс. % триблок сополимера, чем на волокнах из чистого PCL. Таким образом, состав матрикса может влиять на эффективность направленной дифференцировки стволовых клеток и определять потенциал его применения.

1.6.2 Влияние эластичности матриксов на стволовые клетки

Эластичность матриксов также является важным регулятором дифференцировки стволовых клеток. Так, показано, что на очень мягких полиакриламидных гидрогелях, покрытых коллагеном и имеющих механические характеристики, аналогичные таковым для ткани головного мозга (модуль упругости от 0,1 до 1,0 кПа), МСК из костного мозга дифференцировались в нейроны [158]. На менее эластичных гидрогелях с модулем упругости от 8 до 17 кПа, имитирующих мышечную ткань, клетки становились миогенными, а на самых жестких матриксах (модуль упругости от 25 до 40 кПа) клетки дифференцировались в остеобласты. Подобные результаты были получены также при культивировании стволовых клеток из пуповины человека на полиакриламидных гелях с коллагеновым покрытием, отличающихся по своим механическим характеристикам [159]. Жесткость подложки также была решающим фактором для дифференцировки МСК в остеобласты при их культивировании в матриксах на основе желатина. В частности, изменение концентрации макромеров желатин – метакрилоил (от 10 до 14%) позволило увеличить жесткость гидрогелей от $25,75 \pm 1,21$ до $117,82 \pm 9,83$ кПа, соответственно, а также усилить их остеоиндуктивные свойства [160]. В сшитом гидрогеле на основе гиалуроновой кислоты, эластичность матриксов также заметно влияла на хондрогенный потенциал МСК [161]. Зависимость остеогенной дифференцировки МСК от пористости матриксов на основе хитозана и желатина была продемонстрирована в работе Ardeshiryajmi и соавторов [162]. В частности, было показано, что максимальную дифференцировку клеток наблюдали на матриксах с минимальной пористостью, в которых содержание желатина составляло 10 масс. %.

1.7 Влияние состава среды для культивирования на дифференцировку стволовых клеток

Другим важным фактором является состав среды для культивирования клеток, особенно наличие в ней специфических факторов роста и других биомолекул. Например, дифференцировка стволовых клеток в эндотелиальные клетки требует добавления VEGF (от англ. Vascular endothelial growth factor - фактора роста эндотелия сосудов) [163]. Дифференцировку клеток гладкой мускулатуры стимулировали добавлением TGF- β (от англ. Transforming Growth Factor Beta - трансформирующего фактора роста фибробластов β) [164], а нейрогенную дифференцировку активировали путем добавления в среду форсколина и вальпроевой кислоты [165]. Дифференцировка МСК в остециты (клетки костной ткани) может быть усилена в индукционной среде, содержащей β -глицерофосфат, аскорбиновую кислоту и дексаметазон, а также при добавлении в среду рекомбинантного фактора роста костной ткани BMP-2 [166] и дигидрокси-витамина D3 [167].

1.8 Влияние механической стимуляции на дифференцировку стволовых клеток

Еще одним важным фактором, способствующим дифференцировке стволовых клеток в условиях *in vitro* в клетки с нужным фенотипом, является механическая стимуляция, имитирующая нагрузку, которой клетки подвергаются в физиологических условиях *in vivo*. Например, дифференцировка стволовых клеток в эндотелиальные клетки стимулируется ламинарным напряжением сдвига [168], в остеобласты – посредством вибрационного стресса [169], в хондроциты – с использованием нагрузки компрессионного биореактора при продолжительности нагрузки не менее 7 суток (1 – 4 ч/день) [170]. Эффекты механической стимуляции могут быть заменены, по крайней мере частично, электрической стимуляцией или стимуляцией магнитным полем, которое использовали, например, для

дифференцировки стволовых клеток в кардиомиоциты [171], скелетные миоциты [172], остеобласты [173].

1.9 Влияние других факторов на дифференцировку стволовых клеток

В дополнение к изложенным ранее факторам, оказывающим влияние на дифференцировку стволовых клеток, и которые, как правило, имеют физиологический характер, дифференцировка стволовых клеток также может быть запрограммирована посредством генетических манипуляций [174]. Кроме того, на направление дифференцировки МСК может оказывать влияние совокупность факторов, например, жесткость подложки и воспалительное микроокружение [160].

Таким образом, из обзора литературы можно заключить, что наиболее перспективными матриксами для регенеративной медицины являются многокомпонентные системы, в которых каждая из составляющих участвует в формировании оптимальных свойств композитного матрикса. В данном обзоре были рассмотрены основные компоненты триады тканевой инженерии, в частности особенности получения и использования стволовых клеток, а также основные типы матриксов, методы их получения и улучшения функциональности. Следует отметить, что получение сополимеров хитозана с олиголактидами может представлять особый интерес для изготовления матриксов. С одной стороны, это позволяет усилить биоадгезивные свойства этих матриксов за счет хитозана. С другой стороны, благодаря олиголактидам в составе их сополимеров с хитозаном можно варьировать гидрофильно-гидрофобный баланс этих биоматериалов, а также механические свойства матриксов на их основе. При этом благодаря основным свойствам хитозана могут быть нейтрализованы кислотные продукты разложения лактидов [176]. Как упоминалось ранее, скорость биодеградации ПМК зависит от кристалличности, молекулярной массы и стереоизомерного состава [177]. Поэтому скорость деградации

матриц на основе сополимеров хитозана с олиголактодами также можно варьировать [178]. Подводя итог, можно заключить, что разработка двухкомпонентных скаффолдов на основе сополимеров хитозана с олиголактодами может оказаться перспективным подходом для тканевой инженерии.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Используемые реактивы

1. 2-меркаптоэтанол (1М), Sigma-Aldrich, США
2. 2-фосфо-L-аскорбиновая кислота, Sigma-Aldrich, США
3. 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид (МТТ),

ПанЭко, Россия

4. 3-изобутил-1-метилксантин (IBMX), Sigma-Aldrich, США
5. L-глутамин, ПанЭко, Россия
6. β-глицерофосфат, Sigma-Aldrich, США
7. Ализариновый красный (Alizarin Red), Sigma Aldrich, США
8. Антитела к CD105, CD90, CD73 CD45, CD34, HLA-DR, Abcam,

Великобритания

9. Буфер для лизиса эритроцитов (RBC), Bio-Rad, США
10. Бычий сывороточный альбумин, Sigma-Aldrich, США
11. Гидрогели на основе Хит и сополимеров Хит с олигомерами молочной кислоты (Хит-LL, Хит-LD); были получены в ИСПМ РАН
12. Дексаметазон, Merck Millipore, Германия
13. Диметилсульфоксид (ДМСО), Хеликон, Россия
14. Изопропанол, Sigma-Aldrich, США
15. Инсулин, Sigma-Aldrich, США
16. Коллагеназа I типа, ПанЭко, Россия
17. Краситель DAPI, Sigma-Aldrich, США
18. Краситель Calcein AM, eBioscience, Великобритания
19. Лизоцим, Thermo FS, США
20. Масляный красный (Oil Red O), Sigma-Aldrich, США
21. Набор для выделения РНК на колонках, Биолабмикс, Россия

22. Набор для иммуноферментного анализа (Альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ), Вектор-Бест, Россия
 23. Набор для иммуноферментного анализа (Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ), Вектор-Бест, Россия
 24. Набор реактивов для обратной транскрипции (MMLV RT Kit), Евроген, Россия
 25. Набор реактивов для определения активности щелочной фосфатазы (Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit), Sigma-Aldrich, США
 26. Олигонуклеотидные праймеры *Runx2*, *ALPL*, *SPP1*, *ADIPOQ*, *PPAR γ* , *GAPDH* синтезированы Евроген, Россия
 27. Пенициллин – стрептомицин, 100-кратный раствор, ПанЭко, Россия
 28. Пируват натрия, ПанЭко, Россия
 29. Смесь для ПЦР (qPCRmix-HS SYBR+LowROX), Евроген, Россия
 30. Среда RPMI-1640, ПанЭко, Россия
 31. Среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко (Dulbecco Modified Essential Medium, DMEM), ПанЭко, Россия
 32. Среда Игла, альфа модификация (α -MEM), ПанЭко, Россия
 33. Трипсин-ЭДТА (0,5% раствор трипсина с 0,05% ЭДТА), ПанЭко, Россия
 34. Форбол-12-миристат-13-ацетат (Форболовый эфир, ФМА), Sigma-Aldrich, США
 35. Флуорескамин, Sigma-Aldrich, США
 36. Фосфатно-солевой буферный раствор (ФБ, pH = 7,4), ПанЭко, Россия
 37. Хэнкса раствор, ПанЭко, Россия
 38. Эмбриональная телячья сыворотка (FBS), Carlsberg, Австрия
- 2.2. Подготовка материалов и реактивов к работе с животными клетками
- 2.2.1. Приготовление среды для культивирования клеток животных

Культивирование проводили в среде DMEM (L929), α -MEM (МСК) и RPMI-1640 (ТНР-1) с добавлением 10% FBS. Для приготовления 500 мл среды для культивирования DMEM/ α -MEM/RPMI-1640 необходимо:

1. L-глутамин	146 мг
2. Пируват натрия	55 мг
3. 2-меркаптоэтанол (1М)	25 мкл
4. Пенициллин-стрептомицин, 100-кратный раствор	5 мл

Компоненты среды смешивали в 5 мл деионизированной воды и стерилизовали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Merck Millipore, США) в 450 мл стерильной DMEM, α -MEM или RPMI-1640.

Аликвоту приготовленной среды (5 мл + 0,5 мл FBS) ставили в CO₂-инкубатор (HERAEUS B5060 EK/CO₂, Германия) на 4 – 5 дней, чтобы убедиться в ее стерильности.

2.2.2. Приготовление сред для дифференцировки мезенхимальных стромальных клеток

К среде α -MEM (10% FBS), подготовленной как в п.2.1., добавляли 2-фосфо-L-аскорбиновую кислоту (0,2 мМ), β -глицерофосфатом (10 мМ) и дексаметазоном (10 мкМ) для получения остеиндукционной среды (ОС). Добавление в α -MEM 1 мкг/мл инсулина, 0,5 мМ IBMX и 0,5 мкМ дексаметазона – среда для стимуляции направленной адипогенной дифференцировки (АС).

2.2.3. Стерилизация

Пипетки и инструменты для работы с клетками стерилизовали автоклавированием (121 °С, 30 мин).

Для обеспечения стерильности процесса все операции по ведению клеточных культур проводили в ламинарном шкафу микробиологической безопасности BA-Safe (БЕЛАКВИЛОН, Белоруссия) при включенной газовой горелке.

2.3. Работа с клеточными культурами

2.3.1. Выделение мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека

Для выделения МСК гомогенизированную жировую ткань промывали стерильным раствором Хэнкса с антибиотиком (100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) и инкубировали в течение 60 мин с 0,075% раствором коллагеназы I типа в ФБ при 37°C. Нейтрализацию фермента проводили равным объемом ФБ (рН 7,4), содержащего 10% FBS. Фракцию адипоцитов отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 300 g. Осадок ресуспендировали в 10-кратном объеме буфера для лизиса эритроцитов (от англ. Red Blood Cell Lysis Buffer - RBC), инкубировали 10 мин, центрифугировали 5 мин при 300 g. Полученный осадок фильтровали от фрагментов ткани через клеточное сито с размером пор 100 мкм (NEST, Китай) и дважды промывали ФБ (рН 7,4). Полученные клетки ресуспендировали в культуральной среде α -MEM с 2 mM L- глутамина, 1 mM пирувата натрия, 50 мкМ 2- меркаптоэтанола и 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, с добавлением 10% FBS, высевали в флаконы (75 см², SPL Life sciences, Корея) и неадгезированные гемопоэтические клетки удалялись через 24 ч, после прикрепления МСК.

2.3.2. Хранение и размораживание клеток

Полипропиленовые криопробирки (NEST, Китай) с замороженными суспензиями клеток хранили при температуре -135°C или в парах жидкого азота. Размороженную при комнатной температуре суспензию центрифугировали в течение 3 мин при 200 g. Надосадочную жидкость удаляли пипеткой. Полученный осадок

аккуратно ресуспендировали в 15 мл среды для культивирования, содержащей 5% FBS. После центрифугирования (300 g, 5 мин) к осадку добавляли 2 мл новой среды для культивирования, содержащей 15% FBS, и переносили в культуральный флакон (25 см²).

Через 6-12 ч проводили замену среды для культивирования, чтобы удалить не прикрепившиеся/мертвые клетки и удалить остаточное количество диметилсульфоксида (ДМСО). Через 24-48 ч, когда клетки достигали 70-80% конфлюэнтного монослоя, их переносили в новый культуральный флакон (25 см² или 75 см²) и далее культивировали по стандартной методике.

2.3.3. Ведение клеточных культур

В работе использовали клеточные линии мышинных фибробластов L929, ТНР-1 и мезенхимальные стромальные клетки, выделенные из жировой ткани человека. Клетки L929 культивировали в среде DMEM; МСК - в среде α -MEM, а для культивирования клеток ТНР-1 использовали среду RPMI-1640. Во все среды добавляли 2 mM L- глутамина, 1 mM пирувата натрия, 50 мкМ 2-меркаптоэтанола и 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина и 10% FBS. Клетки культивировали во флаконах (25 см² или 75 см², SPL Life sciences, Корея) в CO₂-инкубаторе (HERAEUS B5060 EK/CO₂, Германия) в газовой среде, содержащей 5% CO₂, при температуре 37 °C. В работе использовали МСК не старше 6 пассажей.

Адгезионные клеточные культуры вели по следующей методике. Каждые 3-7 дней, когда клетки достигали 70-80% конфлюэнтного монослоя на дне культурального флакона, проводили пересев клеток и замену среды для культивирования. Для этого декантировали из флакона всю среду для культивирования (клетки оставались прикрепленными ко дну флакона) и клетки отмывали от остатков FBS, используя 2 мл раствора трипсина-ЭДТА. Затем, чтобы снять клетки с поверхности флакона, добавляли 2 мл раствора трипсина-ЭДТА и

оставляли на 3-5 мин при 37 °С. Далее инактивировали действие раствора трипсина-ЭДТА добавлением 5 мл среды для культивирования, содержащей 10% FBS, и ресуспендировали клетки. Полученную клеточную суспензию переносили в 15 мл пробирку и центрифугировали (5 мин, 300 g). К осадку добавляли 5-10 мл свежей среды для культивирования, содержащей 10% FBS, аккуратно суспендировали клетки и 1/4 (или 1/3) переносили в культуральный флакон, а оставшиеся клетки использовались в экспериментах. Для подсчета клеток использовали автоматический счетчик клеток TC20 (Bio-Rad, США).

Суспензионные культуры (клетки ТНР-1) пересевали при достижении концентрации 1×10^6 клеток в 1 мл культуральной среды, путём центрифугирования в течение 4 мин при 250 g. Затем клетки ресуспендировали в свежей среде RPMI-1640 с 10% FBS так, чтобы концентрация клеток в среде не превышала 5×10^5 клеток/мл среды.

2.3.4. Исследование иммунофенотипа мезенхимальных стромальных клеток

Исследование иммунофенотипа МСК проводилось путём анализа экспрессии поверхностных мембранных маркеров. Методом проточной цитофлуориметрии с использованием прибора ZE5 Cell Analyzer (Bio-Rad, США) МСК были исследованы на положительную экспрессию кластеров дифференцировки (CD, от англ. cluster of differentiation) 105, CD 90, CD73 и отсутствие CD45, CD34 и HLA-DR (все антитела – Abcam, Великобритания). Данные маркеры были выбраны согласно минимальным критериям стволовости, установленными Международным обществом клеточной терапии (от англ. International Society for Cellular Therapy - ISCT) [179]. Для этого, осадок клеток фиксировали в 4% растворе формалина в течение 1 ч, промывали в растворе ФБ (рН 7,4) и 20 мин блокировали неспецифические связывания путём инкубации в 1% растворе бычьего сывороточного альбумина в ФБ (рН 7,4). Конъюгированные антитела разводили согласно инструкции производителя в 1%

растворе бычьего сывороточного альбумина в ФБ (pH 7,4) и использовали аликвоты по 100 мкл для окрашивания одного образца. Осадок клеток инкубировали с антителами в течение 20 мин, промывали ФБ (pH 7,4) и затем анализировали на проточном цитофлуориметре. В качестве контроля исследовали неокрашенные клетки. Анализ полученных результатов и визуализацию проводили с помощью программного обеспечения Floreada.io.

Дифференцировочный потенциал выделенных клеток оценивали при культивировании МСК в индукционных средах, приготовленных как описано ранее (см. п. 2.2.2.). Окрашивание ализариновым красным (Alizarin Red) и масляным красным (Oil Red O) использовали для оценки остеогенеза и адипогенеза, соответственно, на 14-й день культивирования. Стоковый раствор (100x) ализаринового красного готовили путём растворения 0,5 г в 40 мл milliQ и доводили pH до значений 4,1 – 4,3 путём внесения 0,25% раствора NH_4OH . Клетки фиксировали в течение 10 мин 4% раствором формалина, после чего промывали дистиллированной водой 2 раза и окрашивали рабочим раствором ализаринового красного в течение 30 мин. Краситель полностью декантировали и затем промывали лунки до получения прозрачного раствора. Для приготовления стокового раствора масляного красного, навеску 0,5 г растворяли в 100 мл изопропанола. Рабочий раствор получали путём смешения 6 мл стокового раствора с 4 мл milliQ и последующей фильтрации. Клетки фиксировали в 10% растворе формалина в течение 60 мин, промывали 50% этанолом, окрашивали в течение 30 мин и промывали этанолом для удаления не связавшегося красителя. Фиксировали накопления кальция и формирование липидных капель с использованием фазово-контрастного микроскопа (Primovert, Carl Zeiss, Германия).

2.3.5. *Замораживание клеток*

На одну криопробирку готовили 1 мл суспензии, содержащей 10^6 клеток (L929, МСК) или 3×10^6 клеток (ТНР-1), ресуспендированных в смеси для заморозки (10% ДМСО, 90% FBS).

Для этого клетки снимали со дна культурального флакона (L929, МСК) или отбирали из флакона (ТНР-1), осаждали и к осадку добавляли охлажденную смесь для заморозки. После этого клетки аккуратно и тщательно ресуспендировали в этой смеси, и полученную суспензию переносили в специальные полипропиленовые криопробирки, предварительно охлажденные во льду, и немедленно переносили на -20°C на 60-90 мин. После полного замерзания суспензии пробирки переносили в криостат на -135°C или в сосуд Дюара с парами жидкого азота для длительного хранения.

2.3.6. Световая микроскопия

Микроскопические исследования морфологии, распределения и роста клеток осуществляли с помощью светового инвертированного микроскопа (Reichert Microstar 1820E, Германия или Primovert, Carl Zeiss, Германия).

2.3.7. МТТ-тест

МТТ-тест основан на способности митохондриальных и цитоплазматических дегидрогеназ клеток восстанавливать МТТ с образованием нерастворимых в воде кристаллов формазана, количество которого может быть измерено спектрофотометрически после растворения в ДМСО. Одной из ключевых особенностей этого метода является то, что количество формазана прямо пропорционально количеству живых клеток.

Раствор МТТ (5 мг/мл) готовили в ФБ (рН 7,4) и хранили при -20°C .

2.4. Получение гидрогелей и плёночных материалов

Гидрогели на основе хитозана и сополимеров хитозана с олиголактидами были получены в Институте синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, как описано ранее [180], и любезно предоставлены для данного исследования. При этом сами сополимеры были получены методом твердофазного синтеза (без

использования растворов) из Хит (ММ 80 кДа, СД 0,89) и кристаллического (Хит-LL) и аморфного олиголактоидов (Хит-LD). ММ олиголактоидов была 5 кДа, а массовое соотношение Хит/олиголактоид составляло 40/60.

Макропористые гидрогели получали лиофильной сушкой 4% растворов сополимеров в 2% уксусной кислоте, предварительно замороженных при -15°C . Образцы переводили в водонерастворимое состояние термической обработкой (150°C , 5 ч). В качестве контроля использовали гидрогели на основе только Хит. Макропористые гидрогели из поперечно сшитого Хит получали путем замораживания и последующей лиофильной сушки с использованием лиофилизатора Alpha 1-4/2-4 (Christ, Германия).

Пленочные образцы (толщина ~ 100 мкм) аналогичного гидрогелям состава были получены методом сухого формования из 2% растворов полимеров в 2% уксусной кислоте.

2.5. Исследование структуры гидрогелей

Исследование структуры образцов гидрогелей проводили с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Для этого образцы гидрогелей инкубировали в ФБ (рН 7,4) при комнатной температуре в течение 2 дней и окрашивали флуоресцентным красителем. Визуализацию структуры набухших гидрогелей проводили путём окрашивания Флуорескамином (0,3 мкг/мл ацетона), обеспечивающим аминспецифическое окрашивание. Образцы гидрогеля инкубировали в растворе красителя в течение 10 мин, затем трижды промывали ФБ (рН 7,4) и помещали на предметное стекло. Для анализа образцов использовали инвертированный микроскоп TE-2000 с конфокальным лазером EZ-C1 (Nikon, Япония). Длина волны возбуждения составляла 408 нм, а сигналы флуоресценции собирались при 515 ± 30 нм. Снимки были получены с помощью программного обеспечения (ПО) Nikon EZ-C1. Специальное ПО (Image J, National Institute of Health,

США) было использовано для определения среднего размера пор гидрогелей. Эффективный диаметр пор (d) рассчитывали следующим образом по формуле (1):

$$d = (L \times S)^{1/2}, (1)$$

где L — длина длинной оси поры, а S — длина короткой оси поры. Средний размер пор определяли путем случайного измерения не менее 100 пор для каждого образца макропористого гидрогеля.

2.6. Исследование физико-химических свойств гидрогелей

2.6.1. Стерилизация плёночных материалов и гидрогелей

К сухим пленкам добавляли раствор ФБ (рН 7,4) для набухания в течение 10 мин, в результате чего пленки становились эластичными. Далее пленки нарезали на образцы с диаметром 6,4 мм (при использовании 96-луночных планшетов для изучения морфологии клеток) или 10,6 мм (для помещения их в 48-луночные планшеты при оценке экспрессии генов дифференцировки с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени). Гидрогели нарезали в форме цилиндров с диаметром 4 мм и толщиной 2 мм. Далее образцы пленок/гидрогелей переносили в соответствующий культуральный планшет, вносили в каждую лунку по 100-300 мкл 70% спирта и стерилизовали в течение 1 ч, после чего промывали 3 раза ФБ (рН 7,4).

2.6.2. Изучение набухаемости гидрогелей

Гидрогели нарезали на образцы цилиндрической формы (4 мм х 2 мм), взвешивали, стерилизовали (как описано выше в п. 2.6.1) и помещали в лунки 24-луночного планшета. Далее к образцам добавляли по 1 мл DMEM без FBS и помещали планшет в CO₂-инкубатор (HERAEUS B5060 EK/CO₂, Германия). Через 1 и 7 дней инкубации взвешивали образцы, а также оставшуюся на предметном стекле

жидкость. Разницу между полученными значениями считали массой набухшего геля. Далее по формуле (2) считали общую (равновесную) набухаемость:

$$\text{Набухаемость} = \frac{M_{\text{наб}} - M_{\text{исх}}}{M_{\text{исх}}} (2),$$

где $M_{\text{наб}}$ – вес набухшего образца, $M_{\text{исх}}$ – вес исходного сухого образца.

2.6.3. Изучение биодegradации гидрогелей

Степень деградации макропористых матриц исследовали гравиметрическим методом, измеряя потерю веса образца. Для этого образцы макропористого гидрогеля предварительно взвешивали, стерилизовали и инкубировали в DMEM или растворе лизоцима (2 мг/мл в ФБ (рН 7,4)). Растворы заменяли на свежие 1 раз в неделю. Через 7, 14, 21 и 31 день инкубации образцы гидрогелей извлекали из среды, трижды промывали водой MilliQ, сушили при 50°C до постоянного веса и взвешивали. Потерю веса рассчитывали следующим образом (3):

$$\text{Потеря массы} = \frac{M_{\text{исх}} - M_{\text{кон}}}{M_{\text{исх}}} \times 100\% (3),$$

где $M_{\text{кон}}$ – вес образца в конце эксперимента, $M_{\text{исх}}$ – вес исходного образца.

2.6.4. Оценка механических характеристик матриц

Механические свойства гидрогелей на основе хитозана и сополимеров хитозана с олиголактидами проводили на установке DMA 242C (NETZSCH, Германия) в динамическом режиме методом динамического механического анализа (ДМА). В частности, гидрогели исследовали при деформации - «сжатие». Образцы гидрогелей были подготовлены в виде цилиндров с высотой 15 мм и диаметром 10 мм. Были получены температурные зависимости следующих динамических механических параметров: модуль упругости E' , модуль потерь E'' и тангенс угла механических

потерь ($tg\delta$). Измерения проводили в интервале температур 25-300°C со скоростью 5°/мин на частоте 1 Гц.

Исследования механических характеристик плёнок проводили путём нагрузки образцов до разрушения на универсальной разрывной машине AG-E или AGS-H (Shimadzu, Япония) при скорости 1 мм/мин, как описано ранее [181].

2.7. Исследование цитотоксичности гидрогелей в модели *in vitro*

Цитотоксичность образцов макропористых гидрогелей в модели *in vitro* изучали путём тестирования экстрактов с использованием фибробластов мыши L929 в качестве модельных животных клеток. Для этого предварительно стерилизованные образцы инкубировали в среде DMEM, содержащей 10% FBS (25 мг образца на 1 мл), при 37 °С, а через 24 ч полученные экстракты собирали для последующего тестирования. Клетки L929 высевали в 96-луночный планшет (10⁴ клеток на лунку) и планшеты переносили в CO₂-инкубатор (HERAEUS B5060 EK/CO₂, Германия) для прикрепления клеток. Через 24 ч среду для культивирования в каждой лунке заменяли на 100 мкл экстракта. В качестве контроля использовали клетки, культивированные в среде без экстракта. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста. Через 24 ч инкубации с экстрактами, содержимое каждой лунки заменяли на 100 мкл раствора МТТ (0,5 мг/мл DMEM), а планшет помещали в CO₂-инкубатор (HERAEUS B5060 EK/CO₂, Германия). Через 1 ч образовавшиеся в живых клетках кристаллы формазана растворяли в ДМСО (100 мкл на лунку) и измеряли оптическую плотность при 540/690 нм с помощью планшет-ридера Multiscan (Flow Laboratories, США). Относительную жизнеспособность клеток рассчитывали по формуле (3):

$$\text{Доля жизнеспособных клеток} = \frac{\text{ОП в тестовых лунках}}{\text{ОП в контрольных лунках}} \times 100\% \quad (3),$$

Где ОП – оптическая плотность.

Полученные результаты представляли как среднее значение \pm стандартное отклонение для трех повторов.

2.8. Оценка риска воспалительной реакции в модели *in vitro*

Индукцированную биоматериалом воспалительную реакцию оценивали в модели *in vitro* с использованием линии клеток острого моноцитарного лейкоза человека THP-1. Для этого стерильные образцы помещали в 48-луночный планшет и инкубировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS (25 мг образца на 1 мл). Далее вносили суспензию клеток THP-1 в объеме 100 мкл (1×10^6 клеток/мл среды). Клетки THP-1, активированные форбол-12-миристан-13-ацетатом (ФМА) в концентрации 20 нг/мл, и интактные клетки использовали в качестве положительного и отрицательного контролей, соответственно. Через 48 ч всю среду отбирали из лунок и центрифугировали 4 мин при 300g для отделения клеток THP-1. Иммуногенность оценивали по секреции THP-1 в культуральную среду цитокинов TNF- α и интерлейкина-6 (IL-6), характерных для активации макрофагов, с помощью наборов альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ и Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ (Вектор-бест, Россия) для иммуноферментного анализа. Анализ проводили согласно инструкции производителя. Измерения оптической плотности оценивали при длине волны 450 нм с помощью планшет-ридера Multiscan (Flow Laboratories, США).

2.9. Исследование роста клеток на матриксах

Для изучения влияния свойств поверхности и состава матриксов на рост животных клеток проводили длительное культивирование клеток L929 и МСК на исследуемых гидрогелях.

2.9.1. Культивирование клеток в гидрогелях

Перед посадкой клеток стерильные образцы гидрогелей (размером 4 x 2 мм, весом 2-3 мг) инкубировали в DMEM, содержащей 10% FBS, в CO₂-инкубаторе

(HERAEUS B5060 EK/CO₂, Германия) в течение 24 ч. Перед посадкой клеток среду удаляли. Клетки высевали, добавляя клеточную суспензию непосредственно к образцу гидрогеля, который предварительно помещали в 96-луночный планшет. Фибробласты L929 и МСК высевали при плотности 2×10^4 и 4×10^4 клеток на образец, соответственно. Суспензию клеток такой же плотности вносили в пустые лунки и использовали как контроль. Через 3 ч после прикрепления клеток, в каждую лунку вносили еще по 200 мкл среды. Далее помещали планшет в CO₂-инкубатор (HERAEUS B5060 EK/CO₂, Германия) и культивировали в стандартных условиях с регулярной заменой среды каждые 2 - 4 дня.

2.9.2. Определение количества жизнеспособных клеток после культивирования в гидрогелях

Количество жизнеспособных клеток оценивали методом МТТ-теста на 3, 7 и 10 день в случае клеток L929 и на 7, 10 и 14 день в случае МСК. Для этого образцы гидрогелей с клетками переносили в новые лунки, добавляли в каждую лунку по 100 мкл раствора МТТ в среде культивирования (0,5 мг/мл) и инкубировали планшет в CO₂-инкубаторе (HERAEUS B5060 EK/CO₂, Германия) в течение 2 ч при 37 °С. Затем кристаллы формазана растворяли в ДМСО (200 мкл/лунку) и отбирали аликвоты по 100 мкл для измерения оптической плотности (540/690 нм) на ридере Multiscan (Flow Laboratories, США). Данные монослойной культуры клеток, культивируемой на дне лунки планшета, были взяты в качестве контроля.

Для оценки количества клеток и учета влияния образцов макропористого гидрогеля на результаты МТТ-теста строили калибровочные кривые в присутствии образцов гидрогеля. Для этого образцы гидрогеля готовили так же, как для длительного культивирования клеток, и инкубировали в среде культивирования в CO₂-инкубаторе (HERAEUS B5060 EK/CO₂, Германия) в течение 7 дней. Затем высевали мышинные фибробласты L929 или мезенхимальные стромальные клетки в 96-луночный планшет ($5-20 \times 10^4$ клеток на лунку) и переносили в CO₂-инкубатор

(HERAEUS B5060 EK/CO₂, Германия) на 3 ч для прикрепления клеток. Наконец, предварительно инкубированные холостые образцы гидрогеля (без клеток) добавляли к ранее прикрепленным клеткам и проводили МТТ-анализ. В качестве контроля использовали монослойную культуру клеток (без макропористых гидрогелей). Для каждого образца строили калибровочную кривую: зависимость оптической плотности клеток в присутствии образца макропористого гидрогеля (абсцисса X) от числа клеток (ордината Y). Количество клеток в каждом образце макропористого гидрогеля рассчитывали по соответствующей кривой.

2.9.3. Изучение морфологии и распределения клеток, растущих в гидрогелях

Качественно морфологию клеток и их распределение по объему матрикса при длительном культивировании изучали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Образцы гидрогелей с клетками для микроскопии были подготовлены аналогично образцам, которые анализировали с помощью МТТ-теста (см. п. 2.9.1.). Через 3 дня культивирования клетки окрашивали флуоресцентными красителями, в частности Calcein AM, обеспечивающем прижизненное окрашивание клеток; краситель DAPI использовали для визуализации гидрогелей (см. Табл. 2).

Таблица 2 –Характеристика флуоресцентных красителей

Краситель	λпоглощения, нм / λиспускания, нм (краситель): (стандартный фильтр)	Цвет	Объект
DAPI	(358/461): (408/515±30)	синий	Ядро клетки, структура гидрогеля
Calcein AM	(482/504): (488/590±50)	зеленый	Цитоплазма живых клеток

Для прижизненного окрашивания гидрогели с клетками отмывали от остатков белков FBS средой для культивирования DMEM без добавления FBS. Далее к клеткам в каждую лунку добавляли по 100 мкл среды для культивирования (без FBS), содержащей Calcein AM (1 мкг/мл) и DAPI (10 мкг/мл) и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Далее жидкость удаляли, добавляли в каждую лунку по 100 мкл среды без сыворотки. Образцы изучали на инвертированном микроскопе TE-2000 (Nikon, Япония), снабженном конфокальной лазерной системой С1. Длина волны возбуждения составляла 488 нм для Calcein AM и 358 нм для DAPI. Сигналы флуоресценции собирали при 500 – 530 нм для Calcein AM и 460 нм для DAPI.

2.10. Исследование дифференцировки клеток при культивировании на матриксах

2.10.1. Культивирование мезенхимальных стромальных клеток на пленочных материалах

В каждую лунку с предварительно стерилизованными образцами пленок добавляли суспензию клеток (4×10^5 клеток/мл) в α -MEM, содержащей 10% FBS. Такую же суспензию клеток вносили в пустые лунки и использовали как контроль. Далее помещали планшет в CO₂-инкубатор (HERAEUS B5060 EK/CO₂, Германия) и культивировали в стандартных условиях. Морфологию клеток оценивали с помощью световой микроскопии на 4-й день культивирования.

2.10.2. Остеогенная дифференцировка мезенхимальных стромальных клеток

Для изучения дифференцировки МСК (пассаж 3-5) высевали на образцы пленок, предварительно помещенных в 96-луночный планшет (1×10^4 клеток/лунку) или 48-луночный планшет (4×10^4 клеток/лунку), и культивировали в среде α -MEM (10% FBS) до получения 80% конфлюэнтного монослоя. Для индукции дифференцировки клетки культивировали в среде ОС в течение 7-14 дней. Клетки, которые культивировали на дне лунок планшета в α -MEM (10% FBS), использовали в качестве контроля.

2.10.3. Оценка дифференцировки мезенхимальных стромальных клеток по активности щелочной фосфатазы

Для качественной оценки дифференцировки МСК, которые культивировали на образцах пленок в 96-луночном планшете, использовали тест по определению активности щелочной фосфатазы. Для этого МСК дважды промывали ФБ (рН 7,4) и затем фиксировали инкубацией в 4% растворе параформальдегида в течение 20 мин. Затем клетки промывали 3 раза ФБ (рН 7,4) и milliQ (200 мкл/лунку). Для определения активности щелочной фосфатазы использовали набор Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit (Sigma-Aldrich, США) в соответствии с инструкциями производителя. В кратце, к образцам с клетками в каждую лунку добавляли по 100 мкл фосфатазы и инкубировали в течение 15 мин. Затем образцы с клетками промывали milliQ. Морфологию клеток и распределение дифференцированных клеток на образцах пленок наблюдали с помощью световой микроскопии.

2.10.4. Адипогенная дифференцировка мезенхимальных стромальных клеток

Для изучения адипогенной дифференцировки МСК (пассаж 3-5) высевали так же, как описано в 2.10.1. Для индукции дифференцировки клетки культивировали в среде α -MEM (10% FBS), содержащей 1 мкг/мл инсулина, 0,5 мМ IBMX и 0,5 мкМ дексаметазона в течение 7-14 дней. Клетки, которые культивировали на дне лунок планшета в α -MEM (10% FBS), использовали в качестве контроля.

2.10.5. Оценка адиподифференцировки мезенхимальных стромальных клеток по наличию жировых накоплений

На 21 день культивирования клеток на плёночных образцах проводили окрашивание клеток красителем масляным красным (Oil Red O) для выявления зрелых адипоцитов. Для этого удаляли среду из лунок, промывали ФБ (рН 7,4) и фиксировали в 10% растворе формалина в течение 1 ч. Затем фиксированные клетки быстро промывали изопропанолом и окрашивали масляным красным (0,3% в

изопропанол) в течение 10 мин, после чего промывали 50% этанолом и дистиллированной водой. Морфологию, распределение дифференцированных клеток и жировых капель на образцах пленок наблюдали с помощью световой микроскопии.

2.10.6. Исследование экспрессии генов остео- и адипогенеза мезенхимальных стромальных клеток

Для исследования экспрессии генов остео- и адипогенеза МСК культивировали на пленках в 48-луночном планшете, а оценку дифференцировки клеток проводили методом ПЦР в реальном времени. После культивирования клеток на пленках в течение 7 и 14 дней образцы пленок однократно промывали ФБ (рН 7,4), выделяли РНК с использованием набора для выделения РНК на колонках (Биолабмикс, Россия), согласно протоколу производителя. Затем измеряли количество РНК на приборе NanoDrop 2000с (Thermo Scientific, США). Реакция обратной транскрипции с 1 мкг РНК проводилась с помощью MMLV RT kit (Евроген, Россия), согласно протоколу производителя. ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием набора qPCRmix-HS SYBR+LowROX (Евроген, Россия) и следующих праймеров (табл. 3). В качестве референсного гена использовали *GAPDH*.

Таблица 3 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>Runx2</i>	CGGAATGCCTCTGCTGTTAT	TGTGAAGACGGTTATGGTCAAG
<i>ALPL</i>	TGGAGTATGAGAGTGACGAGA	GTTCCAGATGAAGTGGGAGTG
<i>SPP1</i>	CCGAGGTGATAGTGTGGTTTATG	CTTTCCATGTGTGAGGTGATGT
<i>ADIPOQ</i>	GAAGGGTGAGAAAGGAGATCCA	GGTATACATAGGCACCTTCTCCA
<i>PPARγ</i>	GGAATTAGATGACAGCGACTTGG	GTAGCAGGTTGTCTTGAATGTCTT
<i>GAPDH</i>	TCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTT	ACCAAATCCGTTGACTCCGACCTT

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Структура и физико-химические свойства матриц на основе сополимеров хитозана с олиголактидами

Начальным этапом исследования гидрогелей на основе хитозана и его сополимеров с олиголактидами было изучение структуры, набухаемости и деградации, поскольку эти параметры определяют возможность культивирования на них животных клеток.

3.1.1. Структура матриц

В работе были получены образцы пленок на основе сополимеров хитозана с олиголактидами и макропористые гидрогели аналогичного состава. Фотографии образцов плёнок представлены на рисунке 2. Плёнки обладали толщиной 100 мкм.

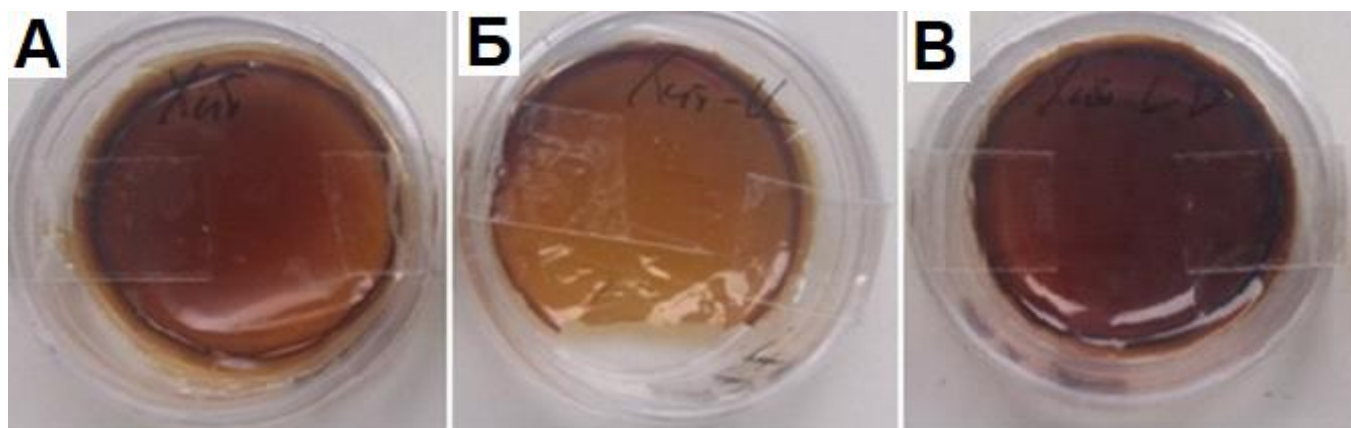


Рисунок 2 – Фотографии образцов пленок на основе хитозана (А) и его сополимеров с олиголактидами: (Б) с олиго(L,L-лактидом); (В) с олиго(L,D-лактидом)

Структуру макропористых гидрогелей в набухом состоянии изучали методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Было показано, что полученные структуры гидрогелей в набухом состоянии представляли собой развитые системы открытых взаимосвязанных пор (Рисунки 3).

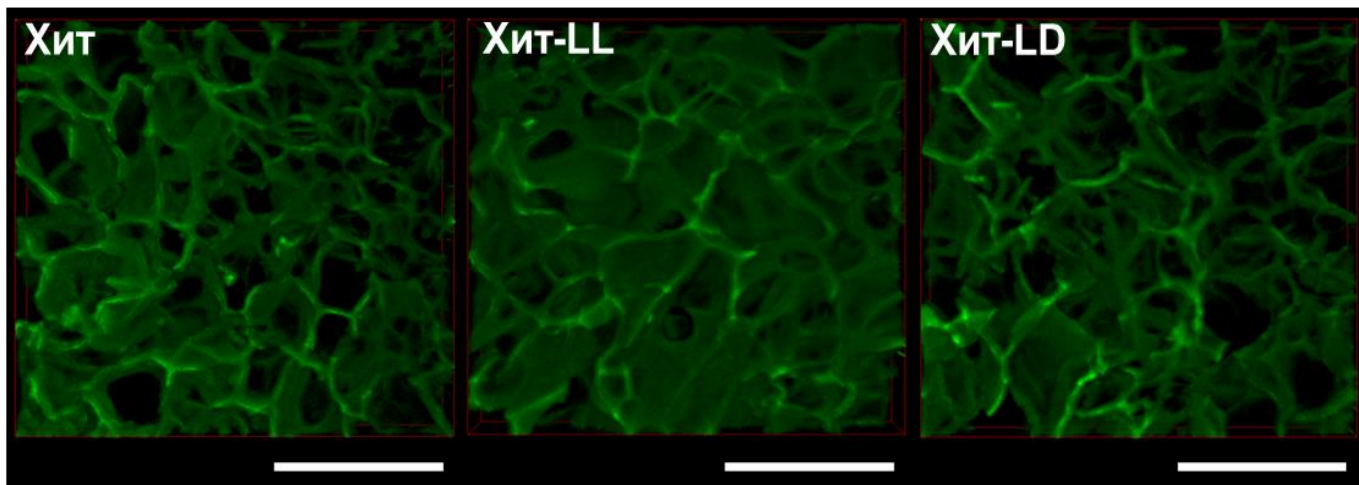


Рисунок 3 – Структура образцов гидрогелей в набухшем состоянии на основе хитозана (Хит) и его сополимеров с олиголактидами: Хит-LL - с олиго(L,L-лактидом); Хит-LD - с олиго(L,D-лактидом). Структура была визуализирована с помощью окрашивания Флуорескаминам. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Шкала 500 мкм

Как видно на рисунке 3, макропористые гидрогели имели трехмерную (3D) структуру. Распределение пор по размерам представлено на рисунке 4. Средний размер пор гидрогелей был в диапазоне от 50 до 400 мкм. Так, для образцов Хит, Хит-LL и Хит-LD средний размер пор составлял 150 ± 5 мкм, 147 ± 15 мкм и 148 ± 8 мкм, соответственно. Полученная структура матриц с такими взаимосвязанными открытыми порами обеспечивала клеткам возможность мигрировать и распределяться по всему объему матрикса, а также поддерживала диффузию газов, питательных веществ к клеткам и выведение метаболитов (Рисунок 3).

Из рисунков 3 и 4 также можно заключить, что структура всех типов гидрогелей существенно не отличалась, что, вероятно, связано с процессом формирования матриц. В частности, концентрации исходных растворов, температура заморозки и время оттаивания были одинаковыми при получении всех типов матриц.

Однако в случае гидрогелей на основе сополимеров, было отмечено образование не только первичных, но и вторичных пор внутри стенок полимера. Так, несмотря на практически одинаковый средний размер пор в образцах сополимеров Хит-LL и Хит-LD (147 ± 15 мкм и 148 ± 8 мкм, соответственно), распределение пор по размерам (площадь под кривой на рисунке 4) было шире в случае образца Хит-LL, чем у образца Хит-LD. Больше количество вторичных пор наблюдали при анализе структуры в случае образца Хит-LL, что, вероятно, можно объяснить более низкой эффективностью сшивки этого сополимера по сравнению с сополимером Хит-LD, что хорошо согласуется с результатами исследования структуры с помощью сканирующей электронной микроскопии, опубликованными ранее [182]. Кроме того, следует отметить преобладание внутримолекулярных взаимодействий в сополимерах на основе хитозана, которые содержали именно фрагменты олиго(L,L-лактида).

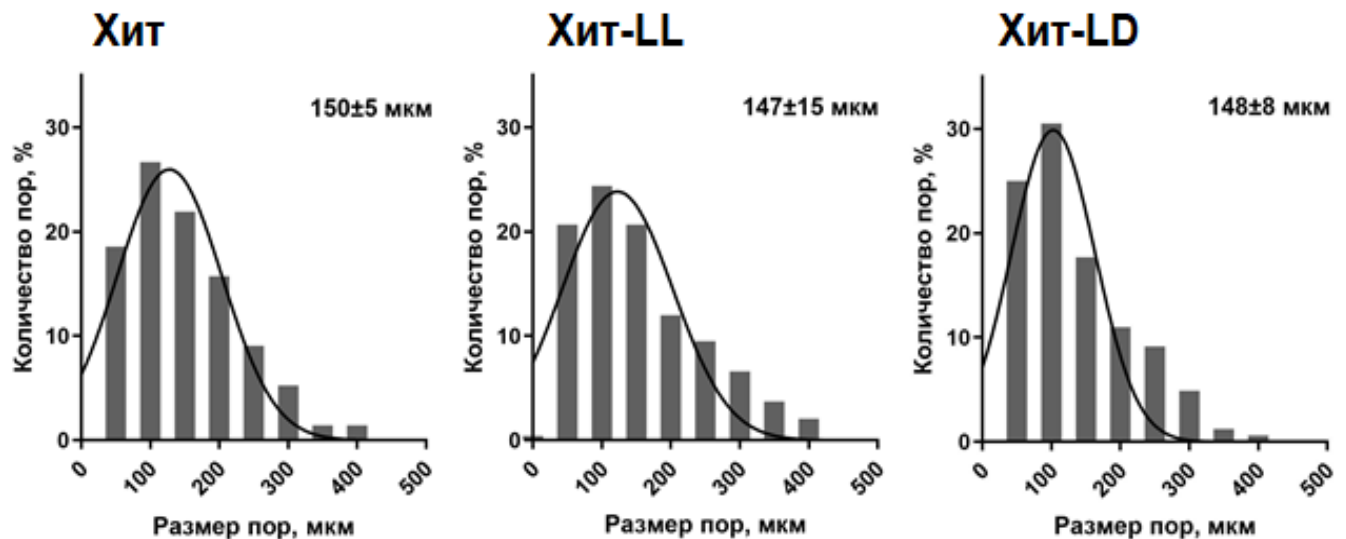


Рисунок 4 – Распределение пор по размерам в образцах гидрогелей на основе хитозана (Хит) и его сополимеров с олиголактидами: Хит-LL - с олиго(L,L-лактидом); Хит-LD - с олиго(L,D-лактидом)

Установлено, что во всех исследованных образцах гидрогелей размер пор являлся оптимальным для роста и пролиферации клеток, что хорошо согласуется с

результатами, полученными ранее другими исследователями. В частности, сообщалось о подобной макропористой структуре гидрогелей на основе желатина, полученных методом 3D принтинга [183], или на основе бактериальной наноцеллюлозы [184]. Следует отметить, что размер пор матрикса имеет важное значение не только для роста и пролиферации клеток, но и играет ключевую роль в обеспечении процессов неоваскуляризации [185]. В частности, увеличение показателя неоваскуляризации коррелирует с увеличением размера пор. В свою очередь, матриксы, обеспечивающие хорошую неоваскуляризацию, перспективны при разработке артериовенозных моделей, например, для преодоления неоинтимальной гиперплазии [185]. Также было показано, что использование нановолокнистых каркасов из ПМК со средним размером пор в диапазоне 125–250 мкм приводило к значительному усилению хондрогенной дифференцировки МСК человека и образованию хряща в отличии от матриксов, которые имели поры большего размера (в диапазоне 425–600 мкм) как в *in vitro* модели, так и в модели *in vivo* (за счет контроля неоваскуляризации) [186]. При этом размер пор 125–250 мкм способствовал прорастанию капилляров для формирования зрелой кости в нановолокнистых матриксах на основе ПМК, засеянных кроличьими МСК и имплантированных подкожно.

Таким образом, исследуемые в нашей работе макропористые матриксы на основе хитозана и сополимеров хитозана с олиголактидами имели структуру, которая удовлетворяла всем требованиям, предъявляемым к ТИК (см. п. 1.2.2.).

3.1.2. Набухаемость матриксов

Известно, что набухаемость гидрогелей является одним из ключевых параметров при изучении физико-химических свойств матриксов для ТИ. В данной работе исследовали равновесную набухаемость макропористых гидрогелей (Рисунок 5).

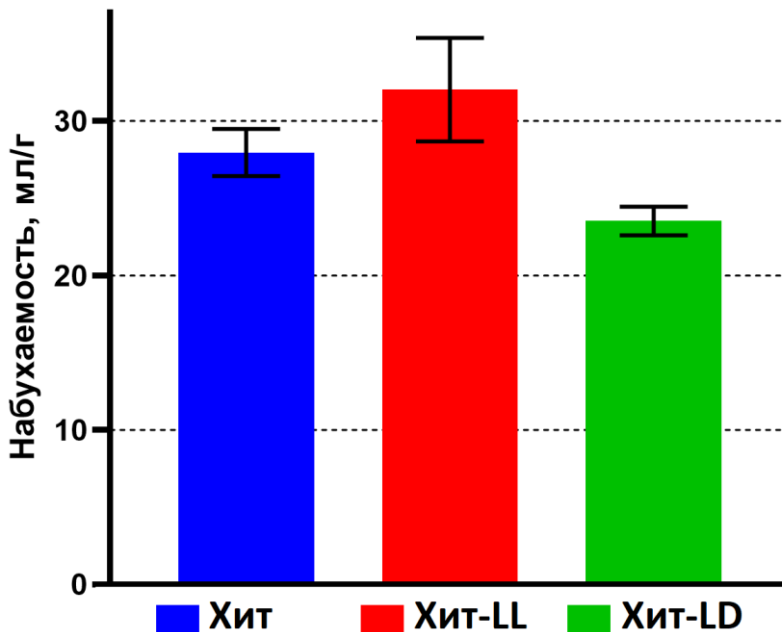


Рисунок 5 – Равновесная степень набухания образцов макропористых гидрогелей на основе хитозана (Хит) и его сополимеров с олиго(L,L-лактидом) (Хит-LL) и олиго(L,D-лактидом) (Хит-LD). Инкубация в среде культивирования DMEM в течение 24 ч. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение

Равновесная набухаемость макропористого гидрогеля Хит в среде DMEM составила $27,8 \pm 1,8$ мл/г после 24 ч инкубации (Рисунок 5). В случае образца макропористого гидрогеля Хит-LL степень набухания увеличилась до $31,1 \pm 3,5$ мл/г. В случае образца из хитозана, даже несмотря на то, что он гидрофильный, наличие сильных водородных связей и кристаллической структуры приводили к уменьшению инфильтрации и диффузии воды. Вероятно, прививка олиго(L,L-лактида) к макромолекулам хитозана разделяла основные цепи Хит и резко снижала силу его водородных связей и степень кристалличности, а также увеличивала его сродство к воде [187]. В нашей работе мы наблюдали такой же эффект, в результате чего отмечали увеличение гидрофильности образца Хит-LL по сравнению с Хит в водной среде, несмотря на гидрофобность боковых цепей L,L-лактида. Кроме того, в работе

Luckachan с соавторами также было показано, что максимальную степень набухания наблюдали в случае привитых сополимеров хитозана с олиго(L,L-лактидом) при содержании лактида 1:2 (мольное соотношение компонентов) [188]. Эти данные также хорошо согласуются с нашими результатами. Кроме того, как видно из рисунка 5, матрицы из сополимеров хитозана с гидрофобным олиго(L,D-лактидом) имели значение набухаемости $23,6 \pm 1,1$ мл/г, что на 15% ниже, чем набухаемость Хит ($27,8 \pm 1,8$ мл/г), а значит, гидрогели Хит-LD имели амфифильные свойства. Наши результаты хорошо согласуются с данными, полученными ранее при исследовании набухания матриц в milliQ [182].

Как известно, внеклеточный матрикс в тканях состоит из белков, содержащих как гидрофильные, так и гидрофобные аминокислоты, что обеспечивает белок-белковые взаимодействия, а также регуляцию фолдинга белков, их биологическую активность и т. д. Связывание/высвобождение факторов роста с/из гидрофильных или гидрофобных белков ЕВМ опосредуют их активность и локализацию, что имеет решающее значение для функционирования и регенерации тканей [189]. Оптимизация влагоудерживающей способности матриц также имеет большое значение, поскольку повышенная набухаемость имплантированных матриц *in vivo* может привести к расшатыванию и смещению имплантата [190]. Кроме того, изучение набухания полимерных гидрогелей является важной задачей при разработке ТИК, так как таким образом позволяет оценить их гидрофильность и сродство к клеткам. Как хорошо известно, набухание гидрогеля определяется коэффициентом проницаемости/диффузии, который имеет большое значение для обеспечения повышенной подвижности как растворенных веществ, так и метаболитов, а также гибкости макромолекул полимерного матрикса. Однако слишком сильное набухание биоматериала может вызвать размягчение (потерю жесткости) матрикса, в частности гидрогеля, что, в свою очередь, может повлиять на механические свойства, а также на общую архитектурную целостность скаффолда [191]. Ранее было показано, что набухание матрикса может влиять и на адгезию клеток [192], [193].

Таким образом, варьируя гидрофильно-гидрофобный баланс сополимеров, можно добиваться улучшения биоадгезивных свойств матрикса на их основе. Например, можно это делать путём изменения типа олиголактида и/или варьирования концентрации привитых олиголактидов при получении их сополимеров с хитозаном.

3.1.3. Биодegradация матриксов

Кинетика биоразложения матрикса должна коррелировать со скоростью пролиферации клеток и временем, необходимым для замещения этого матрикса, вновь формирующимися из клеток тканями. В данной работе, потерю массы образцов гидрогелей на основе Хит или его сополимеров с олиголактидами оценивали после их инкубации в среде DMEM и в растворе лизоциме (2 мг/мл в ФБ (рН 7,4)) при 37°C (Рисунок 6). Из рисунка 6 видно, что деградация всех образцов макропористых гидрогелей в растворе лизоцима происходила быстрее, чем в среде культивирования DMEM. Так, через 21 день инкубации потери массы образцов Хит и Хит-LD достигли $35 \pm 2\%$ и $27 \pm 6\%$, соответственно. Максимальные степени резорбции, а именно $47 \pm 9\%$ и $58 \pm 1\%$ в DMEM и растворе лизоцима, соответственно, были обнаружены в случае образца Хит-LL через 31-й день инкубации. Это можно объяснить меньшей эффективностью термообработки образцов Хит-LL по сравнению с другими образцами гидрогелей [182]. Следует также отметить, что степень деградации хорошо коррелировала с результатами по набуханию образцов (см. 3.1.2.). Более того, наши результаты, в частности тот факт, что увеличение набухания способствовало усилению биодegradации гидрогеля, хорошо согласуются с ранее опубликованными данными Luskachan и соавторов [188]. В этой работе привитые сополимеры с близким к нашему соотношению хитозан/(L,L-лактид) (1:2 масс. %) имели бо́льшую степень набухания, чем хитозан, и также претерпевали бо́льшую потерю массы при инкубации в воде [188]. Также было показано, что матриксы на основе сополимеров хитозана с различными молярными заменами поли(L,D-молочной кислоты) (замены реакционноспособных групп хитозана боковыми цепями поли(L,D-молочной

кислоты) обладали вариабельной гидрофильностью и скоростью деградации. Сополимеры с максимально возможным молярным замещением (12.00) хитозана на поли(L,D-молочную кислоту) проявляли относительно низкую гидрофильность и более медленно деградировали [175].

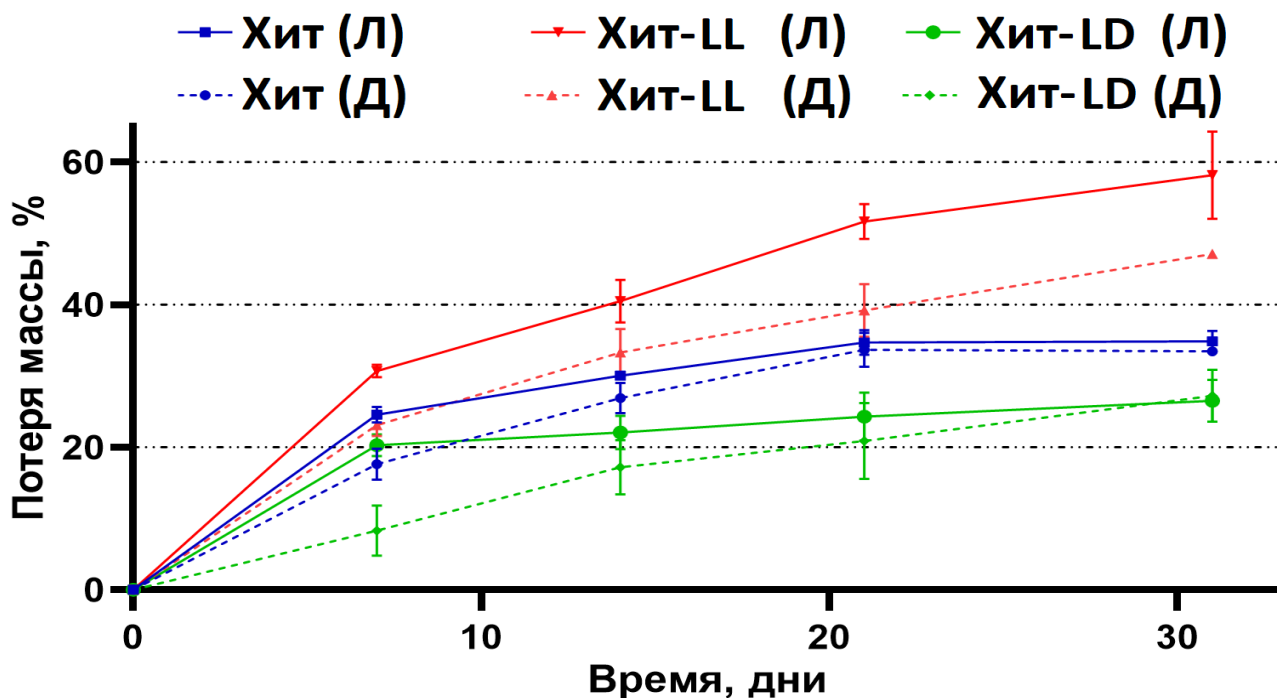


Рисунок 6 – Кинетика биодеградации образцов макропористых гидрогелей на основе хитозана (Хит); сополимера хитозана с олиго(L, L-лактидом) (Хит-LL); сополимера хитозана с олиго(L, D-лактидом) (Хит-LD) после их инкубации в среде DMEM (Д) или растворе лизоцима (Л) при 37°C. Концентрация лизоцима – 2мг/мл в ФБ.

Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение

Ранее установлено, что скорость биодеградации матриц играет важную роль при регенерации несущих нагрузку тканей, например, сердечно-сосудистых, для восстановления которых большое значение имеет достаточно медленная деградация, необходимая для сохранения правильной ориентации коллагена [194]. В то же время показано, что матрицы с достаточно высокой скоростью биодеградации лучше

заполняют дефекты при регенерации хряща в условиях *in vivo* [195]. В результате биодеградации скаффолдов обеспечивается некоторое пространство для миграции клеток и отложения макромолекул ЕВМ, которые могут взаимодействовать с клетками, индуцируя специфические сигнальные пути для клеточной адгезии, миграции, пролиферации и/или дифференцировки. При использовании матриксов фирмы Biomerix Corp. из сополимера полиуретана с мочевиной и капролактоном было показано, что скорость биодеградации влияла на поведение МСК. В частности, эти матриксы имели диапазон профилей деградации от 4 до 13 месяцев. При культивировании на них клеток в модели *in vitro*, было показано, что биодеградирующие в течение 4-х месяцев матриксы обеспечивали лучшую пролиферацию и синтез естественного внеклеточного матрикса МСК по сравнению с теми, что разлагались в течение 13 месяцев [195]. Тем не менее следует иметь в виду, что при слишком быстрой биодеградации матриксов возможно снижение количества жизнеспособных клеток из-за ранней потери их механической целостности матриксов [195]. Следовательно, можно заключить, что этот параметр очень важен для обеспечения пролиферации клеток с желаемой скоростью.

Таким образом, на основании полученных нами результатов по набухаемости матриксов в зависимости от их состава (чистый хитозан либо его сополимеры с разными олиголактидами), можно предложить тот или другой матрикс, адаптировав его под конкретную задачу.

3.1.4. Исследование механических характеристик матриксов

С клинической и биомеханической точки зрения при проектировании биомиметических матриксов следует учитывать механические свойства естественной заменяемой ткани. Как известно, механические свойства матриксов не только определяют механическую интеграцию (взаимодействие) между имплантатами и

тканями хозяина, но и могут оказывать влияние на поведение клеток [196]. В частности, матриксы должны обладать такой жесткостью и эластичностью, которые близки по своим значениям величинам соответствующих параметров тканей пациента. Например, при регенерации кости возможно развитие остеопении из-за имплантации матриксов с жесткостью выше, чем у нативной кости [197]. При разработке тканеинженерных конструкций применение матриксов на основе хитозана лимитируется низкими значениями механической прочности этого природного полимера.

Ранее были исследованы механические характеристики плёнок на основе хитозана и сополимеров хитозана с олиголактидами (см. таблицу 4) [181].

Таблица 4 – Механические характеристики образцов плёнок на основе хитозана (Хит) и его сополимеров с олиго(L,L-лактидом) (Хит-LL) и олиго(L,D-лактидом) (Хит-LD). Результаты выражены как среднее \pm стандартное отклонение [181]

Образец	Напряжение при разрыве, МПа	Относительное удлинение при разрыве, %	Модуль Юнга, ГПа
Хит	$38,0 \pm 1,0$	$3,7 \pm 0,9$	$2,3 \pm 0,1$
Хит-LL	$34,0 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,6$	$1,9 \pm 0,3$
Хит-LD	$53,3 \pm 1,8$	$4,0 \pm 0,5$	$2,6 \pm 0,7$

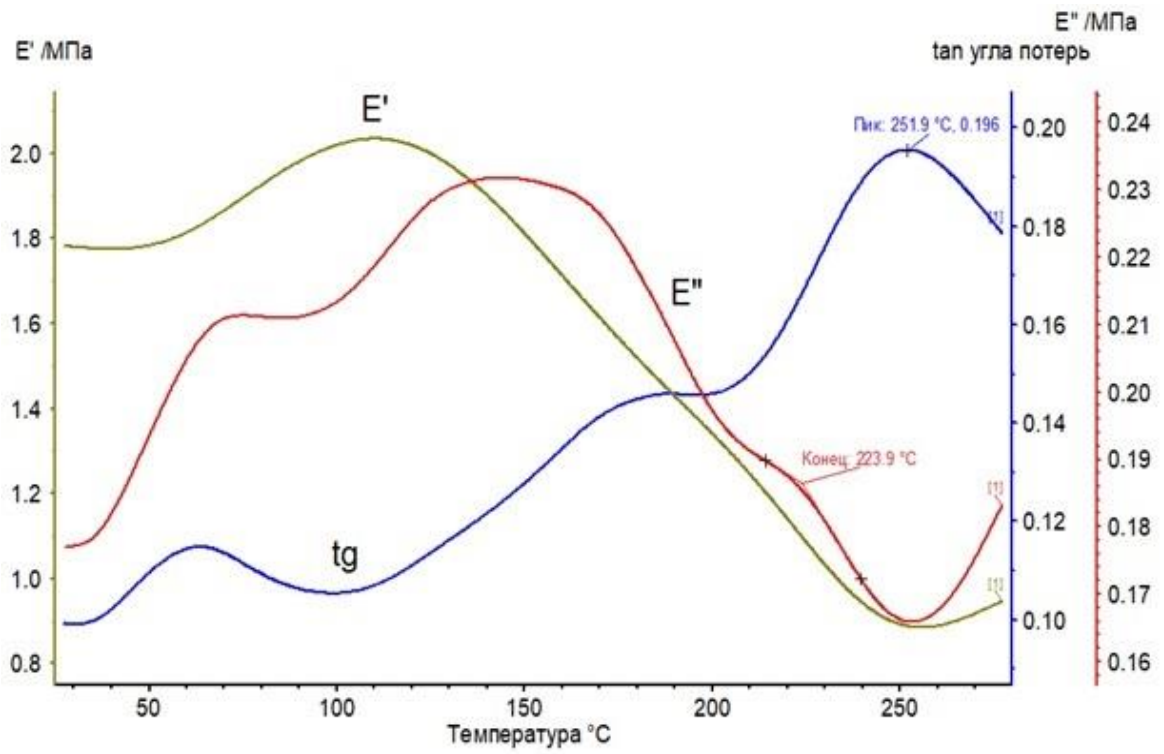
Показано, что образцы сополимеров Хит-LD обладали улучшенными показателями модуля Юнга ($2,6 \pm 0,7$ ГПа), напряжения при разрыве ($53,3 \pm 1,8$ МПа) и относительного удлинения при разрыве ($4,0 \pm 0,5$ %), по сравнению с образцами плёнок из чистого Хит ($2,3 \pm 0,1$ ГПа, $38,0 \pm 1,0$ МПа и $3,7 \pm 0,9$ %, соответственно).

Кроме того, было показано, что образцы плёнок Хит-LL обладали механическими характеристиками, сопоставимыми с таковыми для образцов на основе Хит.

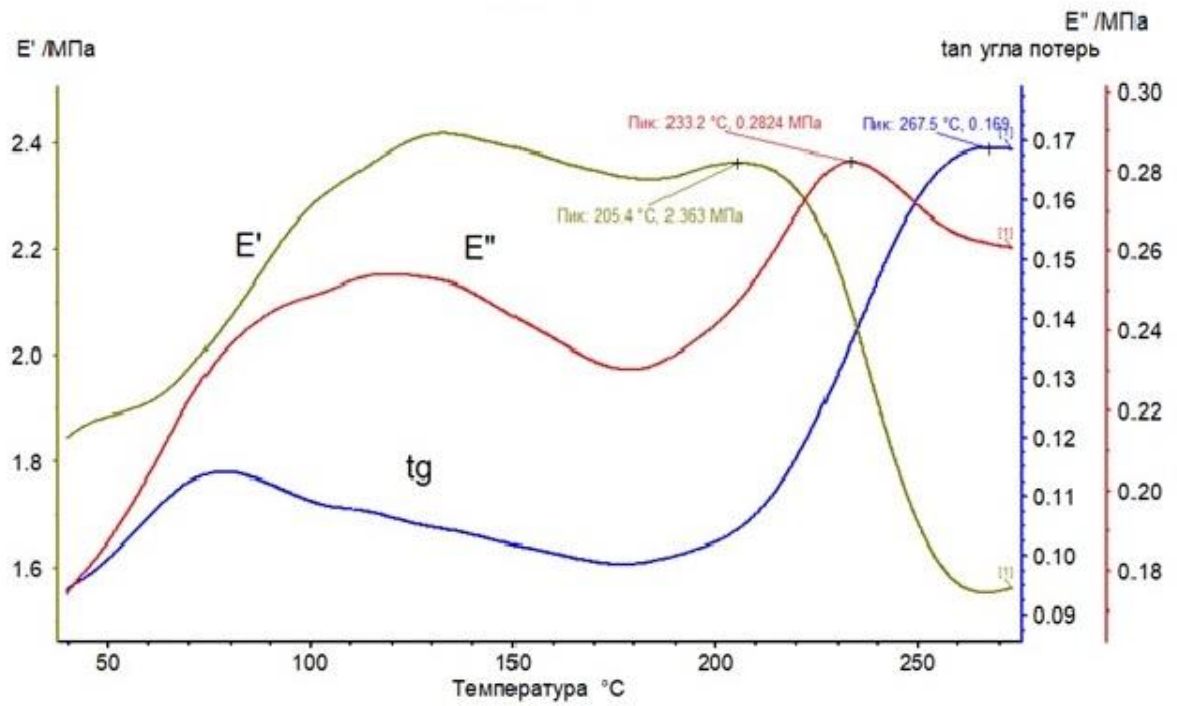
Вероятно, такие результаты по оценке механических характеристик плёнок связаны с тем, что фрагменты аморфного по структуре олиго(L,D-лактида) распределяются равномерно и не образуют отдельной фазы при формовании материалов, в то время как фрагменты олиго(L,L-лактида) образуют отдельные домены [181]. Это наблюдение также объясняет гетерогенную топоологию поверхности образцов плёнок Хит-LL. Разницу в деформационно-прочностных характеристиках пленок в зависимости от типа привитых фрагментов олиголактида скорее всего можно объяснить структурой пленок. В частности, как упоминалось ранее, привитые цепи олиго(L,L-лактида) и олиго(L,D-лактида) вносят разный вклад во внутри-/межмолекулярные взаимодействия полимерных цепей в формовочных растворах [181].

В нашей работе исследовали температуру стеклования образцов макропористых гидрогелей на основе сополимеров хитозана с олиголактидами и определяли тангенс угла механических потерь путём динамического механического анализа на установке DMA 242C (NETZSCH, Германия) (Рисунок 7). Отметим, что согласно литературным данным, температура термодеструкции хитозана близка к температуре стеклования (T_g), поэтому наиболее приемлемым параметром для определения T_g является модуль потерь (E'') [198].

А



Б



В

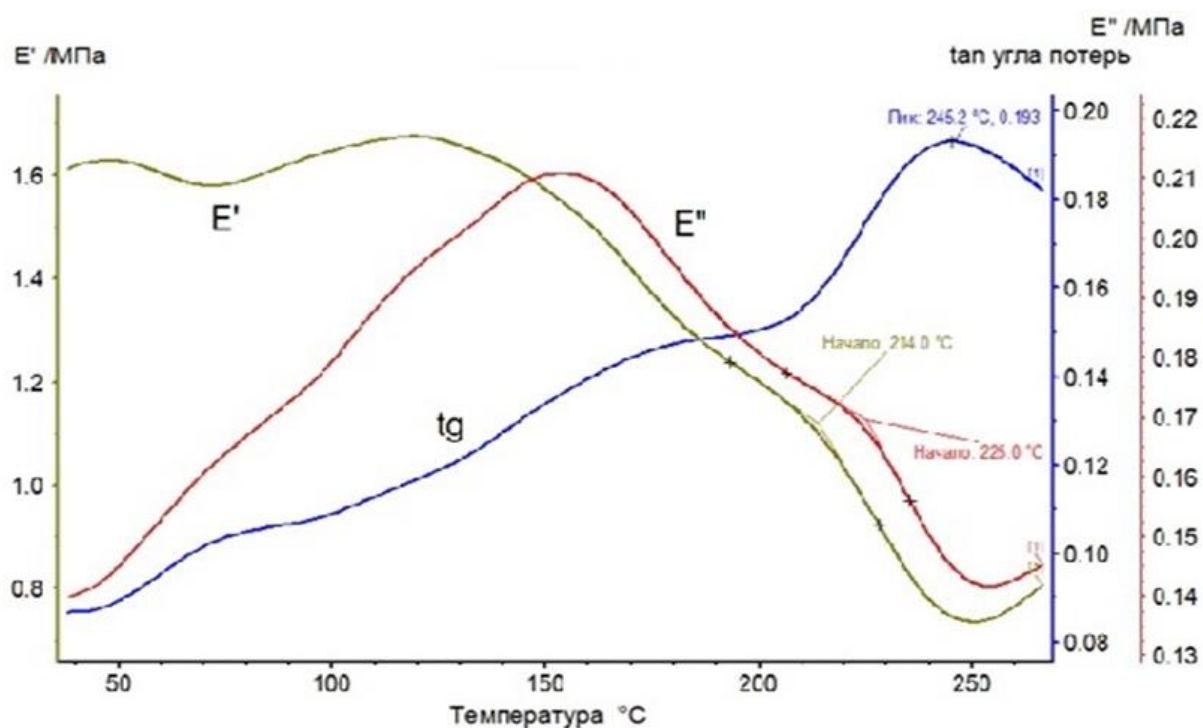


Рисунок 7 – Оценка механических характеристик образцов макропористых гидрогелей. Результаты динамического механического анализа гидрогелей на основе хитозана (А), сополимеров хитозана с олиго(L,L-лактидом) (Б) и олиго(L,D-лактидом) (В) в динамическом режиме «сжатие». Репрезентативные изображения температурных зависимостей динамических механических параметров: модуля упругости E' , модуля потерь E'' и тангенса угла механических потерь ($\tan \delta$). Измерения проведены в интервале температур 25 – 300 °C со скоростью 5°/мин на частоте 1 Гц

На рисунке 7 показаны температурные зависимости механических параметров образцов макропористых гидрогелей. Как известно, метод динамического механического анализа предполагает приложение к образцу синусоидально меняющейся нагрузки (например, сжатие), при котором идеально упругое тело будет реагировать мгновенно, а любое другое вязкоупругое соединение - иметь угол сдвига фаз между синусоидами деформации и напряжения. При анализе данных в системе

декартовых координат можно получить значение комплексного модуля, равного сумме модуля упругости E' и модуля потерь E'' . В частности, E' характеризует ту часть механической работы, которая накапливается и возвращается при разгрузке, а E'' – это работа, которая необратимо рассеивается в виде тепла. Таким образом, отношение E'' / E' соответствует тангенсу угла механических потерь. Чем больше значение $\tan \delta$, тем больше энергии рассеивается при деформации, и, следовательно, полимер является менее упругим. Механические свойства некоторых биологических тканей (мышцы, кости, кровеносные сосуды и др.) также могут быть охарактеризованы с точки зрения ответа на деформацию, поскольку представляют собой вязкоупругий материал. Таким образом, матриксы на основе полимеров лучше имитируют механический отклик ткани в сравнении с искусственными имплантатами на основе металлов или их оксидов (титан, окислы титана, нержавеющая сталь и т.д.), а также различных сплавов, которые не проявляют гистерезисных обратимых деформационных изменений и имеют линейную зависимость между напряжением и деформацией [199]. Отметим, что, поскольку механические свойства тканей имеют индивидуальный характер и зависят от многих параметров, в частности возраста, образа жизни и т.д. [200], в рамках нашей работы мы проводили сравнительный анализ механических свойств только полученных нами образцов, без корреляции с соответствующими параметрами конкретных тканей человека.

Было установлено, что минимальное значение тангенса угла механических потерь ($0,169 \pm 0,012$) соответствовало матриксам на основе сополимеров хитозана с олиго(L,D-лактидом), что позволяет сделать предположение о повышенной упругости гидрогелей на его основе по сравнению с образцами Хит и Хит-LL (см. Таблицу 5). Температуры стеклования образцов при этом практически не различались и составляли 224 ± 10 °C, 225 ± 12 °C и 233 ± 7 °C для образцов Хит, Хит-LL и Хит-LD, соответственно.

Таблица 5 – Динамические механические характеристики образцов гидрогелей на основе хитозана (Хит) и его сополимеров с олиго(L,L-лактидом) (Хит-LL) и олиго(L,D-лактидом) (Хит-LD). Результаты выражены как среднее \pm стандартное отклонение

Образец	Тангенс угла механических потерь, $\tan \delta = E''/E'$	Температура стеклования, T _g , °C
Хит	0,196 \pm 0,011	224 \pm 10
Хит-LL	0,193 \pm 0,008	225 \pm 12
Хит-LD	0,169 \pm 0,012	233 \pm 7

Таким образом, на основании результатов исследования механических характеристик плёнок и макропористых гидрогелей из хитозана и сополимеров хитозана с олиголактидами, показано, что механические свойства матриц зависят от типа привитого олиголактида и могут быть улучшены путём получения матриц на основе сополимеров хитозана с олиго(L,D-лактидом).

3.2. Исследование цитотоксичности матриц

Как известно, оценка цитотоксичности в модели *in vitro* является одним из первых шагов при разработке биоматериалов для тканевой инженерии. В работе было изучено влияние экстрактов на количество жизнеспособных клеток. При этом экстракты были получены после предварительной инкубации образцов макропористых гидрогелей в DMEM (10% FBS) в течение 24 ч. В качестве модельных клеток использовали фибробласты мыши линии L929, а количество жизнеспособных клеток после их инкубации в экстрактах в течение 24 ч оценивали с помощью МТТ-теста. В качестве контроля (100%) использовали монослойную культуру клеток,

которую культивировали в среде DMEM (10% FBS) без экстрактов. Результаты представлены на рисунке 8.

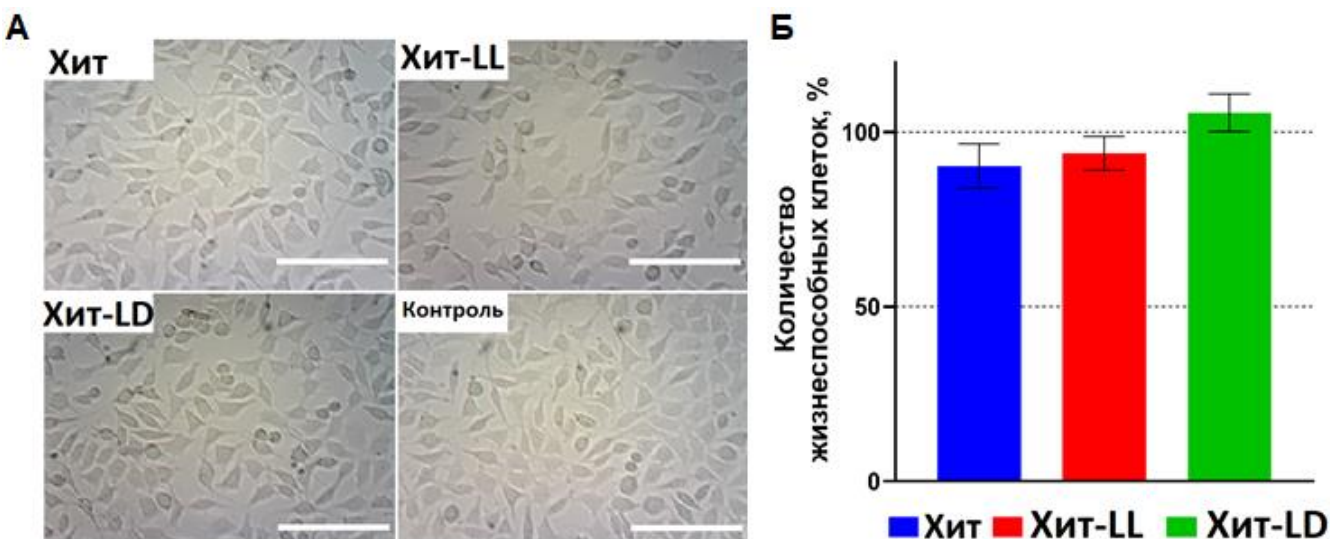


Рисунок 8 – Оценка цитотоксичности образцов макропористых гидрогелей на основе хитозана (Хит), сополимера хитозана с олиго(L,L-лактидом) (Хит-LL) и с олиго(L,D-лактидом) (Хит-LD) для клеток линии мышинных фибробластов (L929). А – микрофотографии клеток L929. Оптическая микроскопия. Шкала 100 мкм; Б – результаты МТТ-анализа по определению количества жизнеспособных клеток после их культивирования в экстрактах в течение 24 ч. Экстракты были получены после предварительной инкубации образцов гидрогелей в среде DMEM (10% FBS) в течение 24 ч. Контроль (100%) - монослойная культура клеток в среде DMEM (10% FBS) без экстрактов. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение

Морфологию клеток L929 после культивирования в экстрактах исследовали с помощью световой микроскопии. Как видно на рисунке 8А, инкубация клеток с экстрактами в течение 24 ч не приводила к изменению морфологии: мышинные

фибробласты представляли собой прикрепленные клетки с характерной для них веретенообразной формой.

Как видно на рисунке 8Б, все экстракты были нетоксичными для клеток, при этом количества жизнеспособных клеток для всех образцов гидрогелей существенно не различались и составляли $90,3 \pm 6,1\%$, $94,0 \pm 5,4\%$; $105,6 \pm 5,7\%$ от контроля для образцов Хит, Хит-LL и Хит-LD, соответственно.

Таким образом, установлено, что все образцы гидрогелей были не токсичны для клеток, и, следовательно, их можно было использовать в последующих экспериментах для изучения роста и пролиферации клеток при их длительном культивировании в модели *in vitro*.

3.3. Оценка риска воспалительной реакции в модели *in vitro*

Воспаление представляет собой серьезную проблему для клинического применения биоматериалов, поэтому на следующем этапе мы оценили риск воспалительной реакции в модели *in vitro* при использовании матриксов на основе сополимеров хитозана с олиголактидами. Широко признано, что макрофаги являются важным источником воспалительных сигналов [201]. Например, активированные макрофаги в месте повреждения сосудов продуцируют ряд медиаторов, таких как интерлейкины (например, IL-6) и фактор некроза опухоли (TNF- α), которые стимулируют размножение и миграцию гладкомышечных клеток сосудов [202]. Линия клеток THP-1 широко используется в качестве модели воспалительной реакции в условиях *in vitro*, поскольку моноциты THP-1 и макрофаги, происходящие от THP-1, очень похожи на первичные моноциты и макрофаги с точки зрения их морфологии, мембранных рецепторов и секреторных продуктов [203].

В нашей работе уровни цитокинов после инкубации клеток THP-1 в течение 48 ч с образцами гидрогелей на основе хитозана, а также сополимеров хитозана с

олиголактидами определяли с помощью ИФА (Рисунок 9). Интактные клетки, которые культивировали в лунках культурального планшета, рассматривали в качестве отрицательного контроля (K-), а клетки линии ТНР-1, активированные ФМА в концентрации 20 нг/мл – в качестве положительного контроля (K+).

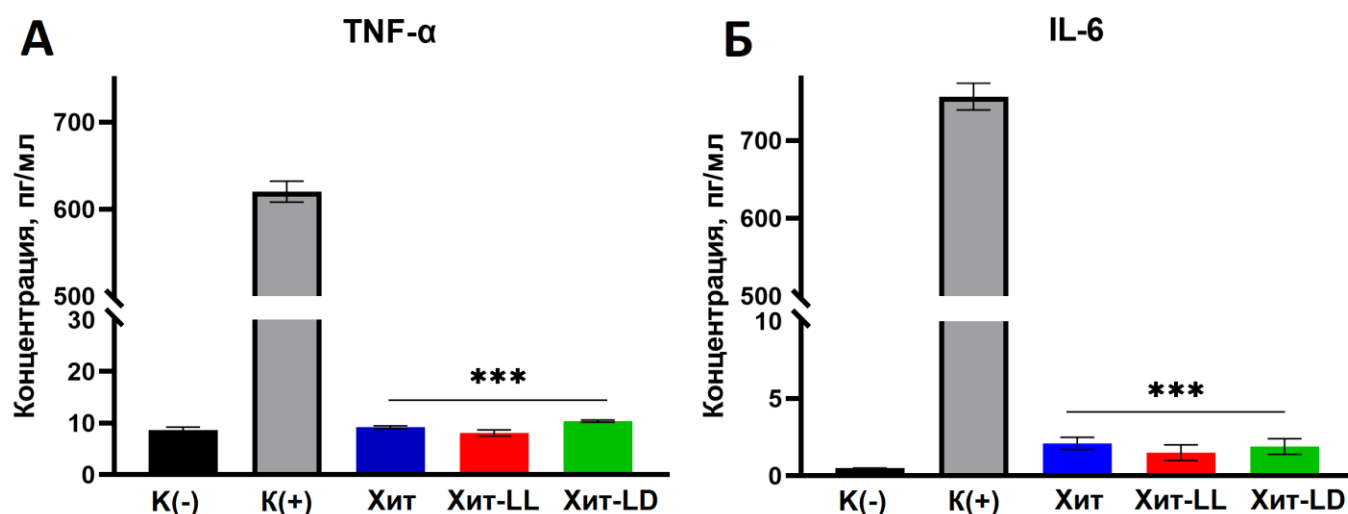


Рисунок 9 – Цитокиновый профиль клеток ТНР-1, культивируемых в присутствии образцов гидрогелей на основе хитозана (Хит), сополимера хитозана с олиго(L,L-лактидом) (Хит-LL) и олиго(L,D-лактидом) (Хит-LD). В качестве контроля использовали клетки в лунках культурального планшета (без гидрогелей). Уровни секреции TNF-α (А) и IL-6 (Б) моноцитов/макрофагов с добавлением ФМА (положительный контроль K(+)) или без ФМА (отрицательный контроль K(-)) определяли с помощью ИФА. ***P < 0,005 по сравнению с положительным контролем (K(+)). Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение

В результате было показано, что уровни провоспалительных цитокинов TNF-α и IL-6 не повышались при культивировании клеток ТНР-1 в присутствии образцов гидрогелей и были сопоставимы со значениями, полученными для контрольных

лунок. Так, уровни секреции TNF- α при культивировании клеток в присутствии образцов Хит, Хит-LL и Хит-LD образцах составляли $9,2 \pm 0,3$ пг/мл, $8,1 \pm 0,6$ пг/мл и $10,4 \pm 0,5$ пг/мл, соответственно (рисунок 9А). Эти величины были сопоставимы с контрольным значением $8,6 \pm 0,6$ пг/мл. Как видно из рисунка 9Б, концентрации IL-6 составляли $2,1 \pm 0,4$ пг/мл, $1,5 \pm 0,5$ пг/мл и $1,9 \pm 0,4$ пг/мл в случае образцов Хит, Хит-LL и Хит-LD, соответственно, а в отрицательном контроле концентрация интерлейкина-6 была $0,5 \pm 0,1$ пг/мл. Обнаружено, что активированные ФМА клетки секретировали в среду $756,3 \pm 17,2$ пг/мл TNF- α и $620,3 \pm 12,1$ пг/мл IL-6. Следует отметить, что поведение клеток ТНР-1 при инкубации с образцами гидрогелей не менялось: клетки росли в виде суспензионной культуры. В случае клеток ТНР-1, которые были дифференцированы/стимулированы ФМА, наблюдали их прикрепление ко дну культурального планшета и распластывание.

Таким образом, было показано, что активация ТНР-1 с помощью ФМА приводила к дифференцировке моноцитов в классически активированные макрофаги. При этом установлено, что наличие образцов гидрогелей не приводило к активации клеток линии ТНР-1, то есть эти образцы потенциально не иммуногенны.

3.4. Культивирование клеток на/в матриксах в модели *in vitro*

Для изучения клеточной адгезии и морфологии клеток, а также их роста и пролиферации на/в матриксах (плёнках или макропористых гидрогелях) при длительном культивировании использовали два типа клеток, а именно мышечные фибробласты L929 и мезенхимальные стромальные клетки человека МСК, выделенные из жировой ткани. Пленки, в отличие от макропористых гидрогелей, имели микропористую структуру (со средним размером пор 1-3 мкм) и, следовательно, представляли собой подложки, на которых клетки росли в монослое только по их поверхности (2D рост клеток). Макропористые гидрогели в набухом состоянии представляли собой развитые системы открытых взаимосвязанных пор со средним размером 150 мкм, что примерно в десять раз больше размера клеток. Такая

структура гидрогелей позволяла клеткам мигрировать в поры и расти как на поверхности гидрогелей, так и внутри пор, обеспечивая 3D рост клеток. Исходя из вышесказанного, пленки мы рассматривали как 2D-матрицы, а макропористые гидрогели- как 3D-матрицы. Для оценки дифференцировочного потенциала МСК при культивировании на плёнках, выделенные из жировой ткани клетки предварительно исследовали на соответствие фенотипу стволовых клеток и подтверждали их мультипотентность.

3.4.1. Характеристика фенотипа мезенхимальных стромальных клеток

Мезенхимальные стромальные клетки были выделены из жировой ткани здоровых доноров и охарактеризованы на соответствие фенотипу стволовых клеток (Рисунок 10). Выделенные клетки (Рисунок 10А) представляли собой адгезионную культуру с характерной фибробластоподобной (веретенообразной) морфологией (Рисунок 10Б). При культивировании клеток в среде, содержащей индукторы остеогенной дифференцировки, фиксировали наличие отложений кальция с помощью окрашивания ализариновым красным через 14 дней (Рисунок 10В). Окрашивание накоплений нейтральных липидов с помощью масляного красного подтвердило возможность дифференцировки выделенных клеток в адипогенном направлении (Рисунок 10Г).

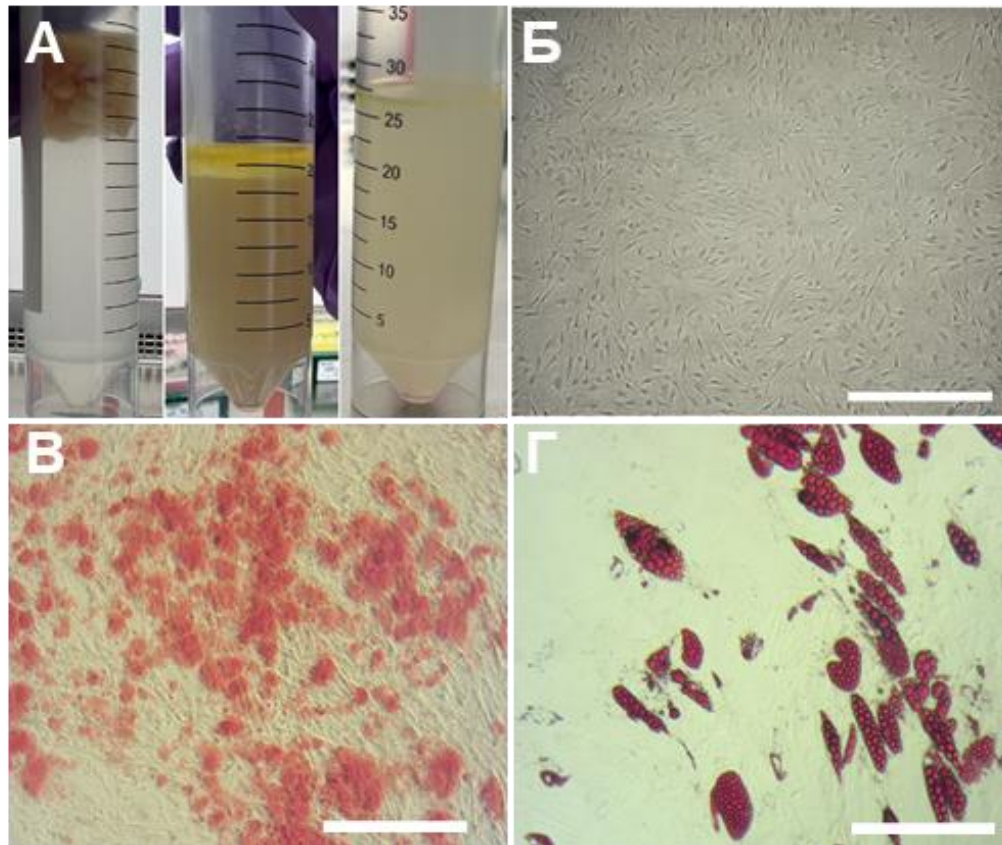


Рисунок 10 – Фенотипическая характеристика МСК. А – выделение МСК из жировой ткани человека; Б – микрофотографии МСК на 7-ой день после прикрепления. Шкала 100 мкм; В, Г – микрофотографии МСК в индуцированном остео- и адипогенном состояниях. Окрашивание отложений кальция (ализариновый красный) и накоплений нейтральных липидов (масляный красный) через 14 дней индукции. Оптическая микроскопия. Шкала 100 мкм

Методом проточной цитометрии был исследован иммунофенотип МСК (Рисунок 11). Стволовые клетки определяются в том числе по экспрессии на своей поверхности характерных маркеров. В частности, кластер дифференцировки 73 (CD73), также известный как экто-5 – нуклеотидаза, является характерным мембранным белком МСК, а также маркером созревания Т- и В-лимфоцитов [204]. Кроме того, большая часть выделенных из ткани МСК должна экспрессировать маркеры CD90 (гликозилфосфатидилинозитол-заякоренный белок суперсемейства

иммуноглобулинов, продукт гена *THY1*) и CD105 (эндоглин) [205]. При этом МСК не должны экспрессировать общий лейкоцитарный антиген (CD45) и маркер примитивных гемопоэтических клеток (CD34). Кроме того, МСК характеризуются низкой иммуногенностью, что также определяет отсутствие на их поверхности антигенов МНС класса II, в частности HLA-DR. Так, исследуемые клетки в данной работе были негативны по маркерам CD34 и CD45, не экспрессировали HLA-DR и были положительны по маркерам CD73, CD105 и CD90.

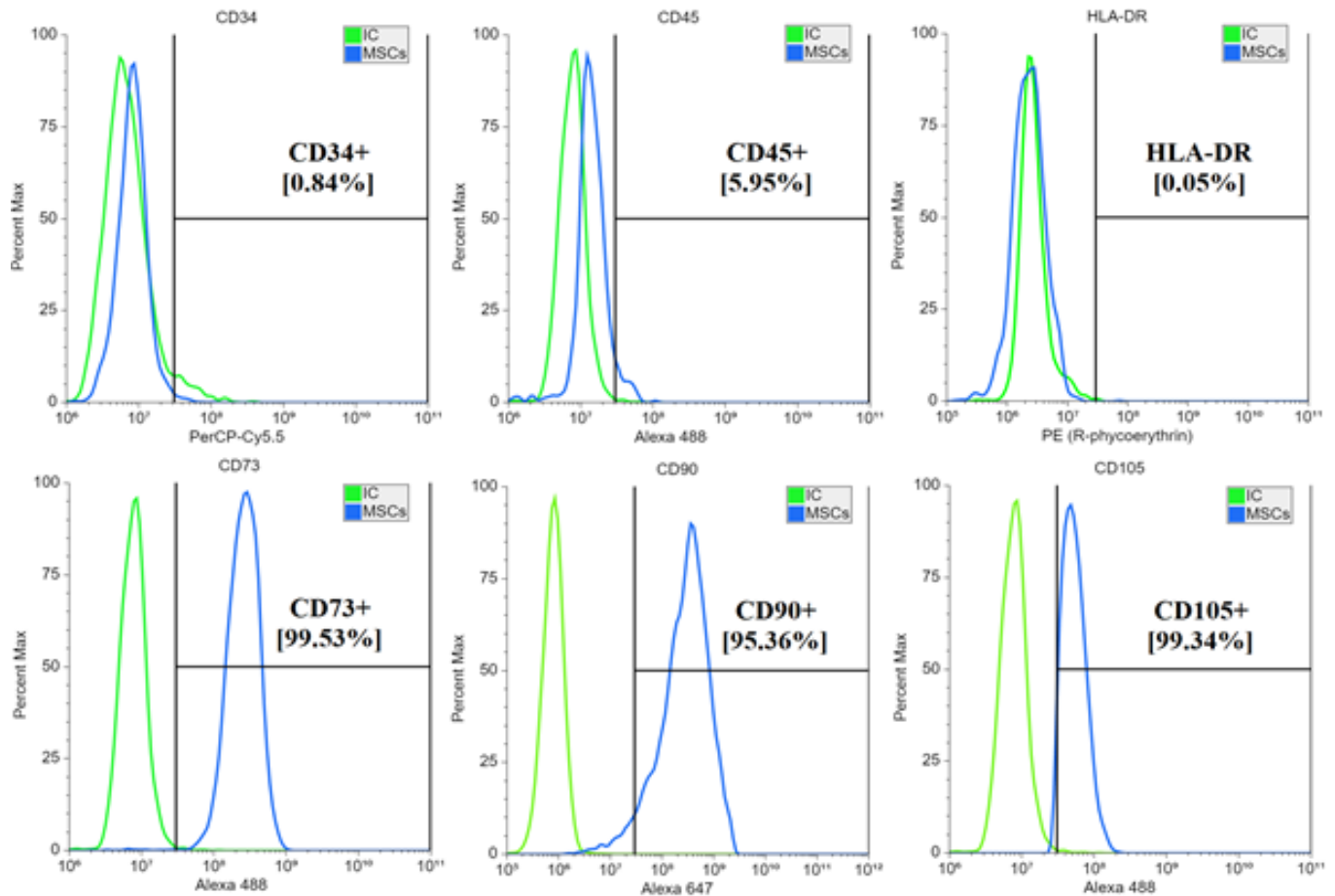


Рисунок 11 – Исследование иммунофенотипа стволовых клеток. Проточная цитометрия. Гистограммы распределения интенсивности флуоресценции неокрашенных клеток (зеленый цвет - изотипический контроль) и исследуемых клеток (синий цвет). Верхняя панель: отсутствие экспрессии маркеров CD34, CD45 и HLA-DR. Нижняя панель: экспрессия маркеров CD73, CD90 и CD105

Таким образом, было показано, что выделенные клетки соответствовали фенотипу стволовых клеток, установленному Международным обществом клеточной терапии (ISCT) [179].

3.4.2. Морфология клеток, культивируемых на пленках

Как хорошо известно, тканеинженерные матрицы должны обеспечивать соответствующие так называемые «химию поверхности» (наличие функциональных групп, заряд) и «топографию поверхности» (рельеф поверхности) для поддержания клеточной адгезии, распластывания, а также последующей пролиферации и/или дифференцировки клеток. Для изучения морфологии клетки L929 и МСК культивировали как на пленках из хитозана, так и на образцах пленок на основе сополимеров хитозана с олиголактидами в течение 4 дней, после чего исследовали с помощью оптической микроскопии (Рисунок 12).

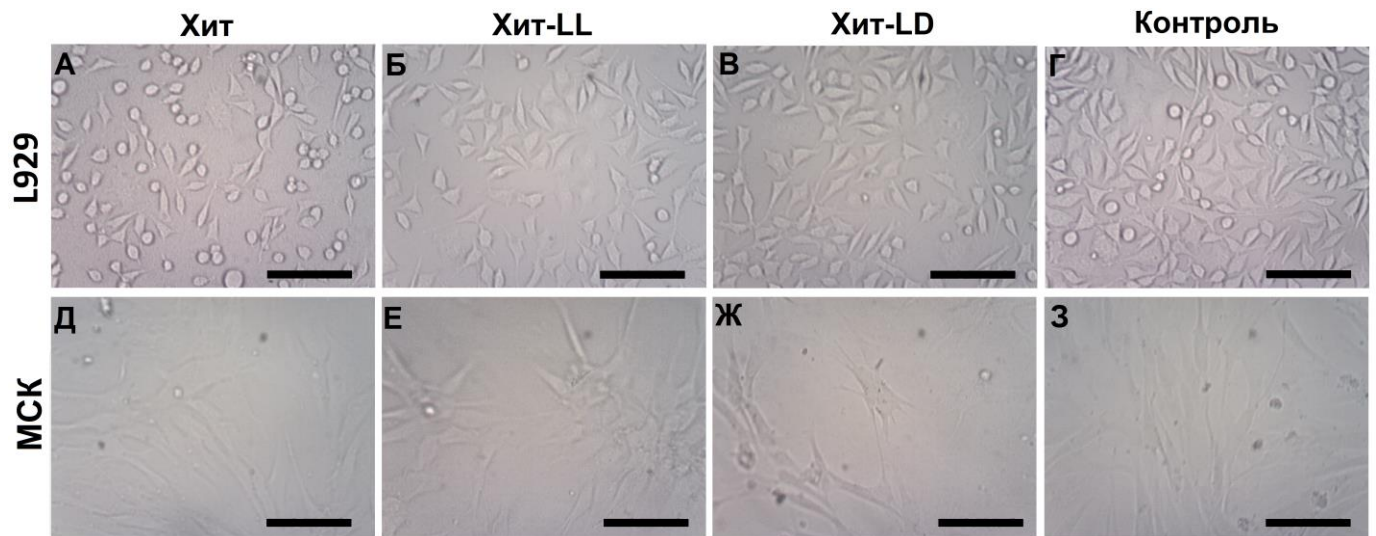


Рисунок 12 – Микрофотографии фибробластов мыши L929 (верхний ряд) и мезенхимальных стромальных клеток (МСК) (нижний ряд) на образцах плёнок из хитозана (Хит), сополимера хитозана с олиго(L, L-лактидом) (Хит-LL) и сополимера хитозана с олиго(L,D-лактидом) (Хит-LD) после культивирования в течение 4 дней.

Контроль - монослойная культура клеток (Г, З). Оптическая микроскопия. Шкала

100 мкм

Было обнаружено, что клетки L929 хорошо прикреплялись ко всем пленкам. При этом свойства поверхности пленок влияли на морфологию клеток. Так, в случае образца Хит-LL (Рисунок 12Б) и Хит-LD (Рисунок 12В) клетки L929 характеризовались веретенообразной формой, в то время как на пленке из Хит (Рисунок 12А) отмечали также достаточно много прикрепленных клеток сферической формы.

Известно, что клеточное микроокружение оказывает сильное влияние на биологию МСК. Так, дифференцировка стволовых клеток регулируется в значительной степени их нишей посредством как внутренних, так и внешних сигналов. Следует отметить, что МСК могут спонтанно образовывать сфероиды на пленках хитозана, как описано ранее [206]. Однако в нашем случае большинство клеток имели типичную веретенообразную морфологию на всех образцах пленок (Рисунок 12 Д, Е, Ж). Различия в поведении клеток могут быть связаны с источником хитозана и его характеристиками (молекулярная масса и степень деацетилирования), источником МСК, а также с начальной плотностью (концентрацией) клеток, которая была использована при посеве [207]. Следует отметить, что на пленках из сополимеров хитозана с олиголактидами в единичных случаях отмечали наличие неравномерно распределенных клеток или их небольших агрегатов.

3.4.3. Морфология клеток, культивируемых в макропористых гидрогелях

Морфологию и распределение (локализацию) клеток L929 и МСК в образцах макропористых гидрогелей изучали методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии после культивирования их в модели *in vitro* в течение 3-х дней (Рисунок 13). Для визуализации клеток и матриц, клетки окрашивали прижизненным красителем Calcein AM (зеленым цветом), а гидрогели визуализировали по неспецифическому поглощению DAPI (синим цветом).

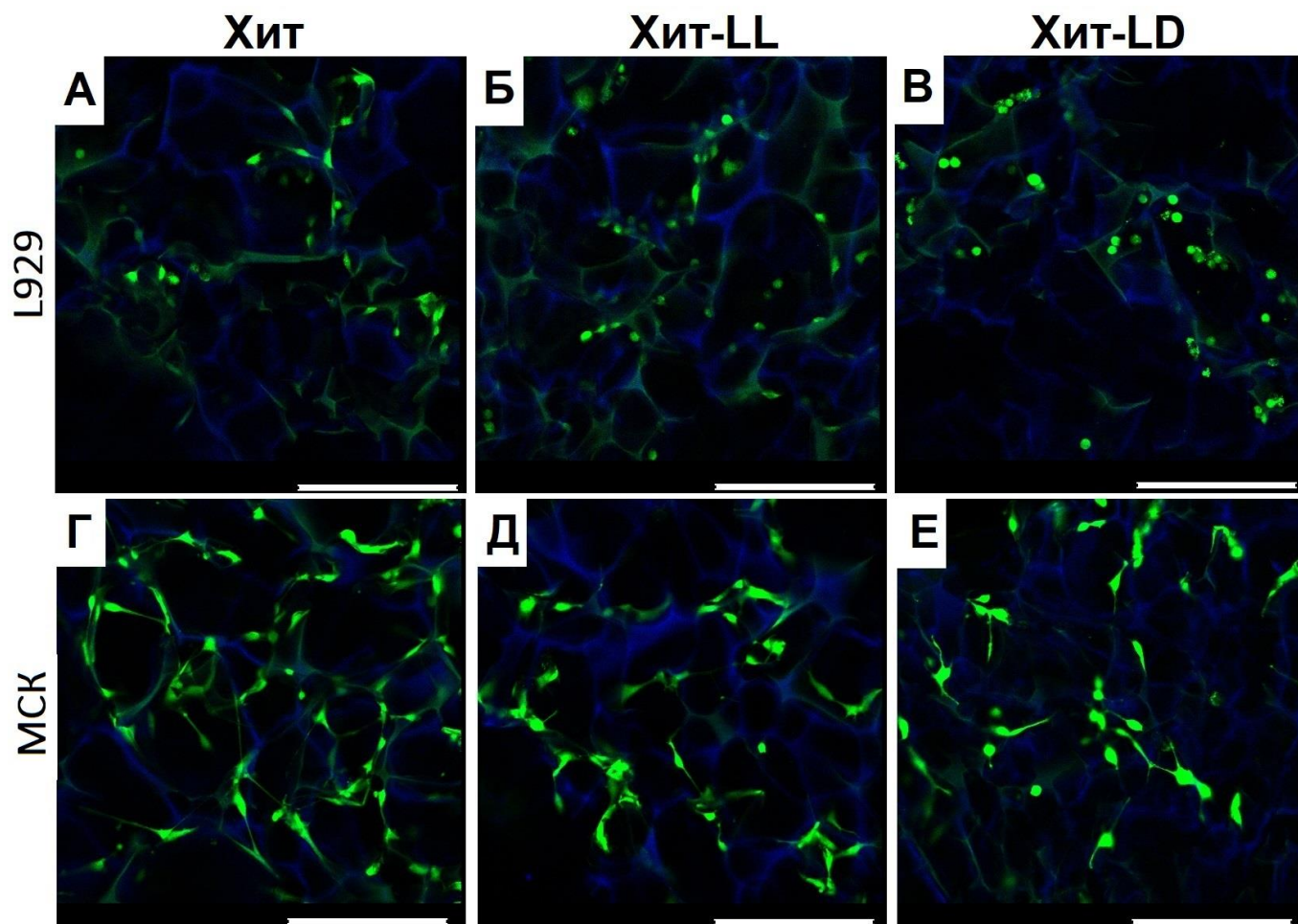


Рисунок 13 – Микрофотографии клеток фибробластов мыши линии L929 (А, Б, В) и МСК (Г, Д, Е) после их культивирования в макропористых гидрогелях на основе хитозана (Хит); сополимера хитозана с олиго(L,L-лактидом) (Хит-LL) и с олиго(L, D-лактидом) (Хит-LD) в течение 3 дней. Живые клетки (в зеленом цвете) и гидрогели (в синем цвете) были окрашены Calcein AM и DAPI, соответственно. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Шкала 200 мкм

Как видно на рисунке 13 (А, Б, В), клетки L929 были жизнеспособны, о чем свидетельствует их окрашивание витальным красителем Calcein AM в зеленый цвет, и достаточно равномерно распределялись по поверхности пор во всех образцах макропористых гидрогелей. Кроме того, было обнаружено, что состав гидрогеля

влият на морфологию клеток. Например, в случае образца Хит мышинные фибробласты L929 имели типичную веретенообразную морфологию (Рисунок 13А). Они хорошо распластывались и равномерно распределялись внутри пор образца гидрогеля Хит. Что касается образца Хит-LL, то было обнаружено, что некоторые клетки прикреплялись, но не распластывались, сохраняя округлую форму. В случае образца Хит-LD большинство клеток имели сферическую форму, но при этом достаточно равномерно заполняли макропоры гидрогеля. Эти особенности поведения и морфологии клеток, вероятно, можно объяснить в том числе некоторым изменением гидрофильно-гидрофобного баланса сополимеров хитозана с олиголактидами по сравнению с Хит.

После культивирования МСК в течение 3 дней в гидрогелях было обнаружено, что в основном клетки имели веретенообразную морфологию во всех образцах макропористых гидрогелей (Рисунок 13, нижняя панель). Однако следует отметить, что в образцах Хит-LL и Хит-LD наблюдали также клетки и округлой формы.

Таким образом, было продемонстрировано, что структура, а также «химия поверхности» и топография образцов макропористых гидрогелей обеспечивали миграцию клеток внутри взаимосвязанных макропор гидрогеля, а также прикрепление клеток к их поверхности. Показано, что большинство клеток имели характерную морфологию при культивировании во всех образцах гидрогелей. В конечном итоге можно заключить, что матриксы на основе сополимеров хитозана с олиголактидами не уступали по своим свойствам матриксам на основе чистого хитозана, обеспечивая практически одинаковое поведение (адгезию и морфологию) клеток.

3.4.4. Рост и пролиферация клеток в макропористых гидрогелях

Для количественной оценки пролиферации клеток с помощью МТТ-теста, фибробласты L929 и МСК культивировали в макропористых гидрогелях в течение 10

и 14 дней, соответственно. Для оценки количества живых клеток в образцах использовали МТТ-тест (Рисунок 14). Было установлено, что клетки обоих типов росли и пролиферировали во всех образцах гидрогелей, при этом количество жизнеспособных клеток зависело от состава матрикса.

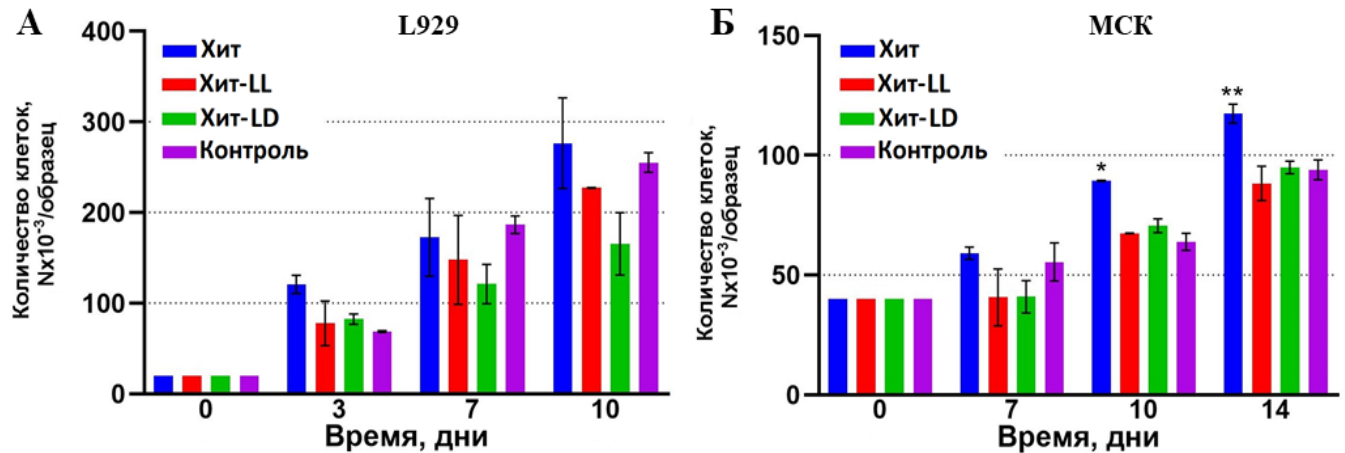


Рисунок 14 – Рост клеток фибробластов мыши L929 в течение 10 дней (А) и МСК в течение 14 дней (Б) в образцах гидрогелей на основе хитозана (Хит); сополимера хитозана с олиго(L,L-лактидом) (Хит-LL) и с олиго(L,D-лактидом) (Хит-LD).

Контроль - монослой клеток на дне лунки планшета. Результаты МТТ-теста.

Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. *P <0,05, **P <0,01 по сравнению с контролем

Следует отметить, что во всех образцах матриксов количество клеток значительно увеличивалось к 10 (в случае клеток L929) и 14 (в случае МСК) дню культивирования, что подтверждает рост и пролиферацию обоих типов клеток (Рисунок 10). При этом, было установлено, что количество жизнеспособных клеток зависело от состава матрикса. Так, в случае клеток L929 на каждый образец матрикса и на дно лунки планшета (контроль) было внесено 2×10^3 кл (0 день) мышинных фибробластов L929. Как видно из рисунка 10А, все образцы гидрогелей поддерживали

рост клеток с приблизительно одинаковой эффективностью на протяжении 10 дней культивирования. Так, на 7 день количество жизнеспособных клеток L929 составляло $(172 \pm 42) \times 10^3$ кл/образец Хит, $(147 \pm 49) \times 10^3$ кл/образец Хит-LL, $(121 \pm 22) \times 10^3$ кл/образец Хит-LD и $(186 \pm 10) \times 10^3$ кл в контроле. В качестве контроля использовали монослойную культуру клеток на дне лунки планшета. На 10-й день культивирования максимальное количество клеток фибробластов мыши L929 было выявлено для образца гидрогеля Хит $((276 \pm 50) \times 10^3$ кл), а количество клеток в образце Хит-LL $((227 \pm 2) \times 10^3$ кл) было сравнимо с этим результатом. Минимальное количество фибробластов L929 $((165 \pm 34) \times 10^3$ кл) обнаружили в образце Хит-LD на 10-ый день исследования.

Что касается МСК, на каждый образец гидрогеля и на дно лунки планшета (контроль) было внесено 4×10^3 кл (0 день). Как видно из рисунка 10Б, МСК лучше всего пролиферировали в образцах на основе Хит: было получено $(89 \pm 1) \times 10^3$ кл и $(117 \pm 4) \times 10^3$ кл на 10-й и 14-й день, соответственно. При этом на 10-й день культивирования количество жизнеспособных МСК на образцах Хит-LL и Хит-LD составляло $(67 \pm 1) \times 10^3$ кл и $(71 \pm 3) \times 10^3$ кл, соответственно, что было несколько выше, чем в контроле на дне лунки планшета $((64 \pm 4) \times 10^3$ кл). Аналогичная тенденция сохранялась до 14-го дня культивирования, при этом количество жизнеспособных клеток на образцах Хит-LL и Хит-LD было $(88 \pm 7) \times 10^3$ кл и $(95 \pm 3) \times 10^3$ кл, соответственно, что практически не отличалось от контроля $(94 \pm 4) \times 10^3$ кл.

Таким образом, было продемонстрировано, что все образцы гидрогелей поддерживали рост и пролиферацию обоих типов клеток при длительном культивировании в модели *in vitro* в течение 10-14 дней.

3.5. Исследование дифференцировки клеток при культивировании на пленках

3.5.1. Osteогенный потенциал мезенхимальных стромальных клеток при культивировании на плёнках

Следующим этапом исследования была оценка возможности остеогенной дифференцировки МСК при их культивировании на пленках различного состава. Как известно, МСК могут дифференцироваться в остеобласты (клетки кости), хондроциты (клетки хряща), адипоциты (жировые клетки) и др. В данном исследовании проводили индуцированную дифференцировку МСК в клетки костной ткани. Известно, что многие факторы влияют на этот процесс. Например, как упоминалось выше, следует учитывать топографические характеристики и «химию поверхности» матрикса. Сначала мы оценивали сначала качественно влияние матриксов (пленок) на ранние стадии остеоиндукции МСК.

Для выявления остеогенной дифференцировки МСК определяли активность щелочной фосфатазы путём цитохимического окрашивания через 7 дней после индукции в ОС. Этот подход позволяет качественно оценить наличие дифференцированных клеток. Как видно на рисунке 15, после 7 дней индукции МСК окрашивались в фиолетовый цвет как в контроле (дно лунки 96-луночного планшета), так и на всех трёх типах плёнок, что подтверждает начальную стадию остеогенеза. Следует отметить, что по сравнению с контролем, клетки на пленках распределялись неравномерно. Они формировали клеточные агрегаты, так называемые «нодулы» (сфероиды). Известно, что МСК в условиях 3D культивирования, в том числе в сфероидах, обладают усиленным стволовым потенциалом. Из рисунка 15 также видно, что процесс образования скоплений был сильнее выражен в образцах Хит-LL и Хит-LD, чем на пленке из Хит. Можно предположить, что формирование сфероидов связано с повышенным остеогенным потенциалом клеток на этих матриксах. Однако эта гипотеза нуждается в дальнейшем подтверждении.

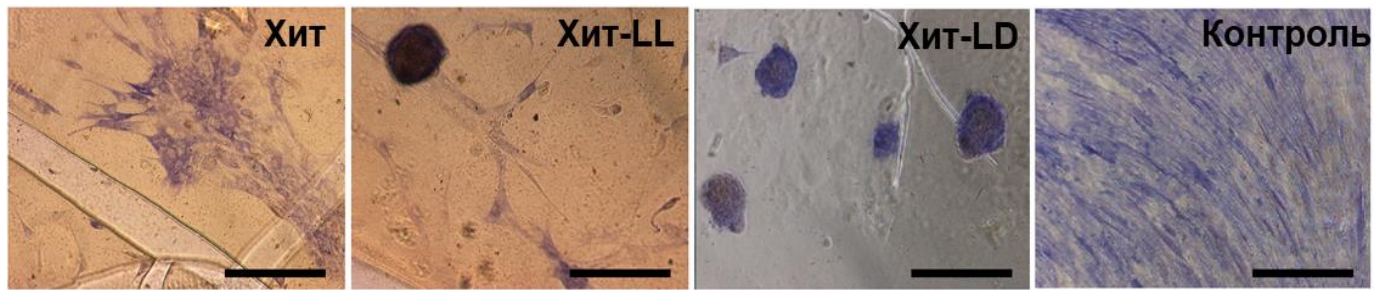


Рисунок 15 – Индуцированная остеодифференцировка МСК на пленках различного состава: хитозан (Хит); сополимер хитозана с олиго(L, L-лактидом)(Хит-LL); сополимер хитозана с олиго(L, D-лактидом) (Хит-LD). Оценка активности щелочной фосфатазы. Репрезентативные изображения цитохимической реакции. МСК культивировали в остеогенной среде (ОС) в течение 7 дней. Контроль - монослойная культура клеток. Световая микроскопия. Шкала 100 мкм

Через 7 и 14 дней культивирования в ОС, клетки лизировали и выделяли мРНК для проведения ПЦР в режиме реального времени (Рисунок 16). Видно, что гены, связанные с остеодифференцировкой, такие как щелочная фосфатаза (*ALPL*) [208], костный фактор транскрипции (*Runx2*) и секретируемый фосфопротеин 1 (*SPP1*) [209], активировались после остеоиндукции во всех образцах. Известно, что активность *ALPL* является временным ранним маркером остеодифференцировки стволовых клеток, пик которой приходится на конец пролиферативной стадии и до созревания матрикса [210]. *Runx2* является главным остеогенным транскрипционным фактором, участвующим в дифференцировке МСК в остеобласты [211]. *SPP1* представляет собой ген, кодирующий белок остеопонтин, который, в свою очередь, специфично экспрессируется на поздней стадии остеогенеза и играет роль связующего белка во внеклеточном матриксе. Кроме того, известно, что остеопонтин (кислый фосфопротеин) связан с прикреплением клеток, пролиферацией и минерализацией внеклеточного матрикса в кости. В частности, ранее было показано, что он способствует прикреплению остеокластов к минеральному матриксу

костей и активно экспрессируется на стадии пролиферации остеобластов в качестве маркера дифференцировки остеобластов [212].

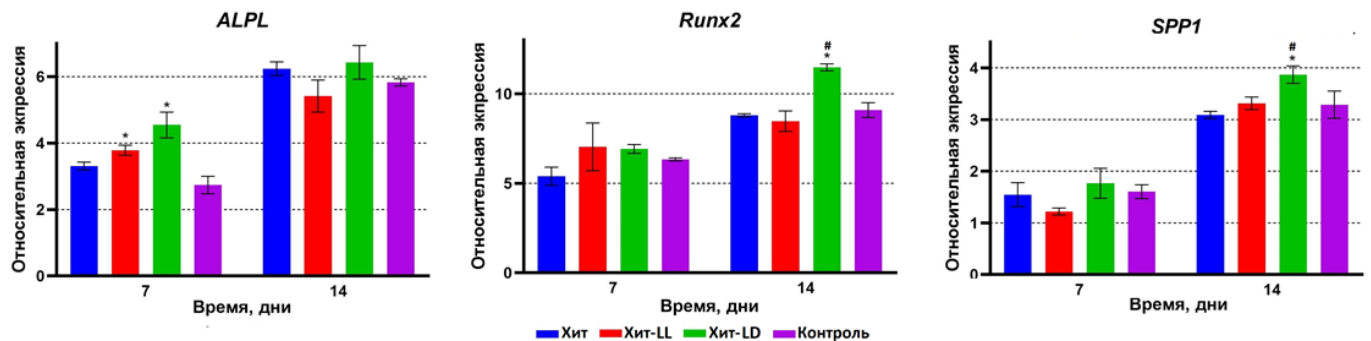


Рисунок 16 – Дифференциальная экспрессия мРНК генов, участвующих в остеодифференцировке МСК. Анализ ПЦР в реальном времени костных специфических маркеров *ALPL*, *Runx2* и *SPP1*. МСК культивировали в остеогенной среде в течение 14 дней на плёнках различного состава: хитозан (Хит); сополимер хитозана с олиго(L,L-лактидом) (Хит-LL); сополимер хитозана с олиго(L,D-лактидом) (Хит-LD). Данные представлены в виде кратных изменений уровней транскрипции остеоиндуцированных МСК по сравнению с интактными МСК, культивируемыми на дне лунки планшета без индукции. Контроль – остеоиндуцированные МСК на дне лунки планшета. Результаты выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение. *P < 0,05 по сравнению с контролем, #P < 0,05 по сравнению с образцом Хит

Как видно из рисунка 16, через 7 дней индукции наблюдали выраженное достоверное увеличение экспрессии *ALPL* (в $3,79 \pm 0,15$ и $4,5 \pm 0,39$ раз в образцах Хит-LL и Хит-LD, соответственно), что хорошо коррелировало с результатами цитохимических исследований (см. рисунок 15). На 14-й день остеоиндукции транскрипция гена *ALPL* дополнительно увеличилась по сравнению с соответствующим значением на 7-ой день. При этом следует отметить, что уровни *ALPL* были примерно одинаковы для всех остеоиндуцированных образцов (изменение

экспрессии в $6,24 \pm 0,21$ раз для образца Хит; в $5,42 \pm 0,48$ раз для образца Хит-LL; в $6,44 \pm 0,50$ раз для образца Хит-LD и в $5,83 \pm 0,11$ раз в контроле при индукции клеток на дне лунки планшета). Уровни экспрессии генов *Runx2* и *SPP1* также были выше на 14-й день, чем на 7-ой день индукции. Максимальное повышение экспрессии *Runx2* в $11,47 \pm 0,19$ раз и *SPP1* в $3,87 \pm 0,17$ раз было выявлено для пленок Хит-LD (*P < 0,05), что может быть связано с изменением физико-химических свойств, в частности гидрофильно-гидрофобного баланса сополимера хитозана с олиго(L,D-лактидом), на основе которого были получены плёнки Хит-LD, по сравнению с хитозаном, из которого был сформирован образец Хит.

Таким образом, можно предположить, что матриксы на основе Хит-LD способствовали остеоиндукции МСК и могут быть перспективны для регенерации костной ткани.

3.5.2. Адипогенный потенциал мезенхимальных стромальных клеток при культивировании на пленках

Следующим этапом исследования была оценка возможной адипогенной дифференцировки МСК при их культивировании на пленках. Для этого МСК индуцировали в адипогенной среде для адипоцитарной дифференцировки. Как известно, накопление в клеточном цитозоле везикул, содержащих триглицериды, является важным признаком дифференцировки клеток в адипоциты. С помощью световой микроскопии путем окрашивания Масляным красным на всех плёнках наблюдали клетки с накоплением капель внутриклеточного жира (Рисунок 17). Как видно из рисунка 17, в случае образцов Хит-LL и Хит-LD капли липидов были равномерно распределены по всей поверхности пленок, а их количество было сопоставимо с контролем (монослойная культура клеток на дне лунки планшета). Однако в случае образца Хит наблюдали меньшее количество клеток, содержащих липиды (триглицериды), чем в контроле и в других образцах. Ранее некоторые

исследователи отмечали ингибирование хитозаном дифференцировки клеток 3T3-L1, то есть жировых клеток, применяемых для имитации дифференцировки адипоцитов в условиях *in vitro*, путём подавления фосфорилирования протеинкиназы В [213], [214]. Однако в нашем случае при культивировании клеток на плёнках процесс дифференцировки также моделировался «химией» и топографией поверхности. Можно предположить, что матрицы на основе сополимеров хитозана с олиголактидами оказались более предпочтительны при индукции адипонаправленной дифференцировки МСК, в частности благодаря наличию в их структуре гидрофобных олиголактидов [215].

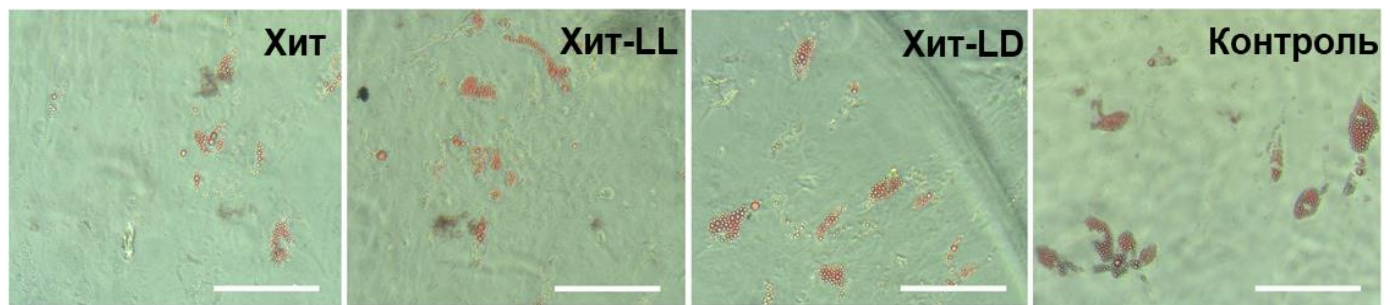


Рисунок 17 – Индуцированная адипогенная дифференцировка МСК на пленках различного состава: хитозан (Хит); сополимер хитозана с олиго(L, L-лактидом)(Хит-LL); сополимер хитозана с олиго(L, D-лактидом) (Хит-LD). Окрашивание капель внутриклеточного жира масляным красным (Oil Red O). Репрезентативные изображения цитохимической реакции. МСК культивировали в адипогенной среде (АС) в течение 7 дней. Контроль - монослойная культура клеток. Световая микроскопия. Шкала 100 мкм

Клетки культивировали на пленках в АС для оценки изменения уровней транскрипции маркеров адипогенеза. Через 7 и 14 дней после индукции, клетки лизировали и лизат использовали для выделения мРНК для проведения ПЦР в режиме реального времени. Результаты представлены на рисунке 18.

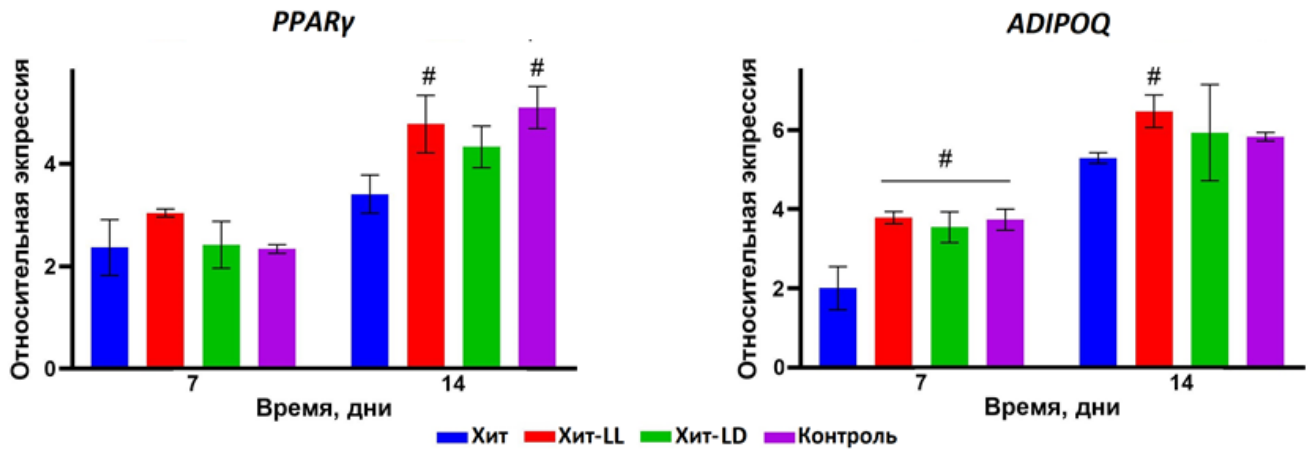


Рисунок 18 – Дифференциальная экспрессия мРНК генов, участвующих в адиподифференцировке МСК. Анализ экспрессии специфических маркеров адипогенеза *PPAR γ* и *ADIPOQ* методом ПЦР в режиме реального времени. МСК культивировали в адипогенной среде в течение 14 дней на пленках различного состава: хитозан (Хит); сополимер хитозана с олиго(L, L-лактидом) (Хит-LL); сополимер хитозана с олиго(L, D-лактидом) (Хит-LD). Данные представлены в виде кратных изменений уровней транскрипции адипоиндуцированных МСК по сравнению с интактными МСК, культивируемыми на дне лунки планшета без индукции. Контроль – адипоиндуцированные МСК на дне лунки планшета. Результаты выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение. $\#P < 0,05$ по сравнению с образцом Хит

Известно, что ключевыми регуляторами обмена липидов являются рецепторы, активируемые пролифераторами пероксисом (в частности, ген *PPAR γ*) [216], и адипонектин, который кодируется геном *ADIPOQ* и отвечает за созревание адипоцитов [217]. Таким образом, в качестве подтверждения адипонаправленной дифференцировки МСК может быть рассмотрено увеличение экспрессии соответствующих генов [218]. Нами было обнаружено, что гены *PPAR γ* и *ADIPOQ*

активировались в МСК в результате культивирования клеток в АС во всех образцах плёнок (Рисунок 18).

Из рисунка 18 видно, что на 7 дней после индукции адипогенеза в МСК наблюдали увеличение экспрессии гена *PPAR γ* в 2 - 3 раза (по сравнению с интактными МСК) как в индуцированном контроле (клетки на дне лунки планшета), так и на плёнках независимо от их состава. Что касается экспрессия *ADIPOQ* на 7-ой день, она была достоверно выше при индукции дифференцировки в контрольных клетках (на дне лунки планшета) и клетках на образцах Хит-LL, Хит-LD ($\#P < 0,05$) по сравнению с уровнем экспрессии в индуцированных МСК, которые культивировали на образце Хит. Эти данные хорошо коррелирует с результатами по окрашиванию жировых капель масляным красным (см. рисунок 17).

К 14-ому дню стимуляции адипогенеза, экспрессия *PPAR γ* была увеличена в 4-5 раз в клетках, культивируемых на всех образцах плёнок по сравнению с интактным контролем. Кроме того, в случае образцов Хит и Хит-LL отмечали достоверное различие ($\#P < 0.05$) в экспрессии этого гена (увеличение в $3,41 \pm 0,37$ раз и в $4,77 \pm 0,56$ раз, соответственно). Что касается уровня экспрессии гена *ADIPOQ* в клетках, он составлял ($5,3 \pm 0,4$) в случае образца Хит, что не отличалось достоверно от экспрессии в случае индуцированного контроля ($5,8 \pm 0,1$) на дне лунки планшета. Максимальное повышение экспрессии *ADIPOQ* отмечали в случае пленок Хит-LL ($*P < 0.05$), что может быть связано с некоторыми различиями в физико-химических свойствах Хит и сополимера Хит с олиго(L,L-лактидом).

Результаты, полученные в нашей работе, представляют интерес для стимуляции и поддержания адипогенеза *de novo* в косметических и реконструктивных целях. Это необходимо при небольших повреждениях жировой ткани вследствие старения, травматических дефектов, онкологических резекций и дегенеративных заболеваний [219], [220]. Инженерия жировой ткани с применением биodeградируемых матриц

и клеток, в том числе стволовых, позволяет добиться более высоких показателей удержания трансплантата, эффективной васкуляризации и является более функциональной, чем использование аутологичных тканей или бесклеточной терапии [220], [221]. Кроме того, существующие в настоящее время материалы для заполнения подкожных пустот имеют ряд недостатков, связанных с быстрой резорбцией, неспособностью стимулировать естественное образование и/или «врастание» жировой ткани, что требует повторных инъекций для длительного эффекта. Поэтому актуальной остается задача разработки тканеинженерных конструкций, которые будут действовать не только как наполнители, но и способствовать адипогенезу *in vivo* [222]. В этом контексте результаты нашей работы представляют особый интерес.

В нашей работе было показано, что матриксы на основе Хит и Хит-LL поддерживали, а образцы Хит-LD даже усиливали адиподифференцировку МСК в модели *in vitro*. Таким образом, матриксы на основе сополимеров хитозана с олиголактидами являются перспективными биоматериалами для тканевой инженерии не только костной, но и жировой ткани.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данной работы были получены и исследованы новые биodeградируемые матриксы, в частности плёнки и макропористые гидрогели на основе сополимеров хитозана с олиго(L,L-лактидом) и олиго(L,D-лактидом). Все макропористые гидрогели были охарактеризованы с точки зрения их структуры и физико-химических свойств (средний размер пор, распределение пор по размерам, набухаемость, биodeградация под действием лизоцима в модели *in vitro*). Кроме того, в моделях *in vitro* были исследованы цитотоксичность матриксов в отношении модельных животных клеток линии мышинных фибробластов L929, а также их потенциальная иммуногенность с использованием клеток моноцитов линии ТНР-1. Были также изучены механические свойства (модуль Юнга, напряжение при разрыве, тангенс угла механических потерь и др.) плёнок и макропористых гидрогелей и оценена способность этих матриксов поддерживать адгезию, рост, пролиферацию и/или дифференцировку клеток при длительном культивировании в модели *in vitro*. В частности, было проведено культивирование в течение 10-14 дней нескольких линий клеток, в том числе первичных стволовых клеток человека, в частности МСК, выделенных из жировой ткани и охарактеризованных согласно минимальным критериям стволовости Международного общества клеточной терапии (ISCT). Было показано, что все матриксы были цитосовместимы и не иммуногенны, обеспечивали адгезию и распластывание клеток, а также поддерживали рост и пролиферацию различных типов клеток. В работе также впервые обнаружено, что в зависимости от состава матриксов (Хит, сополимеры Хит с олиго(L,L-лактидом) или олиго(L,D-лактидом) усиливалось определенное направление дифференцировки МСК, что можно объяснить некоторыми различиями в физико-химических свойствах Хит и его сополимеров с олиголактидами.

Таким образом, полученные матриксы являются перспективными для тканевой инженерии, поскольку обладают уникальными свойствами для регенерации костной и/или жировой тканей человека.

ВЫВОДЫ

1. Получены биodeградируемые матриксы (пленки и макропористые гидрогели) на основе сополимеров хитозана с олиго(L,L-лактидом) и олиго(L,D-лактидом). Изучены структуры и физико-химические свойства гидрогелей (средний размер пор, распределение пор по размерам, набухаемость, биodeградация под действием лизоцима, механические характеристики). Показано, что введение олиголактидов в состав сополимеров, из которых получены гидрогели, позволяет варьировать набухаемость, деградацию и механические свойства матриксов в зависимости от их состава.

2. Все образцы матриксов не цитотоксичны в модели *in vitro*, что показано на мышинных фибробластах (L929) методом экстракт-теста с использованием МТТ-анализа. При культивировании клеток острого моноцитарного лейкоза человека (ТНР-1) в присутствии матриксов продемонстрировано отсутствие их иммуногенности, что подтверждено с помощью ИФА.

3. Изучены особенности роста и пролиферации различных типов животных клеток, в частности мышинных фибробластов L929 и мезенхимальных стромальных клеток человека при их длительном культивировании в течение 10-14 дней на/в матриксах (плёнках, макропористых гидрогелях) в модели *in vitro*. Все образцы матриксов поддерживали адгезию, рост и пролиферацию клеток. Кроме того, показано, что все эти параметры, а также морфология клеток и их распределение в матриксах зависели от их состава.

4. Исследована возможность дифференцировки МСК в остеогенном (по активности щелочной фосфатазы) и адипогенном (по окрашиванию липидных капель) направлениях при культивировании клеток на плёнках различного состава в модели *in vitro*. Максимальные уровни экспрессии маркеров остеогенеза (*ALPL*, *Runx2*, *SPP1*) были выявлены после культивирования МСК на пленках Хит-LD методом ПЦР в

реальном времени. Установлено, что матриксы на основе Хит-LL усиливали адипогенный потенциал МСК, что подтверждено оценкой экспрессии маркеров адипогенеза (*PPAR γ* , *ADIPOQ*).

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор искренне признателен и благодарен сотрудникам лаборатории твердофазных химических реакций ИСПМ РАН и лично Деминой Т.С. и Попыриной Т.Н. за помощь в получении матриц и исследовании деформационно-прочностных характеристиках пленок, за ценные методологические указания и рекомендации. Автор выражает благодарность коллективу лаборатории механики полимеров и композиционных материалов ИВС РАН и лично Смирновой В.Е. и Юдину В.Е. за помощь в проведении исследований по оценке механических характеристик макропористых гидрогелей.

Автор благодарит научного руководителя д.х.н. Марквичеву Е.А. за возможность выполнить данную работу и помощь на всех этапах подготовки диссертации. Автор глубоко признателен коллективу лаборатории биомедицинский материалов ИБХ и лично Дроздовой М.Г. за помощь в планировании, проведении и обсуждении результатов экспериментов, а также за дружественную и располагающую к научной работе атмосферу.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- [1] R. Langer and J. P. Vacanti, Tissue engineering, *Science*, vol. 260, no. 5110, pp. 920–926, May 1993, doi: 10.1126/science.8493529.
- [2] V. Raeisdasteh Hokmabad, S. Davaran, A. Ramazani, and R. Salehi, Design and fabrication of porous biodegradable scaffolds: a strategy for tissue engineering, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 28, no. 16, pp. 1797–1825, Nov. 2017, doi: 10.1080/09205063.2017.1354674.
- [3] L. R. Yadav, S. V. Chandran, K. Lavanya, and N. Selvamurugan, Chitosan-based 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 183, pp. 1925–1938, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.215.
- [4] A. M. Brokesh and A. K. Gaharwar, Inorganic Biomaterials for Regenerative Medicine, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 12, no. 5, pp. 5319–5344, Feb. 2020, doi: 10.1021/acsmi.9b17801.
- [5] M. Vallet-Regi and A. J. Salinas, Mesoporous bioactive glasses for regenerative medicine, *Mater. Today Bio*, vol. 11, p. 100121, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.mtbio.2021.100121.
- [6] База данных ОПТН - ОПТН. Accessed: Aug. 01, 2022. [Online]. Available: <https://optn.transplant.hrsa.gov/data/about-data/optn-database/>
- [7] K. Y. Kulebyakin, P. P. Nimiritsky, and P. I. Makarevich, Growth Factors in Regeneration and Regenerative Medicine: “the Cure and the Cause”, *Front. Endocrinol.*, vol. 11, p. 384, 2020, doi: 10.3389/fendo.2020.00384.
- [8] M. Jarrige *et al.*, The Future of Regenerative Medicine: Cell Therapy Using Pluripotent Stem Cells and Acellular Therapies Based on Extracellular Vesicles, *Cells*, vol. 10, no. 2, p. 240, Jan. 2021, doi: 10.3390/cells10020240.
- [9] M.-N. Hsu, Y.-H. Chang, V. A. Truong, P.-L. Lai, T. K. N. Nguyen, and Y.-C. Hu, CRISPR technologies for stem cell engineering and regenerative medicine, *Biotechnol. Adv.*, vol. 37, no. 8, p. 107447, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.107447.
- [10] H. Xu *et al.*, Targeted Disruption of HLA Genes via CRISPR-Cas9 Generates iPSCs with Enhanced Immune Compatibility, *Cell Stem Cell*, vol. 24, no. 4, pp. 566–578.e7, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.stem.2019.02.005.
- [11] H. Capella-Monsonís and D. I. Zeugolis, Decellularized xenografts in regenerative medicine: From processing to clinical application, *Xenotransplantation*, vol. 28, no. 4, p. e12683, 2021, doi: 10.1111/xen.12683.

- [12] T. Lu, B. Yang, R. Wang, and C. Qin, Xenotransplantation: Current Status in Preclinical Research, *Front. Immunol.*, vol. 10, p. 3060, Jan. 2020, doi: 10.3389/fimmu.2019.03060.
- [13] N. Cengiz and C. S. Wareham, Ethical considerations in xenotransplantation: a review, *Curr. Opin. Organ Transplant.*, vol. 25, no. 5, pp. 483–488, Oct. 2020, doi: 10.1097/MOT.0000000000000796.
- [14] S. G. Inc, Synthetic Genomics Inc. Expands Collaborative Research and Development Agreement with Lung Biotechnology PBC, a Subsidiary of United Therapeutics Corporation, to Develop Organs for Transplantation. Accessed: Aug. 01, 2022. [Online]. Available: <https://www.prnewswire.com/news-releases/synthetic-genomics-inc-expands-collaborative-research-and-development-agreement-with-lung-biotechnology-pbc-a-subsidiary-of-united-therapeutics-corporation-to-develop-organs-for-transplantation-300147402.html>
- [15] C. Tong *et al.*, Generation of bioartificial hearts using decellularized scaffolds and mixed cells, *Biomed. Eng. Online*, vol. 18, no. 1, p. 71, Jun. 2019, doi: 10.1186/s12938-019-0691-9.
- [16] K. H. Hillebrandt, H. Everwien, N. Haep, E. Keshi, J. Pratschke, and I. M. Sauer, Strategies based on organ decellularization and recellularization, *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.*, vol. 32, no. 6, pp. 571–585, Jun. 2019, doi: 10.1111/tri.13462.
- [17] M. Ghiringhelli *et al.*, Using Decellularization/Recellularization Processes to Prepare Liver and Cardiac Engineered Tissues, in *Next Generation Culture Platforms for Reliable In Vitro Models : Methods and Protocols*, T. A. L. Brevini, A. Fazeli, and K. Turksen, Eds., in *Methods in Molecular Biology.*, New York, NY: Springer US, 2021, pp. 111–129. doi: 10.1007/978-1-0716-1246-0_7.
- [18] J. J. Uriarte, F. E. Uhl, S. E. Rolandsson Enes, R. A. Pouliot, and D. J. Weiss, Lung bioengineering: advances and challenges in lung decellularization and recellularization, *Curr. Opin. Organ Transplant.*, vol. 23, no. 6, pp. 673–678, Dec. 2018, doi: 10.1097/MOT.0000000000000584.
- [19] H. J. Chen and M. L. Shuler, Engineering a Bioartificial Human Colon Model Through Decellularization and Recellularization, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 1907, pp. 91–102, 2019, doi: 10.1007/978-1-4939-8967-6_7.
- [20] A. Raya-Rivera, D. R. Esquiliano, J. J. Yoo, E. Lopez-Bayghen, S. Soker, and A. Atala, Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study, *Lancet*, vol. 377, no. 9772, pp. 1175–1182, Apr. 2011, doi: 10.1016/S0140-6736(10)62354-9.

- [21] A. A. Khan, S. K. Vishwakarma, A. Bardia, and J. Venkateshwarulu, Repopulation of decellularized whole organ scaffold using stem cells: an emerging technology for the development of neo-organ, *J. Artif. Organs Off. J. Jpn. Soc. Artif. Organs*, vol. 17, no. 4, pp. 291–300, Dec. 2014, doi: 10.1007/s10047-014-0780-2.
- [22] L. Ngo, A. D. Nathanson, T. Garbowski, U. Knothe, D. Zeidler, and M. L. Knothe Tate, Electron Microscopy Sample Preparation Protocol Enabling Nano-to-mesoscopic Mapping of Cellular Connectomes and Their Habitats in Human Tissues and Organs, *Bio-Protoc.*, vol. 9, no. 14, p. e3298, Jul. 2019, doi: 10.21769/BioProtoc.3298.
- [23] J. Lawandi *et al.*, Reversal of diabetes following transplantation of an insulin-secreting human liver cell line: Melligen cells, *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, vol. 2, p. 15011, 2015, doi: 10.1038/mtm.2015.11.
- [24] J. J. Meier *et al.*, Intrahepatic transplanted islets in humans secrete insulin in a coordinate pulsatile manner directly into the liver, *Diabetes*, vol. 55, no. 8, pp. 2324–2332, Aug. 2006, doi: 10.2337/db06-0069.
- [25] C. Anasetti, Use of alternative donors for allogeneic stem cell transplantation, *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, vol. 2015, pp. 220–224, 2015, doi: 10.1182/asheducation-2015.1.220.
- [26] J. Stolp, M. Zaitsev, and K. J. Wood, Immune Tolerance and Rejection in Organ Transplantation, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 1899, pp. 159–180, 2019, doi: 10.1007/978-1-4939-8938-6_12.
- [27] K. W. Lee *et al.*, Inducing Transient Mixed Chimerism for Allograft Survival Without Maintenance Immunosuppression With Combined Kidney and Bone Marrow Transplantation: Protocol Optimization, *Transplantation*, vol. 104, no. 7, pp. 1472–1482, Jul. 2020, doi: 10.1097/TP.0000000000003006.
- [28] H. Sasaki *et al.*, Preclinical and clinical studies for transplant tolerance via the mixed chimerism approach, *Hum. Immunol.*, vol. 79, no. 5, pp. 258–265, May 2018, doi: 10.1016/j.humimm.2017.11.008.
- [29] C. R. McLaughlin *et al.*, Regeneration of functional nerves within full thickness collagen-phosphorylcholine corneal substitute implants in guinea pigs, *Biomaterials*, vol. 31, no. 10, pp. 2770–2778, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.12.031.
- [30] C. Seebach, D. Henrich, K. Wilhelm, J. H. Barker, and I. Marzi, Endothelial progenitor cells improve directly and indirectly early vascularization of mesenchymal stem cell-driven bone regeneration in a critical bone defect in rats, *Cell Transplant.*, vol. 21, no. 8, pp. 1667–1677, 2012, doi: 10.3727/096368912X638937.

- [31] J. Cai, H. Chen, S. Xie, Z. Hu, and Y. Bai, Research Progress of Totipotent Stem Cells, *Stem Cells Dev.*, vol. 31, no. 13–14, pp. 335–345, Jul. 2022, doi: 10.1089/scd.2022.0061.
- [32] G. Liu, B. T. David, M. Trawczynski, and R. G. Fessler, Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications, *Stem Cell Rev. Rep.*, vol. 16, no. 1, pp. 3–32, Feb. 2020, doi: 10.1007/s12015-019-09935-x.
- [33] M. Z. Ratajczak, J. Ratajczak, and M. Kucia, Very Small Embryonic-Like Stem Cells (VSELs), *Circ. Res.*, vol. 124, no. 2, pp. 208–210, Jan. 2019, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.314287.
- [34] A. Sobhani *et al.*, Multipotent Stem Cell and Current Application, *Acta Med. Iran.*, vol. 55, no. 1, pp. 6–23, Jan. 2017.
- [35] D. Klein, Lung Multipotent Stem Cells of Mesenchymal Nature: Cellular Basis, Clinical Relevance, and Implications for Stem Cell Therapy, *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 35, no. 3, pp. 204–216, Jul. 2021, doi: 10.1089/ars.2020.8190.
- [36] T. S. Ramasamy, V. Velaithan, Y. Yeow, and F. H. Sarkar, Stem Cells Derived from Amniotic Fluid: A Potential Pluripotent-Like Cell Source for Cellular Therapy?, *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, vol. 13, no. 4, pp. 252–264, 2018, doi: 10.2174/1574888X13666180115093800.
- [37] H. Ranjbaran *et al.*, Whartons Jelly Derived-Mesenchymal Stem Cells: Isolation and Characterization, *Acta Med. Iran.*, vol. 56, no. 1, pp. 28–33, Jan. 2018.
- [38] F. J. Vizoso, N. Eiro, S. Cid, J. Schneider, and R. Perez-Fernandez, Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 9, p. E1852, Aug. 2017, doi: 10.3390/ijms18091852.
- [39] Y. Liang *et al.*, Chondrocyte-Targeted MicroRNA Delivery by Engineered Exosomes toward a Cell-Free Osteoarthritis Therapy, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 12, no. 33, pp. 36938–36947, Aug. 2020, doi: 10.1021/acsami.0c10458.
- [40] M. Jafarina, F. Alsahebfosoul, H. Salehi, N. Eskandari, and M. Ganjalikhani-Hakemi, Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: A Novel Cell-Free Therapy, *Immunol. Invest.*, vol. 49, no. 7, pp. 758–780, Oct. 2020, doi: 10.1080/08820139.2020.1712416.
- [41] F. R. Kahmini and S. Shahgaldi, Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles as novel cell-free therapy for treatment of autoimmune disorders, *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 118, p. 104566, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.yexmp.2020.104566.

- [42] C. Hu, L. Zhao, L. Zhang, Q. Bao, and L. Li, Mesenchymal stem cell-based cell-free strategies: safe and effective treatments for liver injury, *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 11, no. 1, p. 377, Sep. 2020, doi: 10.1186/s13287-020-01895-1.
- [43] N. He, Y. Zhang, S. Zhang, D. Wang, and H. Ye, Exosomes: Cell-Free Therapy for Cardiovascular Diseases, *J Cardiovasc. Transl. Res.*, vol. 13, no. 5, pp. 713–721, Oct. 2020, doi: 10.1007/s12265-020-09966-7.
- [44] M. Mendt, K. Rezvani, and E. Shpall, Mesenchymal stem cell-derived exosomes for clinical use, *Bone Marrow Transplant.*, vol. 54, no. Suppl 2, pp. 789–792, Aug. 2019, doi: 10.1038/s41409-019-0616-z.
- [45] N. Dray, E. Than-Trong, and L. Bally-Cuif, Neural stem cell pools in the vertebrate adult brain: Homeostasis from cell-autonomous decisions or community rules?, *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.*, vol. 43, no. 3, p. e2000228, Mar. 2021, doi: 10.1002/bies.202000228.
- [46] M. Scalise *et al.*, Heterogeneity of Adult Cardiac Stem Cells, *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1169, pp. 141–178, 2019, doi: 10.1007/978-3-030-24108-7_8.
- [47] X. Yang, Y. Ma, W. Guo, B. Yang, and W. Tian, Stem cells from human exfoliated deciduous teeth as an alternative cell source in bio-root regeneration, *Theranostics*, vol. 9, no. 9, pp. 2694–2711, 2019, doi: 10.7150/thno.31801.
- [48] F. Relaix *et al.*, Perspectives on skeletal muscle stem cells, *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, p. 692, Jan. 2021, doi: 10.1038/s41467-020-20760-6.
- [49] L. Bacakova *et al.*, Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review, *Biotechnol. Adv.*, vol. 36, no. 4, pp. 1111–1126, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.03.011.
- [50] M. Purwaningrum, N. S. Jamilah, S. D. Purbantoro, C. Sawangmake, and S. Nantavisai, Comparative characteristic study from bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *J. Vet. Sci.*, vol. 22, no. 6, p. e74, Nov. 2021, doi: 10.4142/jvs.2021.22.e74.
- [51] V. Volarevic *et al.*, Ethical and Safety Issues of Stem Cell-Based Therapy, *Int. J. Med. Sci.*, vol. 15, no. 1, pp. 36–45, 2018, doi: 10.7150/ijms.21666.
- [52] Главная – Гемабанк. Accessed: Aug. 01, 2022. [Online]. Available: <https://gemabank.ru/>
- [53] J. Varghese, M. Griffin, A. Mosahebi, and P. Butler, Systematic review of patient factors affecting adipose stem cell viability and function: implications for regenerative therapy, *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 8, no. 1, p. 45, Feb. 2017, doi: 10.1186/s13287-017-0483-8.

- [54] W. L. Lim, L. L. Liao, M. H. Ng, S. R. Chowdhury, and J. X. Law, Current Progress in Tendon and Ligament Tissue Engineering, *Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 16, no. 6, pp. 549–571, Dec. 2019, doi: 10.1007/s13770-019-00196-w.
- [55] Heparan sulfate alterations in extracellular matrix structures and fibroblast growth factor-2 signaling impairment in the aged neurogenic niche - PubMed. Accessed: Aug. 01, 2022. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28547849/>
- [56] F. Ullah *et al.*, Synthesis and functionalization of chitosan built hydrogel with induced hydrophilicity for extended release of sparingly soluble drugs, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 29, no. 4, pp. 376–396, Mar. 2018, doi: 10.1080/09205063.2017.1421347.
- [57] K. Nagayama and K. Nishimiya, Moderate substrate stiffness induces vascular smooth muscle cell differentiation through cellular morphological and tensional changes, *Biomed. Mater. Eng.*, vol. 31, no. 3, pp. 157–167, 2020, doi: 10.3233/BME-201087.
- [58] Y.-R. V. Shih, K.-F. Tseng, H.-Y. Lai, C.-H. Lin, and O. K. Lee, Matrix stiffness regulation of integrin-mediated mechanotransduction during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 26, no. 4, pp. 730–738, Apr. 2011, doi: 10.1002/jbmr.278.
- [59] A. Hernández-Rangel and E. S. Martín-Martínez, Collagen based electrospun materials for skin wounds treatment, *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 109, no. 9, pp. 1751–1764, Sep. 2021, doi: 10.1002/jbm.a.37154.
- [60] E. Rezvani Ghomi, N. Nourbakhsh, M. Akbari Kenari, M. Zare, and S. Ramakrishna, Collagen-based biomaterials for biomedical applications, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, vol. 109, no. 12, pp. 1986–1999, Dec. 2021, doi: 10.1002/jbm.b.34881.
- [61] C. Feng *et al.*, Co-inspired hydroxyapatite-based scaffolds for vascularized bone regeneration, *Acta Biomater.*, vol. 119, pp. 419–431, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.actbio.2020.11.010.
- [62] M. Sari, P. Hening, null Chotimah, I. D. Ana, and Y. Yusuf, Bioceramic hydroxyapatite-based scaffold with a porous structure using honeycomb as a natural polymeric Porogen for bone tissue engineering, *Biomater. Res.*, vol. 25, no. 1, p. 2, Jan. 2021, doi: 10.1186/s40824-021-00203-z.
- [63] M. Lu *et al.*, The morphological effect of nanostructured hydroxyapatite coatings on the osteoinduction and osteogenic capacity of porous titanium, *Nanoscale*, vol. 12, no. 47, pp. 24085–24099, Dec. 2020, doi: 10.1039/d0nr06306a.
- [64] Y. P. Singh, S. Dasgupta, R. Bhaskar, and A. K. Agrawal, Monetite addition into gelatin based freeze-dried scaffolds for improved mechanical and osteogenic

- properties, *Biomed. Mater. Bristol Engl.*, vol. 16, no. 6, Nov. 2021, doi: 10.1088/1748-605X/ac2e17.
- [65] M. M. Sk, P. Das, A. Panwar, and L. P. Tan, Synthesis and characterization of site selective photo-crosslinkable glycidyl methacrylate functionalized gelatin-based 3D hydrogel scaffold for liver tissue engineering, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, vol. 123, p. 111694, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.msec.2020.111694.
- [66] R. Wu, H. Li, Y. Yang, Q. Zheng, S. Li, and Y. Chen, Bioactive Silk Fibroin-Based Hybrid Biomaterials for Musculoskeletal Engineering: Recent Progress and Perspectives, *ACS Appl. Bio Mater.*, vol. 4, no. 9, pp. 6630–6646, Sep. 2021, doi: 10.1021/acsabm.1c00654.
- [67] Y. Tian *et al.*, Chitosan-Based Biomaterial Scaffolds for the Repair of Infected Bone Defects, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 10, p. 899760, 2022, doi: 10.3389/fbioe.2022.899760.
- [68] C. Chircov, A. M. Grumezescu, and L. E. Bejenaru, Hyaluronic acid-based scaffolds for tissue engineering, *Romanian J. Morphol. Embryol. Rev. Roum. Morphol. Embryol.*, vol. 59, no. 1, pp. 71–76, 2018.
- [69] M. Xu *et al.*, Alginate microgels as delivery vehicles for cell-based therapies in tissue engineering and regenerative medicine, *Carbohydr. Polym.*, vol. 266, p. 118128, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118128.
- [70] A. Wartenberg, J. Weisser, and M. Schnabelrauch, Glycosaminoglycan-Based Cryogels as Scaffolds for Cell Cultivation and Tissue Regeneration, *Mol. Basel Switz.*, vol. 26, no. 18, p. 5597, Sep. 2021, doi: 10.3390/molecules26185597.
- [71] M. Jin, J. Shi, W. Zhu, H. Yao, and D.-A. Wang, Polysaccharide-Based Biomaterials in Tissue Engineering: A Review, *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 27, no. 6, pp. 604–626, Dec. 2021, doi: 10.1089/ten.TEB.2020.0208.
- [72] M. Abbasian, B. Massoumi, R. Mohammad-Rezaei, H. Samadian, and M. Jaymand, Scaffolding polymeric biomaterials: Are naturally occurring biological macromolecules more appropriate for tissue engineering?, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 134, pp. 673–694, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.04.197.
- [73] D. Umuhoza, F. Yang, D. Long, Z. Hao, J. Dai, and A. Zhao, Strategies for Tuning the Biodegradation of Silk Fibroin-Based Materials for Tissue Engineering Applications, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 6, no. 3, pp. 1290–1310, Mar. 2020, doi: 10.1021/acsbomaterials.9b01781.
- [74] E. Entekhabi, M. Haghbin Nazarpak, M. Sedighi, and A. Kazemzadeh, Predicting degradation rate of genipin cross-linked gelatin scaffolds with machine learning,

- Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, vol. 107, p. 110362, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.msec.2019.110362.
- [75] A. Naini *et al.*, Inflammatory and Immunogenic Response of the Tissue after Application of Freeze-Dried Hydroxyapatite Gypsum Puger Scaffold Compared to Freeze-dried Hydroxyapatite Bovine Scaffold, *Contemp. Clin. Dent.*, vol. 11, no. 4, pp. 371–375, Dec. 2020, doi: 10.4103/ccd.ccd_443_19.
- [76] Y. Song, F. Zhang, and R. J. Linhardt, Glycosaminoglycans, *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1325, pp. 103–116, 2021, doi: 10.1007/978-3-030-70115-4_4.
- [77] M. Drozdova *et al.*, Composite Hydrogels Based on Cross-Linked Chitosan and Low Molecular Weight Hyaluronic Acid for Tissue Engineering, *Polymers*, vol. 15, no. 10, p. 2371, May 2023, doi: 10.3390/polym15102371.
- [78] H. S. Hwang and C.-S. Lee, Recent Progress in Hyaluronic-Acid-Based Hydrogels for Bone Tissue Engineering, *Gels*, vol. 9, no. 7, p. 588, Jul. 2023, doi: 10.3390/gels9070588.
- [79] S. Tiwari, R. Patil, and P. Bahadur, Polysaccharide Based Scaffolds for Soft Tissue Engineering Applications, *Polymers*, vol. 11, no. 1, p. 1, Dec. 2018, doi: 10.3390/polym11010001.
- [80] S. Lj. Tomić, M. M. Babić Radić, J. S. Vuković, V. V. Filipović, J. Nikodinovic-Runic, and M. Vukomanović, Alginate-Based Hydrogels and Scaffolds for Biomedical Applications, *Mar. Drugs*, vol. 21, no. 3, p. 177, Mar. 2023, doi: 10.3390/md21030177.
- [81] D. Chawla, T. Kaur, A. Joshi, and N. Singh, 3D bioprinted alginate-gelatin based scaffolds for soft tissue engineering, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 144, pp. 560–567, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.127.
- [82] G. Sun and J. J. Mao, Engineering dextran-based scaffolds for drug delivery and tissue repair, *Nanomed.*, vol. 7, no. 11, pp. 1771–1784, Nov. 2012, doi: 10.2217/nmm.12.149.
- [83] S. Banerjee *et al.*, Dextran-based scaffolds for in-situ hydrogelation: Use for next generation of bioartificial cardiac tissues, *Carbohydr. Polym.*, vol. 262, p. 117924, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.carbpol.2021.117924.
- [84] P. Wu, X. Xi, R. Li, and G. Sun, Engineering Polysaccharides for Tissue Repair and Regeneration, *Macromol. Biosci.*, vol. 21, no. 9, p. e2100141, Sep. 2021, doi: 10.1002/mabi.202100141.
- [85] Z. Terzopoulou, A. Zamboulis, I. Koumentakou, G. Michailidou, M. J. Noordam, and D. N. Bikiaris, Biocompatible Synthetic Polymers for Tissue Engineering Purposes, *Biomacromolecules*, vol. 23, no. 5, pp. 1841–1863, May 2022, doi: 10.1021/acs.biomac.2c00047.

- [86] O. Janoušková, Synthetic polymer scaffolds for soft tissue engineering, *Physiol. Res.*, vol. 67, no. Suppl 2, pp. S335–S348, Oct. 2018, doi: 10.33549/physiolres.933983.
- [87] D. Anandan, S. Mary Stella, N. Arunai Nambiraj, U. Vijayalakshmi, and A. K. Jaiswal, Development of mechanically compliant 3D composite scaffolds for bone tissue engineering applications, *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 106, no. 12, pp. 3267–3274, Dec. 2018, doi: 10.1002/jbm.a.36525.
- [88] T. Baudequin and M. Tabrizian, Multilineage Constructs for Scaffold-Based Tissue Engineering: A Review of Tissue-Specific Challenges, *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 7, no. 3, Feb. 2018, doi: 10.1002/adhm.201700734.
- [89] M. Maisani *et al.*, A new composite hydrogel combining the biological properties of collagen with the mechanical properties of a supramolecular scaffold for bone tissue engineering, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 12, no. 3, pp. e1489–e1500, 2018, doi: 10.1002/term.2569.
- [90] Y. Liu, S. Wang, and R. Zhang, Composite poly(lactic acid)/chitosan nanofibrous scaffolds for cardiac tissue engineering, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 103, pp. 1130–1137, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.101.
- [91] B. Balakrishnan and R. Banerjee, Biopolymer-based hydrogels for cartilage tissue engineering, *Chem. Rev.*, vol. 111, no. 8, pp. 4453–4474, Aug. 2011, doi: 10.1021/cr100123h.
- [92] R. Floreani, C. N. Cranson, and S. P. James, Synthesis and characterization of a Hyaluronan-polyethylene copolymer for biomedical applications, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, vol. 94, no. 2, pp. 441–446, Aug. 2010, doi: 10.1002/jbm.b.31672.
- [93] M. Kaliva, A. Georgopoulou, D. A. Dragatogiannis, C. A. Charitidis, M. Chatzinikolaidou, and M. Vamvakaki, Biodegradable Chitosan-graft-Poly(l-lactide) Copolymers For Bone Tissue Engineering, *Polymers*, vol. 12, no. 2, p. 316, Feb. 2020, doi: 10.3390/polym12020316.
- [94] M. G. Drozdova *et al.*, Macroporous modified poly (vinyl alcohol) hydrogels with charged groups for tissue engineering: Preparation and in vitro evaluation, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 75, pp. 1075–1082, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.03.017.
- [95] M. Kheradmandi, E. Vasheghani-Farahani, A. Ghiaseddin, and F. Ganji, Skeletal muscle regeneration via engineered tissue culture over electrospun nanofibrous chitosan/PVA scaffold, *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 104, no. 7, pp. 1720–1727, Jul. 2016, doi: 10.1002/jbm.a.35702.

- [96] I. Jun, H.-S. Han, J. R. Edwards, and H. Jeon, Electrospun Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering: Viewpoints on Architecture and Fabrication, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 3, p. 745, Mar. 2018, doi: 10.3390/ijms19030745.
- [97] W. Liu *et al.*, Electrospun fibrous silk fibroin/poly(L-lactic acid) scaffold for cartilage tissue engineering, *Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 13, no. 5, pp. 516–526, Oct. 2016, doi: 10.1007/s13770-016-9099-9.
- [98] G. J.-R. Delcroix, P. C. Schiller, J.-P. Benoit, and C. N. Montero-Menei, Adult cell therapy for brain neuronal damages and the role of tissue engineering, *Biomaterials*, vol. 31, no. 8, pp. 2105–2120, Mar. 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.084.
- [99] D. Fan *et al.*, Resveratrol and Angiogenin-2 Combined With PEGDA/TCS Hydrogel for the Targeted Therapy of Hypoxic Bone Defects via Activation of the Autophagy Pathway, *Front. Pharmacol.*, vol. 12, p. 618724, 2021, doi: 10.3389/fphar.2021.618724.
- [100] C.-G. Wang *et al.*, Polyelectrolyte Hydrogels for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, *Chem. Asian J.*, p. e202200604, Jul. 2022, doi: 10.1002/asia.202200604.
- [101] T. T. Hoang Thi, L. H. Sinh, D. P. Huynh, D. H. Nguyen, and C. Huynh, Self-Assemblable Polymer Smart-Blocks for Temperature-Induced Injectable Hydrogel in Biomedical Applications, *Front. Chem.*, vol. 8, p. 19, 2020, doi: 10.3389/fchem.2020.00019.
- [102] L. Lu *et al.*, The Formation Mechanism of Hydrogels, *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, vol. 13, no. 7, pp. 490–496, 2018, doi: 10.2174/1574888X12666170612102706.
- [103] M. Bustamante-Torres, D. Romero-Fierro, B. Arcentales-Vera, K. Palomino, H. Magaña, and E. Bucio, Hydrogels Classification According to the Physical or Chemical Interactions and as Stimuli-Sensitive Materials, *Gels Basel Switz.*, vol. 7, no. 4, p. 182, Oct. 2021, doi: 10.3390/gels7040182.
- [104] C. Yan, A. Altunbas, T. Yucel, R. P. Nagarkar, J. P. Schneider, and D. J. Pochan, Injectable solid hydrogel: mechanism of shear-thinning and immediate recovery of injectable β -hairpin peptide hydrogels, *Soft Matter*, vol. 6, no. 20, pp. 5143–5156, Oct. 2010, doi: 10.1039/C0SM00642D.
- [105] C. Kayal, R. J. Shipley, and J. B. Phillips, Physical and mechanical properties of RAFT-stabilised collagen gels for tissue engineering applications, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 99, pp. 216–224, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.jmbbm.2019.07.011.
- [106] P. Panyamao, W. Ruksiriwanich, P. Sirisa-Ard, and S. Charumanee, Injectable Thermosensitive Chitosan/Pullulan-Based Hydrogels with Improved Mechanical Properties and Swelling Capacity, *Polymers*, vol. 12, no. 11, p. E2514, Oct. 2020, doi: 10.3390/polym12112514.

- [107] V. G. Muir and J. A. Burdick, Chemically Modified Biopolymers for the Formation of Biomedical Hydrogels, *Chem. Rev.*, vol. 121, no. 18, pp. 10908–10949, Sep. 2021, doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00923.
- [108] S. Stucchi *et al.*, Squarate Cross-Linked Gelatin Hydrogels as Three-Dimensional Scaffolds for Biomedical Applications, *Langmuir*, vol. 37, no. 48, pp. 14050–14058, Dec. 2021, doi: 10.1021/acs.langmuir.1c02080.
- [109] N. Zerbinati, Chemical and mechanical characterization of hyaluronic acid hydrogel cross-linked with polyethylen glycol and its use in dermatology, *Dermatol. Ther.*, vol. 33(4), Accessed: Aug. 23, 2022. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32475040/>
- [110] N. R. Kildeeva *et al.*, Biodegradable scaffolds based on chitosan: Preparation, properties, and use for the cultivation of animal cells, *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, vol. 52, no. 5, pp. 504–512, Oct. 2016.
- [111] G. Giammona, G. Pitarresi, G. Cavallaro, and G. Spadaro, New biodegradable hydrogels based on an acryloylated polyaspartamide cross-linked by gamma irradiation, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 10, no. 9, pp. 969–987, 1999, doi: 10.1163/156856299x00568.
- [112] I. I. Abu Hashim *et al.*, Potential use of gamma-cyclodextrin polypseudorotaxane hydrogels as an injectable sustained release system for insulin, *Int. J. Pharm.*, vol. 392, no. 1–2, pp. 83–91, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.03.026.
- [113] S. M. Bittner *et al.*, Swelling Behaviors of 3D Printed Hydrogel and Hydrogel-Microcarrier Composite Scaffolds, *Tissue Eng. Part A*, vol. 27, no. 11–12, pp. 665–678, Jun. 2021, doi: 10.1089/ten.TEA.2020.0377.
- [114] M. Lazaridou *et al.*, Super absorbent chitosan-based hydrogel sponges as carriers for caspofungin antifungal drug, *Int. J. Pharm.*, vol. 606, p. 120925, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120925.
- [115] A. H. Karoyo and L. D. Wilson, A Review on the Design and Hydration Properties of Natural Polymer-Based Hydrogels, *Mater. Basel Switz.*, vol. 14, no. 5, p. 1095, Feb. 2021, doi: 10.3390/ma14051095.
- [116] E. A. Günter, O. V. Popeyko, V. S. Belozero, E. A. Martinson, and S. G. Litvinets, Physicochemical and swelling properties of composite gel microparticles based on alginate and callus cultures pectins with low and high degrees of methylesterification, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 164, pp. 863–870, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.189.

- [117] M. Gomez-Florit *et al.*, Natural-Based Hydrogels for Tissue Engineering Applications, *Mol. Basel Switz.*, vol. 25, no. 24, p. E5858, Dec. 2020, doi: 10.3390/molecules25245858.
- [118] H. Chopra, S. Kumar, and I. Singh, Biopolymer-based Scaffolds for Tissue Engineering Applications, *Curr. Drug Targets*, vol. 22, no. 3, pp. 282–295, 2021, doi: 10.2174/1389450121999201102140408.
- [119] S. M. Ahsan, M. Thomas, K. K. Reddy, S. G. Sooraparaju, A. Asthana, and I. Bhatnagar, Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 110, pp. 97–109, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.140.
- [120] G. Tang *et al.*, Recent Advances of Chitosan-Based Injectable Hydrogels for Bone and Dental Tissue Regeneration, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 8, p. 587658, 2020, doi: 10.3389/fbioe.2020.587658.
- [121] M. Rajabi, M. McConnell, J. Cabral, and M. A. Ali, Chitosan hydrogels in 3D printing for biomedical applications, *Carbohydr. Polym.*, vol. 260, p. 117768, May 2021, doi: 10.1016/j.carbpol.2021.117768.
- [122] A. Acemi, Polymerization degree of chitosan affects structural and compositional changes in the cell walls, membrane lipids, and proteins in the leaves of *Ipomoea purpurea*: An FT-IR spectroscopy study, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 162, pp. 715–722, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.171.
- [123] A. Abruzzo *et al.*, Mucoadhesive and mucopenetrating chitosan nanoparticles for glycopeptide antibiotic administration, *Int. J. Pharm.*, vol. 606, p. 120874, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120874.
- [124] A. Kumar and K. Y. J. Zhang, Human Chitinases: Structure, Function, and Inhibitor Discovery, *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1142, pp. 221–251, 2019, doi: 10.1007/978-981-13-7318-3_11.
- [125] N. Islam, I. Dmour, and M. O. Taha, Degradability of chitosan micro/nanoparticles for pulmonary drug delivery, *Heliyon*, vol. 5, no. 5, p. e01684, May 2019, doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01684.
- [126] B. Hu, Y. Guo, H. Li, X. Liu, Y. Fu, and F. Ding, Recent advances in chitosan-based layer-by-layer biomaterials and their biomedical applications, *Carbohydr. Polym.*, vol. 271, p. 118427, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118427.
- [127] J. M. Vaz, D. Pezzoli, P. Chevallier, C. S. Campelo, G. Candiani, and D. Mantovani, Antibacterial Coatings Based on Chitosan for Pharmaceutical and Biomedical Applications, *Curr. Pharm. Des.*, vol. 24, no. 8, pp. 866–885, 2018, doi: 10.2174/1381612824666180219143900.

- [128]M. Ito, A. Koga, A. Nishida, A. Shiraishi, M. Saito, and K. Hayashi, Evaluation of mechanical properties of trabecular and cortical bone, *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 496, pp. 47–56, 2001, doi: 10.1007/978-1-4615-0651-5_6.
- [129]B. McClarren and R. Olabisi, Strain and Vibration in Mesenchymal Stem Cells, *Int. J. Biomater.*, vol. 2018, p. 8686794, 2018, doi: 10.1155/2018/8686794.
- [130]Orientated crystallization in drawn thermoplastic polyimide modified by carbon nanofibers - Smirnova - 2009 - Polymer Engineering & Science - Wiley Online Library. Accessed: Aug. 23, 2022. [Online]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pen.21241>
- [131]M. Xie *et al.*, Chitosan nanocomposite films based on halloysite nanotubes modification for potential biomedical applications, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 151, pp. 1116–1125, May 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.154.
- [132]J. Yan, T. Wu, Z. Ding, and X. Li, Preparation and characterization of carbon nanotubes/chitosan composite foam with enhanced elastic property, *Carbohydr. Polym.*, vol. 136, pp. 1288–1296, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.carbpol.2015.10.049.
- [133]M. Liu, C. Wu, Y. Jiao, S. Xiong, and C. Zhou, Chitosan-halloysite nanotubes nanocomposite scaffolds for tissue engineering, *J. Mater. Chem. B*, vol. 1, no. 15, pp. 2078–2089, Apr. 2013, doi: 10.1039/c3tb20084a.
- [134]Y. Zhang, M. Ni, M. Zhang, and B. Ratner, Calcium phosphate-chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering, *Tissue Eng.*, vol. 9, no. 2, pp. 337–345, Apr. 2003, doi: 10.1089/107632703764664800.
- [135]Y. Jiao, Z. Liu, and C. Zhou, Fabrication and characterization of PLLA-chitosan hybrid scaffolds with improved cell compatibility, *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 80, no. 4, pp. 820–825, Mar. 2007, doi: 10.1002/jbm.a.31061.
- [136]X. Niu *et al.*, Homogeneous chitosan/poly(L-lactide) composite scaffolds prepared by emulsion freeze-drying, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 23, no. 1–4, pp. 391–404, 2012, doi: 10.1163/092050610X551961.
- [137]M. Shah Mohammadi, M. N. Bureau, and S. N. Nazhat, Polylactic acid (PLA) biomedical foams for tissue engineering, in *Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications*, Elsevier, 2014, pp. 313–334. doi: 10.1533/9780857097033.2.313.
- [138]A. Privalova *et al.*, Biodegradable polyester-based microcarriers with modified surface tailored for tissue engineering, *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 103, no. 3, pp. 939–948, Mar. 2015, doi: 10.1002/jbm.a.35231.
- [139]D. Chen *et al.*, Effect of inflammation on endothelial cells induced by poly-L-lactic acid degradation in vitro and in vivo, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 29, no. 15, pp. 1909–1919, Oct. 2018, doi: 10.1080/09205063.2018.1517858.

- [140] H. Chai *et al.*, The fabrication of polylactide/cellulose nanocomposites with enhanced crystallization and mechanical properties, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 155, pp. 1578–1588, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.135.
- [141] X. Huang *et al.*, Core-Shell Poly(l-lactic acid)-Hyaluronic Acid Nanofibers for Cell Culture and Pelvic Ligament Tissue Engineering, *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 17, no. 3, pp. 399–406, Mar. 2021, doi: 10.1166/jbn.2021.3057.
- [142] W. Zhao *et al.*, Synthetic/natural blended polymer fibrous meshes composed of polylactide, gelatin and glycosaminoglycan for cartilage repair, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 31, no. 11, pp. 1437–1456, Aug. 2020, doi: 10.1080/09205063.2020.1760701.
- [143] T. Ouchi, T. Saito, T. Kontani, and Y. Ohya, Encapsulation and/or release behavior of bovine serum albumin within and from polylactide-grafted dextran microspheres, *Macromol. Biosci.*, vol. 4, no. 4, pp. 458–463, Apr. 2004, doi: 10.1002/mabi.200300106.
- [144] X. Shi, J. Wu, Z. Wang, F. Song, W. Gao, and S. Liu, Synthesis and properties of a temperature-sensitive hydrogel based on physical crosslinking via stereocomplexation of PLLA-PDLA, *RSC Adv.*, vol. 10, no. 34, pp. 19759–19769, May 2020, doi: 10.1039/d0ra01790f.
- [145] Dextrin crosslinked with poly(lactic acid): A novel hydrogel for controlled drug release application - Das - 2014 - Journal of Applied Polymer Science - Wiley Online Library. Accessed: Aug. 23, 2022. [Online]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/app.40039>
- [146] Y. H. Bae, K. M. Huh, Y. Kim, and K. Park, Biodegradable amphiphilic multiblock copolymers and their implications for biomedical applications, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 64, no. 1–3, pp. 3–13, Feb. 2000, doi: 10.1016/s0168-3659(99)00126-1.
- [147] J. Coudane, H. Van Den Berghe, J. Mouton, X. Garric, and B. Nottelet, Poly(Lactic Acid)-Based Graft Copolymers: Syntheses Strategies and Improvement of Properties for Biomedical and Environmentally Friendly Applications: A Review, *Molecules*, vol. 27, no. 13, p. 4135, Jun. 2022, doi: 10.3390/molecules27134135.
- [148] R. V. Castillo, A. J. Müller, M.-C. Lin, H.-L. Chen, U.-S. Jeng, and M. A. Hillmyer, Confined Crystallization and Morphology of Melt Segregated PLLA-b-PE and PLDA-b-PE Diblock Copolymers, *Macromolecules*, vol. 41, no. 16, pp. 6154–6164, Aug. 2008, doi: 10.1021/ma800859y.

- [149]K. Siennicka, A. Zołocińska, T. Dębski, and Z. Pojda, Comparison of the Donor Age-Dependent and In Vitro Culture-Dependent Mesenchymal Stem Cell Aging in Rat Model, *Stem Cells Int.*, vol. 2021, p. 6665358, 2021, doi: 10.1155/2021/6665358.
- [150]L. E. van der Wagen *et al.*, Efficacy of MSC for steroid-refractory acute GVHD associates with MSC donor age and a defined molecular profile, *Bone Marrow Transplant.*, vol. 55, no. 11, pp. 2188–2192, Nov. 2020, doi: 10.1038/s41409-020-0910-9.
- [151]M. S. Carvalho, L. Alves, I. Bogalho, J. M. S. Cabral, and C. L. da Silva, Impact of Donor Age on the Osteogenic Supportive Capacity of Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Matrix, *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 9, p. 747521, 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.747521.
- [152]W. Li, L. Li, and L. Hui, Cell Plasticity in Liver Regeneration, *Trends Cell Biol.*, vol. 30, no. 4, pp. 329–338, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.tcb.2020.01.007.
- [153]J. L. Liesveld, N. Sharma, and O. S. Aljitawi, Stem cell homing: From physiology to therapeutics, *Stem Cells Dayt. Ohio*, vol. 38, no. 10, pp. 1241–1253, Oct. 2020, doi: 10.1002/stem.3242.
- [154]S. Hosseini, L. Taghiyar, F. Safari, and M. Baghaban Eslaminejad, Regenerative Medicine Applications of Mesenchymal Stem Cells, *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1089, pp. 115–141, 2018, doi: 10.1007/5584_2018_213.
- [155]J. M. Gluck, C. Delman, J. Chyu, W. R. MacLellan, R. J. Shemin, and S. Heydarkhan-Hagvall, Microenvironment influences vascular differentiation of murine cardiovascular progenitor cells, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, vol. 102, no. 8, pp. 1730–1739, Nov. 2014, doi: 10.1002/jbm.b.33155.
- [156]M. Rampichová *et al.*, Elastic three-dimensional poly (ϵ -caprolactone) nanofibre scaffold enhances migration, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Cell Prolif.*, vol. 46, no. 1, pp. 23–37, Feb. 2013, doi: 10.1111/cpr.12001.
- [157]D. Vaikkath, R. Anitha, B. Sumathy, and P. D. Nair, A simple and effective method for making multipotent/multilineage scaffolds with hydrophilic nature without any postmodification/treatment, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 141, pp. 112–119, May 2016, doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.12.041.
- [158]A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher, Matrix elasticity directs stem cell lineage specification, *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 677–689, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.06.044.
- [159]J. Lee, A. A. Abdeen, X. Tang, T. A. Saif, and K. A. Kilian, Matrix directed adipogenesis and neurogenesis of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue

- and bone marrow, *Acta Biomater.*, vol. 42, pp. 46–55, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.actbio.2016.06.037.
- [160] W. Wan *et al.*, Synergistic Effect of Matrix Stiffness and Inflammatory Factors on Osteogenic Differentiation of MSC, *Biophys. J.*, vol. 117, no. 1, p. 129, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.bpj.2019.05.019.
- [161] B. Teong *et al.*, The stiffness of a crosslinked hyaluronan hydrogel affects its chondro-induction activity on hADSCs, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, vol. 106, no. 2, pp. 808–816, Feb. 2018, doi: 10.1002/jbm.b.33881.
- [162] A. Ardeshirylajimi, M. Delgoshai, S. Mirzaei, and A. Khojasteh, Different Porosities of Chitosan Can Influence the Osteogenic Differentiation Potential of Stem Cells, *J. Cell. Biochem.*, vol. 119, no. 1, pp. 625–633, Jan. 2018, doi: 10.1002/jcb.26223.
- [163] Y. He *et al.*, Effects of VEGF-ANG-1-PLA nano-sustained release microspheres on proliferation and differentiation of ADSCs, *Cell Biol. Int.*, vol. 42, no. 8, pp. 1060–1068, Aug. 2018, doi: 10.1002/cbin.10986.
- [164] D. Wang, E. Wang, K. Liu, C.-H. Xia, S. Li, and X. Gong, Roles of TGF β and FGF signals during growth and differentiation of mouse lens epithelial cell in vitro, *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 7274, Aug. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-07619-5.
- [165] Z. Pan *et al.*, The combination of forskolin and VPA increases gene expression efficiency to the hypoxia/neuron-specific system, *Ann. Transl. Med.*, vol. 8, no. 15, p. 933, Aug. 2020, doi: 10.21037/atm-20-3871.
- [166] C. H. Jang, G. W. Cho, and A.-J. Song, Effect of Bone Powder/Mesenchymal Stem Cell/BMP2/Fibrin Glue on Osteogenesis in a Mastoid Obliteration Model, *Vivo Athens Greece*, vol. 34, no. 3, pp. 1103–1110, Jun. 2020, doi: 10.21873/invivo.11881.
- [167] F. Posa *et al.*, Vitamin D Promotes MSC Osteogenic Differentiation Stimulating Cell Adhesion and α V β 3 Expression, *Stem Cells Int.*, vol. 2018, p. 6958713, 2018, doi: 10.1155/2018/6958713.
- [168] E. Hasanzadeh *et al.*, The stability evaluation of mesenchymal stem cells differentiation toward endothelial cells by chemical and mechanical stimulation, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, vol. 53, no. 9, pp. 818–826, Oct. 2017, doi: 10.1007/s11626-017-0165-y.
- [169] H. Liu, J. F. Usprech, P. K. Parameshwar, Y. Sun, and C. A. Simmons, Combinatorial screen of dynamic mechanical stimuli for predictive control of MSC mechano-responsiveness, *Sci. Adv.*, vol. 7, no. 19, p. eabe7204, May 2021, doi: 10.1126/sciadv.abe7204.

- [170] J. R. Choi, K. W. Yong, and J. Y. Choi, Effects of mechanical loading on human mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering, *J. Cell. Physiol.*, vol. 233, no. 3, pp. 1913–1928, 2018, doi: 10.1002/jcp.26018.
- [171] M. M. Bekhite, H.-R. Figulla, H. Sauer, and M. Wartenberg, Static magnetic fields increase cardiomyocyte differentiation of Flk-1+ cells derived from mouse embryonic stem cells via Ca²⁺ influx and ROS production, *Int. J. Cardiol.*, vol. 167, no. 3, pp. 798–808, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.ijcard.2012.02.020.
- [172] Influence of static magnetic fields combined with human insulin-like growth factor 1 on human satellite cell cultures - PubMed. Accessed: Aug. 01, 2022. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25189891/>
- [173] N. Bloise *et al.*, The effect of pulsed electromagnetic field exposure on osteoinduction of human mesenchymal stem cells cultured on nano-TiO₂ surfaces, *PloS One*, vol. 13, no. 6, p. e0199046, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0199046.
- [174] A. Neureiter, E. Eberhardt, and A. Lampert, Differentiation of iPS-Cells into Peripheral Sensory Neurons, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 2429, pp. 175–188, 2022, doi: 10.1007/978-1-0716-1979-7_11.
- [175] Q. Sun, J. Sheng, and R. Yang, Controllable biodegradation and drug release behavior of chitosan-graft-poly(D, L-lactic acid) synthesized by an efficient method, *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 186, p. 109458, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2020.109458.
- [176] L. Li, S. Ding, and C. Zhou, Preparation and degradation of PLA/chitosan composite materials, *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 91, no. 1, pp. 274–277, Jan. 2004, doi: 10.1002/app.12954.
- [177] Z. Li, B. H. Tan, T. Lin, and C. He, Recent advances in stereocomplexation of enantiomeric PLA-based copolymers and applications, *Prog. Polym. Sci.*, vol. 62, pp. 22–72, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2016.05.003.
- [178] T. S. Demina, D. S. Zaytseva-Zotova, T. A. Akopova, A. N. Zelenetskii, and E. A. Markvicheva, Macroporous hydrogels based on chitosan derivatives: Preparation, characterization, and *in vitro* evaluation, *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 134, no. 13, Apr. 2017, doi: 10.1002/app.44651.
- [179] M. Dominici *et al.*, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*, vol. 8, no. 4, pp. 315–317, Jan. 2006, doi: 10.1080/14653240600855905.
- [180] T. Demina *et al.*, Two-Photon-Induced Microstereolithography of Chitosan-g-Oligolactides as a Function of Their Stereochemical Composition, *Polymers*, vol. 9, no. 12, p. 302, Jul. 2017, doi: 10.3390/polym9070302.

- [181]Т. С. Демина, Материалы биомедицинского назначения на основе механохимически модифицированного хитозана: дис... док. Хим. Наук 02.00.06. – Москва, 2021. – 307 с. – 111 с. Accessed: Sep. 12, 2023. [Online]. Available: <https://istina.msu.ru/dissertations/523146740/>
- [182]T. N. Popyrina, E. A. Svidchenko, T. S. Demina, T. A. Akopova, and A. N. Zelenetsky, Effect of the Chemical Structure of Chitosan Copolymers with Oligolactides on the Morphology and Properties of Macroporous Hydrogels Based on Them, *Polym. Sci. Ser. B*, vol. 63, no. 5, pp. 536–543, Sep. 2021, doi: 10.1134/S1560090421050109.
- [183]L. Tytgat *et al.*, Evaluation of 3D Printed Gelatin-Based Scaffolds with Varying Pore Size for MSC-Based Adipose Tissue Engineering, *Macromol. Biosci.*, vol. 20, no. 4, p. 1900364, Apr. 2020, doi: 10.1002/mabi.201900364.
- [184]M. Osorio *et al.*, Development of novel three-dimensional scaffolds based on bacterial nanocellulose for tissue engineering and regenerative medicine: Effect of processing methods, pore size, and surface area, *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 107, no. 2, pp. 348–359, Feb. 2019, doi: 10.1002/jbm.a.36532.
- [185]T. C. Boire *et al.*, Effect of pore size and spacing on neovascularization of a biodegradable shape memory polymer perivascular wrap, *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 109, no. 3, pp. 272–288, Mar. 2021, doi: 10.1002/jbm.a.37021.
- [186]M. J. Gupte *et al.*, Pore size directs bone marrow stromal cell fate and tissue regeneration in nanofibrous macroporous scaffolds by mediating vascularization, *Acta Biomater.*, vol. 82, pp. 1–11, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.actbio.2018.10.016.
- [187]N. Gorochovceva and R. Makuška, Synthesis and study of water-soluble chitosan-O-poly(ethylene glycol) graft copolymers, *Eur. Polym. J.*, vol. 4, no. 40, pp. 685–691, 2004, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2003.12.005.
- [188]G. E. Luckachan and C. K. S. Pillai, Chitosan/oligo L-lactide graft copolymers: Effect of hydrophobic side chains on the physico-chemical properties and biodegradability, *Carbohydr. Polym.*, vol. 64, no. 2, pp. 254–266, May 2006, doi: 10.1016/j.carbpol.2005.11.035.
- [189]A. B. Kutikov and J. Song, Biodegradable PEG-Based Amphiphilic Block Copolymers for Tissue Engineering Applications, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 1, no. 7, pp. 463–480, Jul. 2015, doi: 10.1021/acsbiomaterials.5b00122.
- [190]Aguilar *et al.*, Application of Chitosan in Bone and Dental Engineering, *Molecules*, vol. 24, no. 16, p. 3009, Aug. 2019, doi: 10.3390/molecules24163009.
- [191]G. D. Mahumane, P. Kumar, L. C. du Toit, Y. E. Choonara, and V. Pillay, 3D scaffolds for brain tissue regeneration: architectural challenges, *Biomater. Sci.*, vol. 6, no. 11, pp. 2812–2837, 2018, doi: 10.1039/C8BM00422F.

- [192] A. Mukhopadhyay *et al.*, Improved Mesenchymal Stem Cell Proliferation, Differentiation, Epithelial Transition, and Restrained Senescence on Hierarchically Patterned Porous Honey Silk Fibroin Scaffolds, *ACS Appl. Bio Mater.*, vol. 4, no. 5, pp. 4328–4344, May 2021, doi: 10.1021/acsabm.1c00115.
- [193] W. Qi, P. Cai, W. Yuan, and H. Wang, Tunable swelling of polyelectrolyte multilayers in cell culture media for modulating NIH-3T3 cells adhesion, *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 102, no. 11, pp. 4071–4077, Nov. 2014, doi: 10.1002/jbm.a.35094.
- [194] N. de Jonge, J. Foolen, M. C. P. Brugmans, S. H. M. Söntjens, F. P. T. Baaijens, and C. V. C. Bouten, Degree of scaffold degradation influences collagen (re)orientation in engineered tissues, *Tissue Eng. Part A*, vol. 20, no. 11–12, pp. 1747–1757, Jun. 2014, doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0517.
- [195] S. S. Shah *et al.*, Optimization of Degradation Profile for New Scaffold in Cartilage Repair, *Cartilage*, vol. 9, no. 4, pp. 438–449, Oct. 2018, doi: 10.1177/1947603517700954.
- [196] G. Chen, R. Xu, C. Zhang, and Y. Lv, Responses of MSCs to 3D Scaffold Matrix Mechanical Properties under Oscillatory Perfusion Culture, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 2, pp. 1207–1218, Jan. 2017, doi: 10.1021/acsami.6b10745.
- [197] M. Joyce, T. Hodgkinson, M. Lemoine, A. González-Vázquez, D. J. Kelly, and F. J. O'Brien, Development of a 3D-printed bioabsorbable composite scaffold with mechanical properties suitable for treating large, load-bearing articular cartilage defects, *Eur. Cell. Mater.*, vol. 45, pp. 158–172, Jun. 2023, doi: 10.22203/eCM.v045a11.
- [198] А. М. Бочек, Н. М. Забивалова, Е. Н. Попова, М. Ф. Лебедева, В. К. Лаврентьев, and В. Е. Юдин, Влияние Природы Кислоты На Свойства Растворов Смесей Метилцеллюлозы С Хитозаном И Композиционных Пленок На Их Основе, *Высокомолекулярные Соединения Серия А*, vol. 63, no. 1, pp. 66–80, 2021, doi: 10.31857/S2308112021010028.
- [199] В. Э. Гюнтер, Материалы с памятью формы и новые медицинские технологии : [сборник статей и материалов], 2010, Accessed: Sep. 13, 2023. [Online]. Available: <https://www.openrepository.ru/article?id=327761>
- [200] M. Amabili, P. Balasubramanian, I. Bozzo, I. D. Breslavsky, and G. Ferrari, Layer-specific hyperelastic and viscoelastic characterization of human descending thoracic aortas, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 99, pp. 27–46, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.jmbbm.2019.07.008.
- [201] M. Ghosh *et al.*, The Impact of Biomaterial Cell Contact on the Immuno-peptidome, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 8, p. 571294, 2020, doi: 10.3389/fbioe.2020.571294.

- [202]H. Rammal *et al.*, Combining Calcium Phosphates with Polysaccharides: A Bone-Inspired Material Modulating Monocyte/Macrophage Early Inflammatory Response, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 11, p. E3458, Nov. 2018, doi: 10.3390/ijms19113458.
- [203]W. Chanput, J. J. Mes, and H. J. Wichers, THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach, *Int. Immunopharmacol.*, vol. 23, no. 1, pp. 37–45, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.intimp.2014.08.002.
- [204]K. Tan *et al.*, CD73 Expression on Mesenchymal Stem Cells Dictates the Reparative Properties via Its Anti-Inflammatory Activity, *Stem Cells Int.*, vol. 2019, p. e8717694, May 2019, doi: 10.1155/2019/8717694.
- [205]A. Mildmay-White and W. Khan, Cell Surface Markers on Adipose-Derived Stem Cells: A Systematic Review, *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, vol. 12, no. 6, pp. 484–492.
- [206]G.-S. Huang, L.-G. Dai, B. L. Yen, and S. Hsu, Spheroid formation of mesenchymal stem cells on chitosan and chitosan-hyaluronan membranes, *Biomaterials*, vol. 32, no. 29, pp. 6929–6945, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.092.
- [207]N.-C. Cheng, S. Wang, and T.-H. Young, The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities, *Biomaterials*, vol. 33, no. 6, pp. 1748–1758, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.11.049.
- [208]M. Kanawa *et al.*, The Identification of Marker Genes for Predicting the Osteogenic Differentiation Potential of Mesenchymal Stromal Cells, *Curr. Issues Mol. Biol.*, vol. 43, no. 3, Art. no. 3, Dec. 2021, doi: 10.3390/cimb43030150.
- [209]Q. Chen *et al.*, An osteopontin-integrin interaction plays a critical role in directing adipogenesis and osteogenesis by mesenchymal stem cells, *Stem Cells Dayt. Ohio*, vol. 32, no. 2, pp. 327–337, Feb. 2014, doi: 10.1002/stem.1567.
- [210]X. Luo *et al.*, Osteogenic BMPs promote tumor growth of human osteosarcomas that harbor differentiation defects, *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, vol. 88, no. 12, pp. 1264–1277, Dec. 2008, doi: 10.1038/labinvest.2008.98.
- [211]T. Komori, Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation, *Histochem. Cell Biol.*, vol. 149, no. 4, pp. 313–323, Apr. 2018, doi: 10.1007/s00418-018-1640-6.
- [212]J. Grzesiak, A. Śmieszek, and K. Marycz, Ultrastructural changes during osteogenic differentiation in mesenchymal stromal cells cultured in alginate hydrogel, *Cell Biosci.*, vol. 7, p. 2, Jan. 2017, doi: 10.1186/s13578-016-0128-0.
- [213]H. Xiong *et al.*, Chitosan inhibits inflammation and adipogenesis of orbital fibroblasts in Graves ophthalmopathy, *Mol. Vis.*, vol. 24, pp. 509–517, Jul. 2018.

- [214]E. J. Cho *et al.*, Chitosan oligosaccharides inhibit adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes, *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 18, no. 1, pp. 80–87, Jan. 2008.
- [215]Y. Kambe, S. Ogino, H. Yamanaka, N. Morimoto, and T. Yamaoka, Adipose tissue regeneration in a 3D-printed poly(lactic acid) frame-supported space in the inguinal region of rats, *Biomed. Mater. Eng.*, vol. 31, no. 4, pp. 203–210, 2020, doi: 10.3233/BME-201103.
- [216]Y. Li *et al.*, PPAR- γ and Wnt Regulate the Differentiation of MSCs into Adipocytes and Osteoblasts Respectively, *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, vol. 13, no. 3, pp. 185–192, Feb. 2018, doi: 10.2174/1574888X12666171012141908.
- [217]T. Kadowaki, T. Yamauchi, H. Waki, M. Iwabuchi, M. Okada-Iwabuchi, and M. Nakamura, Adiponectin, adiponectin receptors, and epigenetic regulation of adipogenesis, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, vol. 76, pp. 257–265, 2011, doi: 10.1101/sqb.2012.76.010587.
- [218]D. Moseti, A. Regassa, and W.-K. Kim, Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 1, p. 124, Jan. 2016, doi: 10.3390/ijms17010124.
- [219]C. W. Patrick Jr., B. Zheng, C. Johnston, and G. P. Reece, Long-term implantation of preadipocyte-seeded PLGA scaffolds, *Tissue Eng.*, vol. 8, no. 2, pp. 283–293, 2002, doi: 10.1089/107632702753725049.
- [220]J. Yang *et al.*, In situ Adipogenesis in Biomaterials Without Cell Seeds: Current Status and Perspectives, *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 9, p. 647149, Mar. 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.647149.
- [221]H. Karagoz, F. Zor, E. Goktas, and V. S. Gorantla, Adipogenesis for soft tissue reconstruction, *Curr. Opin. Organ Transplant.*, vol. 24, no. 5, p. 598, Oct. 2019, doi: 10.1097/MOT.0000000000000694.
- [222]D. A. Young and K. L. Christman, Injectable Biomaterials for Adipose Tissue Engineering, *Biomed. Mater. Bristol Engl.*, vol. 7, no. 2, p. 024104, Apr. 2012, doi: 10.1088/1748-6041/7/2/024104.