

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва, 2024 г.

Работа выполнена в лаборатории биомедицинских материалов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный руководитель: **Марквичева Елена Арнольдовна**, доктор химических наук

Официальные оппоненты: **Горин Дмитрий Александрович**, доктор химических наук, профессор центра фотоники и фотонных технологий автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий»

Ефименко Анастасия Юрьевна, кандидат медицинских наук, зав. лабораторией репарации и регенерации тканей Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра, доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Ведущая организация: Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Защита состоится 5 июня 2024 г. в 11 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, г. Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая 16/10.

С текстом диссертации можно ознакомиться в библиотеке ИБХ РАН и на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан _____

Учёный секретарь
Диссертационного
совета,
доктор физико-
математических наук



В.А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Изменения в образе жизни людей и улучшение её качества способствуют увеличению продолжительности жизни и, как следствие, появлению новых заболеваний. Старение населения обуславливает увеличение количества хронических расстройств, что увеличивает и 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. 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. 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. Перспективными представляются матриксы на основе природного полисахарида хитозана (Хит), которые биосовместимы, не иммуногенны и обладают антибактериальными свойствами. Однако низкий уровень механической прочности и скорости биодеградации таких матриксов, а также их высокая гидрофильность ограничивают их применение в тканевой инженерии. Для создания матриксов с оптимальными свойствами все чаще используют композитные биоматериалы, например, комбинируют хитозан с другими полимерами или получают сополимеры с хитозаном.

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

Для достижения поставленной цели предстояло решить следующие задачи:

1. Получить и охарактеризовать матриксы (плёнки и макропористые гидрогели) на основе хитозана и его сополимеров с олиголактоидами. 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 матриксов 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 матриксах 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-/L,D-лактидами) (Хит-LL, Хит-LD) были 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 мышечных 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 (мышечные фибробласты L929, мезенхимальные стромальные клетки (МСК), выделенные из жировой ткани человека). Впервые установлено, что пленки на основе сополимеров Хит с олиголактидами могут влиять на остео- 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 остео- 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 мышечных

фибробластов (L929) и культивирования в их присутствии клеток линии острого моноцитарного лейкоза человека (ТНР-1).

3. Мышечные 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. Матрикс (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. Матрикс 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

Начальным этапом исследования матриц на основе хитозана и его сополимеров с олиголактидами было изучение структуры, набухаемости и деградации, поскольку именно эти параметры определяют возможность культивирования на/в них животных клеток. В работе были изучены образцы пленок на основе сополимеров хитозана с олиголактидами и макропористые гидрогели аналогичного состава.

1.1. Структура матриц

Структура полученных макропористых гидрогелей в набухом состоянии была изучена методом конфокальной лазерной микроскопии (Рис. 1).

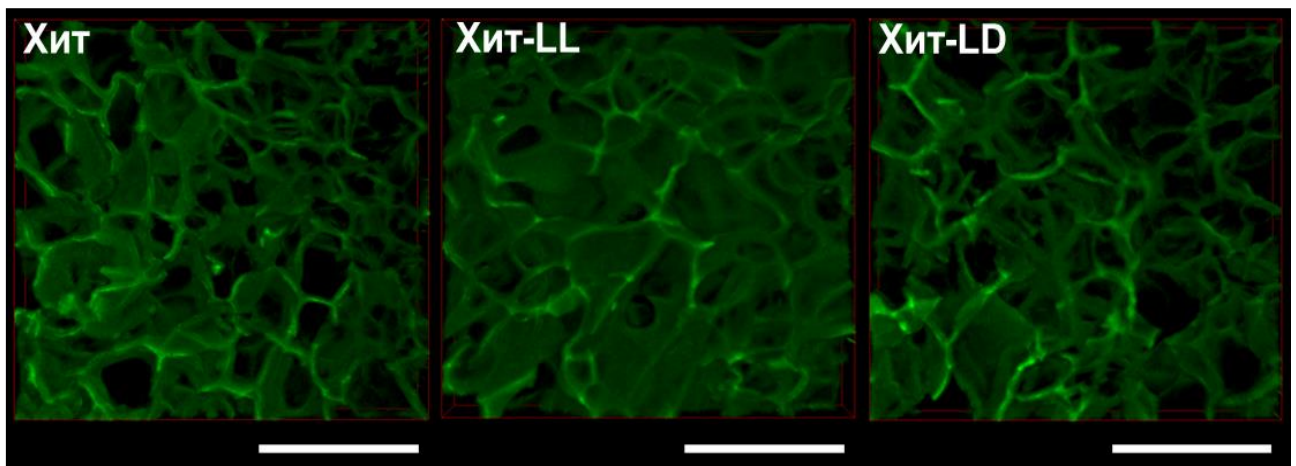


Рисунок 1 – Структура образцов гидрогелей на основе хитозана (Хит) и его сополимеров с олиголактидами: Хит-LL - с олиго(L,L-лактидом); Хит-LD - с олиго(L,D-лактидом). Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Шкала 500 мкм

Как видно на рисунке 1, макропористые гидрогели имели трехмерную (3D) структуру, представляющую собой систему открытых взаимосвязанных пор. Распределение пор по размерам представлено на рисунке 2. 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. Таким образом, 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.

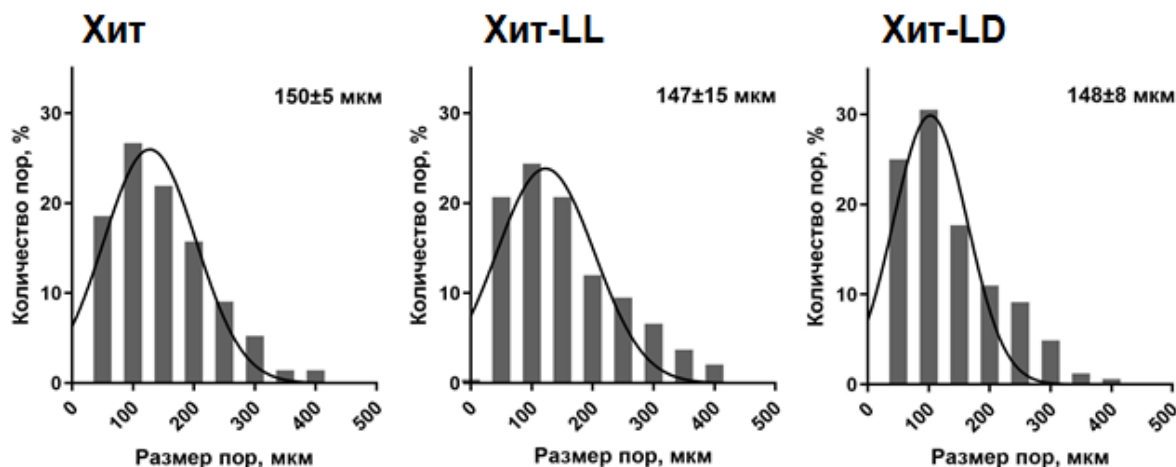


Рисунок 2 – Распределение пор по размерам в гидрогелях на основе хитозана (Хит) и его сополимеров с олиголактидами: Хит-LL - с олиго(L,L-лактидом); Хит-LD - с олиго(L,D-лактидом)

Из рисунков 1 и 2 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 2) 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. Кроме того, следует отметить преобладание внутримолекулярных взаимодействий в сополимерах на основе хитозана, которые содержали именно фрагменты олиго(L,L-лактида).

Установлено, что во всех образцах гидрогелей размер пор являлся оптимальным для роста и пролиферации клеток. 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. В частности, увеличение показателя неоваскуляризации коррелирует с увеличением размера пор. Таким образом, исследуемые в нашей работе макропористые матриксы на основе хитозана и сополимеров хитозана с олиголактидами имели структуру, которая удовлетворяла всем требованиям, предъявляемым к скаффолдам для тканевой инженерии.

1.2. Набухаемость матриц

Известно, что набухаемость гидрогелей является одним из ключевых параметров при изучении физико-химических свойств матриц для тканевой инженерии. В данной работе исследовали равновесную набухаемость макропористых гидрогелей (Рисунок 3). Равновесная набухаемость макропористого гидрогеля Хит в среде DMEM составила $27,8 \pm 1,8$ мл/г после 24 ч инкубации (Рисунок 3). 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. В результате отмечали увеличение гидрофильности образца Хит-LL по сравнению с Хит в водной среде, несмотря на гидрофобность боковых цепей олиго(L,L-лактида). Кроме того, как видно из рисунка 3, матриксы 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.

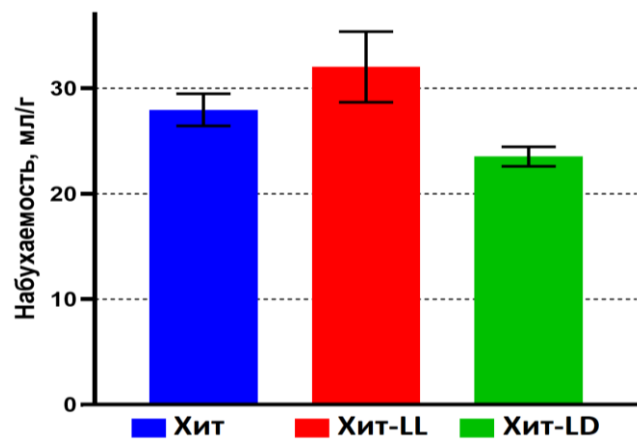


Рисунок 3 – Равновесная степень набухания образцов макропористых гидрогелей на основе хитозана (Хит) и его сополимеров с олиго(L,L-лактидом) (Хит-LL) и олиго(L,D-лактидом) (Хит-LD). Инкубация в среде культивирования DMEM в течение 24 ч. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение

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. Оптимизация влагоудерживающей способности матриксов также имеет большое значение, поскольку повышенная набухаемость имплантированных матриксов *in vivo* может привести к расшатыванию и смещению имплантата. Кроме того, изучение набухания полимерных гидрогелей является важной задачей при разработке скаффолдов, так как таким образом позволяет оценить их гидрофильность и сродство к клеткам.

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.

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 лизоцима (2 мг/мл в ФБ (pH 7,4)) при 37°C (Рисунок 4).

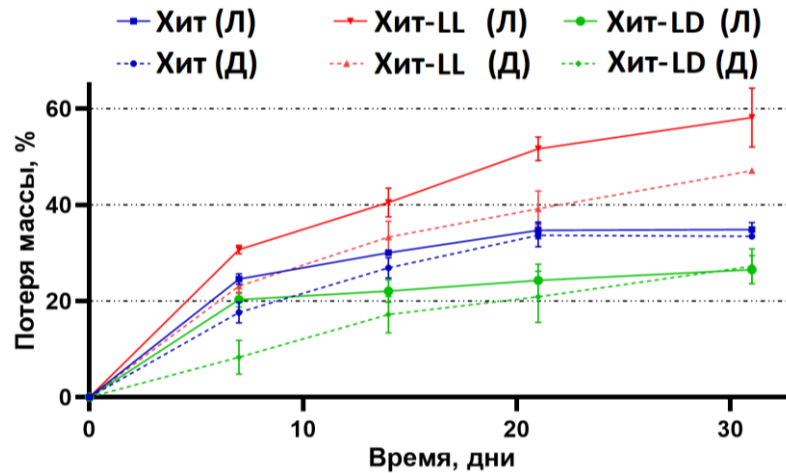


Рисунок 4 – Кинетика биодegradации образцов макропористых гидрогелей на основе хитозана (Хит); сополимера хитозана с олиго(L, L-лактидом) (Хит-LL); сополимера хитозана с олиго(L, D-лактидом) (Хит-LD) после их инкубации в среде DMEM (Д) или растворе лизоцима (Л) при 37°C. Концентрация лизоцима – 2мг/мл в ФБ. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение

Из рисунка 4 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. Следует также отметить, что степень деградации хорошо коррелировала с результатами по набуханию образцов (см. 1.2.). Более того, наши результаты, и, в частности, тот факт, что увеличение набухания способствовало усилению биодegradации гидрогеля, хорошо согласуются с ранее опубликованными данными. Скорость биодegradации матриксов играет важную роль при регенерации несущих нагрузку тканей. Кроме того, в результате биодegradации 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. Тем не менее следует иметь в виду, что при слишком быстрой биодegradации матриксов возможно снижение количества жизнеспособных клеток из-за ранней потери механической целостности матриксов. Следовательно, можно заключить, что этот параметр очень важен для обеспечения пролиферации клеток с желаемой скоростью.

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

1.4. Исследование механических характеристик матриц

С клинической и биомеханической точки зрения при проектировании биомиметических матриц следует учитывать механические свойства естественной заменяемой ткани. Как известно, механические свойства матриц не только определяют механическую интеграцию (взаимодействие) между имплантатами и тканями хозяина, но и могут оказывать влияние на поведение клеток. В частности, матрицы должны обладать такой жесткостью и эластичностью, которые близки по своим значениям величинам соответствующих параметров тканей пациента. При разработке тканеинженерных конструкций применение матриц на основе хитозана лимитируется низкими значениями механической прочности этого природного полимера.

Были исследованы механические характеристики образцов плёнок и макропористых гидрогелей. Показано, что плёнки на основе 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, 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 формировании материалов, в то время как фрагменты олиго(L,L-лактида) образуют отдельные домены. Это наблюдение также объясняет гетерогенную топологию поверхности образцов плёнок Хит-LL. Разницу в деформационно-прочностных характеристиках пленок в зависимости от типа привитых фрагментов олиголактида также можно скорее всего объяснить структурой пленок. В частности, привитые цепи олиго(L,L-лактидов) и олиго(L,D-лактидов) вносят разный вклад во внутри-/межмолекулярные взаимодействия полимерных цепей в формовочных растворах.

При исследовании макропористых гидрогелей были получены данные о температурах стеклования образцов на основе сополимеров хитозана с олиголактидами и определён тангенс угла механических потерь путём динамического механического анализа на установке DMA 242C (NETZSCH, Германия) (Таблица 1). 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'').

Таблица 1 – 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, $T_g, ^\circ\text{C}$
Хит	$0,196 \pm 0,011$	224 ± 10
Хит-LL	$0,193 \pm 0,008$	225 ± 12
Хит-LD	$0,169 \pm 0,012$	233 ± 7

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. 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 1). Температуры стеклования образцов при этом практически не различались и составляли $224 \pm 10 ^\circ\text{C}$, $225 \pm 12 ^\circ\text{C}$ и $233 \pm 7 ^\circ\text{C}$ для образцов Хит, Хит-LL и Хит-LD, соответственно.

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

2. Исследование цитотоксичности матриксов

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. Морфологию клеток L929 после культивирования в экстрактах исследовали с помощью световой микроскопии. Результаты представлены на рисунке 5.

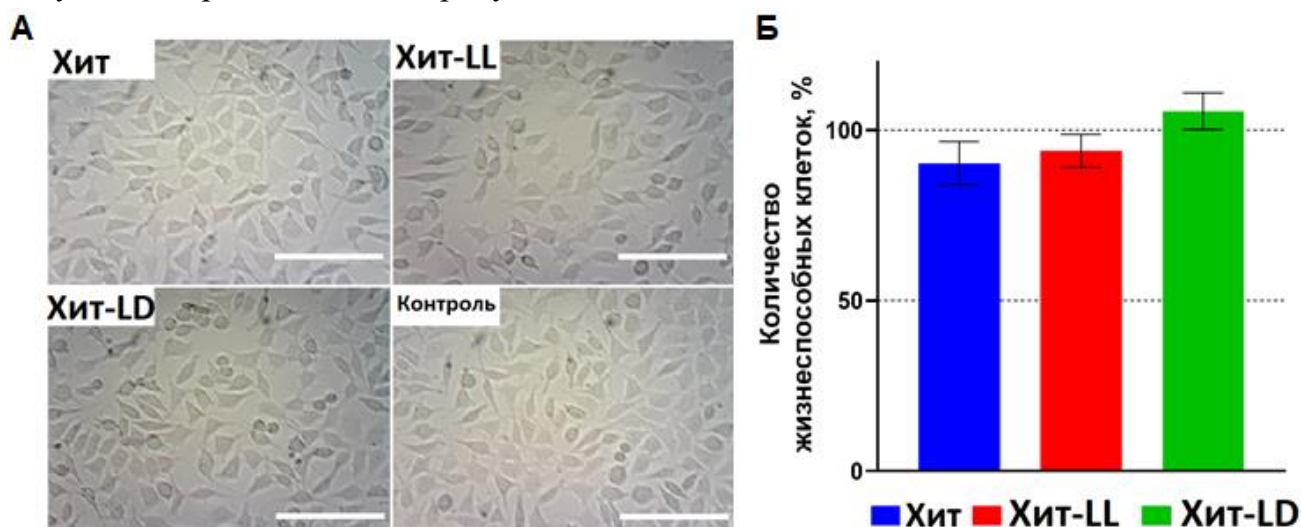


Рисунок 5 – Оценка цитотоксичности образцов макропористых гидрогелей на основе хитозана (Хит), сополимера хитозана с олиго(L,L-лактидом) (Хит-LL) и с олиго(L,D-лактидом) (Хит-LD) для клеток линии мышинных фибробластов (L929). А – микрофотографии клеток L929. Оптическая микроскопия. Шкала 100 мкм; Б – 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 ± стандартное отклонение

Как видно на рисунке 5А, 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 5Б, все экстракты были нетоксичными для клеток, при этом количества жизнеспособных клеток для всех образцов гидрогелей существенно не различались и составляли $90,3 \pm 6,1\%$, $94,0 \pm 5,4\%$ и $105,6 \pm 5,7\%$ 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. Оценка риска воспалительной реакции *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. Линия клеток острого моноцитарного лейкоза THP-1 широко используется в качестве модели воспалительной реакции в условиях *in vitro*, поскольку моноциты THP-1 и макрофаги, происходящие от них,

очень похожи на первичные моноциты и макрофаги с точки зрения их морфологии, мембранных рецепторов и секреторных продуктов.

В нашей работе уровни цитокинов после инкубации клеток ТНР-1 в течение 48 ч с образцами гидрогелей на основе хитозана, а также сополимеров хитозана с олиголактидами определяли с помощью ИФА (Рисунок 6).

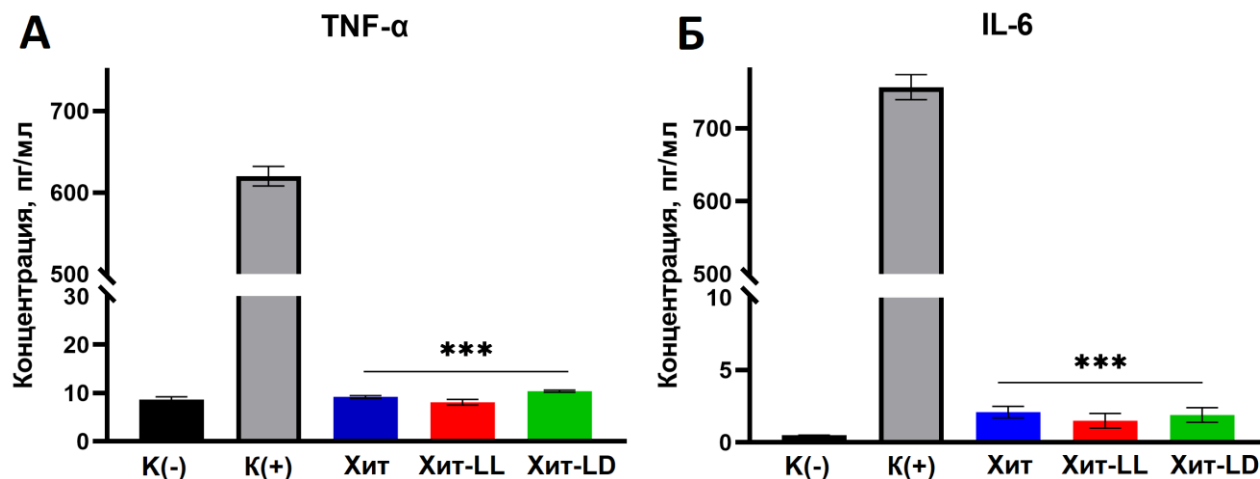


Рисунок 6 – Цитокиновый профиль клеток ТНР-1, культивируемых в присутствии образцов гидрогелей на основе хитозана (Хит), сополимера хитозана с олиго(L,L-лактидом) (Хит-LL) и олиго(L,D-лактидом) (Хит-LD). В качестве контроля использовали клетки в лунках культурального планшета (без гидрогелей). Уровни 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

Интактные клетки, которые культивировали в лунках культурального планшета, рассматривали в качестве отрицательного контроля (K-), а клетки линии ТНР-1, активированные форбол-12-мирикат-13-ацетатом (ФМА) в концентрации 20 нг/мл – в качестве положительного контроля (K+). 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 6А). Эти величины были сопоставимы с контрольным значением $8,6 \pm 0,6$ пг/мл. Как видно из рисунка 6Б, 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 ТНР-1, которые были

дифференцированы/стимулированы ФМА, наблюдали их прикрепление ко дну культурального планшета и распластывание.

Таким образом, было показано, что активация клеток 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.

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

Для изучения клеточной адгезии и морфологии, а также роста и пролиферации клеток на/в матрицах (плёнках или макропористых гидрогелях) при длительном культивировании использовали два типа клеток, а именно мышинные фибробласты L929 и МСК. 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 около 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 клетки предварительно исследовали на соответствие фенотипу стволовых клеток и подтверждали их мультипотентность.

4.1. Характеристика фенотипа МСК

Для подтверждения стволовости выделенных из ткани клеток, проводили исследование фенотипических характеристик МСК. Клетки были выделены из жировой ткани здоровых доноров и представляли собой адгезионную культуру с характерной фибробластоподобной (веретенообразной) морфологией (Рисунок 7А). При культивировании клеток в среде, содержащей индукторы остеогенной дифференцировки, фиксировали наличие отложений кальция с помощью окрашивания Ализариновым красным (Alizarin Red) через 14 дней (Рисунок 7Б). Окрашивание накоплений нейтральных липидов с помощью красителя Масляного красного (Oil Red O) подтвердило возможность дифференцировки выделенных клеток в адипогенном направлении (Рисунок 7В). Методом проточной цитометрии был также исследован иммунофенотип МСК (Рисунок 7Г). Показано, что исследуемые клетки негативны по маркерам CD34 и CD45, не экспрессировали антиген второго класса гистосовместимости (HLA-DR), слабоположительны по маркеру CD73 и положительны по маркерам CD105 и CD90.

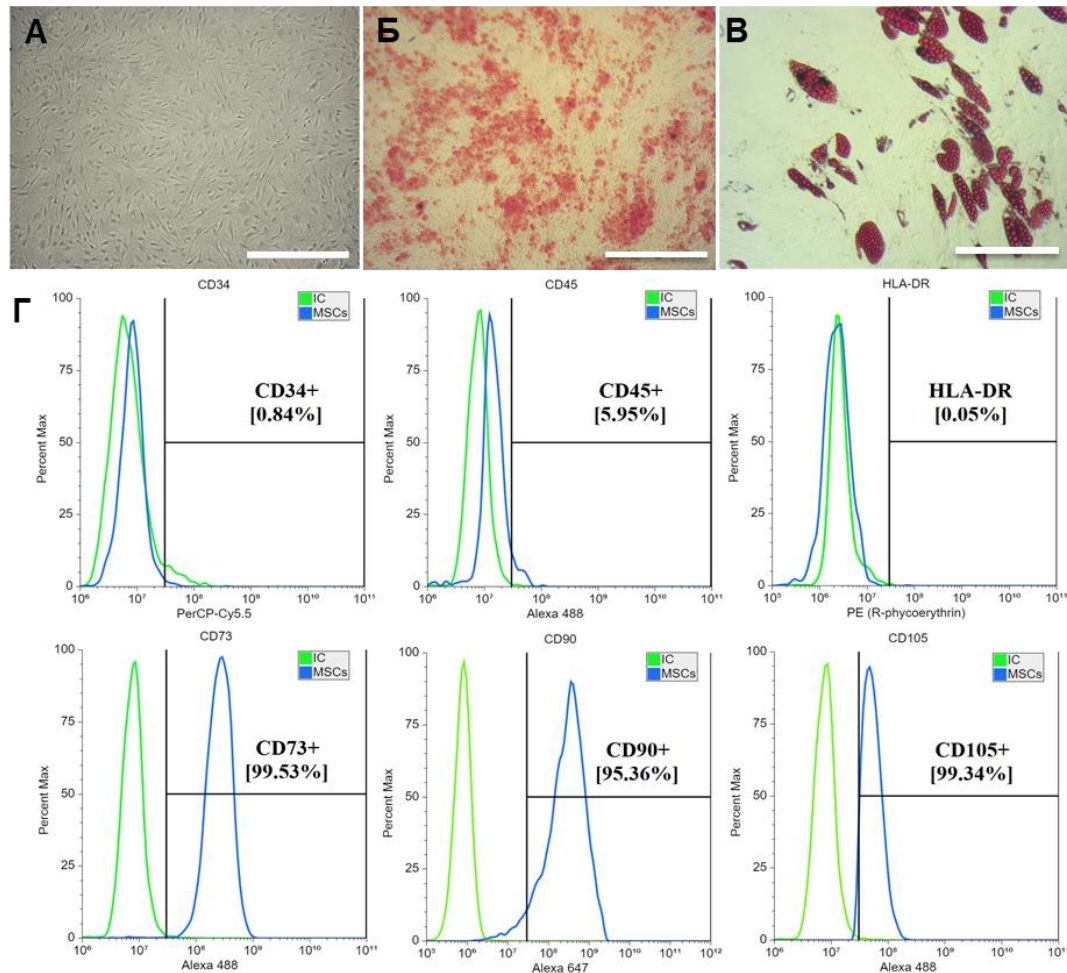


Рисунок 7 – Характеристика фенотипа МСК. А – микрофотографии МСК на 7-ой день после прикрепления. Шкала 100 мкм; Б, В – микрофотографии МСК в индуцированном остео- и адипогенном состояниях. Окрашивание отложений кальция (Ализариновый красный) и накопления нейтральных липидов (Масляный красный) через 14 дней после индукции. Шкала 100 мкм; Г – экспрессия иммунофенотипа стволовых клеток (проточная цитометрия). Гистограммы распределения интенсивности флуоресценции неокрашенных клеток (зеленый цвет - изотипический контроль) и исследуемых клеток (синий цвет). Верхняя панель: отсутствие экспрессии CD34, CD45 и HLA-DR. Нижняя панель: экспрессия CD73, CD90 и CD105

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

4.2. Морфология клеток, культивируемых на пленках

Для поддержания клеточной адгезии, распластывания, а также последующей пролиферации и/или дифференцировки клеток, матрицы должны обеспечивать соответствующие так называемые «химию поверхности» (наличие функциональных групп, заряд и т.д.) и «топографию поверхности» (рельеф поверхности).

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 8).

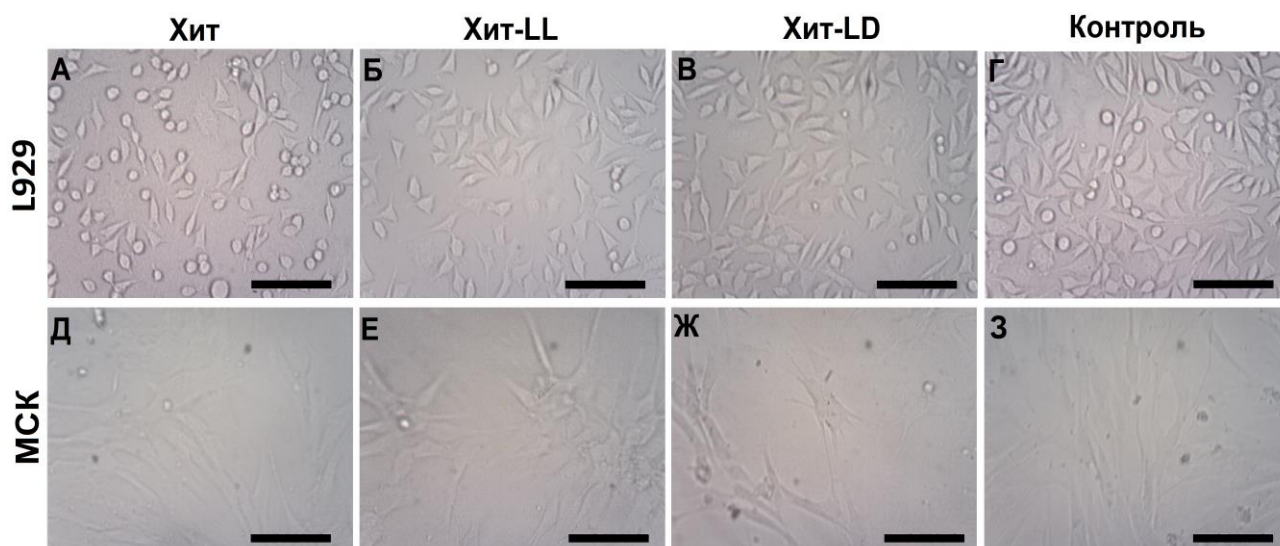


Рисунок 8 – Микрофотографии фибробластов мыши L929 (верхний ряд) и мезенхимальных стромальных клеток (МСК) (нижний ряд) на образцах плёнок из хитозана (Хит), сополимера хитозана с олиго(L, L-лактидом) (Хит-LL) и сополимера хитозана с олиго(L,D-лактидом) (Хит-LD) после культивирования в течение 4 дней. 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 8Б) и Хит-LD (Рисунок 8В) клетки L929 характеризовались веретенообразной формой, в то время как на пленке из Хит (Рисунок 8А) отмечали также достаточно много прикрепленных клеток сферической формы.

Известно, что клеточное микроокружение оказывает сильное влияние на биологию МСК. Например, 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. Однако в нашем случае большинство клеток имели типичную веретенообразную морфологию на всех образцах пленок (Рисунок 8 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. Следует отметить, что на пленках из сополимеров хитозана с олиголактидами в единичных случаях отмечали наличие неравномерно распределенных клеток или их небольших агрегатов.

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 9). Для визуализации клеток и матриц, клетки окрашивали прижизненным красителем Calcein AM (зеленым цветом), а гидрогели визуализировали по неспецифическому поглощению DAPI (синим цветом).

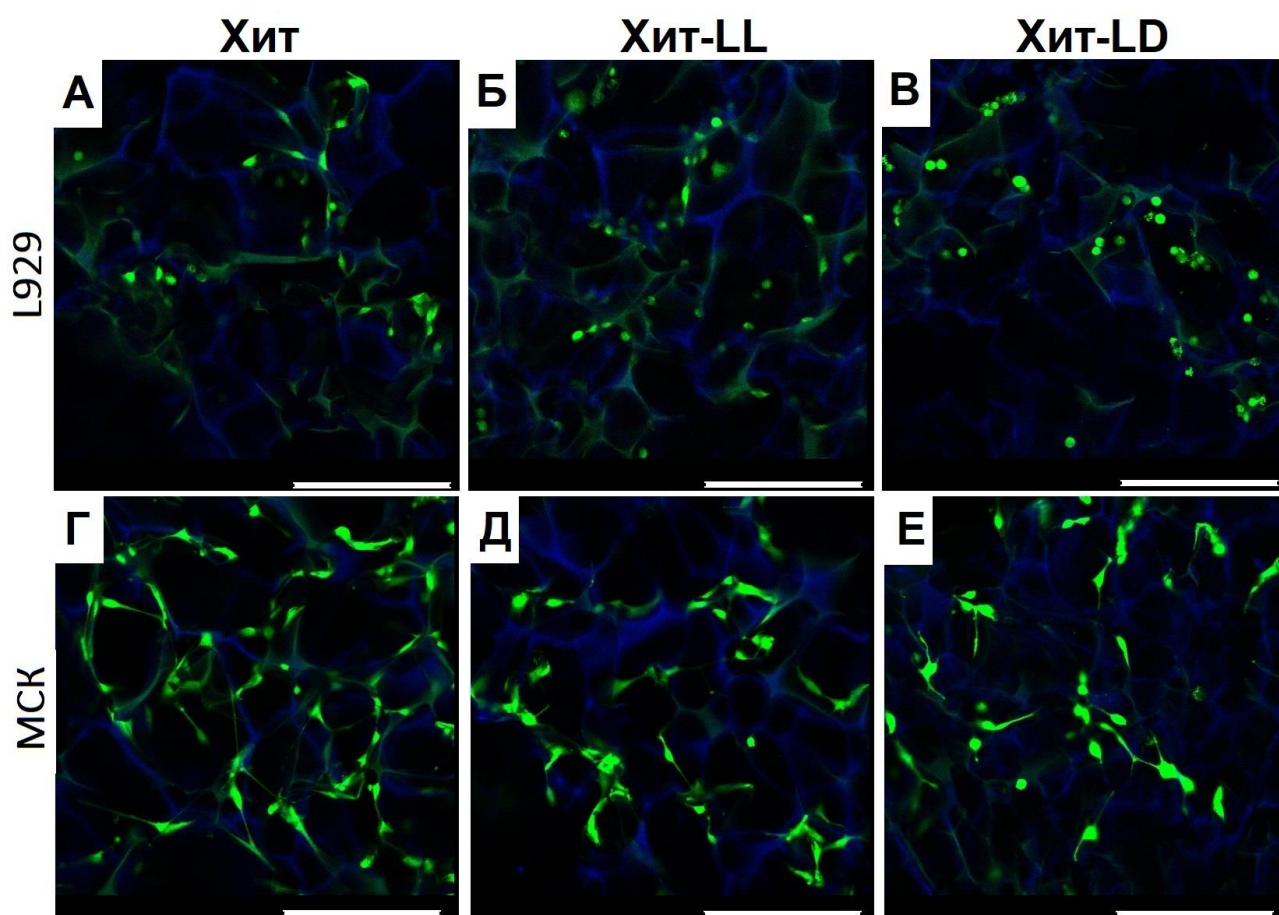


Рисунок 9 – Микрофотографии клеток фибробластов мыши линии L929 (А, Б, В) и МСК (Г, Д, Е) после их культивирования в макропористых гидрогелях на основе хитозана (Хит); сополимера хитозана с олиго(L, L-лактидом) (Хит-LL) и с олиго(L, D-лактидом) (Хит-LD) в течение 3 дней. Живые клетки (в зеленом цвете) и гидрогели (в синем цвете) были окрашены Calcein AM и DAPI, соответственно. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Шкала 200 мкм

Как видно на рисунке 9 (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 всех образцов макропористых гидрогелей. Кроме того, было обнаружено, что состав гидрогеля влиял на морфологию клеток. Например, в случае образца Хит мышечные фибробласты L929 имели типичную веретенообразную морфологию (Рисунок 9А). 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 образцом Хит. После культивирования МСК в течение 3 дней в гидрогелях было обнаружено, что в основном клетки имели веретенообразную морфологию во всех

образцах (Рисунок 9, 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 в макропоры, 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.

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.

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).

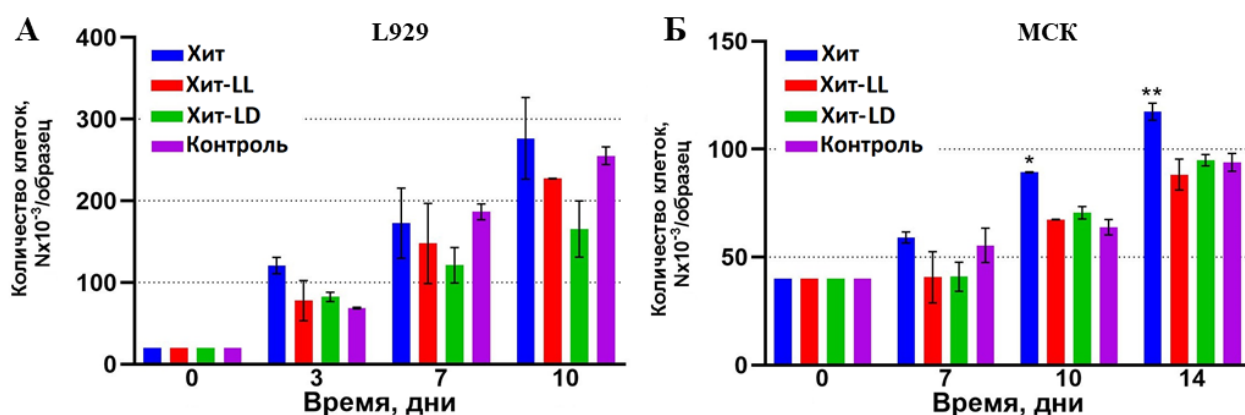


Рисунок 10 – Рост клеток фибробластов мыши L929 в течение 10 дней (А) и МСК в течение 14 дней (Б) в образцах гидрогелей на основе хитозана (Хит); сополимера хитозана с олиго(L,L-лактидом) (Хит-LL) и с олиго(L,D-лактидом) (Хит-LD). Контроль - монослой клеток на дне лунки планшета. Результаты МТТ-теста. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. *P < 0,05, **P < 0,01 по сравнению с контролем

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.

5. Исследование дифференцировки клеток при культивировании на матриксах

5.1. Остеогенный потенциал МСК, культивируемых 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 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 клеток в остеогенной среде (ОС). Этот подход позволяет качественно оценить наличие дифференцированных клеток. Как видно на рисунке 11, после 7 дней индукции МСК окрашивались в фиолетовый цвет как в контроле (дно лунки 96-луночного планшета), так и на всех трёх образцах 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 11 также видно, что процесс образования скоплений был

сильнее выражен в образцах Хит-LL и Хит-LD, чем на плёнке Хит. Можно предположить, что формирование сфероидов связано с повышенным остеогенным потенциалом клеток на этих матриксах. Однако эта гипотеза нуждается в дальнейшем подтверждении.

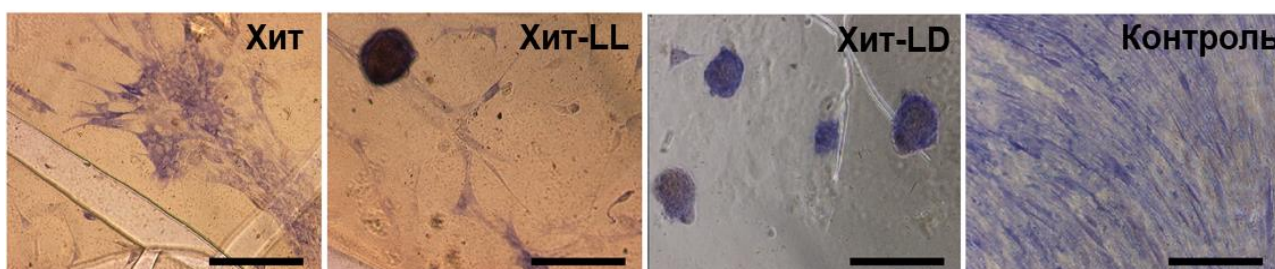


Рисунок 11 – Индуцированная остеодифференцировка МСК на пленках различного состава: хитозан (Хит); сополимер хитозана с олиго (L, L-лактидом)(Хит-LL); сополимер хитозана с олиго (L, D-лактидом) (Хит-LD). Оценка активности щелочной фосфатазы.

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 МСК в остеогенной среде провели количественный анализ экспрессии связанных с остеодифференцировкой генов: щелочная фосфатаза (*ALPL*), костный фактор транскрипции *Runx2* и остеопонтин (*SPP1*). Для этого использовали метод количественной ПЦР в режиме реального времени (Рисунок 12).

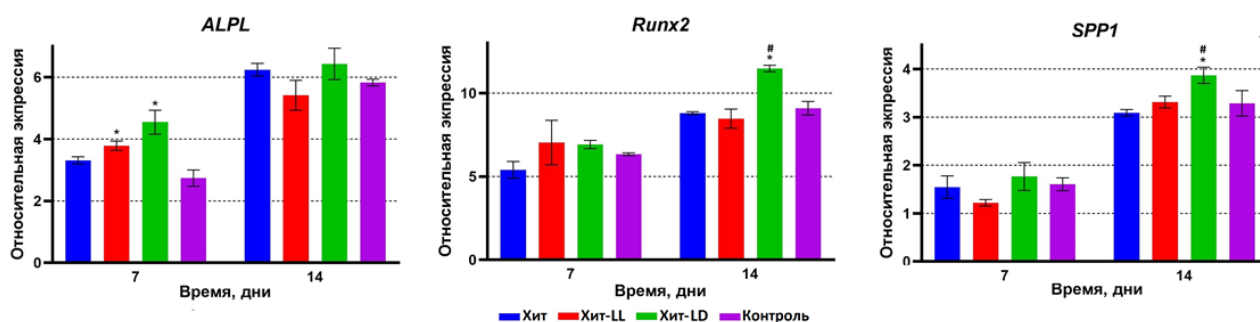


Рисунок 12 – Дифференциальная экспрессия мРНК генов, участвующих в остеодифференцировке МСК. Анализ ПЦР в реальном времени костных специфических маркеров *ALPL*, *Runx2* и *SPP1*. МСК культивировали в остеогенной среде в течение 14 дней на плёнках различного состава: хитозан (Хит); сополимер хитозана 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

Видно, что экспрессия маркеров остеогенеза увеличивалась в результате остеоиндукции во всех образцах. Как видно из рисунка 12, 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 11). 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 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 L,D-олиголактидом, на основе которого были получены плёнки Хит-LD, по сравнению с хитозаном, из которого был сформирован образец Хит.

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

5.2. Адипогенный потенциал МСК при культивировании на плёнках

Следующим этапом исследования была оценка возможности адипогенной дифференцировки МСК при культивировании на пленках. МСК индуцировали в адипогенной среде (АС) для адипоцитарной дифференцировки. Как известно, накопление в клеточном цитозоле везикул, содержащих триглицериды, является важным признаком дифференцировки клеток в адипоциты. С помощью световой микроскопии путём окрашивания Масляным красным на всех плёнках наблюдали клетки с накоплением капель внутриклеточного жира (Рисунок 13).

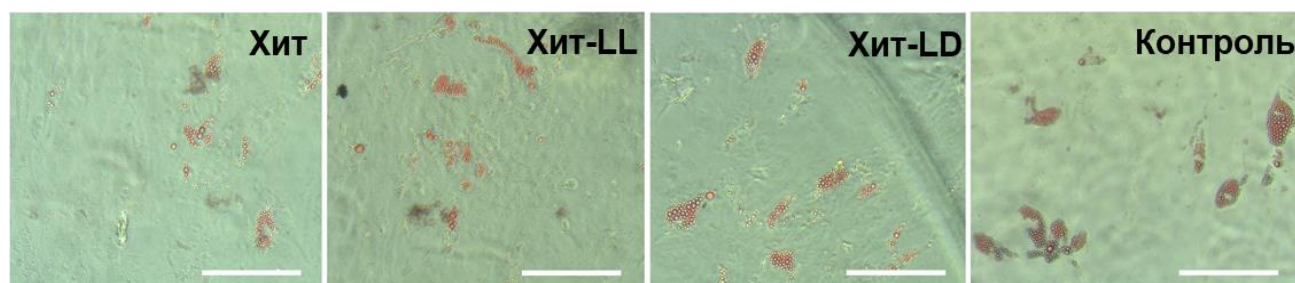


Рисунок 13 – Индуцированная адипогенная дифференцировка МСК на пленках различного состава: хитозан (Хит); сополимер хитозана с олиго(L, L-лактидом)(Хит-LL); сополимер хитозана с олиго(L, D-лактидом) (Хит-LD). Окрашивание капель внутриклеточного жира Масляным красным (Oil Red O). Репрезентативные изображения цитохимической реакции. МСК культивировали в адипогенной среде (АС) в течение 7 дней. Контроль - монослойная культура клеток. Световая микроскопия. Шкала 100 мкм

Как видно из рисунка 13, 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), по сравнению с контролем и другими образцами плёнок. 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 олиголактоидов и различающейся топографии поверхности.

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 14.

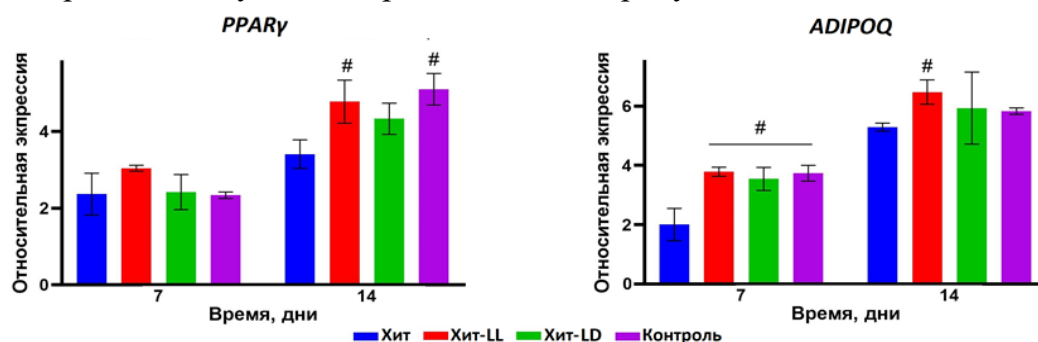


Рисунок 14 – Дифференциальная экспрессия мРНК генов, участвующих в адиподифференцировке МСК. Анализ экспрессии специфических маркеров адипогенеза *PPARγ* и *ADIPOQ* методом ПЦР в режиме реального времени. МСК культивировали в адипогенной среде в течение 14 дней на пленках различного состава: хитозан (Хит); сополимер хитозана с олиго (L, L-лактоидом) (Хит-LL); сополимер хитозана с олиго (L, D-лактоидом) (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 ± стандартное отклонение. # $P < 0,05$ по сравнению с образцом Хит

В качестве подтверждения адипонаправленной дифференцировки МСК может быть рассмотрено увеличение экспрессии генов *PPARγ* и *ADIPOQ*. Нами было обнаружено, что гены *PPARγ* и *ADIPOQ* активировались в МСК в результате культивирования клеток в АС во всех образцах плёнок. Из рисунка 14 видно, что на 7 дней после индукции адипогенеза в МСК наблюдали увеличение экспрессии гена *PPARγ* 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. При этом на 7-ой день экспрессия *ADIPOQ* была достоверно выше при индукции дифференцировки в контрольных клетках (на дне лунки планшета) и клетках на образцах плёнок 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 13).

К 14-ому дню стимуляции адипогенеза, экспрессия *PPARγ* 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 пленок на основе Хит и сополимеров Хит с олиго(L,L-лактидом).

Результаты, полученные в нашей работе, могут быть перспективны 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. 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. В этом контексте результаты нашей работы представляют особый интерес.

В нашей работе было показано, что матрицы на основе Хит и Хит-LL поддерживали, а образцы Хит-LD даже усиливали адиподифференцировку МСК в модели *in vitro*. Таким образом, матрицы 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 матрицы, в частности плёнки и макропористые гидрогели на основе сополимеров хитозана с олиго(L,L-/L,D-лактидами). 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 цитотоксичности матриц в отношении модельных животных клеток линии мышечных фибробластов L929, а также их потенциальная иммуногенность с использованием клеток моноцитов линии THP-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 матриц 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, МСК, выделенных из жировой ткани и охарактеризованных согласно минимальным критериям стволовости Международного общества клеточной терапии (ISCT). Было показано, что все матрицы были цитосовместимы и не иммуногенны, обеспечивали адгезию и распластывание клеток, а также поддерживали рост и пролиферацию различных типов животных клеток. В работе также впервые обнаружено, что в зависимости от состава матриц (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, из которых были получены матрицы для культивирования клеток.

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*).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Sazhnev, N. A., Drozdova, M. G., Rodionov, I. A., Kil'deeva, N. R., **Balabanova, T. V. (Tolstova T.V.)**, Markvicheva, E. A., Lozinsky, V. I. Preparation of chitosan cryostructurates with controlled porous morphology and their use as 3D-scaffolds for the cultivation of animal cells //Applied Biochemistry and Microbiology. – 2018. – Т. 54. – №. 5. – p. 459-467. IF 1.02 Q3 (WoS) (<https://doi.org/10.1134/S0003683818050162>).
2. **Tolstova T.**, Drozdova M., Popyrina T., Matveeva D., Demina T., Akopova T., Andreeva E., Markvicheva, E. Preparation and In Vitro Evaluation of Chitosan-g-Oligolactide Based Films and Macroporous Hydrogels for Tissue Engineering //Polymers. – 2023. – Т. 15. – №. 4. – С. 907. IF 5.0 Q1 (WoS, Scopus) (<https://doi.org/10.3390/polym15040907>).

3. Drozdova M., Vodyakova M., **Tolstova T.**, Chernogortseva M., Sazhnev N., Demina T., Aksenova N., Timashev P., Kildeeva N., Markvicheva E. Composite Hydrogels Based on Cross-Linked Chitosan and Low Molecular Weight Hyaluronic Acid for Tissue Engineering //Polymers. – 2023.–Т. 15.– №. 10. – С. 2371. IF 5.0 Q1 (WoS, Scopus) (<https://doi.org/10.3390/polym15102371>).
4. **Tolstova T.**, Dotsenko E., Kozhin P., Novikova S., Zgoda V., Rusanov A., Luzgina N. The effect of TLR3 priming conditions on MSC immunosuppressive properties // Stem Cell Research & Therapy. – 2023.– Т. 14. – №. 1. – С. 344. IF 8.0 Q1 (WoS, Scopus) (<https://doi.org/10.1186/s13287-023-03579-y>).

Глава в книге:

Балабанова Т.В. (Толстова Т.В.) и др. Иммунизация животных клеток в/на биodeградируемых матриксах для тканевой инженерии и регенеративной медицины. В кн: Иммунизированные клетки: биокатализаторы и процессы/Под ред. Е.Н. Ефременко/ ISBN 978-5-369-02004-3, М. : РИОР, 2018. — 495с.

Тезисы докладов на конференциях:

1. **Балабанова Т.В. (Толстова Т.В.)**, Строилова М.А., Дроздова М.Г., Демина Т.С., Сотникова Ю.С., Истомин А.В., Аكوпова Т.А., Марквичева Е.А. Макропористые гидрогели на основе привитых сополимеров хитозана с олиго (L, L-/L, D-лактидами) для регенеративной медицины //Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии. – 2018. – С. 107.
2. **Балабанова Т.В. (Толстова Т.В.)**, Сальникова А.Г., Дроздова М.Г., Демина Т.С., Сажнев Н.А., Черногорцева М.А., Кильдеева Н.Р., Марквичева Е.А. Биodeградируемые матриксы на основе хитозана для тканевой инженерии //Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии. – 2019. – С. 138.
3. **Балабанова Т.В. (Толстова Т.В.)**, Сальникова А.Г., Дроздова М.Г., Демина Т.С., Сажнев Н.А., Кильдеева Н.Р., Марквичева Е.А., Биodeградируемые макропористые матриксы на основе хитозана и его сополимеров с олиголактидами для регенеративной медицины // Гены и Клетки. – 2019. – Т.14 - р.33-35.
4. Попырина Т. Н., **Балабанова Т.В. (Толстова Т.В.)**. Влияние стереорегулярности олиголактида на структуру и свойства гидрогелей на основе привитых сополимеров хитозана с олиголактидами //Гагаринские чтения-2019. – 2019. – С. 862.
5. **Толстова Т.В.**, Сальникова А.Г., Дроздова М.Г., Демина Т.С., Сажнев Н.А., Черногорцева М.В., Кильдеева Н.Р., Марквичева Е.А. Биodeградируемые матриксы на основе хитозана для регенеративной медицины//Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии. – 2020. – С. 33.
6. Мамедова А.Р., **Толстова Т.В.**, Дроздова М.Г., Демина Т.С., Попырина Т.Н., Марквичева Е.А. Макропористые термосшитые матриксы на основе сополимеров хитозана с олиголактидами для тканевой инженерии //Труды Московского физико-технического института. – 2021. – Том. Биологическая и медицинская физика. – С. 127.
7. **Tolstova T.V.**, Mamedova A. R., Drozdova M. G., Demina T. S., Akopova T. A., Markvicheva E.A., Biodegradable 2D and 3D scaffolds based on chitosan for regenerative medicine //Public Health Toxicology. – 2021. – Т. 1. – р. 15-17 (Supplement).
8. Дроздова М.Г., **Толстова Т.В.**, Черногорцева М.В., Демина Т.С., Успенский С.А., Кильдеева Н.Р., Марквичева Е.А. Макропористые композиционные гидрогели на основе хитозана, гиалуриновой кислоты и фиброина для тканевой инженерии// Четвёртая международная конференция со школой молодых учёных «Физика – наукам о жизни» – 2021. – С. 56.
9. **Толстова Т.В.**, Мамедова А.Р., Дроздова М.Г., Демина Т.С., Аكوпова Т.А., Марквичева Е.А. Биodeградируемые 2D и 3D матриксы на основе хитозана для регенеративной медицины//Четвёртая международная конференция со школой молодых учёных «Физика – наукам о жизни» – 2021. – С. 141.
10. **Толстова Т. В.**, Дроздова М.Г., Попырина Т.Н., Демина Т.С., Аكوпова Т.А., Марквичева Е.А., Матрикссы на основе сополимеров хитозана с олиголактидами: получение и изучение в модели in vitro //Гены и клетки. – 2022. – Т. 17. – №. 3. – С. 231-232.
11. Бирюкова В.Н., Дроздова М.Г., **Толстова Т.В.**, Черногорцева М.В., Демина Т.С., Сажнев Н.А., Кильдеева Н.Р., Марквичева Е.А. Изучение матриксов на основе фиброина и природных полисахаридов для тканевой инженерии в модели in vitro//Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии. – 2022. – С. 125.
12. Мамедова А.Р., **Толстова Т.В.**, Дроздова М.Г., Демина Т.С., Попырина Т.Н., Марквичева Е.А. Композитные матриксы на основе сополимеров хитозана с олиголактидами для тканевой инженерии//Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии. – 2022. – С. 139.
13. **Толстова Т.В.**, Кожин П.М., Доценко Е.Д., Ромашин Д.Д., Русанов А.Л., Лузгина Н.Г. Влияние условий активации TLR3 в мезенхимальных стромальных клетках человека на иммуномодулирующие свойства//Международный конгресс «Биотехнология: Состояние и перспективы развития». – 2023. – С. 79.