

Институт фотонных технологий РАН
Федерального государственного учреждения «Федеральный научно-
исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» РАН»

На правах рукописи

Бардакова Ксения Николаевна

**Влияние структуры и физико-механических свойств
трехмерных биodeградируемых полимерных
материалов на их биосовместимость и клеточную
адгезию**

1.4.7 – высокомолекулярные соединения

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, доцент
Тимашев Петр Сергеевич

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	14
1.1. Основные требования к материалам биомедицинского назначения	14
1.2. Химическая форма материалов биомедицинского назначения	17
1.3. Методы формирования материалов биомедицинского назначения	33
1.4. Методы пост-обработки материалов биомедицинского назначения	50
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И ПРИБОРЫ	57
2.1. Материалы	57
2.2. Методы и приборы Главы 3	58
2.3. Методы и приборы Глав 4 и 5.....	67
2.4. Методы и приборы Главы 6	71
ГЛАВА 3. БИОПОЛИМЕРНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА	73
3.1. Гидродинамический диаметр агрегатов в водных растворах.....	73
3.2. Механические свойства и РФА плёночных образцов	74
3.3. Трёхмерные конструкции, сформированные однофотонной лазерной стереолитографией.....	77
3.4. Степень набухания и смачиваемость трёхмерных конструкций	81
3.5. Полимерные конструкции после обработки сверхкритическим диоксидом углерода. Локальный модуль упругости	84
3.6. Шероховатость, энергетические свойства поверхности трёхмерных конструкций после обработки сверхкритическим диоксидом углерода.....	88
3.7. Биосовместимость хитозановых конструкций.....	91
3.8. Имплантация и гистология хитозановых конструкций	92
ГЛАВА 4. ГУБЧАТЫЕ ГИБРИДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ	95
4.1. Параметры лазерного воздействия. Формирование полилактидных шаблонов	95
4.2. СЭМ и ИК-спектроскопия	98
4.3. Механические свойства коллагеновых материалов	100

4.4. Биосовместимость губчатых гибридных материалов, их способность поддерживать адгезию и пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека	102
ГЛАВА 5. ПЛЕНОЧНЫЕ ГИБРИДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ	104
5.1. Фотохимическое сшивание коллагена	104
5.2. Параметры лазерного воздействия. Формирование армирующих полилактидных шаблонов	106
5.3. ИК-спектрометрия.....	109
5.4. Топография и свойства поверхности пленочного гибридного материала..	111
5.5. Механические свойства пленочного гибридного материала	114
5.6. Биосовместимость пленочного гибридного материала, адгезия и направленная пролиферация фибробластов.....	115
ГЛАВА 6. МИКРОСТРУКТУРИРОВАНИЕ ФОТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ	117
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	123
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	125
СПИСОК ТЕРМИНОВ	127
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	128
БЛАГОДАРНОСТИ	147
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	148
Приложение А	148
Приложение Б	151
Приложение В.....	155
Приложение Г	156
Приложение Д.....	158
Приложение Е.....	159
Приложение Ж.....	161
Приложение З	162
Приложение И	163
Приложение К.....	165

Приложение Л.....	166
Приложение М.....	168
Приложение Н	169
Приложение О	173
Приложение П	174
Приложение Р	176

ВВЕДЕНИЕ

Полимеры являются одним из привлекательных материалов биомедицинского назначения: их используют для медицинских устройств и имплантатов, например, в системах доставки лекарств, искусственных артериях, нитях, катетерах, зубных протезах. Полимерные материалы позволяют имитировать внеклеточный матрикс (англ. extracellular matrix), контролировать поведение клеток *in vitro* и *in vivo*. В случае практического применения для задач тканевой инженерии первостепенное значение имеют природные биodeградируемые полимеры.

Хитозан – природный катионный полиэлектролит, содержит первичные аминогруппы практически в каждом элементарном звене. Аминогруппы могут быть протонированы и получившийся поликатион может образовывать ионные комплексы с различными белками, липидами, отрицательно заряженными синтетическими полимерами [1], взаимодействовать с поверхностью мембран клеток [2]. Хитозан является неиммуногенным биodeградируемым материалом, демонстрирует противогрибковые и антимикробные свойства [3], минимальный тканевый ответ и фиброзную инкапсуляцию при имплантации [4, 5].

Коллаген – волокнистый белок, преобладает во всех биологических тканях (коже, костях, хрящах), гидрофилен, характеризуется минимальной антигенностью, способен к ферментативной биodeградации [6, 7].

Несмотря на обширные возобновляемые источники получения и уникальные свойства хитозана и коллагена, существует ограниченное число биodeградируемых материалов на их основе, которые преимущественно представлены в форме гелей, порошков, коллоидных растворов, пленок, губок и используются для закрытия плоскостных раневых дефектов кожи.

Для расширения количества доступных биodeградируемых материалов на основе хитозана и коллагена актуальными являются три направления исследований. Во-первых, остро стоит вопрос в разработке полимерных

композиций, из которых могут быть сформированы *трехмерные структуры* для восстановления поврежденных тканей и органов.

В качестве методов изготовления подобных полимерных структур особого внимания заслуживают технологии быстрого прототипирования, в частности методы однофотонной и двухфотонной лазерной стереолитографии. Под действием сфокусированного лазерного излучения происходит печать трехмерных структур, которые повторяют форму дефекта пациента и обладают необходимыми пористостью и шероховатостью. Для масштабирования методов лазерной стереолитографии в регенеративной медицине, как правило, требуется разработка широкой номенклатуры биосовместимых *фотополимеризующихся композиций (ФПК)*, что явилось одной из задач этой работы.

Во-вторых, помимо получения биodeградируемых материалов трехмерной архитектуры, требуется учитывать их *физико-механические свойства*, которые должны быть *сопоставимы* со свойствами замещаемой ткани. Природные полимеры зачастую демонстрируют низкие механические характеристики, обладают высокой скоростью деградации, тогда как использование их в смеси с *синтетическими* полимерами позволяет значительно улучшить свойства получаемого материала.

Среди синтетических биodeградируемых полимеров привлекательными для тканевой инженерии являются полиэферы, в частности, *полилактид (ПЛА)*, а также полимеры на основе *полиэтиленгликоля*. Так, ПЛА предлагают использовать для хирургических имплантатов, систем доставки лекарств, в качестве рассасывающегося шовного материала, для регенерации кости (костные пробки, винты, пластины для фиксации переломов), хряща, сухожилий, сосудов [8–11]. В связи с этим, в настоящей работе использовали смеси хитозана с *диакрилатом полиэтиленгликоля (ПЭГ-ДА)*, а для получения коллагеновых материалов – фоточувствительный разветвленный ПЛА.

Наконец, в-третьих, важным этапом для улучшения биосовместимости и *контроля клеточного поведения*, а именно регулирования степени адгезии и

направления клеточного роста, является пост-обработка биodeградируемых материалов различными методами.

Для регенеративной медицины оптимальным способом такой пост-обработки оказалась обработка биodeградируемых материалов в *сверхкритическом диоксиде углерода (скСО₂)*, что обусловлено специфическими физико-химическими свойствами этой среды: нетоксичностью, относительной инертностью в химических процессах, низкими вязкостью и поверхностным натяжением, высокими коэффициентами диффузии модифицирующих компонентов в этой среде [12]. Обработку скСО₂ можно рассматривать как способ регулирования механических свойств и шероховатости поверхности биodeградируемых материалов, а также использовать для стерилизации и экстракции низкомолекулярных компонентов из полимерных конструкций [12, 13].

В свою очередь, контроль адгезии клеток к биodeградируемым материалам и создание определенного пространственного положения клеток достигается путем формирования участков с различным химическим составом, механическими свойствами, шероховатостью. Так, формирование на поверхности материала *полимерных шаблонов* с использованием фотолабильных молекул и облучения стало одним из многообещающих методов регулирования клеточного поведения [14, 15].

С учетом изложенного, была определена **цель работы**, состоящая в разработке новых фотополимеризующихся композиций на основе природных и синтетических биodeградируемых полимеров, их структурировании методами лазерной стереолитографии и комплексном исследовании свойств сформированных материалов биомедицинского назначения, в том числе после этапа их пост-обработки в среде скСО₂ и лазерно-индуцированного нанесения полимерных шаблонов различной геометрии.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Подобрать соотношения компонентов ФПК на основе хитозана и ФПК на основе ПЛА; определить условия формирования полимерных материалов

биомедицинского назначения методами лазерной стереолитографии и *двухфотонной полимеризации (2ФП)*; охарактеризовать механические и гидрофобно-гидрофильные свойства (набухание, смачиваемость) сформированных полимерных материалов, их внутреннюю структуру и топографию, рассчитать поверхностную энергию и ее составляющие.

2. Разработать комбинированный подход (УФ-сшивание и лазерно-индуцированное нанесение армирующих шаблонов из ПЛА) для получения упрочненных коллагеновых конструкций, способных контролировать клеточное поведение; установить взаимосвязи между геометрией армирующего шаблона, параметрами лазерной обработки и механическими характеристиками полимерных конструкций.

3. Для трехмерных конструкций на основе хитозана исследовать пост-обработку в среде scCO_2 ; установить влияние статического и проточного режима пост-обработки на свойства поверхности (шероховатость, контактные и равновесные углы смачивания, энергетические свойства), биосовместимость и механические свойства трехмерных конструкций.

4. Провести исследования цитотоксичности, долгосрочной стабильности полимерных материалов на основе хитозана и ПЛА, а также способности коллагеновых конструкций с полилактидными шаблонами поддерживать направленный клеточный рост.

Научная новизна

Впервые из ФПК на основе хитозана получен широкий ряд биodeградируемых материалов различной конфигурации: полимерные носители, пленочные и губчатые конструкции, трехмерные микроструктуры. Продemonстрировано, что с ростом степени замещения хитозана аллильными фрагментами может быть увеличен диапазон оптимальных скоростей сканирования лазерным излучением и формируемая трехмерная конструкция становится более устойчивой в водных средах.

Показано, что стереохимический состав привитых цепей хитозана влияет на параметры лазерного структурирования и механические свойства трехмерных

структур: ФПК, основанная на сополимере хитозана с олиго(L,D)-лактидом, демонстрирует более широкое окно параметров печати, при этом сформированные структуры характеризуются большим модулем упругости в сравнении с сополимером хитозана с олиго(L,L)-лактидом.

Установлено, что в отличие от стандартной процедуры отмывки в растворителях, обработка трехмерных структур в среде scCO_2 позволяет экстрагировать несшитые компоненты ФПК. Такая обработка является перспективным методом предстерилизационной подготовки полимерных гидрогелевых структур и также способом регулирования свойств поверхности биodeградируемых материалов (шероховатости, локального модуля упругости, углов смачивания, поверхностной энергии).

Предложен новый подход к получению упрочненных коллагеновых биodeградируемых материалов с помощью комбинирования фотохимического сшивания и лазерно-индуцированного нанесения армирующих шаблонов из фоточувствительного ПЛА. Продemonстрирован рост модуля упругости до 7 раз, показана адгезия коллагеновых биodeградируемых материалов в отношении первичных мышечных фибробластов и *мезенхимальных стволовых клеток (МСК)* костного мозга человека, также направленная пролиферация клеток, при том, что для коллагеновых материалов без шаблона селективная адгезия к поверхности не наблюдалась.

Практическая значимость

Показано, что путем изменения количества введенных в структуру хитозана гидрофобных фрагментов, а также стереохимического состава привитых цепей возможно формировать полимерные носители требуемых размеров, в широком диапазоне регулировать механические свойства трехмерных конструкций, повышать производительность лазерного структурирования.

Продemonстрировано, что введение аллильных групп повышает основные свойства молекулы хитозана, тем самым препятствует некротическим и островоспалительным изменениям тканей при имплантации трехмерных конструкций *in vivo*. Разработанные фотопolyмерные композиции и подобные

трехмерные конструкции на их основе могут быть перспективны для восстановления тканевых дефектов критического размера (от 1 см).

Пост-обработка полимерных биodeградируемых материалов в среде scCO_2 может быть актуальна для культивирования тканеспецифичных клеток, чувствительных к нанотопографии, и помимо этого применяться для биodeградируемых материалов другого состава, когда требуется регулирование механических свойств для их соответствия со свойствами регенерируемых тканей или изменение полярности поверхности и ее гидрофобизация, например, для последующей модификации биodeградируемых материалов протеинами.

Предложенные условия лазерно-индуцированного нанесения армирующего полилактидного шаблона могут быть перспективны для замены химического сшивания коллагеновых материалов, в том числе, децеллюляризованных. Кроме того, возможно регулировать механические и поверхностные свойства структур, тем самым осуществлять контроль за клеточным поведением, создавать определенное пространственное положение клеток.

Формирование на коллагеновых материалах флуоресцирующих полилактидных шаблонов в дальнейшем позволит исследовать их биodeградацию *in vivo* без необходимости разрабатывать сложные гистологические процедуры и жертвовать экспериментальными животными.

Хорошая совместимость трехмерных микроструктур на основе производных хитозана с первичной культурой гиппокампа и формирование на поверхности микроструктур морфологически полноценной нейронной сети представляет интерес с точки зрения их использования для нейротрансплантации.

Полилактидные микроструктуры с модулем упругости 4,11 ГПа заслуживают внимания с точки зрения замещения костных дефектов и инициирования спонтанной остеогенной дифференцировки.

Положения, выносимые на защиту

Получение широкого ряда биodeградируемых материалов различной конфигурации: полимерных носителей, пленочных и губчатых конструкций, трехмерных микроструктур.

Экспериментальные данные по полученным образцам биodeградируемых материалов: их набуханию и смачиваемости, шероховатости поверхности, деформационно-прочностным характеристикам, ИК- и масс-спектрометрии, РФА, СЭМ; полученные результаты расчета поверхностной энергии и ее составляющих для трехмерных конструкций на основе хитозана до и после УФ-облучения, после обработки в среде scCO_2 , после перевода хитозана в основную форму.

Экспериментальные данные по зависимости механических свойств коллагеновых материалов (пленочных и губчатых), а также размеров полилактидного шаблона от параметров УФ-сшивания и параметров лазерно-индуцированного нанесения шаблона.

Данные СЭМ, 3D-микроскопии, флуоресцентной и ИК-спектрометрии для немодифицированных и армированных коллагеновых материалов.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность результатов диссертационной работы обеспечивается использованием прецизионного оборудования и современных методов характеристики формируемых материалов. Воспроизводимость предложенных условий структурирования и пост-обработки биodeградируемых материалов и конструкций подтверждается проведенными на больших выборках натурными экспериментами (*in vitro*, *in vivo*). Полученные экспериментальные данные верифицированы в рамках отчетов по НИР от государственных ведомств (РФФИ, Минобрнауки России) и согласуются с частично имеющимися в литературе данными других авторов.

По теме диссертации опубликовано 11 статей в журналах из списка ВАК при Минобрнауки РФ, входящих в системы цитирования Web of Science и Scopus; сделано 26 докладов на международных и российских конференциях, получено 2 патента РФ.

Основные результаты работы представлены на II Байкальском материаловедческом форуме (Улан-Удэ, 2015), VI Всероссийской конференции «Актуальные проблемы химии высоких энергий» (Москва, 2015), 69-й Всероссийской школе-конференции молодых ученых (Нижний Новгород, 2016),

VIII школе-семинаре молодых ученых России «Проблемы устойчивого развития региона» (Улан-Удэ, 2016), VIII Всероссийском съезде трансплантологов (Москва, 2016), 2 International Scientific Conference “Science of the Future” (Казань, 2016), Первом российском кристаллографическом конгрессе (Москва, 2016), VII Всероссийской Каргинской конференции «Полимеры-2017» (Москва, 2017), Международной XLIII конференции Гагаринские чтения (Москва, 2017), Sechenov International Biomedical Summit (Москва, 2017, 2018); III, IV, VI междисциплинарном научном форуме «Новые материалы и перспективные технологии» (Москва, 2017, 2018, 2020), XX Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2017), III Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2017), VII международной конференции по фотонике и информационной оптике (Москва, 2018), Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы регенеративной медицины, инновации в репродуктологии» (Самара, 2018), II международной конференции «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (Екатеринбург, 2018), XVII Всероссийской молодежной научной конференции «Функциональные материалы: синтез, свойства, применение» (Санкт-Петербург, 2018), 18th International Conference on Chemistry and Physical Chemistry of Oligomers (Нижний Новгород, 2019), Всероссийской научной школе-семинаре «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине» (Саратов, 2019), VI Международной конференции «Аддитивные технологии: настоящее и будущее» (online, 2020), XVII Международной научно-практической конференции «Новые полимерные композиционные материалы. Микитаевские чтения» (Нальчик, 2021).

Личный вклад автора

Автор принимала участие в постановке задач, подготовке и проведении экспериментальных исследований, в обработке, интерпретации и обобщении полученных результатов, в написании и подготовке работ к печати. Работа

выполнена в рамках проведения исследований, включенных в план ИФТ РАН, грантов РФФИ, и дважды поддержана стипендией президента РФ.

Структура работы

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, методической части, описания и обсуждения результатов, заключения, списков цитируемой литературы, терминов и сокращений, приложений. Работа изложена на 177 страницах, содержит 66 рисунков, 9 таблиц, 16 приложений и 338 библиографических ссылок.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

В литературном обзоре последовательно рассмотрены основные требования к материалам биомедицинского назначения (глава 1.1) и три ключевых направления этой диссертации (Рисунок 1): выбор химической формы или состава материала биомедицинского назначения, установление оптимального метода формирования и метода пост-обработки материала биомедицинского назначения (главы 1.2–1.4, соответственно).

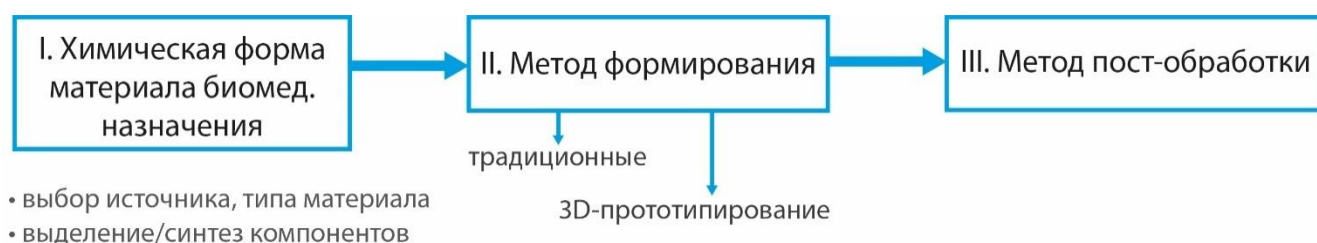


Рисунок 1 – Ключевые направления диссертации

Литературный обзор сфокусирован на материалах и методах, которые использовали в диссертации. С целью не утяжелять работу общедоступной информацией и излишним цитированием, для материалов и подходов, которые напрямую к этой диссертации не относятся, даны ссылки на литературные источники, где приводится их подробное обсуждение.

1.1. Основные требования к материалам биомедицинского назначения

Одной из многообещающих альтернатив пересадки донорских органов и тканей является формирование трехмерных конструкций (трехмерных структур), которые служат подложкой для выращивания клеток и тканей вне организма, обеспечивают регенерацию и укрепление его частей. При разработке подобных трехмерных конструкций следует опираться на шесть основных требований, которые предъявляют к материалам биомедицинского назначения [16–21] (Рисунок 2).

Во-первых, материал конструкции должен быть *биосовместимым*. Имплантация любого материала неизбежно вызывает воспаление и повреждение

тканей (подробности рассмотрены, например, в [22]), при этом биосовместимым можно назвать такой материал, который создает в ткани минимальные изменения механического и химического характера. В случае биоразлагаемых материалов продукты разложения являются нетоксичными, легко выводятся или метаболизируются в организме [23].



Рисунок 2 – Основные требования к материалам биомедицинского назначения

Во-вторых, материал конструкции должен обеспечивать необходимые *свойства поверхности* для контроля клеточного поведения – адгезии, пролиферации, дифференцировки. Клеточная адгезия к определенным поверхностям происходит через интегрины – специальные белковые рецепторы; те клетки, которые не прикрепляются, обычно умирают [24]. Ключевыми факторами, определяющими клеточную адгезию, последующий рост и дифференцировку являются *топография, механические и химические свойства поверхности материала* [24–28]. Топография поверхности материала в свою очередь определяется шероховатостью, формой и размером пор, ориентацией волокон. Например, в [29] сравнивали имплантаты с микротопографией (бороздками глубиной 30–120 мкм) с контрольными гладкими. Продемонстрировано, что шероховатые имплантаты способствовали остеоинтеграции *in vivo*. В случае наноразмерных пор показано [30], что их наличие влияет на образование коллагеновых волокон и внеклеточного матрикса, степень дифференцировки клеток, их внешний вид; в особенности для эндотелиальных и нейрональных

клеток [31]. В случае если на трехмерной структуре культивируют фибробласты, то оптимальная пористость находится в пределах 5–15 мкм; для хондроцитов она составляет 70–120 мкм [32, 33].

Механические свойства поверхности трехмерной конструкции влияют на экспрессию белков, межклеточные взаимодействия, определяют скорость пролиферации клеток, в частности для нервных клеток и клеток, образующих кость, требуются материалы различной жесткости [34].

К химическим характеристикам поверхности помимо функциональных групп относят также поверхностную энергию (смачиваемость), поверхностный заряд и его плотность. Для каждого типа клеток установлен свой диапазон оптимальных краевых углов смачивания, при этом общая тенденция состоит в том, что клетки прикрепляются к более гидрофильным материалам. Так, в случае фибробластов адгезия максимальна при углах 60–80°, что скоррелировано с максимальной адсорбцией белков [35]. Супергидрофильные и супергидрофобные поверхности (с углами смачивания менее 5° и более 150°, соответственно) не способствуют прикреплению и росту клеток. Для поверхностного заряда большинство исследований показало, что положительно заряженные поверхности усиливают клеточную адгезию, тем самым способствуют деградации трехмерных структур [36].

Третье основное требование к трехмерной конструкции – это *пористость*, а именно наличие взаимосвязанной сети макропор, которая позволяет расти ткани в трех измерениях, способствует миграции клеток, доставке питательных компонентов среды и кислорода к клеткам и тканям, интеграции материала конструкции в окружающие ткани [37–39]. При формировании трехмерной конструкции необходимо контролировать распределение пор по размерам, их морфологию, ориентацию, отношение поверхностной пористости к объемной [40]. Взаимосвязанные поры в трехмерной конструкции необходимы также для формирования новых кровеносных сосудов, для расширения и ремоделирования сосудистой сети – ангиогенеза [41]. Например, при конструировании эквивалента костной ткани минимальный диаметр поры для ангиогенеза составляет порядка 100

мкм, а с точки зрения физиологического жидкостного обмена необходимы поры порядка 20–50 мкм [40]. Васкуляризация трехмерной структуры после имплантации индуцирует процесс заживления раны [42]. Когда наблюдается недостаток формирования сосудистой сети, для клеток может наступить гипоксия с последующим некрозом тканей вокруг трехмерной конструкции.

Четвертое требование – *механические свойства* трехмерной конструкции должны соответствовать механическим свойствам (модулю упругости и прочности) анатомической области, где происходит имплантация, обеспечивать поддержку тканей до восстановления их структурной целостности [40, 43].

В-пятых, для того, чтобы регенерировать поврежденную ткань, конструкция должна иметь *3D-форму*, которая действует как шаблон для роста ткани в трех измерениях, стимулирует рост ткани в форме, заданной конструкцией [44]. В этом случае пристальное внимание стоит уделять архитектуре трехмерной конструкции, геометрии и размеру ее структурных элементов (пор). Например, в [45] заселили фибробластами и остеопрогениторными клетками полимерные структуры с треугольными и пятиугольными порами и наблюдали разницу в скорости пролиферации остеопрогениторных клеток в зависимости от геометрии пор.

Наконец, для конструкций, которые обеспечивают *регенерацию* ткани, а не ее *замену* искусственным материалом, имеющим ограниченный срок службы, важным требованием является способность к *биodeградации*. Скорость биodeградации материала конструкции должна быть контролируемой и соответствовать скорости образования новой ткани в месте дефекта [46, 47]. Для регулирования скорости биodeградации трехмерных полимерных конструкций возможно использовать различные соотношения полимеров, изменять степень кристалличности и молекулярную массу полимера [48], варьировать архитектуру конструкции (размер и геометрию пор), прочее.

1.2. Химическая форма материалов биомедицинского назначения

Для материалов биомедицинского назначения в большинстве случаев используют две классификации (Рисунок 3).



Рисунок 3 – Классификация материалов биомедицинского назначения

Во-первых, *по типу вызываемой биологической реакции* организма материалы подразделяют на биоинертные, биоактивные и биорезорбируемые (рассасывающиеся). Тезисно [22, 49], в случае первой группы при имплантации происходит инкапсуляция имплантата волокнистой тканью (образуется шрам), адгезия между имплантатом и тканью минимальна, либо отсутствует. Биоактивные материалы обычно за счет подбора архитектоники и механических свойств трехмерной конструкции стимулируют биологическую реакцию организма, например, присоединение к окружающим тканям. В последние годы основное внимание исследователей в области биомедицинского материаловедения обращено на *биорезорбируемые* материалы, которые не нужно извлекать из организма.

Вторая классификация основа на разделении материалов биомедицинского назначения *по химическому составу* на металлы и сплавы, керамику и стеклокерамику, природные и синтетические *полимеры* и композиты (Рисунок 3, Рисунок А.1) [50–52]. Первые две группы долгое время являлись ключевыми материалами в медицине, их в основном использовали для лечения ортопедических заболеваний. Однако, они не являются биodeградируемыми и возможность их модификации ограничена. Природные и синтетические полимеры привлекают

внимание исследователей в области тканевой инженерии благодаря возможности формирования на их основе конструкций с контролируемой скоростью биodeградации и технологичностью [53].

Далее рассмотрим четыре биорезорбируемых полимера – хитозан, коллаген, полилактид и полиэтиленоксид.

1.2.1. Хитозан

Хитозан – природный катионный полиэлектролит, содержащий первичные аминогруппы практически в каждом элементарном звене (Рисунок 4). Этот биополимер обладает уникальным набором биологических и физико-химических свойств за счет чего широко применяется для создания материалов биомедицинского назначения в форме пленок, волокон, микрогранул, наночастиц [54–56]. Гидрогели на основе хитозана широко используются в качестве носителей различных типов клеток и факторов роста [57, 58], в доставке лекарств [59, 60].

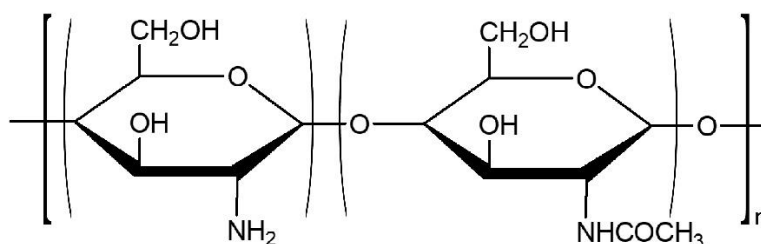


Рисунок 4 – Структурная формула хитозана

Хитозан получают в результате частичного деацетилирования хитина [61] – полисахарида, который является вторым после целлюлозы наиболее распространенным биополимером. Морские ракообразные содержат большое количество хитина, который встречается также в экзоскелете насекомых, клеточных стенках грибов и зеленых водорослях [1].

Помимо биodeградируемости и биосовместимости, хитозан является неиммуногенным материалом, демонстрирует противогрибковые и антимикробные свойства [3], минимальный тканевый ответ и фиброзную инкапсуляцию при имплантации [4, 5, 62]. Много специфических свойств дают

хитозану свободные аминогруппы остатков D-глюкозамина, которые отличают хитозан от хитина. Аминогруппы могут быть протонированы и получившийся поликатион впоследствии может образовывать ионные комплексы с различными белками, липидами, ДНК, отрицательно заряженными синтетическими полимерами [1], а также взаимодействовать с отрицательно заряженной поверхностью мембран клеток [2]. Так в случае применения хитозана и его производных для восстановления центральной нервной системы сообщается о существенном усилении дифференцировки и адгезии нервных стволовых клеток, росте электропроводности [63].

Материалы на основе хитозана способны принимать различные физические формы, а их мукоадгезивные свойства могут быть полезны для применения хитозана и его производных в качестве эксципиентов (вспомогательных веществ лекарственного средства) для приготовления буккальных, вагинальных, назальных лекарственных форм [64, 65].

Несмотря на обширные возобновляемые источники получения и универсальные свойства хитозана, существует ограниченное число биомедицинских продуктов на основе этого биополимера.

В *немодифицированном* виде хитозан главным образом служит материалом покрытий для закрытия плоскостных раневых дефектов кожи и представлен в форме гелей, коллоидных растворов, пленок, губок. В частности, на рынке Российской Федерации известны следующие биodeградируемые материалы на основе хитозана. «Коллахит» (Россия) – общее торговое название раневых покрытий в виде тонких губок и пленок (пластин), которые получены лиофильным осушением. В составе: коллаген, хитозан, различные антисептические препараты (фурагин калия, диоксидин, шиконин, др.). Покрытия «Коллахит» показаны для заживления ожоговых ран, трофических язв, пролежней [66–68].

«ХитоПран» (Биотехфарм, Россия) – раневое покрытие в виде сухой повязки, которая получена методом электроформования. В составе: хитозан, ципрофлоксацин и трипсин. «ХитоПран» применяется для лечения пациентов с ожоговыми травмами [69, 70].

Хитозан в виде гранул и нановолокон используется в гемостатических повязках, бинтах, салфетках – торговые названия «Гепоглос», «Гемофлекс», «Chito-SAM», «Axiostat», «Celox».

«Васна» (ВекторПро, Россия) – серия хитозановых гидрогелей с экстрактами лекарственных растений, ионами серебра, прополисом, др. Гидрогели применяются при незначительных повреждениях кожи и слизистых, в основном в косметологии и дерматологии.

Ограниченное число биodeградируемых материалов на основе хитозана обусловлено рядом причин. Во-первых, хитозан является полимером, восприимчивым к условиям хранения и обработки: сильный нагрев или охлаждение могут быть причиной деградации полимера, вызвать окисление его функциональных групп [64]. Этот факт лимитирует число реагентов, пригодных для химической модификации хитозана с целью получения его производных.

Отметим, что в многочисленных исследованиях, которые посвящены хитозановым материалам, получение хитозана и его производных происходит в основном с помощью *классического химического синтеза*. Применение токсичных растворителей и малый выход целевого продукта в итоге не дают возможность экстраполировать до промышленных масштабов схемы синтеза, разработанные в научных исследованиях.

Другая причина, которая накладывает ограничение на применение хитозана и его производных для фармацевтики и биомедицины – это широкий диапазон вариативности свойств хитозана как природного биополимера. От выбора сырьевого источника и метода получения хитозана будут существенно зависеть его молекулярная масса, молекулярно-массовое распределение, степень деацетилирования и уровень чистоты [71]. Эти характеристики влияют на физико-химические и биологические свойства хитозана и его производных: вязкость, растворимость, клеточную адгезию, долгосрочную стабильность. Биodeградируемым материалам на основе хитозана необходимо быть термически, химически, механически стабильными, тем самым они должны поддерживать поврежденные ткани до момента восстановления их структурной целостности,

обеспечивать эффективность импрегнированных лекарств в течение длительного времени [72].

Известно несколько стратегий увеличения долгосрочной стабильности хитозановых биodeградируемых материалов. К ним относятся: модификация структуры хитозана с помощью полимераналогичных превращений его функциональных групп (обычно гидроксильных и аминогрупп), использование стабилизирующих агентов, физический кросслинкинг (используют ряд небольших анионных молекул, анионы металлов, отрицательно заряженные полиэлектролиты), химический кросслинкинг (применяют глутаральдегид, генипин, т.д.) [64, 73–76].

Химическая модификация реактивных групп хитозана обеспечивает возможность точного контроля конечных свойств получаемого материала биомедицинского назначения: долгосрочной стабильности, набухания, чувствительности к pH и температуре, эффективности загрузки лекарственного средства, др. [76]. Например, в патенте [77] текучий водный раствор акрированного хитозана предлагают использовать для эндоваскулярного введения в кровеносный сосуд или лимфатический проток, для доставки биоактивных компонентов, живых клеток и цитокинов. Так, при контакте с организмом растет pH раствора и введенная композиция затвердевает, превращается в гидрогель *in situ* для закупорки внутреннего объема аневризмы или других участков нормального кровеносного сосуда или лимфатического протока.

Помимо увеличения долгосрочной стабильности, модификация химической структуры полимера необходима с точки зрения расширения количества доступных биodeградируемых материалов на основе хитозана: остро стоит вопрос в разработке полимерных композиций, которые позволяют формировать *трехмерные структуры* для восстановления повреждений *сложной геометрии*.

Традиционные методы изготовления трехмерных структур – литье из раствора, газовое вспенивание, выщелачивание порообразователей, сублимационная сушка, др. – не позволяют контролировать геометрию конструкции и ее пористость, трудно сформировать конструкции с механическими

и физическими свойствами, которые бы соответствовали тканям пациента. Для формирования трехмерных конструкций сложной архитектуры особого внимания заслуживают лазерные и УФ-методы структурирования (подробности далее в главе 1.3) и в этих случаях использование немодифицированного хитозана возможно лишь в качестве неактивного «гостя» (a guest-host scheme). Например, в [78] хитозан вводили в акриловую смолу, после формировали трехмерные структуры методом двухфотонной стереолитографии. Или в [79] хитозан использовали в качестве гидрофильной добавки к смоле на основе поли(ϵ -капролактон) диакрилата и полиэтиленгликоль диакрилата; трехмерные структуры формировали методом цифровой светодиодной проекции.

Прицельная химическая модификация с целью получения *фоточувствительных производных хитозана* для биомедицинских приложений была успешно проведена с использованием глицидилметакрилата [80], метакрилового ангидрида [81], флуоресцеина [82], эфира азидобензойной кислоты [83]. Сложность создания материалов на основе полисахаридов связана с их неспособностью при нагревании переходить без разложения в вязкотекучее состояние при котором обычно перерабатывают синтетические полимеры [84].

В этой диссертации использовали хитозан и его производные, полученные в результате воздействия на твердые смеси реагентов давления и сдвиговых деформаций, так называемый твердофазный или механохимический синтез [85–87]. Метод твердофазного смешения полимеров разработан в Институте химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, базируется на многочисленных работах академика Н.С. Ениколопова с сотрудниками. Твердофазное смешение полимеров осуществляют в устройствах различного типа (экструдерах, смесителе Брабендера, на наковальне Бриджмена) и в литературе наблюдается устойчивая тенденция к переходу от обработки природных соединений с точки зрения их измельчения или переработки к получению химически модифицированных полимеров [84, 88, 89].

В сравнении с классическим химическим синтезом в присутствии растворителей, механохимический синтез является удобным и эффективным

способом целенаправленного химического модифицирования неплавких и малорастворимых полисахаридов, так как не требует расплавления реакционных смесей [90, 91]. Благодаря возможности адаптации механохимического синтеза к условиям производства и его масштабируемости, метод используется в различных отраслях промышленности, включая производство полимеров, пищевую и фармацевтическую отрасли [92]. Метод механохимического синтеза привлекает к себе пристальное внимание исследователей в области биомедицинского материаловедения, так как полное отсутствие растворителей, катализаторов и инициаторов химических процессов приводит к снижению негативной нагрузки на окружающую среду. Как следствие, исключаются экономические затраты на утилизацию растворителей и очистку синтезированных полимеров биомедицинского назначения от токсичных загрязняющих остатков.

1.2.2. Коллаген

Коллаген – это волокнистый природный белок, преобладает во всех биологических тканях (основной компонент кожи, костей, хрящей), хорошо воспринимается клетками, гидрофилен, обладает минимальной антигенностью, способен к ферментативной биodeградации [6, 7, 93].

Структурной детерминантой коллагена является тройная (третичная) спираль, которая состоит из трех полипептидных цепей. Тройная спираль имеет молекулярную массу около 300 кДа, длину примерно 300 нм и диаметр около 1,5 нм (Рисунок А.2) [94]. Пучки тройных спиралей образуют фибриллы, которые объединяются в более крупные коллагеновые волокна (Рисунок 5; Рисунок А.3) [95].

Отдельные полипептидные цепи коллагена содержат различные аминокислоты, основные из которых – это глицин, пролин и гидроксипролин. Пролин и гидроксипролин придают коллагеновой спирали жесткость, кроме того гидроксильные группы остатков гидроксипролина участвуют в образовании водородных связей и важны для стабилизации структуры тройной спирали [94]. Последовательность и точный состав аминокислот меняются в зависимости от

ткани, что приводит к существованию коллагенов различного типа. На сегодняшний день у позвоночных идентифицировано 28 различных типов коллагена, наиболее часто встречаются коллаген I и III типа. Коллаген I типа в основном содержится в коже, сухожилиях и костях, III типа – в кровеносных сосудах [96].

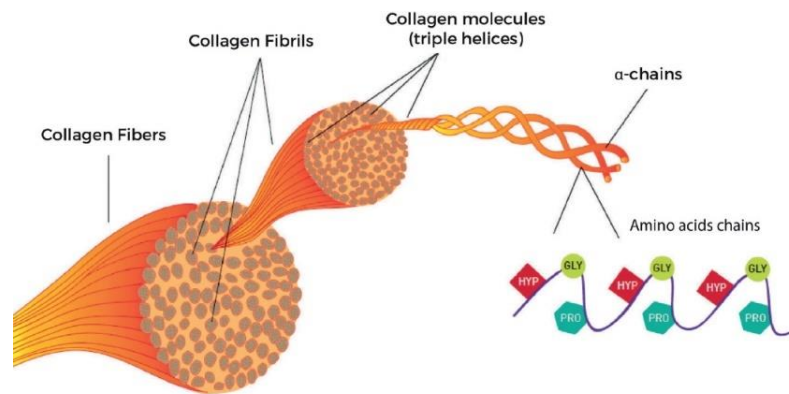


Рисунок 5 – Структура коллагена [95]

Существует два основных *способа получения* коллагеновых материалов. Первый способ заключается в удалении клеточных компонентов из тканей посредством химических, механических или ферментативных обработок (т.н. *децеллюляризация*) с целью получить из них имплантируемые протезы, например, сердечные клапаны, перикард, сосудистые трансплантаты. Второй подход предполагает выделение коллагена из различных тканей с последующим восстановлением коллагеновых структур из раствора (т.н. *реконструирование* коллагена) [97]. Этим способом получают коллагеновые материалы в виде губок, трубок, пленок, гидрогелей.

Выделение и реконструирование коллагена возможно практически из любого животного, тем не менее, основные источники коллагена для применения в тканевой инженерии – это кожа и сухожилия крупного рогатого скота, хвосты крыс, кожа свиньи. Источником коллагена являются также морские организмы (рыбы, медузы, губки), однако, такой коллаген в основном используется в промышленности и реже для биомедицинских исследований [98].

Биодеградируемые материалы на основе нативного коллаген представлены на рынке России препаратами серии «Коллост» (мембраны, гели, жгуты, порошки на основе бычьего коллагена I типа) и серии «Аллоплант» (на основе соединительнотканых образований кадаверных тканей), мембранами «Mucograft» (на основе свиного коллагена I и II типа), гемостатическими губками «Тахокомб», др.

Как и в случае прочих материалов природного происхождения для расширения сферы применения коллагена необходимо улучшать его физические свойства. Так коллагеновые материалы подвергаются ферментативной и гидролитической деградации, при добавлении клеток может произойти спонтанное гелеобразование коллагена [99]. Разупорядочение структуры коллагена также приводит к снижению механической прочности и эластичности материала. Вследствие этого актуально использование специальных подходов для улучшения манипулятивных и механических свойств, ферментативной резистентности коллагеновых материалов. Для этого используют отбор коллагена по типу, варьируют концентрацию коллагена [100]; применяют протоколы, инициирующие определенную ориентацию фибрилл при воздействии пластической деформации и нагрузок (сжатия или растяжения) [101–103].

Другие стратегии модификации коллагеновых материалов основаны на использовании различных наполнителей, например, наночастиц биоактивного стекла [104], разнообразных биомолекул (фиброина шелка [105], хитозана [106, 107], эластина [108, 109]), частиц гидроксиапатита [110]; коллаген комбинируют с синтетическими сетками, например, полилактидными [111]. Сообщается об улучшении механических свойств коллагеновых материалов при их модифицировании полимерными покрытиями [112, 113].

Одной из наиболее распространенных и известных стратегий улучшения физических свойств коллагеновых биодеградируемых материалов является сшивка различными методами. Выделяют ферментативную, химическую и физическую сшивки [98, 114, 115].

Ферментативную сшивку проводят в присутствии ферментов, которые встречаются в биологических тканях, например, используют лизилоксидазу [114, 116]. Использование ферментов является безопасным для человека, однако, не позволяет получить необходимую для регенеративной медицины плотность сшивки коллагеновых материалов.

Химическую сшивку осуществляют с помощью глутаральдегида, формальдегида, карбодиимида, эпоксидных соединений, рибозы [17, 94]. Реакции сшивания коллагена химическими агентами широко изучены и не будут обсуждаться в литературном обзоре. Отметим, что среди недостатков химической сшивки называют кальцификацию сформированных материалов, иногда низкую плотность сшивания, деполимеризацию полимерных сшивок и последующую токсичность коллагеновых материалов. Например, в случае сшивания высокотоксичным глутаральдегидом деполимеризация приводит к его высвобождению в реципиента.

Физическая или *фотохимическая сшивка* является эффективным методом упрочнения коллагена, его основное преимущество заключается в отсутствии токсичных химических реагентов [101]. УФ-облучение формирует связи из остатков ароматического тирозина и фенилаланина, которые являются менее важными для биологической активности коллагена, чем, например, поперечные связи из карбоксилат-анионов при химическом сшивании карбодиимидом [117]. Существенной побочной реакцией, приводящей к денатурации молекул коллагена, может стать разрыв цепи, поэтому часто перед физическим сшиванием проводят дегидротермальную обработку – сушат коллагеновые материалы в вакууме в течение нескольких дней при температуре до 100°C, что приводит к удалению воды и образованию дополнительных межцепочечных (межмолекулярных) сшивок [94, 118].

Как правило, степень сшивки коллагена уменьшается в ряду «химическая сшивка – физическая сшивка – ферментативная сшивка/гидротермальная обработка», поэтому для получения упрочненных коллагеновых биodeградируемых материалов, которые бы имели сопоставимые с тканью

реципиента механику и необходимую скорость деградации, актуальным является *комбинирование различных методов сшивания*. Так, например, в работе [119] на основе коллагеновой губки, обработанной глутаральдегидом, формировали гибридный материал, армированный волокнами полилактида.

В этой диссертации предлагается оригинальная схема упрочнения коллагеновых материалов (на примере пленок и губок), которая реализуется при совмещении фотохимического сшивания коллагена в присутствии *флавинмононуклеотида (ФМН)* в качестве нетоксичного фотоинициатора и направленного лазерно-индуцированного нанесения армирующих структур на основе реакционноспособного полилактида (Рисунок 6).

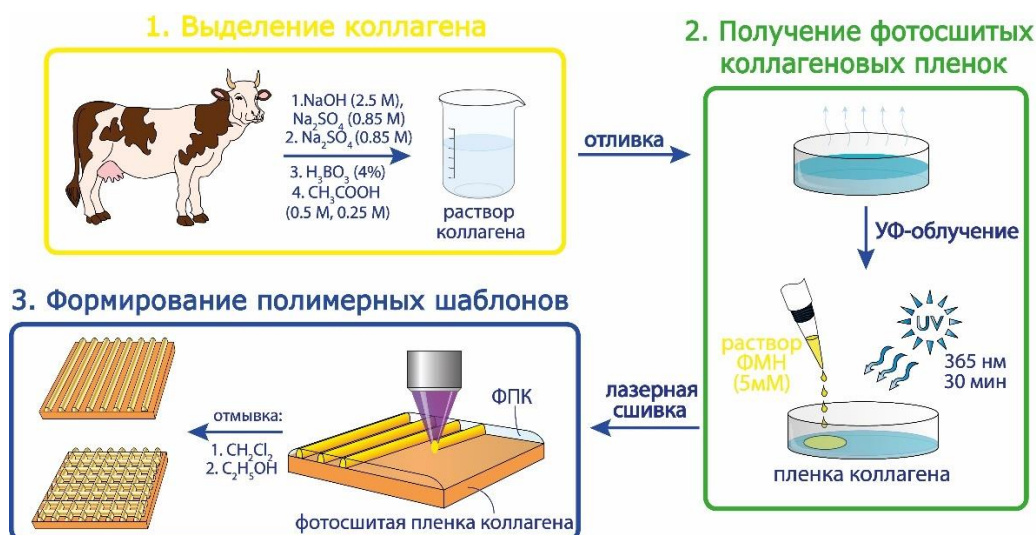


Рисунок 6 – Основные этапы предложенного подхода по формированию упрочненных коллагеновых материалов. ФПК – фотополимеризующая композиция на основе реакционноспособного полилактида

ФМН является производным рибофлавина (витамина В₂), поглощает свет в области 330–470 нм [120], при возбуждении светом может инициировать формирование супероксид-радикалов (O₂^{•-}), которые запускают ряд специфических реакций [121] (физико-химические и фотохимические свойства ФМН обсуждаются далее в разделе 1.3.3.1). Как показано в работе [101], коллаген, сшитый с помощью рибофлавина, в сравнении с несшитыми контрольными

образцами демонстрирует большее сродство к воде, обладает более толстыми фибриллами, что в результате приводит к высоким значениям модуля упругости.

Однако такой подход не позволяет регулировать в широких пределах механические свойства получаемого коллагенового материала. В связи с этим в этой диссертации в качестве дополнительной обработки предложен метод лазерно-индуцированного формирования направляющих структур на основе биосовместимого фоточувствительного полилактида. Отметим, что при таком способе на коллагеновом материале формируются участки не только с различными механическими свойствами, но и с разным химическим составом, что, например, можно использовать для направленной дифференцировки стволовых клеток [122, 123].

1.2.3. Полилактид

Полилактид или полимолочная кислота (**ПЛА**) является биodeградируемым биосовместимым алифатическим полиэфиром. Основные способы получения ПЛА – это поликонденсация молочной кислоты (получают низкомолекулярный ПЛА) и полимеризация лактида (циклического димера молочной кислоты) (Рисунок 7).

В свою очередь молочная кислота является продуктом ферментации сахаров из возобновляемого растительного сырья (кукурузы, сахарного тростника, картофеля, др.), следовательно, производство ПЛА может быть привлекательной альтернативой традиционным полимерам на основе нефтепродуктов, позволит снизить загрязнение воздуха и воды.

Наряду с такими синтетическими полимерами как поликапролактон и полигликолид, ПЛА обладает универсальностью с точки зрения свойств и применяемых технологий его обработки. ПЛА предлагают использовать для хирургических имплантатов, систем доставки лекарств, в качестве рассасывающегося шовного материала. Он является одним из перспективных кандидатов для формирования тканеинженерных конструкций для регенерации кости (включая костные пробки, винты и пластины для фиксации переломов), хряща, сухожилий, нервов, сосудов, мышечной ткани [8–11, 124].

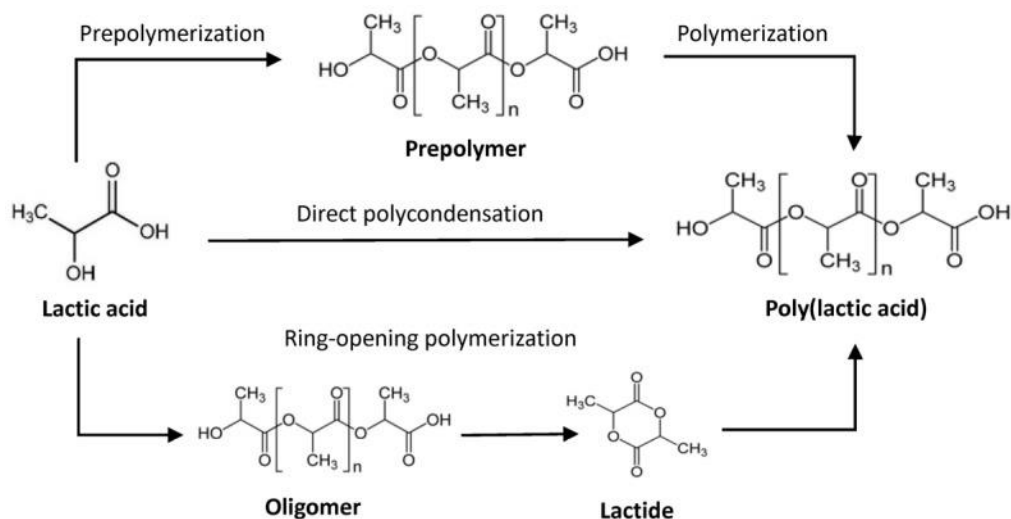


Рисунок 7 – Способы получения полилактида из молочной кислоты [125]

Среди преимуществ ПЛА, как и подобных синтетических полимеров, можно назвать высокую технологичность производства (в отличие от природных полимеров, свойства которых сильно зависят от источника выделения), что позволяет получать полимерные материалы с контролируемой скоростью деградации и механическими свойствами, причем материалы из синтетических полимеров обычно жестче природных. Кроме того, уникальные свойства ПЛА позволяют использовать традиционные технологии формирования конструкций: литье из раствора, электроформование, газовое вспенивание, др. [126].

Благодаря хиральности лактида, ПЛА может быть синтезирован в различной стереохимической форме: поли(L-молочная кислота), поли(D-молочная кислота) и поли(D,L-молочная кислота); в биомедицине наиболее широко используют первые две формы ПЛА [126]. Молекулярная масса полимера, его стереохимическая форма и термическая история, которые определяют кристалличность, будут влиять на конечные характеристики ПЛА: его механические свойства, скорость разложения, температуры плавления и стеклования. Температура стеклования ПЛА обычно находится в диапазоне от 50 до 65°C, а температура плавления около 170–180°C. С уменьшением степени кристалличности происходит снижение обеих температур [127].

ПЛА разрушается в организме путем случайного гидролитического разрыва полимерной цепи по сложноэфирной связи с уменьшением молекулярной массы и образованием мономеров молочной кислоты, которые включаются в цикл трикарбоновых кислот и выводятся из организма в виде углекислого газа и воды [53, 127]. По причине неэффективного отвода продуктов деградации ПЛА может происходить резкое закисление окружающих тканей, что приводит к сильной воспалительной реакции. Для стабилизации pH предлагают использовать низкомолекулярный ПЛА и смеси ПЛА с различными добавками (биоактивным стеклом, фосфатом кальция).

В чистом виде ПЛА подвергается медленной гидролитической деградации: полное растворение высокомолекулярного ПЛА (10^6 г/моль) при 37°C происходит за 3–5 лет [53, 126]. Следовательно, биodeградируемые материалы на основе ПЛА подходят для приложений, где требуется длительное сохранение прочности, например, при восстановлении связок и сухожилий, в стентах для урологической и сосудистой хирургии. В иных случаях проводят сополимеризацию лактида с другими мономерами (например, с мономерами лактона, полиэтиленгликолем [128]), смешивают ПЛА с другими компонентами, которые разлагаются за меньшее время, способствуют клеточной адгезии (ПЛА не является биоактивным) и являются более гидрофильными (угол смачивания ПЛА водой около 80° [127]).

В числе недостатков ПЛА называют также плохую ударную вязкость – полимер является хрупким материалом, удлинение при разрыве менее 10%; высокую стоимость производства из-за сложности синтеза – используют катализаторы в строго контролируемых условиях, требуется длительное время полимеризации, следовательно, высокое потребление энергии [11, 128].

Одним из способов преодоления описанных недостатков полимера является синтез и последующее применение *разветвленных* форм ПЛА. В настоящей диссертации использовали фоточувствительный разветвленный ПЛА, во-первых, для формирования армирующего полимерного шаблона на коллагеновых материалах с помощью лазерной 3D-печати. Во-вторых, разветвленный ПЛА являлся основным компонентом трехмерных микроструктур, сформированных

методом двухфотонной стереолитографии. В отличие от линейного полилактида, разветвленный ПЛА имеет меньшую вязкость и кристалличность, более низкие температуры стеклования и плавления [129, 130]. Эти свойства расширяют области применения ПЛА для тканевой инженерии, а именно позволяют использовать его в качестве материала-основы для получения трехмерных конструкций. Кроме того, изменяя количество и длину лучей разветвленных сополимеров ПЛА, можно контролировать механические свойства получаемого материала [131], а в случае лазерно-индуцированного структурирования также менять морфологию поверхности трехмерной конструкции [132]. Более того, наличие большего количества ненасыщенных групп у разветвленного ПЛА позволяет отказаться от использования дополнительных сшивающих агентов и тем самым создавать однородные по свойствам и составу полимерные конструкции [133, 134].

1.2.4. Полиэтиленоксид

Полиэтиленоксид или *полиэтиленгликоль* (ПЭГ) и полимеры на его основе являются биосовместимыми материалами с хорошей растворимостью и в воде, и в органических растворителях. Полимеры нетоксичны при молекулярной массе выше 400 Да [135], обладают минимальной иммуногенностью после имплантации, используются в виде гидрогелей для изготовления трехмерных структур, в качестве биосовместимых покрытий, носителей или модификаторов белков и лекарств для улучшения фармакодинамики и фармакокинетики (например, в лечении гепатита С, в слабительных средствах).

Метод получения материалов биомедицинского назначения на основе ПЭГ будет влиять на характеристики итогового продукта: проницаемость, молекулярную диффузию, модуль упругости, скорость деградации [136]. Для улучшения свойств материалов биомедицинского назначения применяют химическую модификацию ПЭГ, используют ПЭГ в качестве конъюгата для получения привитых полимерных материалов, добавляют полимеры на основе ПЭГ к другим гидрогелям для снижения скорости деградации, улучшения механических свойств и регулирования степени набухания [137].

Производное ПЭГ – *диакрилат полиэтиленгликоля (ПЭГ-ДА)* (Рисунок 8), полученный при замещении концевых гидроксильных групп акрилатными группами, может быть сшит свободнорадикальной фотополимеризацией (например, в присутствии фотоинициатора Irgacure 2959), инициируемой УФ-светом или окислительно-восстановительной реакцией, пригоден для 3D-печати. Трехмерные конструкции на основе ПЭГ-ДА предлагают использовать для инженерии хрящевой ткани, т.к. они могут имитировать статические и динамические механические свойства суставного хряща. Подробный обзор гидрогелей ПЭГ-ДА представлен в [135, 138].

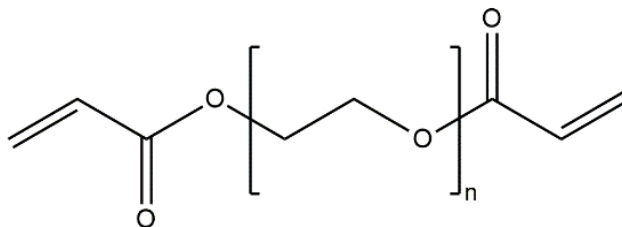


Рисунок 8 – Структурная формула ПЭГ-ДА

Из-за сильно гидрофильной природы ПЭГ-ДА биоинертен и не может поддерживать адсорбцию белков и адгезию клеток [139]. Для улучшения биосовместимости формируемых конструкций возможна прививка на полимер биоактивных пептидов, его комбинация с природными полимерами, например, работы [137, 140–142], где ПЭГ-ДА добавляли к желатиновым, альгинатным гидрогелям, коллагену, гиалуроновой кислоте, смешивали с нанокристаллической целлюлозой.

1.3. Методы формирования материалов биомедицинского назначения

В зависимости от физической формы материалы биомедицинского назначения можно разделить на 2D-материалы (волокна, пленки, микрочастицы) и 3D-материалы (гели, губки, трехмерные конструкции). В случае повреждений сложной геометрии актуальными становятся методы получения 3D-материалов, которые повторяют форму дефекта пациента.

В этой главе будет дано общее представление о существующих методах формирования 3D-материалов, а также подробно рассмотрены лазерные методы прототипирования (лазерная стереолитография и двухфотонная фотополимеризация) и лежащие в их основе физические явления.

1.3.1. Классификация существующих методов

К *традиционным* методам изготовления 3D-материалов относят выщелачивание порообразователей (солей, частиц), литье из раствора, газовое вспенивание, сублимационную (лиофильную) сушку (англ. freeze-drying), электропрядение (электроспиннинг), др. [127, 143, 144]. Использование подобных методов приводит к хаотично распределенной геометрии пор, что ограничивает клеточную адгезию и рост, т.к. отсутствуют микро- и наноразмерные сигналы для поддержания фенотипа и регулирования поведения клеток [145]. Помимо этого, трудно с высокой пространственной точностью (менее 10 мкм) контролировать геометрию и соответствие механических и физических свойств формируемых материалов тканям пациента.

Для формирования трехмерных конструкций строго определенной геометрии, с регулируемой пористостью и свойствами поверхности (локальным модулем упругости, шероховатостью) целесообразно использовать *технологии быстрого прототипирования* (в англоязычной литературе – rapid manufacturing или rapid tooling), основанные на принципах аддитивного производства, при котором происходит послойное изготовление трехмерных физических объектов на основе желаемой компьютерной модели. Подобные трехмерные структуры повторяют геометрию дефекта пациента, т.к. при их изготовлении используют данные КТ и МРТ. Аддитивные технологии позволяют регулировать общую пористость трехмерных структур, дают возможность включать в состав белки, лекарства, сигнальные молекулы, клетки и клеточные сфероиды [146].

По одной из классификаций в зависимости от принципа работы технологии быстрого прототипирования разделяют на три группы: системы на основе света или

лазеров (англ. laser-based), на основе экструзии (англ. nozzle-based) и струйная или 3D-печать (англ. printer-based) (Рисунок 9).



Рисунок 9 – Классификация методов формирования материалов биомедицинского назначения

Экструзионные методы – это одни из широко распространенных и изученных технологий формирования 3D-объектов, простота их реализации компенсирует низкое разрешение (Рисунок 10а) [147]. Например, к ним относят трехмерное осаждение волокон (англ. 3D-fibre deposition), прецизионную экструзию депонирования (англ. precision extrusion deposition), многофазное струйное затвердевание (англ. multiphase jet solidification) и другие методы, основанные на процессе плавления. Как правило, плавление ведет к нежелательному повышению температуры, поэтому были предложены способы, где используют растворение, что привлекательно для обработки гидрогелей и позволяет включать биомолекулы в трехмерную структуру непосредственно при ее создании. Так, известен способ формирования трехмерных конструкций методом low-temperature deposition modelling (LDM), при котором применяют низкотемпературную насадку (температуры ниже 0°C), что приводит к затвердеванию материала при его нанесении на платформу.

Под *методами на основе 3D-печати* обычно понимают технологии, которые в своей основе реализуют струйную печать. Струйные принтеры можно разделить на две группы: принтеры непрерывного действия и drop-on-demand («капля по

требованию») принтеры [148, 149]. В последнем случае происходит выброс отдельных капель материала при поступлении на управляющую систему электрических сигналов, а для принтеров непрерывного действия материал под давлением непрерывно выходит струей из сопла принтера, после чего струя разбивается на отдельные капли (Рисунок 10b). Обе группы струйных принтеров работают с каплями в диапазоне от 15 до нескольких сотен микрометров, для структурирования обычно используются материалы с низкой вязкостью, а шероховатость получаемой конструкции может способствовать клеточной адгезии.

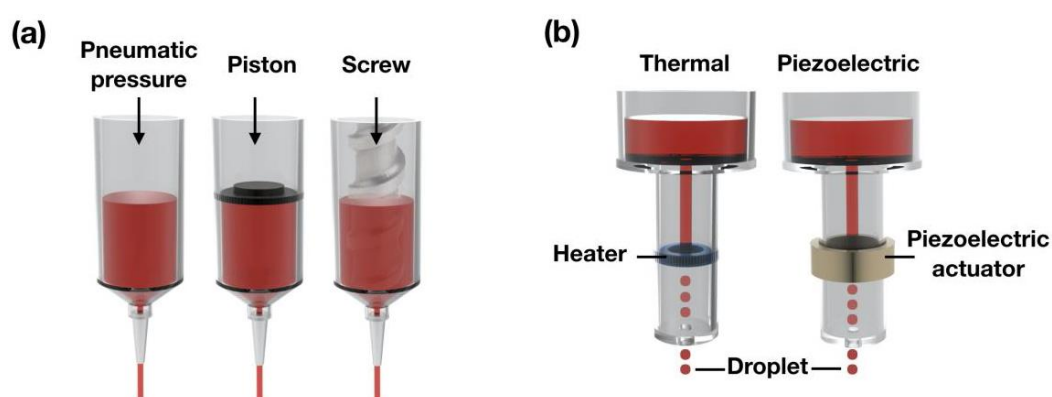


Рисунок 10 – Схематическая иллюстрация методов формирования материалов биомедицинского назначения на основе экструзии (a) и струйной печати (b) [150]

К лазерным методам формирования 3D-конструкций относят однофотонную стереолитографию и многофотонную полимеризацию (англ. multi-photon polymerization), когда структурирование конструкции происходит в жидком фотополимере; лазерно-индуцированный прямой перенос (англ. laser-induced forward transfer, LIFT) и матричное импульсное лазерное испарение (англ. matrix-assisted pulsed laser evaporation, MAPLE), при которых происходит перенос и осаждение термочувствительных полимерных материалов на подложку; лазерную абляцию, когда лазером селективно удаляют материал, формируя отверстия, сетки. Печать с использованием света часто стоит дорого, имеются ограничения в выборе доступных биосовместимых фотополимеров [148], при этом лазерные методы

позволяют осуществлять пространственный контроль печати с разрешением менее 10 мкм [145].

Далее будет рассмотрена информация, важная в контексте этой диссертации: методы лазерной стереолитографии и двухфотонной полимеризации (глава 1.3.2), понятие «фотополимеризация» и характеристики используемых в работе фотоинициаторов (глава 1.3.3). Детальное обсуждение прочих методов формирования трехмерных структур можно найти в обзорах [127, 151, 152].

1.3.2. Лазерные технологии быстрого прототипирования

Лазерные технологии послойного изготовления трехмерных объектов разделяют на три группы [153]: лазерный раскрой листовых материалов; спекание и наплавка порошков металлов, керамики и полимеров; фотоинициированная полимеризация. С точки зрения формирования трехмерных структур лазерные методы на основе фотосшивания интересны благодаря возможности пространственно-временного контроля облучения, что позволяет формировать конструкции с необходимыми свойствами, например, скоростью набухания, механической прочностью, скоростью деградации. В качестве исходного материала используют *фотополимеризующиеся композиции (ФПК)*, которые состоят из фотополимера и *фотоинициатора (ФИ)*. ФПК могут включать в себя также клетки, биоактивные вещества, др. [135].

1.3.2.1. Лазерная стереолитография

Наиболее популярным методом прототипирования, основанным на эффекте однофотонного поглощения, является метод лазерной стереолитографии (англ. stereolithography, SLA). Устройство и принцип работы лазерного стереолитографа приведены на Рисунке 11.

Стереолитограф состоит из резервуара, заполненного жидкой ФПК, лазерного источника (используют УФ- и ИК-излучение), сканирующей системы, которая контролирует движение лазерного луча в горизонтальной плоскости XY и специальной платформы для перемещения в вертикальной плоскости.

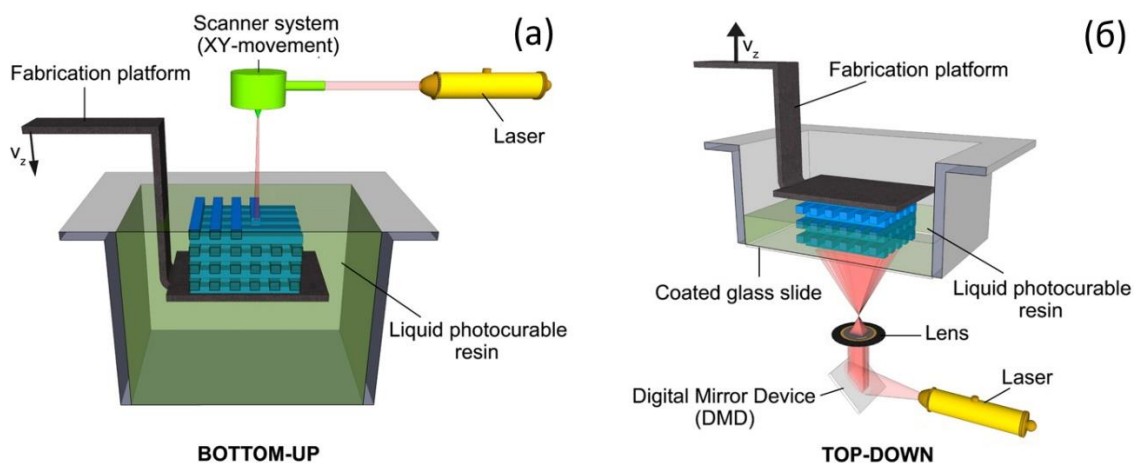


Рисунок 11 – Схемы установок лазерной стереолитографии, которые работают по принципу «снизу вверх» (а) и «сверху вниз» (б) [144]

Сканирование ФПК лазерным излучением приводит к образованию активных центров (радикалов, ионов, активированных комплексов), которые, взаимодействуя с мономерными молекулами фоточувствительного материала, запускают процесс полимеризации, следовательно, происходит локальное изменение фазового состояния однородной среды: в облученной области образуется сшитый полимер. Создание трехмерной конструкции возможно благодаря специальной платформе, перемещающейся по оси Z на величину одного слоя, при этом его высота, как правило меньше, чем глубина отверждения, что обеспечивает хорошее сцепление последующих слоев. На глубину отверждения влияет природа реакционноспособного мономера, тип и концентрация ФИ, скорость лазерного сканирования и мощность лазера. Следующий шаг состоит в отмывке сформированных полимерных структур от несшитой ФПК, также в большинстве случаев необходимо дополнительное отверждение структур УФ-светом [154].

Важные преимущества лазерной стереолитографии – это формирование структур необходимой геометрии и пористости, простота и быстрота реализации. Изменяя параметры лазерного структурирования – расстояние между отдельными проходами лазерного луча и расстояние между слоями, мощность и скорость сканирования лазерным излучением, количество проходов одного слоя лазером – и

подбирая состав ФПК, возможно регулировать механические свойства получаемой структуры и ее шероховатость, следовательно, формировать материал со свойствами близкими к замещаемым тканям.

Разрешение метода лазерной стереолитографии в основном определяется природой фотополимера и ФИ, находится в пределах 50–200 мкм [150, 155]. Для масштабирования использования лазерной стереолитографии в регенеративной медицине необходима разработка широкой номенклатуры биосовместимых ФПК. В частности, уже получены трехмерные структуры на основе желатина [156], гиалуроновой кислоты [157], фибрина [158].

1.3.2.2. Многофотонные процессы и двухфотонная микростереолитография

С начала 1990-х годов известно, что воздействие на материалы ультракоротких лазерных импульсов значительно эффективнее, нежели воздействие лазерного излучения в непрерывных режимах или лазерных импульсов большей длительности [159]. Если в обычных источниках света напряженность электрического поля находится в пределах 1 В/см, то удлинение диполя при таких воздействиях не превышает 10^{-16} м, что много меньше характерных размеров атомов и молекул ($10^{-10} \sim 10^{-8}$ м). Напротив, напряженность электрического поля световой волны в случае фемтосекундных лазерных импульсов достигает 10^8 В/см – этого вполне достаточно для непосредственного разрыва химических связей. С использованием фемтосекундных импульсов могут быть запущены различные нелинейные эффекты, в частности, многофотонное поглощение, которое используют в лазерных технологиях обработки материалов [160].

Многофотонные процессы (МП) – это процессы взаимодействия электромагнитного излучения с веществом, при которых в одном элементарном акте одновременно происходит поглощение и/или испускание нескольких фотонов. Разность энергий поглощенных и испущенных фотонов равна энергии, приобретаемой или теряемой атомами или молекулами. В этом случае происходит многофотонный переход частиц между квантовыми состояниями [161].

Простейшими МП являются двухфотонные. В элементарном акте комбинационного рассеяния частица одновременно поглощает фотон с энергией $\hbar\omega_1$ и испускает фотон с энергией $\hbar\omega_2$ (Рисунок 12а). Рассеивающая частица при этом переходит из состояния с энергией E_1 на уровень с энергией E_2 . При двухфотонном поглощении (Рисунок 12б) частица приобретает энергию $E_2 - E_1$, равную сумме энергий двух поглощённых фотонов $\hbar\omega_1 + \hbar\omega_2$, происходит т.н. двухфотонное возбуждение атома или молекулы.

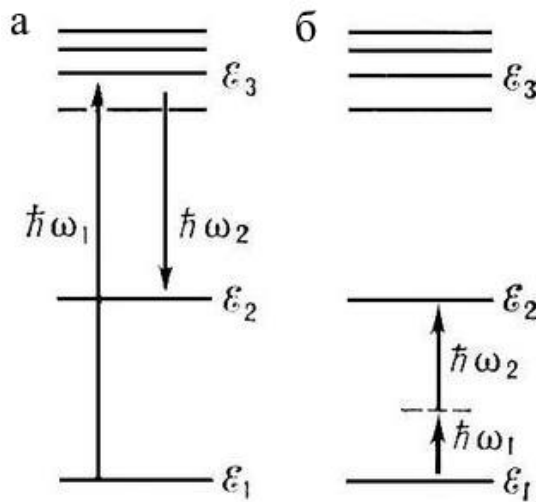


Рисунок 12 – Квантовые переходы для двухфотонных процессов в случае комбинационного рассеяния (а) и двухфотонного возбуждения (б) [161]

Каждый фотон, возникающий при МП, может испускаться либо самопроизвольно, либо под действием внешнего излучения с той же частотой (вынужденное испускание). Отношение вероятности МП с участием m фотонов к вероятности МП с участием $(m-1)$ фотонов по порядку величины равно $(E/E_{\text{ат}})^2$, где E – амплитуда напряжённости электрического поля излучения, $E_{\text{ат}}$ – средняя напряжённость внутриатомного электрического поля ($E_{\text{ат}} \sim 10^9$ В/см). Для нелазерных источников излучения $E \ll E_{\text{ат}}$ и с увеличением числа фотонов, участвующих в элементарном акте, вероятность МП резко уменьшается [161]. В связи с этим до появления лазеров помимо однофотонных наблюдали лишь двухфотонные процессы при рассеянии света: резонансную люминесценцию,

рэлеевское и комбинационное рассеяние света, спонтанное рассеяние Мандельштама-Бриллюэна. Лазеры позволяют получать высокие плотности мощности излучения ($E \sim E_{\text{ат}}$), при этом резко возрастает вероятность МП.

МП реализуется в окрестности фокуса лишь в очень малом 3D-объеме, который не превосходит λ^3 , тем самым при использовании фемтосекундных лазеров для формирования трехмерных микроструктур достигается высокое пространственное разрешение [160]. Помимо этого, когда материалы находятся под воздействием фемтосекундных лазерных импульсов, энергия фотонов выделяется много быстрее, нежели электроны могли бы передать ее решетке, так что исключаются нежелательные термические эффекты и такое возбуждение оказывается «теплоизолирующим» [162].

МП применяются для создания трехмерной оптической памяти, изомеризации фотохромных материалов, проведения кавитационных процессов, создания оптических волноводов и т.д. [163–165]. Однако наибольшее распространение МП получили в связи с разработкой метода трехмерной лазерной микростереолитографии, основанной на *двухфотонной полимеризации* (метод **2ФП**), который можно использовать для формирования трехмерных микроструктур с разрешением печати менее 100 нм [145, 166].

Отсутствие нежелательных термических реакций в сравнении с классическим методом однофотонной стереолитографии [167] делает метод 2ФП привлекательным для широкого спектра приложений, включая фотонику, микрофлюидику, сенсоры и биомедицину, когда в процессе изготовления возможна иммобилизация чувствительных компонентов (белков, клеток и т.д.) [168]. Так как в основе метода лежит нелинейное поглощение материала, то не требуется использовать дополнительные поглотители (например, диоксид титана), что снижает токсичность ФПК и формируемой конструкции.

Обычно в ФПК для метода 2ФП как и для однофотонной стереолитографии есть два основных компонента – ФИ и фоточувствительные мономеры или олигомеры. На начальных этапах развития метода 2ФП для создания полимерных микроструктур использовали ФПК, разработанные для однофотонной

стереолитографии по причине их коммерческой доступности [169, 170]. Стоит отметить, что несмотря на большой пул исследований и перспективность метода с точки зрения формирования трехмерных конструкций, моделирующих клеточное поведение [155, 171, 172], существует лишь ограниченное количество биоразлагаемых и коммерчески доступных фотополимеров для 2ФП. Среди других недостатков метода 2ФП можно отметить высокую стоимость лазерной системы и сложность масштабирования из-за низкой скорости печати.

1.3.3. Фотополимеризация. Фотоинициаторы

Фотополимеризация – это полимеризация, которая инициируется воздействием света. Образование фотоинициированных полимеров возможно по свободнорадикальному механизму и катионному механизму [173], причем большинство коммерческих ФПК основаны на химии свободных радикалов. Такие ФПК обычно состоят из смесей этиленовых ненасыщенных соединений (акрилатов или метакрилатов) и содержат небольшое количество ФИ (0,5–6%).

Молекула ФИ поглощает свет (обычно УФ) и распадается на свободные радикалы, которые в одних случаях реагируют с функциональными группами преполимера, в иных – абстрагируют атомы водорода от других молекул. Это приводит к образованию инициирующих частиц, а последующее формирование ковалентных связей между полимерными цепями происходит как при традиционной свободнорадикальной полимеризации (Рисунок 13) [135].

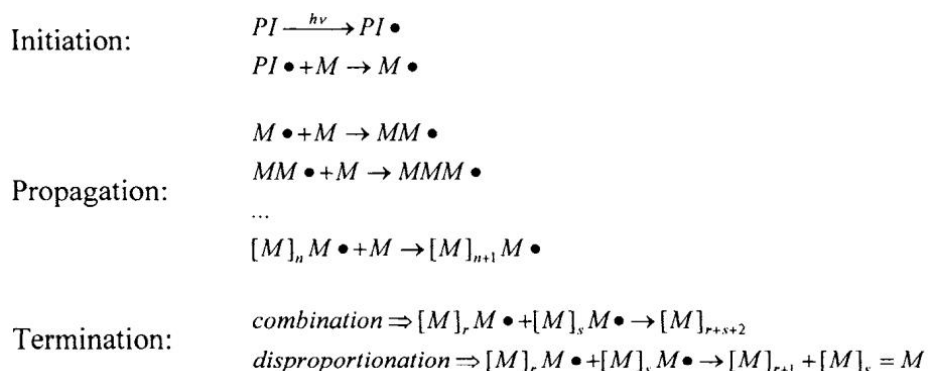


Рисунок 13 – Схема фотоотверждения [173]. PI – фотоинициатор; M – реакционноспособный мономер или полимер

Отметим, что инициируемый радикалами рост цепи имеет несколько ограничений. Стоит учитывать ингибирующее воздействие кислорода, неоднородности в сформированной полимерной сетке, присутствие остатков непрореагировавшей ФПК, которые могут отрицательно сказываться на биосовместимости [174].

Крайне важным является выбор ФИ. Среди определяющих характеристик ФИ можно назвать спектр поглощения и молярный коэффициент экстинкции, растворимость в фотополимере, фотостабильность и эффективность генерации свободных радикалов [175]. Одна из проблем при выборе ФИ – это потенциальная токсичность свободных радикалов, которые могут реагировать с нуклеиновыми кислотами и белками клеток, тем самым снижать их жизнеспособность, вызывать повреждение ДНК. Цитотоксичность сильно зависит от типа и концентрации ФИ, времени и интенсивности воздействия света. Для биомедицинских приложений наиболее широко используют радикальные ФИ благодаря их низкой цитотоксичности, тогда как применение катионных ФИ приводит к закислению фотополимера и токсичности формируемых трехмерных структур [135].

Радикальные ФИ по механизму формирования свободных радикалов разделяют на два типа: фоторасщепляемые (тип I) и бимолекулярные или нерасщепляемые (тип II) [176]. К типу I относят производные бензоина и ацетофенона, которые поглотив падающий фотон, распадаются на два радикала, которые инициируют фотосшивание. ФИ типа II, например, камфорхинон, тиоксантон и бензофенон, имеют более сложный механизм инициации (Рисунок 14): быстрый перенос электрона и последующее медленное отщепление протона приводит к образованию вторичных радикалов для фотосшивания. В сравнении с ФИ типа I подобные ФИ гораздо менее эффективны из-за бимолекулярного механизма, обратного переноса электрона, эффекта «клетки» растворителя.

Далее рассмотрим свойства ФИ, которые использовали в диссертации: рибофлавина, Irgacure 2959, 4,4'-бис(диэтиламино)бензофенона.

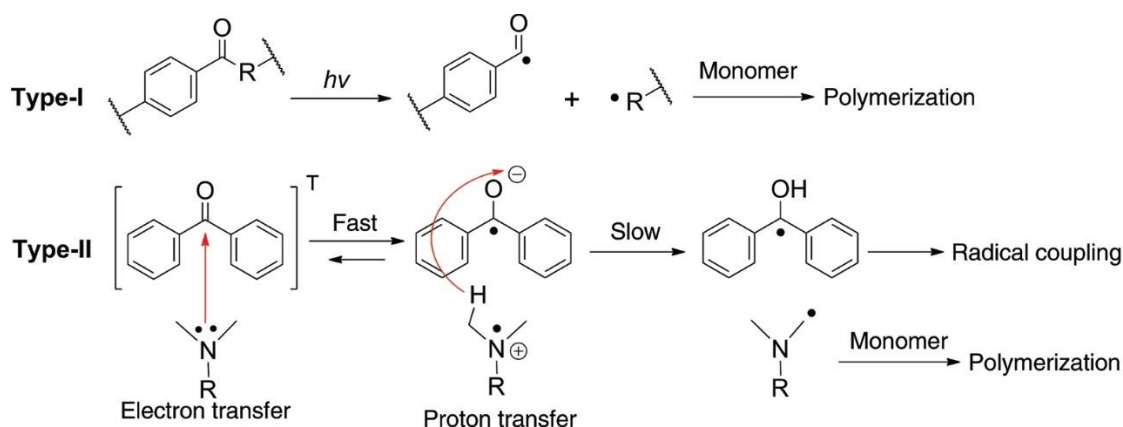


Рисунок 14 – Механизм фотоинициации для фотоинициаторов типа I и II [176]

1.3.3.1. Рибофлавин

Рибофлавин или витамин В₂ – вещество желтого цвета, в водном растворе при рН = 7 имеет максимум абсорбции в синей ($\lambda = 445$ нм) и в ближней УФ-области ($\lambda = 373$ нм) (Рисунки 15, 16а).

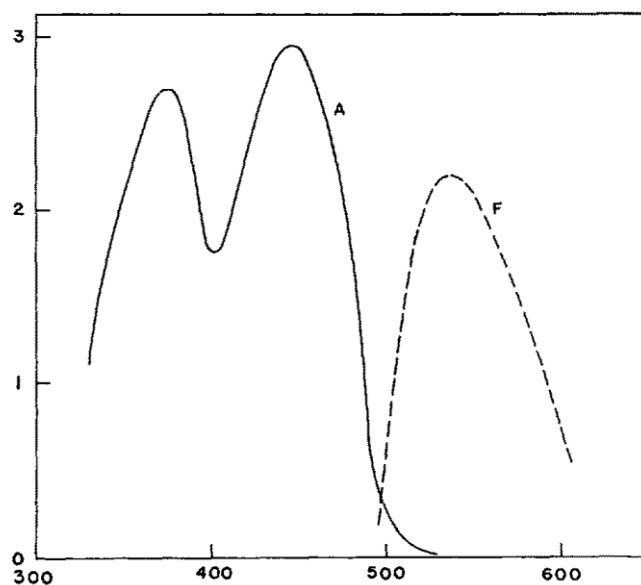


Рисунок 15 – Спектры абсорбции (A) и флуоресценции (F) для рибофлавина при рН = 7 [177]

Все полосы имеют высокие молярные коэффициенты экстинкции ($> 10^4$ М⁻¹см⁻¹), что указывает на электронные $\pi - \pi^*$ переходы. Также есть максимумы абсорбции в дальней УФ-области: при 260 (267) и 224 (223) нм [120, 177, 178].

Для анализа рибофлавина часто используют его свойство флуоресцировать в желто-зеленой области при 520 нм при возбуждении ближним УФ или синим светом (Рисунок 15) [177]. Квантовый выход флуоресценции и время жизни первого возбужденного синглетного состояния S_1 составляют 0,26 и 5 нс, соответственно. На эти значения, как и на положения полос абсорбции и коэффициенты молярной экстинкции влияют полярность и протонный/апротонный характер растворителя, а также значение pH. Хотя нейтральный рибофлавин обладает сильной флуоресценцией, протонированные частицы, образующиеся при $\text{pH} < 4$, не флуоресцируют, а анионные частицы при $\text{pH} > 9,7$ флуоресцируют слабо [178].

В биологических системах рибофлавин представлен в виде рибофлавин-5'-фосфата или флавинмононуклеотида (**ФМН**) (Рисунок 16b) и в виде флавинадениндинуклеотида [177]. Эти соединения, присутствующие в ферментах и фоторецепторах, как активные хромофоры в процессах окисления и редукции, участвуют в клеточном метаболизме, играют важную роль в процессах репарации ДНК [179]. Наличие единичной фосфатной группы не влияет на спектр абсорбции вещества, однако, значительно увеличивает его растворимость в воде: для рибофлавина она равняется 0,045 мг/мл; для ФМН часто используют водные растворы 92 мг/мл [180].

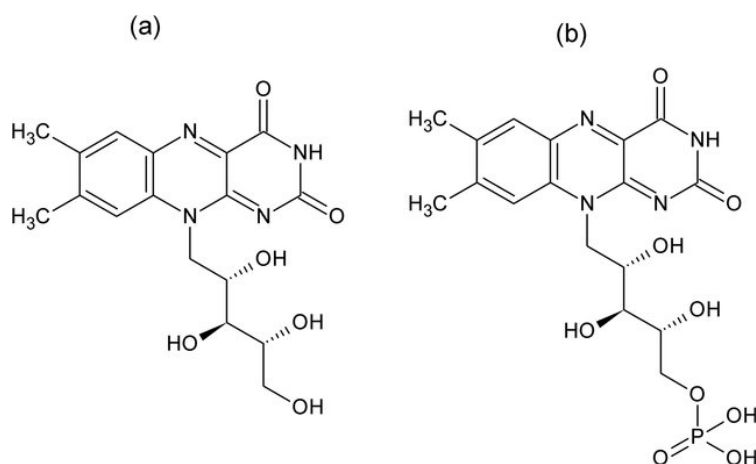


Рисунок 16 – Химическая структура рибофлавина (a) и флавинмононуклеотида (b)

При возбуждении светом флавины реагируют с нуклеиновыми кислотами, могут служить сенситизатором при разрушении опухолевых клеток в фотодинамической терапии, катализировать окисление пестицидов [121, 179]. Сшивание компонентов внеклеточного матрикса – одна из областей применения фотохимических свойств рибофлавина. Его используют для лечения варикозного расширения вен, при деградации дентина, при ряде офтальмологических заболеваний (кератоконус, инфекционный кератит, др.).

При фотолизе рибофлавин возбуждается до синглетного состояния с более высокой энергией с последующим безызлучательным межсистемным переходом в возбужденное триплетное состояние. Из этого состояния рибофлавин может участвовать в процессе фотосенсибилизированного окисления по одному из двух механизмов. При низкой концентрации кислорода реализуется механизм типа I, когда рибофлавин передает энергию субстрату и генерирует свободные радикалы рибофлавина, которые затем взаимодействуют с молекулярным кислородом в основном состоянии для получения продуктов окисления. В механизме типа I также происходит образование активных форм кислорода: $\text{HO}\bullet$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ и $\text{O}_2\bullet$.

В механизме типа II рибофлавин передает энергию молекулярному кислороду в основном состоянии, в результате чего генерируется более реактивный синглетный молекулярный кислород ($^1\text{O}_2$), который может дополнительно генерировать пероксидные и гидроксильные радикалы. Синглетный кислород при взаимодействии с субстратом приводит к конечным продуктам окисления (Рисунок 17). Для исследования механизма реакций в фоточувствительной системе обычно используют радикальный поглотитель кислорода – азид натрия [178, 180].

Активные формы кислорода, являясь реакционноспособными частицами, способствуют реакциям с карбонильными группами белковой цепи, что увеличивает поперечное сшивание белков и меняет их биологическую активность. Так, коллагеновые гели в смесях с полисахаридами, ПЭГ и рибофлавином успешно используют для инкапсулирования клеток, что интересно с точки зрения регенерации мениска, дентина, кожи [17], клинически доказана эффективность УФ-сшивания роговицы, пропитанной рибофлавином [181].

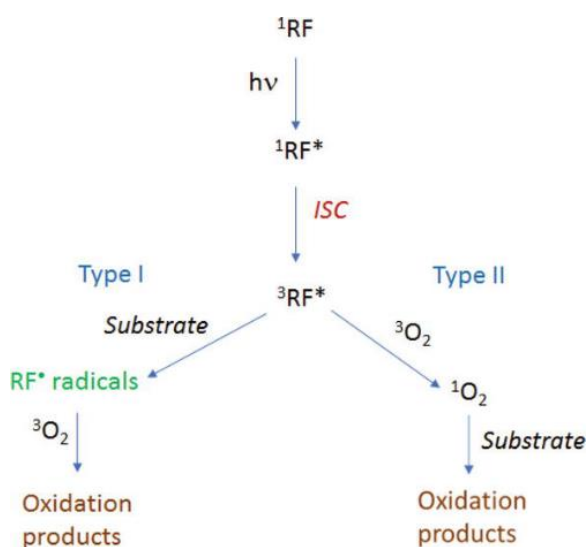


Рисунок 17 – Схема фотосенсибилизирующего окисления в присутствии рибофлавина [178]

1.3.3.2. Irgacure 2959

Irgacure 2959 (1-[4-(2-гидроксиэтокси)-фенил]-2-гидрокси-2-метил-1-пропан-1-он) является наиболее широко используемым УФ-чувствительным ФИ, благодаря таким свойствам как растворимость в воде, низкая цитотоксичность и минимальная иммуногенность [135, 175]. Спектр поглощения Irgacure 2959 характеризуется широкими полосами с максимумами при 276 нм и 220 нм (Рисунок 18).

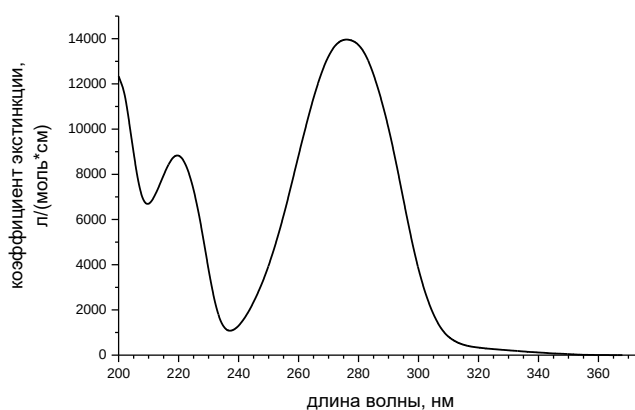
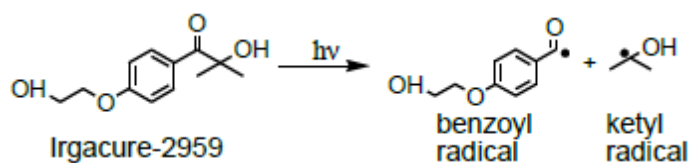


Рисунок 18 – Спектральное распределение коэффициента экстинкции Irgacure 2959 в спирте

Irgacure 2959 является ФИ типа I, в [182] показано, что при длине волны 267 нм он разрушается с образованием бензоильных и кетильных фрагментов:



Эту реакцию расщепления детально изучили в [183] и определили промежуточные соединения в водных растворах (Рисунок 19). При воздействии на Irgacure 2959 высокоинтенсивного излучения, его молекула переходит из основного состояния в возбужденное синглетное, которое затем переходит в триплетное состояние за 4,0 пс. Разрыв С–С связей, с образованием бензоильных и кетильных фрагментов, происходит за 27,1 пс.

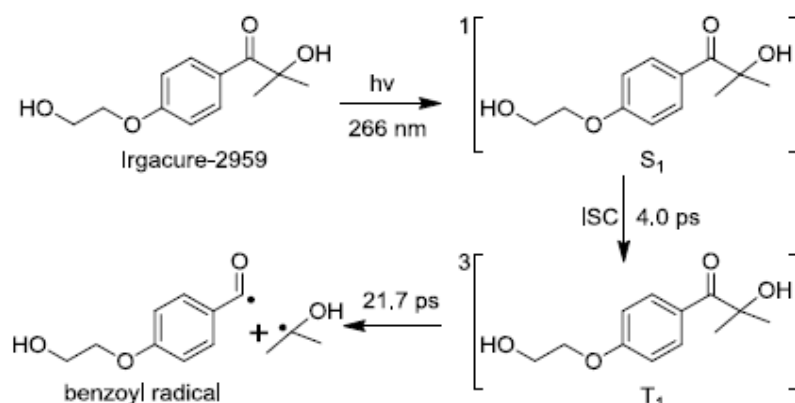


Рисунок 19 – Схема распада Irgacure 2959 при облучении светом с длиной волны 266 нм [183]

Irgacure 2959 использовали для инкапсуляции клеток *in situ* [176, 184], для адресной доставки лекарств [185], в качестве двухфотонного ФИ для гидрогелей на основе метакрилированного желатина [186], ПЭГ-ДА [187], метакрилированной гиалуроновой кислоты [188].

Среди недостатков Irgacure 2959 называют низкую эффективность инициации, высокую стоимость синтеза, узкий диапазон поглощения (до 365 нм),

возможное негативное влияние на клетки, т.к. инициирование происходит средневолновым УФ-излучением [148, 189].

1.3.3.3. 4,4'-бис(диэтиламино)бензофенон

4,4'-бис(диэтиламино)бензофенон – желтоватый порошок молекулярной формулы $C_{21}H_{28}N_2O$, впервые использован в качестве ФИ в 1970 г. Является производным бензофенона, содержит как кето-, так и аминогруппу (Рисунок 20а), что обеспечивает хорошую биосовместимость и заставляет его молекулу демонстрировать сильное поглощение при 365 нм, при этом без значительного поглощения в видимом свете (Рисунок А.4) [190]. Кроме того, доступность на рынке светодиодов длиной волны от 350 до 500 нм (т.е. перекрывающих спектр абсорбции 4,4'-бис(диэтиламино)бензофенона) является одной из причиной его широкого использования в ФПК [191].

Фотораспад 4,4'-бис(диэтиламино)бензофенона происходит по аналогии с механизмом фотолиза системы «кетон – амин» с образованием пары нейтральных свободных радикалов (Рисунок 20б). Принято считать, что при поглощении света карбонильная группа переходит в возбужденное синглетное состояние, которое может вернуться в основное состояние или путем интеркомбинационной конверсии перейти в триплетное состояние. Затем возбужденный триплет образует эксиплекс с молекулой 4,4'-бис(диэтиламино)бензофенона в основном состоянии с образованием двух ион-радикалов. Два нейтральных свободных радикала образуются при отщеплении протона. Обычно считается, что аминорадикал ответственен за инициирование полимеризации, а кеторадикал является неэффективным инициатором из-за стерических затруднений, в результате которых он димеризуется [190].

4,4'-бис(диэтиламино)бензофенон используют в качестве добавки для улучшения фотоинициирования. Например, в [191] его добавляли к стоматологической ФПК с традиционной фотоиницирующей парой камфорхинона и амина, что повысило скорость фотополимеризации и степень конверсии $C=C$ связей в процессе 3D-печати. В качестве ФИ для формирования

трехмерных микроструктур методом 2ФП его использовали в [192], а в [193, 194] продемонстрирована биосовместимость трехмерных микроструктур и их остеогенные свойства, следовательно, потенциал для инженерии костной ткани. Из недостатков 4,4'-бис(диэтиламино)бензофенона можно назвать высокую автофлуоресценцию, которая часто пересекается с флуоресценцией красителей, что затрудняет анализ клеточного поведения [193].

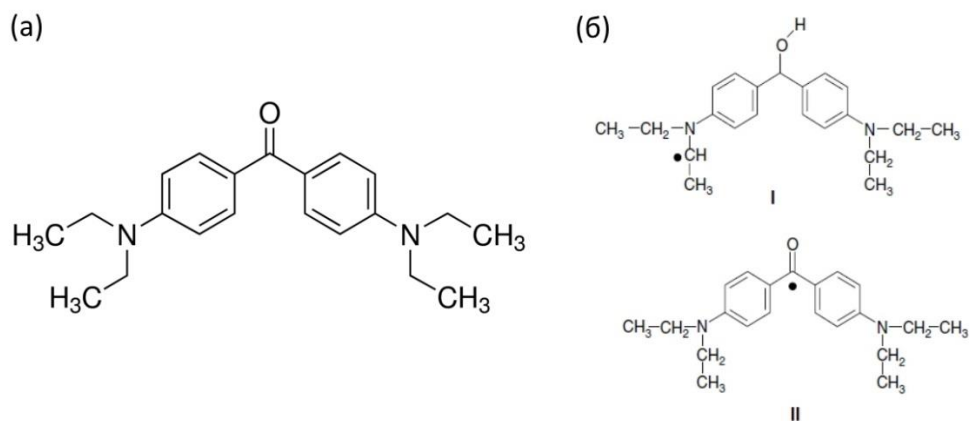


Рисунок 20 – Химическая структура (а) и радикалы после фотолиза (б) фотоинициатора 4,4'-бис(диэтиламино)бензофенона

1.4. Методы пост-обработки материалов биомедицинского назначения

В тканевой инженерии дополнительная обработка материала после его формирования позволяет регулировать такие важные характеристики как механические свойства, пористость, поверхностную энергию и смачиваемость, тем самым изменять скорость деградации, профиль релиза импрегнированных биоактивных веществ, улучшать сцепление материала с окружающими тканями, контролировать клеточное поведение (адгезию и рост) [14].

Помимо этого, пост-обработку можно рассматривать в качестве этапа очистки трехмерных конструкций, т.к. после структурирования с использованием экструзионных и лазерных технологий остаются несшитые фрагменты полимеров и олигомеров, сшивающие агенты и фотоинициаторы, которые снижают биосовместимость конструкций, могут привести к воспалительной реакции в организме, тем самым затруднить заживление [195].

В случае использования метода 2ФП часто наблюдается анизотропная усадка конструкций, несоответствие размеров 3D-модели и сформированной структуры [196]. Т.к. для 2ФП используют вязкие ФПК и полимеризация происходит лишь в небольшом объеме материала – вокселе, то в готовой конструкции в ловушке между вокселями присутствуют остатки ФПК, распределение компонентов в трехмерной конструкции неоднородно [197]. Для того чтобы обойти ограничения метода 2ФП используют различные направляющие усадки, увеличивают время лазерного воздействия, регулируют мощность лазера, применяют методы пост-обработки материалов по аналогии с методами однофотонной фотополимеризации. Пост-обработка УФ-светом наравне с обработкой температурой является одним из доступных и распространенных методов, при этом она эффективна для субмикронных структур с открытыми ячейками [198].

Методы пост-обработки с целью модификации свойств поверхности материалов биомедицинского назначения подразделяют на две категории: физические и химические [199]. Физические методы, например травление, пескоструйная и механическая обработка, приводят к изменению топографии поверхности материала практически без изменений в химическом составе. Химические методы могут привести к оксидированию/азотированию/карбидированию поверхности, ее функционализации. Хорошо зарекомендовавшие себя химические методы – плазменное и химическое осаждение из паровой фазы, атомно-слоевое осаждение и электрохимическое осаждение.

Сообщается об обработке материалов биомедицинского назначения химическими растворителями (например, структур из ПЛА щелочью), литографией (фото-, электронной, сканирующей зондовой), фемтосекундным лазером, спин-коутингом (нанесение полимерных пленок микронного и нанометрового размеров), электроспиннингом (нанесение волокон от 10 нм до нескольких микрон); используют метод послойной сборки (англ. layer-by-layer assembly), самособирающиеся монослои (англ. self-assembled monolayers) и полимерные щетки (polymer brushes) [24, 127].

Далее будут рассмотрены методы пост-обработки, которые использовали в этой диссертации: сверхкритическая флюидная обработка и методы формирования клеточных шаблонов.

1.4.1. Сверхкритический диоксид углерода

Согласно определению ИЮПАК, максимальная температура, при которой газ может превратиться в жидкость при повышении давления, называется критической температурой фазового перехода в сверхкритическое состояние ($T_{кр}$), а минимальное давление, при котором вещество при критической температуре может быть сконденсировано, называется критическим давлением ($P_{кр}$) [200]. Вещество при переходе температуры и давления выше критических значений превращается в *сверхкритический флюид*, который одновременно демонстрирует свойства как жидкости (растворяющая способность, плотность), так и газа (вязкость).

К особенностям сверхкритических флюидов можно отнести их способность плавно изменять свои свойства (плотность, вязкость, диэлектрические параметры, растворяющую способность, др.) при изменении давления и/или температуры [12]. Например, на Рисунке А.5 приведена диаграмма зависимости плотности диоксида углерода от параметров состояния.

Хотя большое количество веществ может быть использовано в качестве сверхкритических флюидов, на практике используют лишь две среды в сверхкритическом состоянии – воду и диоксид углерода. Последний вызывает особый интерес благодаря своим специфическим физико-химическим свойствам: негорючесть, нетоксичность, относительная инертность в химических процессах, низкая вязкость (примерно до 100 раз ниже, чем у жидкостей), очень низкое значение поверхностного натяжения и высокий коэффициент диффузии (выше примерно в 100 раз, чем у жидкостей) [12].

Переход в *сверхкритический диоксид углерода* ($scCO_2$) происходит при достаточно низких параметрах (7,38 МПа (73,8 бар) и 31,1°C) (Рисунок А.6), поэтому после проведения процесса с участием этого растворителя нет

необходимости в его дополнительной очистке с целью повторного использования, а также в очистке целевого продукта от CO_2 (он переходит в газообразное состояние при снижении давления и/или температуры) [12]. Для сравнения, сверхкритическая вода существует при температуре выше 374°C и давлении более 22,1 МПа, что требует гораздо больше энергии для ее использования [201].

scCO_2 может растворять гидрофобные вещества, удобен для импрегнации различных соединений в полимеры и пористые тела [202]. Среди недостатков scCO_2 – низкая полярность, что делает его менее эффективным для экстракции полярных соединений, например, сахаров и неорганических солей, и требуется использование небольших количеств сорастворителей, например, спиртов, ацетона, уксусной кислоты. Вода не растворяется в scCO_2 , однако воду можно использовать для производства эмульсии «вода – scCO_2 », которая может быть нанореактором для синтеза материалов (подробно, например, в [201]).

Использование scCO_2 в различных технологических процессах актуально с точки зрения создания экологически чистых «зеленых» производств. Углекислый газ может быть получен как побочный продукт многих промышленных процессов, что делает недорогим использование scCO_2 [201].

Области приложения scCO_2 подробно рассмотрены в обзорах [200, 203, 204]. Кратко, scCO_2 широко применяется в производстве пищевых продуктов, например, для экстракции масел из растительного сырья [205], для декофеинизации кофе, в парфюмерной промышленности, в качестве технологии повышения нефтеотдачи пластов, для подготовки и крашения текстильных волокон [202]. Благодаря большой проникающей способности scCO_2 используют для нанесения покрытий, для импрегнации, пропитки и для обратных процессов – сушки и очистки материалов (например, для отработавших железнодорожных шпал) [201].

Помимо этого scCO_2 применяют для синтеза и модификации полимерных материалов (аэрогелей, пен и композитов) [12, 200, 203]. scCO_2 является перспективным флюидом для фармацевтической промышленности: его интересно использовать для очистки, повышения биодоступности малорастворимых лекарственных веществ, для получения препаратов с пролонгированным выходом.

Стерилизующее воздействие scCO_2 на органические полимерные материалы дает возможность формировать низкоантигенные материалы для реконструктивной хирургии. Такой подход не требует использования высоких температур как в случае, например, с паровой стерилизацией, когда будет происходить повреждение внеклеточного матрикса из-за денатурации белка. Стерилизация УФ-излучением в свою очередь обладает низкой проникающей способностью и не подходит для пористых непрозрачных материалов. Дорогостоящей является также стерилизация этиленоксидом и гамма-излучением [200].

В ряде работ [206, 207] показано влияние scCO_2 обработки на механические свойства биоматериалов (связок, сухожилий, аортальных клапанов) без изменения их трехмерной структуры. Использование среды scCO_2 для экстракции низкомолекулярных компонентов из полимерных структур предлагают в качестве способа повышения стабильности и биосовместимости материалов, содержащих высокомолекулярные соединения [12]. Обработку в среде scCO_2 можно рассматривать также как способ регулирования механических свойств и шероховатости поверхности полимерных структур [13].

1.4.2. Методы формирования шаблонов для направленного клеточного роста

Помимо улучшения клеточной адгезии к поверхности материалов биомедицинского назначения важной является задача по формированию определенного клеточного паттерна (англ. cell patterning) или шаблона, что актуально, во-первых, в фундаментальных исследованиях механотрансдукции, микрофлюидики, взаимодействия гетерогенных клеток при их совместном культивировании; влияния межклеточных контактов на процессы дифференцировки, деления, смерти; в изучении различных заболеваний, например рака. Во-вторых, с точки зрения регенерации тканей необходимо определенное пространственное положение клеток. Например, для регенерации скелетных мышц мышечные клетки должны иметь линейный рисунок, а для восстановления печени клетки располагают в виде шестиугольных или многоугольных структур [208].

Манипуляция клетками возможна с использованием оптических и оптоэлектронных пинцетов, акустическими волнами, диэлектрофорезом (перемещение клеток в зависимости от их электрической проницаемости), с помощью маркировки клеток магнитными наночастицами (золота, оксида железа), путем нанесения неадгезивных гидрогелей (например, ПЭГ, полиакриламида) [209]. Известны технологии, основанные на лазерном переносе клеток, среди которых, например, лазерно-индуцированный прямой перенос (LIFT), биологическая лазерная обработка (англ. biological laser processing), матричное импульсное лазерное испарение (MAPLE), др. [210].

Одним из многообещающих методов формирования клеточных шаблонов путем изменения шероховатости и функционализации поверхности сигнальными соединениями является использование фотолабильных молекул и облучения. Фотоактивация происходит с помощью воздействия света различных длин волн и интенсивности. Также возможно создавать сложные геометрические шаблоны с высоким пространственным разрешением за счет использования фотошаблонов (т.н. метод фотолитографии) или лазеров. Например, в [14] хитозановую пленку покрывали фоточувствительным 4,5-диметокси-2-нитробензилхлорформиадом (NVOC), после поверхность через фотошаблон облучали УФ-светом, тем самым контролируя расщепление NVOC. В месте облучения оставались незащищенные аминогруппы, на которые следующим этапом иммобилизовали ПЭГ (отталкивает клетки). Далее проводили второе УФ-облучение и иммобилизовали адгезивный RGD-пептид для получения неоднородной поверхности для клеточного прикрепления. Двухстадийное УФ-облучение для формирования стабильного клеточного шаблона из первичных нейронов и миобластов использовали также авторы [15].

В этой диссертации предложен новый простой подход к формированию стабильных шаблонов различной геометрии на полимерных подложках (на примере коллагена) с помощью одноэтапного лазерно-индуцированного воздействия на ФПК на основе разветвленного ПЛА (Рисунок 6). Сформированный

шаблон не только модулирует клеточное поведение, но и является методом упрочнения материалов биомедицинского назначения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И ПРИБОРЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Компоненты пленочных образцов и трехмерных структур на основе хитозана

В работе использовали *аллилзамещенные производные хитозана* (аллилхитозан, **АХ**) и сополимеры хитозана с олиго(L,L-/D,L-лактидом) (**ХЛ**), которые синтезированы в условиях сдвиговых деформаций в опытно-промышленном двухшнековом экструдере («Berstorff ZE 40», Германия) д.х.н. Акоповой Т.А. и д.х.н. Деминой Т.С. в Институте синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова Российской академии наук. Исходный хитозан имел степень ацилирования (**СА**) = 0,11 и молекулярную массу (**ММ**) = 80 кДа. В зависимости от образца АХ суммарная степень замещения (на 100 звеньев полимера) аллильными фрагментами изменялась от 8 до 50%. Степень прививки для сополимеров ХЛ составила 35%. В ряде ФПК использовали немодифицированный хитозан (Sonat, Россия) с ММ = 350 кДа и СА = 0,14 (**Хитозан_350**). Подробности синтеза и свойства АХ и ХЛ приведены в Приложении Б, также в опубликованных статьях [62, 211–214].

В качестве сшивающего агента использовали ПЭГ-ДА (700 Да (Глава 3) и 2000 Да (Глава 6)) (Sigma-Aldrich, Германия), в роли ФИ – Irgacure 2959 (Ciba Specialty Chemicals, Швейцария).

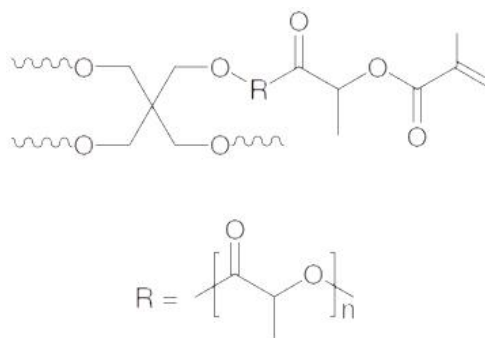
2.1.2. Коллаген

Коллаген выделен из среднего слоя дермы крупного рогатого скота д.фарм.н., проф. Истрановым Л.П. и к.фарм.н. Истрановой Е.В (Первый МГМУ им. И.М. Сеченова). Для экспериментов использовали образцы размером 15×15 мм, толщиной 2–4 мм в случае губок и толщиной 0,1 мм в случае пленок. Образцы относятся к коллагену I и III типов. Фотосшивание коллагена проводили в присутствии ФМН (Sigma-Aldrich, США). Подробности выделения коллагена и

подготовки коллагеновых материалов (губок и пленок) приведены в Приложении В и в опубликованных статьях [215, 216].

2.1.3. Компоненты фоточувствительной композиции на основе полилактида

Использовали разветвленный тетрафункциональный поли(D,L-лактид):



M_n (гель-проникающая хроматография) = 4200 г/моль, $M_w/M_n = 1,18$.

Тетрафункциональный поли(D,L-лактид) синтезирован с.н.с., к.х.н. Пискун Ю.А. в лаборатории катализа полимеризационных процессов (зав. лабораторией д.х.н. Костюк С.В.) Учреждения Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химический проблем» (НИИ ФХП БГУ). Подробности синтеза приведены в Приложении Г и в статье [217].

В качестве ФИ использовали 4,4'-бис(диэтиламино)бензофенон (Sigma-Aldrich, США).

2.2. Методы и приборы Главы 3

2.2.1. Формирование пленочных образцов и 3D-структур

Пленочные образцы получали методом полива 2%-х растворов полимеров в 2%-й уксусной кислоте на пластиковую подложку с последующей сушкой в вытяжном шкафу при температуре $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 48 ч. Предварительно растворы фильтровали через нейлоновую мембрану (Sigma-Aldrich, Германия) с размером пор 0,45 мкм, объем рассчитывали, исходя из количества полимера, необходимого для образования однородных пленок толщиной 100 мкм. Перед проведением механических испытаний пленки выдерживали в вакуумном эксикаторе над КОН в течение недели для удаления избытка кислоты. Для

проведения биологических испытаний пленки выдерживали 2 ч в водном растворе аммиака для перевода полимера из солевой формы в основную и промывали дистиллированной водой до нейтральных значений pH [62].

Для получения фотосшитых пленочных образцов в формовочные растворы АХ вводили 1 мас.% фотоинициатора Irgacure 2959 и облучали пленки в течение 30 мин ртутной лампой ДРШ-500. Интенсивность излучения на поверхности пленок составляла 3,1 мВт/см² [62].

Для формирования *3D-структур* ФПК готовили следующим образом. В 5 мас.% уксуснокислый раствор образца АХ вводили ПЭГ-ДА (6,5–8 мас.% в случае АХ20 и АХ50 [62, 218, 219]; 15 мас.% в случае АХ10 [211, 220]), смесь оставляли перемешиваться на сутки при 35°C для получения гомогенного раствора. После добавляли 1 мас.% Irgacure 2959 и снова перемешивали при 35°C в течение суток, фильтровали через нейлоновую мембрану с размером пор 0,45 мкм. Срок годности ФПК – 7 суток.

Трехмерные конструкции формировали методом однофотонной лазерной стереолитографии. На первом этапе определяли *скорость сканирования лазерным излучением (скорость ЛИ)*, которую меняли в диапазоне от 2 до 20 мм/с (2, 4, 6, 8, 10 и 20 мм/с). В качестве тестовой структуры для подбора скорости ЛИ использовали цилиндр внешнего диаметра 6 мм, внутреннего диаметра 2 мм, высотой 1 мм. Оптимальный диапазон скоростей ЛИ определяли исходя из стабильности тестовых структур в дистиллированной воде в течение 1–2 суток [221].

На следующем этапе производили *формирование 3D-структур* на установке лазерного стереолитографа ЛС120 под руководством н.с. Маркова М.А. (ИПЛИТ РАН, Россия) согласно [211]. Для инициирования процесса трехмерной сшивки в ФПК использовали HeCd-лазер (длина волны 325 нм, мощность излучения 15 мВт). Толщина слоя печати равнялась 0,15 мм, плотность дозы 50 мДж/см². Схемы лазерных стереолитографов приведены в Приложении Д. В качестве *компьютерных моделей 3D-структур* использовали:

(а) пластину 20×20 мм толщиной 1 либо 2 мм, со сквозными овальными отверстиями размером 1×2 мм. Расстояние между центрами отверстий составляло 4 или 6 мм [62];

(б) цилиндрические структуры в виде скрещенных между собой спиралей [211] и цилиндрические структуры со сквозными прорезами под углом 45° (Рисунок 21). Толщина стенок модели 0,4 мм; диаметр 5,1 мм; высота 5,8 мм [218, 219].

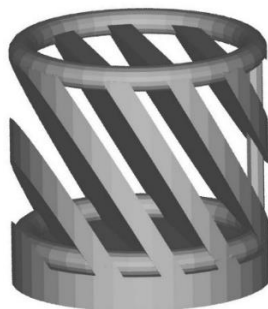


Рисунок 21 – Компьютерная модель трехмерных структур

Готовые структуры *отмывали* от остатков ФПК с помощью 2%-й уксусной кислоты (1–2 ч). После структуры выдерживали в течение 2–4 часов в водном растворе аммиака (25 об.%) для перевода хитозана в основную форму, промывали дистиллированной водой до нейтральных значений pH и производили дополнительное фотоотверждение в течение 20 с УФ-диодом (Epileds, Тайвань) с длиной волны 365 нм при интенсивности 3,9 мВт/см². Структуры хранили при +5°C при постоянной влажности.

Следующим этапом для формирования *пористого материала*, полученные 3D-структуры подвергали лиофильной сушке на установке FreeZone (Labconco, США). Структуры замораживали до температуры –83°C, после чего уменьшали давление в камере до 6 мкбар, оставляли на сутки [62].

2.2.2. Обработка структур в сверхкритическом диоксиде углерода

3D-структуры, полученные методом лазерной стереолитографии, обрабатывали в среде скСО₂ в двух режимах: статическом и проточном [218, 219,

222]. Обработку проводили на установке SCF Applied Separations (Рисунок 22) под руководством м.н.с. Лажко А.Э. (МГУ им. М.В. Ломоносова).

Для scCO_2 обработки в *статическом режиме* структуры помещали в реактор (5) из нержавеющей стали объемом 25 мл, который подключали к линии высокого давления. Далее удаляли из реактора воздух и доводили в нем давление до $\sim 5,5$ МПа, после чего включали насос высокого давления (2) и постепенно доводили давление до $\sim 7,3$ МПа (при $\sim 25^\circ\text{C}$). После отключения насоса устанавливали температуру термостата реактора на 40°C . По достижении заданной температуры результирующее давление в реакторе достигало 12 МПа – этот момент считался началом обработки. Время обработки всех образцов составляло 1,5 часа, после чего нагрев термостата реактора отключали и в течение 1 часа проводили сброс давления CO_2 до атмосферного.

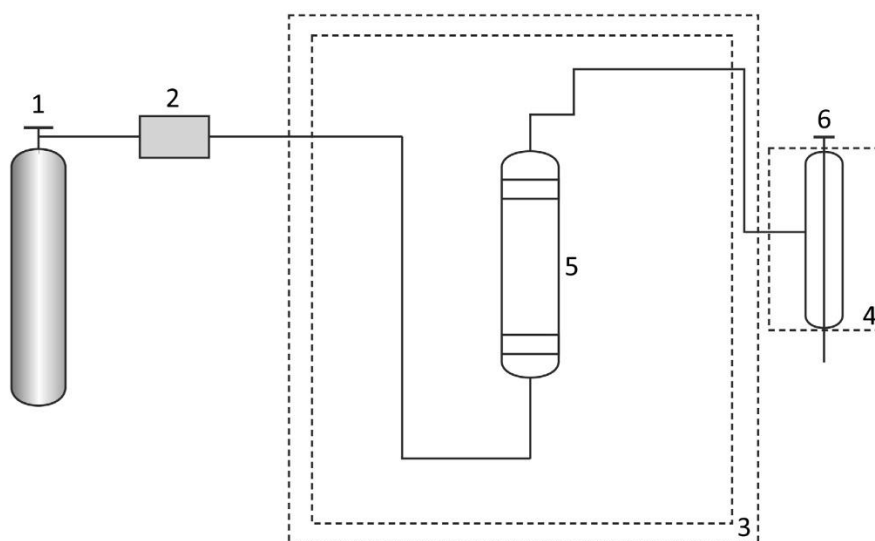


Рисунок 22 – Схема установки для обработки структур в среде scCO_2 : 1 – баллон с диоксидом углерода, 2 – насос высокого давления с элементами Пельтье, 3 – термостат реактора, 4 – термостат вентиля тонкой регулировки, 5 – реактор высокого давления, 6 – вентиль тонкой регулировки [218]

Для scCO_2 обработки в *проточном режиме* структуры помещали в реактор (5) и подключали к линии высокого давления. Далее температуру в термостате устанавливали на 40°C , а температуру термостата вентиля тонкой регулировки (4)

на 50°C. При достижении заданных температур включали подачу CO₂ до ~ 5,5 МПа. Затем включали плунжерный насос (2) с заданным давлением 12 МПа и потоком 8 мл/мин. Когда давление в реакторе (5) достигало 12 МПа, на конце линии высокого давления постепенно открывали вентиль тонкой регулировки (6) таким образом, чтобы давление в системе не падало и оставалось на уровне 12 МПа, а объемная скорость потока составляла 5–7 мл/мин. Время обработки составляла 1,5 часа, по истечении которых, давление в системе понижали до атмосферного в течение 1 часа.

2.2.3. Характеризация пленочных образцов и 3D-структур

а) Гидродинамический диаметр образцов в водных растворах [62]

Метод динамического светорассеяния применяли для определения размеров агрегатов, образующихся при растворении синтезированных производных АХ (0,02 мас.%) в 2%-й уксусной кислоте. Измерения проводили на приборе Zetatrac (США).

б) Механические свойства плёночных образцов [62]

Механические испытания проводили на универсальной разрывной машине AG-E (Shimadzu, Япония) при скорости 1 мм/мин. Перед проведением испытаний пленки выдерживали в эксикаторе при постоянной влажности 81% над насыщенным раствором (NH₄)₂SO₄ в течение недели.

в) Рентгенофазовый анализ (РФА) [62]

РФА проводили на дифрактометре D8 Advance (Bruker AXS GmbH, Германия) (CuK α -излучение и «Vantec-1» детектор) под руководством к.х.н. Фариона И.А. (БИП СО РАН). Пленочные образцы закрепляли на подложке из монокристалла кремния, используя вазелиновое масло. Шаг сканирования 0,021°.

г) Набухание структур [211]

Структуры после лиофильного осушения (1 сутки, –83°C, 6 мкбар) помещали на 2 ч в этиловый спирт (ректификат) или аммиак (25 об.%). После этого образцы инкубировали в течение 9 дней в дистиллированной воде или фосфатно-солевом

буфере (ФСБ). Растворители меняли каждые 48 ч. Набухание измеряли также для структур без обработки спиртом и аммиаком.

Процесс набухания изучали весовым методом. Перед взвешиванием структуры помещали на нетканый материал для удаления излишней влаги, процедуру повторяли до постоянного значения массы. Степень набухания (англ. swelling ratio, **SWR**) определяли по формуле:

$$SWR(\%) = \frac{W_s - W_0}{W_0} \times 100, \quad (1)$$

где W_s – масса набухшей структуры; W_0 – масса структуры после лиофильной сушки.

д) Измерение углов смачивания, расчет поверхностной энергии [218]

Свободная энергия поверхности может быть рассчитана из углов смачивания для определения которых использовали метод лежащей капли на установке, аналогичной с [223]. Образец закрепляли на горизонтальной подложке, после чего на поверхность трехмерной структуры дозировали капли тестовой жидкости (дистиллированной воды и этиленгликоля). Фотокамерой Scopetek DCM 900, установленной на одной высоте с подложкой, каждые 5 секунд фотографировали поверхность образца вместе с каплей тестовой жидкости. Угол смачивания θ определяли как угол между поверхностью полимерной структуры и касательной, проведенной к поверхности тестовой жидкости из точки ее соприкосновения с поверхностью с точностью 1° (Рисунок 23).

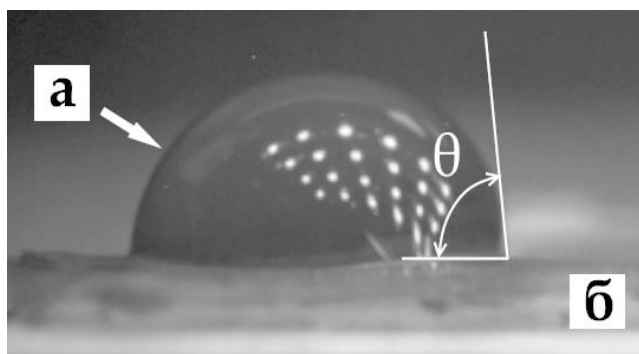


Рисунок 23 – Схема эксперимента по измерению краевого угла смачивания: а – капля тестовой жидкости, б – поверхность полимерной структуры

Для расчета свободной энергии поверхности 3D-структур использовали метод Оунса, Вендта, Рабеля и Кьельбле (**метод ОВРК**), в котором поверхностное натяжение рассматривают как сумму двух составляющих – полярной (диполь-дипольное взаимодействие) и дисперсионной (взаимодействие Ван-дер-Ваальса) [224]. Согласно методу ОВРК полярная и дисперсионная компоненты поверхностной энергии определяются уравнением [225]:

$$\frac{\sigma_l(1+\cos \theta)}{2\sqrt{\sigma_l^d}} = \sqrt{\sigma_s^d} + \sqrt{\sigma_s^p} \sqrt{\frac{\sigma_l^p}{\sigma_l^d}}, \quad (2)$$

где σ^d и σ^p – дисперсионная и полярная компоненты поверхностной энергии, характеризующие твердое тело S или жидкость L.

Расчет произведен графически: уравнение (2) описывает прямую в координатах $\sqrt{\frac{\sigma_l^p}{\sigma_l^d}}$ и $\frac{\sigma_l(1+\cos \theta)}{2\sqrt{\sigma_l^d}}$ с наклоном $\sqrt{\sigma_s^p}$, точкой пересечения с осью ординат $(0; \sqrt{\sigma_s^d})$. В Таблице 1 приведены характеристики тестовых жидкостей. Исследованы 3D-структуры в солевой и основной формах, также после обработки скCO_2 .

Таблица 1 – Свойства тестовых жидкостей [226]

Тестовая жидкость	Поверхностная энергия и ее составляющие, мДж/м ²		
	Полная, σ	Дисперсионная, σ^d	Полярная, σ^p
Дистиллированная вода	72,2	22,0	50,2
Этиленгликоль	48,3	29,3	19,0

е) Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) и оценка поверхности, занимаемой порами [62]

Для визуализации поверхности и внутренней структуры трехмерных конструкций использовали сканирующий электронный микроскоп Phenom ProX (разрешение 15 нм, Phenom-World, Нидерланды). Для количественной оценки поверхности, занимаемой порами, использовали ImageJ software (National Institutes of Health, США) [227]. На первом этапе СЭМ-микрофотографии переводили в 8-

битный формат, после чего осуществляли разделение областей на темные (поры) и светлые участки (непористый материал) – трешхолдинг. Далее темные участки на изображении заменяли равными по площади эллипсами и после подсчитывали их площадь.

ж) Атомно-силовая микроскопия (АСМ)

Шероховатость поверхности исходных полимерных конструкций и конструкций после обработки в среде scCO_2 исследована в полуконтактном режиме на атомно-силовом микроскопе Bruker MultiMode 8. Перед сканированием конструкции выдерживали в течение 7 дней в эксикаторе, после осуществляли измерение с использованием кантилевера RTESPA-150 (коэффициент жесткости 6 Н/м, резонансная частота 150 кГц, радиус закругления иглы зонда 8 нм). Скорость сканирования составляла 1 МГц, разрешение 512×512 точек, размер области сканирования 10×10 мкм.

з) Локальный модуль упругости поверхности структур [218]

Измерение локального модуля упругости поверхности полимерных структур проводили с помощью наноиндентера Piuma Nanoindenter (Optics11, Нидерланды) [228] в водной среде, для чего образцы фиксировали на дне чашки Петри. Измерения проводили при комнатной температуре. Для исходных структур применяли кантилеверы прочностью 0,029 Н/м и радиусом наконечника 17 мкм; для обработанных в scCO_2 – с прочностью 2,94 Н/м и радиусом 45 мкм. Исследовали поверхность 200×200 мкм для основания полимерных структур и 400×400 мкм для боковой части структур с шагом по осям X и Y равным 20 и 40 мкм соответственно.

и) ИК- и масс-спектрометрия

ИК-спектры записывали на ИК-Фурье спектрометре Spectrum Two (PerkinElmer, Великобритания) с разрешением 4 см^{-1} и усредняли по 8 сканам. В качестве внутреннего стандарта использовали полосу смешанных по частоте деформационных колебаний C–H и CH_3 -групп при 1250 см^{-1} . Для ФПК и полимерной структуры использовали пластину KBr, для структуры после scCO_2 – приставку нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО).

Масс-спектры для капель экстрагируемого в реактор вещества после scCO_2 обработки сняты на спектрометре ICP-MS XSeriesII (Thermo Scientific Inc., США) старшим преподавателем Фениным А.А. (РХТУ им. Д.И. Менделеева).

2.2.4. Клеточные испытания

Для клеточных тестов ФПК наносили на поверхность покровных стекол диаметром 12 мм (площадь поверхности образцов $1,13 \text{ см}^2$). Далее ФПК сшивали в течение 30 мин при облучении УФ-лампой ДРШ-100 (Россия). Были приготовлены материалы двух типов – чистый AX10 и AX10 со сшивающим агентом ПЭГ-ДА. Для них исследована биосовместимость МТТ-тестом с использованием фибробластов линии NCTC L929 и адгезионные характеристики с использованием мезенхимальных стволовых клеток (МСК) [211]. Исследования цитотоксичности для 3D-структур до и после scCO_2 обработки проводили при прямом контакте 3D-структур с культурой фибробластов мыши линии NIH 3T3 в асептических условиях [218, 219].

Исследования *in vitro* выполнены в сотрудничестве с ИТЭБ РАН и НМИЦ трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова. Методики клеточных тестов приведены в Приложении Е.

2.2.5. Имплантация и гистологический анализ. Выявление внутренней структуры плёнок (метод вейвлет-анализа)

Пленочные образцы и трехмерные конструкции имплантированы белым крысам линии Vistar под кожу межлопаточной области на 30, 60 и 90 суток. Подробности имплантации и морфологического анализа приведены в Приложении Ж и в [62]. Исследования *in vivo* проведены в виварии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. Морфологический анализ образцов после имплантации выполнен к.м.н. Курковым А.В. (Первый МГМУ им. И.М. Сеченова).

Периодические структуры на срезе ткани с хитозановой конструкцией анализировали методом вейвлет-анализа [229]. В отличие от обычного

преобразования Фурье использование вейвлетов позволяет охарактеризовать пространственные поля со сложной многомасштабной структурой [229] и может дополнительно объяснить процесс разрушения имплантированных образцов. В качестве базового вейвлета использовался МНАТ-вейвлет (Mexican HAT) [230]. Первоначально из полученного фрагмента изображения формировали два одномерных ряда, которые представляют собой пространственные распределения усредненных (вдоль и поперек видимой поверхности образца) интенсивностей пикселей. Далее по каждому такому ряду вычисляли вейвлетограмму и обобщенный пространственный спектр структурных неоднородностей [229, 230].

2.3. Методы и приборы Глав 4 и 5

2.3.1. Фотосшивание коллагеновых материалов

В случае *коллагеновых губок* фотосшиванию подвергали образцы без ФИ и образцы, содержащие 0,25 об.% ФМН.

Перед фотосшиванием образцы *коллагеновых пленок* помещали в 5мМ водный раствор ФМН на 40 минут, после чего отмывали в течение суток в дистиллированной воде. Для оценки количества импрегнированного ФМН использовали спектрофотометрический метод измерения оптической плотности при 444 нм (максимум поглощения ФМН) на спектрофотометре Cary-50 (Varian Optical Spectroscopy Instruments) [215].

Фотосшивание коллагеновых образцов проводили с помощью светодиода с длиной волны 365 нм (Epileds, Тайвань) при интенсивности 3,9 мВт/см². Облучение производили с двух сторон коллагеновых образцов, суммарное время облучения коллагеновых пленок составляло 5; 7,5; 10, 20 и 30 мин; коллагеновых губок – 15 и 30 мин.

2.3.2. Подготовка фотополимеризующихся композиций

Для *коллагеновой губки* ФПК готовили следующим образом [216]: к 800 мкл 50 мас.% раствора фоточувствительного полилактида в дихлорметане добавляли

3600 мкл дихлорметана и 40 мг 4,4'-бис(диэтиламино)бензофенона, раствор оставляли перемешиваться на 24 ч. Итоговая ФПК содержала 9,1 мас.% фоточувствительного полилактида и 0,91 мас.% фотоинициатора. ФПК в объеме 500 мкл равномерно покрывали коллагеновые губки до исчезновения сухих участков. Через 10 мин коллагеновый образец фиксировали на предметном стекле с помощью металлической рамки и производили лазерной воздействию.

Для *коллагеновой пленки* ФПК готовили по следующей методике [215]: навеску фоточувствительного полилактида растворяли в дихлорметане до получения 5 мас.% раствора полимера, после вводили 4,4'-бис(диэтиламино)бензофенон (1 мас.% в конечной ФПК). ФПК оставляли перемешиваться на 24 ч. Далее ФПК в объеме 150 мкл равномерно наносили на поверхность коллагеновой пленки, сушили при комнатной температуре в течение 6 мин и формировали армирующие шаблоны.

2.3.3. Нанесение армирующих полилактидных шаблонов

Для подбора параметров лазерного излучения и нанесения армирующих полилактидных шаблонов использовали установку лазерной стереолитографии (Рисунок 24), собранную к.ф.-м.н. Минаевым Н.В. в ИФТ ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН (Россия).

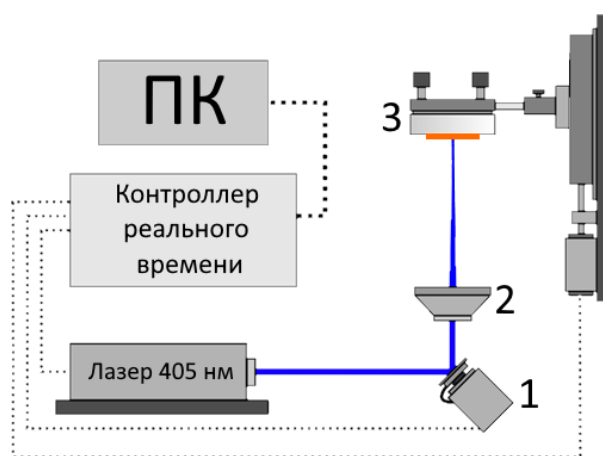


Рисунок 24 – Схема установки лазерной стереолитографии для нанесения армирующих полилактидных шаблонов: 1 – гальваносканер, 2 – объектив, 3 – подложка с закрепленным образцом

Излучение подводили снизу, в качестве источника использовали лазер MDL-III-405 (CNI-Laser, Китай) с длиной волны 405 нм и максимальной мощностью излучения 100 мВт. Излучение фокусировали с помощью F-theta объектива, позволяющего получить лазерное пятно диаметром 50–80 мкм в фокальной плоскости. Перемещение лазерного пятна производили с помощью гальваносканера.

Для *коллагеновой губки* армирующие линии формировали при следующих параметрах: скорость ЛИ 3 и 5 мм/с, плотность заливки армирующими линиями 5 и 6 лин./мм [216].

На *коллагеновой пленке* на первом этапе формировали массив отдельных линий сшитого полилактида при скоростях ЛИ 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 мм/с. Были сформированы линии длиной 12 мм, расстояние между центрами соседних линий составляло 1,5 мм. Средняя мощность лазерного излучения в экспериментах была постоянна и равнялась 70 мВт. На следующем этапе на коллагеновой пленке сформированы армирующие полилактидные шаблоны двух конфигураций: при сканировании по одной оси (полосатые образцы) и при сканировании по двум осям (сетчатые образцы). Для скорости лазерного излучения 15 мм/с использовали плотность заливки армирующими линиями 8 лин./мм, для скорости ЛИ 3 мм/с – плотность заливки 3 лин./мм [215].

Для удаления остатков непрореагировавшей ФПК использовали трехступенчатую *схему отмывки*: сразу после лазерного воздействия коллагеновые образцы помещали в дихлорметан на 2–3 суток, причем растворитель меняли за это время 3–4 раза. Далее коллагеновые образцы отмывали этиловым спиртом (95 об.%) и деионизированной водой в течение 4–7 суток.

2.3.4. Характеризация гибридных материалов

Топографию гибридных материалов оценивали с помощью СЭМ на микроскопе Phenom ProX (разрешение 15 нм, Phenom-World, Нидерланды). Для количественной оценки поверхности, занимаемой пора́ми, использовали программу ImageJ.

Для оценки ширины сформированных линий после воздействия лазера использовали флуоресцентный микроскоп KOZO XJF900 (Kozo optics, Китай). Ширину линий и их трехмерный рельеф после отмывки оценивали с помощью 3D-микроскопа Huvitz HRM (Huvitz, Южная Корея).

Спектры флуоресценции записаны на спектрофлуориметре Fluoromax Plus (Horiba-Jobin-Yvon) в центре коллективного пользования ФИЦ ХФ РАН н.с. Каплиным В.С.

ИК-спектры записывали на ИК-Фурье спектрометре Spectrum Two (PerkinElmer, Великобритания) с разрешением 4 см^{-1} и усредняли по 8 сканам. Каждый спектр коллагена откалиброван по интенсивности C-H колебания (2932 см^{-1}) и подвергнут процедуре Фурье-сглаживания по четырем точкам.

Для ИК-микроскопии гибридных материалов использовали микроскоп Spotlight 200i (PerkinElmer, Великобритания) с ИК-детектором MCT (теллурид ртути и кадмия). Спектры отражения образцов выполнены с измерительной сеткой 18×18 и с индивидуальной апертурой каждой ячейки сетки $50\times 50\text{ мкм}$. Изображения перестраивали по длине волны 1547 см^{-1} .

Локальные механические характеристики коллагеновых образцов определяли с помощью наноиндентора "Piuma Nanoindenter" (Optics11, Нидерланды). Для определения модуля упругости коллагеновых материалов сферический зонд погружали на 5 мкм вглубь образца в каждой точке измерения. По полученной кривой "сила-смещение" с использованием модели Герца производили расчет значений модуля упругости и формировали карты распределения модуля упругости по поверхности. Для губчатых материалов использовали кантилевер прочностью $0,45\text{ Н/м}$ и зонд с радиусом скругления наконечника $26,5\text{ мкм}$; для пленочных материалов – $0,052\text{ Н/м}$ и 9 мкм соответственно. Образцы фиксировали на дне чашки Петри, измерения проводили в дистиллированной воде при 37°C . Для губчатых материалов площадь сканирования составила $1000\times 500\text{ мкм}$ с шагом по осям X и Y 25 мкм . Для пленочных материалов площадь сканирования равнялась $1000\times 400\text{ мкм}$ с шагом по оси X 25 мкм и по оси Y 50 мкм .

Испытания на растяжение исходных коллагеновых образцов и пленок с армирующими полилактидными шаблонами проводили на воздухе при комнатной температуре со скоростью 5 мм/мин с использованием универсальной испытательной машины Shimadzu EZTest EZ-SX (Япония). Перед измерениями все образцы гидратировали ФСБ в течение двух дней. Образцы размером 12×8 мм были закреплены с использованием наждачной бумаги. Все испытания на растяжение проводились в направлении, параллельном сформированным линиям армирования. Для каждой группы материалов исследовано по четыре образца.

2.3.5. Исследования *in vitro* гибридных материалов

Для оценки влияния процедуры армирования на цитотоксичность коллагеновых образцов проведен комплексный *in vitro* анализ. Экстракционный МТТ-тест взят из ГОСТ ISO 10993–5, использовали мышинные фибробласты линии NIH 3T3.

Дополнительно для *пленочных гибридных материалов (ПГМ)* проанализирована контактная цитотоксичность, основанная на измерении высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ) из мышинных фибробластов линии NIH 3T3 [215]. Направленный клеточный рост на ПГМ продемонстрирован с помощью флуоресцентной микроскопии.

Для изучения адгезивности и роста клеток на *губчатом гибридном материале (ГГМ)* использовали МСК костного мозга человека четвертого пассажа [216]. Подробности клеточных экспериментов приведены в Приложении 3.

2.4. Методы и приборы Главы 6

2.4.1. Подготовка фотополимеризующихся композиций для двухфотонной стереолитографии

В случае образцов АХ и ХЛ готовили 5 мас.% растворы в 2%-й CH_3COOH , после чего вводили ПЭГ-ДА (6,5–7,1 мас.%) и фотоинициатор Irgacure 2959 (1 мас.%). Полученные ФПК помещали в силиконовую проставку (спейсер),

накрывали покровным стеклом и подвергали структурированию на установке 2ФП [213, 306, 307].

Для формирования трехмерных структур из разветвленного полилактида его навеску растворяли в двойном объеме хлористого метилена, добавляли 1 мас.% 4,4'-бис(диэтиламино)бензофенона. ФПК оставляли перемешиваться на 2 часа при комнатной температуре, далее наносили ее в объеме 200 мкл на покровное стекло и через сутки использовали на установке 2ФП [217]. Описание установки 2ФП и подробности формирования микроструктур приведены в Приложении И.

2.4.2. Характеризация и биосовместимость трехмерных микроструктур

Для характеристики сформированных микроструктур применяли наноиндентометрию, СЭМ, АСМ. Использовали приборы и методы, описанные в разделе 2.2.3.

Исследования *in vivo* и *in vitro* выполнены в ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Первом МГМУ им. И.М. Сеченова, Приволжском исследовательском медицинском университете. Описание методик представлено в Приложении К.

ГЛАВА 3. БИОПОЛИМЕРНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА

3.1. Гидродинамический диаметр агрегатов в водных растворах

Так как применение хитозана и его производных в основном связано с водными растворами, то необходимо понимать его поведение в этой среде. Особый интерес представляют самопроизвольно формирующиеся агрегаты хитозана, которые в дальнейшем можно использовать в качестве носителей лекарственных веществ или генов [231, 232]. На Рисунке 25 представлены данные о зависимости гидродинамического диаметра агрегатов от *степени замещения (СЗ)* аминогрупп хитозана.

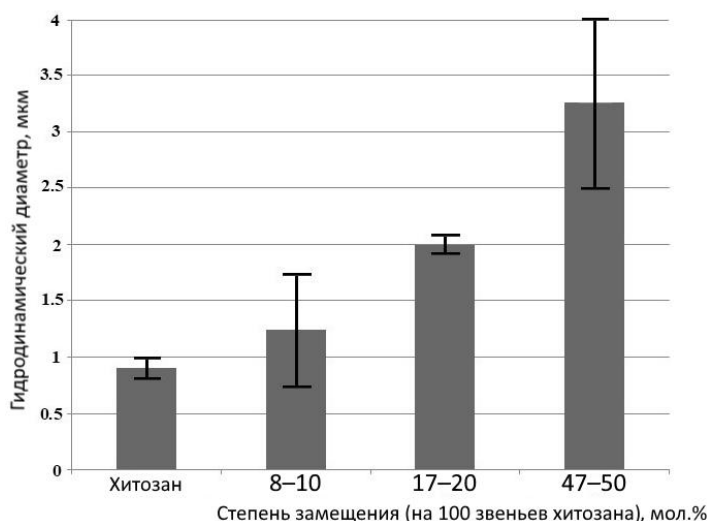


Рисунок 25 – Гидродинамический диаметр агрегатов хитозана и АХ в зависимости от степени замещения функциональных групп аллильными фрагментами. Концентрация растворов 0,02 мас.%, растворитель 2%-я уксусная кислота [62]

Схожие величины для среднего размера агрегатов хитозана получены в работе [233]: для 0,01 мас.% растворов хитозана диаметр агрегатов находился в пределах 200–2000 нм. Причем авторы [233] показывают увеличение размеров агрегатов с увеличением степени ацетилирования, т.е. с увеличением количества гидрофобных заместителей в структуре хитозана. Авторы работ [234, 235] также наблюдали более выраженную агрегацию из-за влияния ацетамидных групп,

оставшихся в результате неполного деацетилирования хитина. Агрегация в этих работах была связана как с изменением степени протонирования макромолекул в растворе, так и с усилением гидрофобных межмолекулярных взаимодействий.

Стоит отметить, что имеющиеся данные по межмолекулярной агрегации хитозана весьма противоречивы. Сложное поведение макромолекул хитозана в растворе определяется способностью функциональных групп полисахаридов к образованию водородных связей как межмолекулярных, так и внутримолекулярных, которые стабилизируют конформационную структуру. Например, в работах [236, 237], напротив, обнаружили подавление агрегации с ростом степени ацетилирования, что авторы объясняют уменьшением кристалличности хитозана. По-видимому, склонность хитозана к агрегации зависит от нескольких факторов, каждый из которых вносит свой вклад в энергию ассоциации.

В проведенных экспериментах методом динамического светорассеяния выявлено, что в разбавленных растворах образцов АХ возникают межмолекулярные взаимодействия липофильного характера. Когда СЗ достигает значительных величин (17–20 и 47–50 мол.%), эти взаимодействия приводят к образованию агрегатов существенно большего размера по сравнению с исходным хитозаном. Таким образом, изменяя количество гидрофобных фрагментов, введенных в структуру хитозана, возможно получать полимерные носители необходимого размера [62].

3.2. Механические свойства и РФА плёночных образцов

Влияние модификации аллильными фрагментами, а также УФ-облучения на механические свойства пленок хитозана продемонстрировано в Таблице 2 [62]. Полученные значения прочности на разрыв и удлинения для исходного хитозана выше, чем у Souza и соавт. [238] ($\sigma = 13$ МПа и $\epsilon = 16\%$) и также превосходят значения для хитозановых пленок, обработанных различными мономерами и УФ-облучением у Khan и соавт. [239] (σ до 29,1 МПа и ϵ до 16,2%). Это может быть связано с характеристиками сырьевого источника для получения хитозана,

степенью ацетилирования и молекулярной массой хитозана, применяемыми растворителями и концентрацией полимера в формовочных растворах, условиями приготовления и хранения пленок [240, 241].

Таблица 2 – Деформационно-прочностные характеристики хитозановых пленок

	СЗ, мол. %	До УФ-облучения		После УФ-облучения	
		σ , МПа	ε , %	σ , МПа	ε , %
Хитозан	0	37 ± 1	18 ± 2	39 ± 1	18 ± 3
АХ10*	8–10	37 ± 2	26 ± 5	41 ± 1	21 ± 4
АХ20	17–20	38 ± 2	25 ± 3	38 ± 3	19 ± 2
АХ50	47–50	33 ± 3	23 ± 3	33 ± 3	17 ± 2

*здесь и далее цифрой перед «АХ» указана степень замещения (мол. %)

Дополнительные липофильные взаимодействия за счет наличия аллильных фрагментов в структуре образцов АХ не вносят весомого вклада в разрывную прочность, также нет выраженного влияния на этот показатель обработки пленок УФ-излучением. Относительное удлинение для необлученных пленок АХ выше на 5–8% по сравнению с исходными хитозановыми пленками. Очевидно, введение гидрофобных заместителей в макромолекулу хитозана приводит к изменению кристаллической морфологии пленок [242]. УФ-облучение приводит к снижению относительного удлинения пленок АХ, наиболее выраженному для образцов с высокими СЗ. Такой результат является вполне ожидаемым: при УФ-облучении в полимерной пленке, содержащей ненасыщенные фрагменты, образуются сшивки. Это приводит к уменьшению подвижности полимерных цепей и, соответственно, к меньшей пластичности образцов. Повышение гидрофобности пленки также вызывает снижение содержания в ней воды, которая действует как пластификатор [243].

Рентгенограммы пленочных образцов хитозана до и после УФ-облучения приведены на Рисунке 26 [62]. Сравнивая данные РФА двух образцов, можно видеть, что сшивка не приводит к изменению положения пиков на рентгенограммах. Широкий интенсивный максимум при 2θ около 20° ($d_1 = 4,434$

Å) для модифицированного механохимическим синтезом хитозана согласуется с другими опубликованными результатами [238, 244–246]. Этот максимум определяется наличием в полимере наряду с аморфными также и «псевдокристаллических» областей – кристаллитов, которые представляют собой упорядоченные области полимерных цепей, ориентированных параллельно друг другу. Другой широкий интенсивный максимум при 2θ около 10° ($d_2 = 8,835 \text{ Å}$) относится к гидратированной кристаллической структуре хитозана и зарегистрирован в работах [238, 247]. Значения межплоскостного расстояния d_2 и d_1 соотносятся приблизительно как 2:1, что может соответствовать двум периодам отражения между двумя плоскостями кристаллитов. То есть минимальное расстояние между этими плоскостями равняется $4,434 \text{ Å}$. Максимум малой интенсивности при 2θ около 15° ($d_3 = 5,899 \text{ Å}$) может также быть обусловлен присутствием кристаллических областей в структуре исходного хитозана как показано в работах [245, 248].

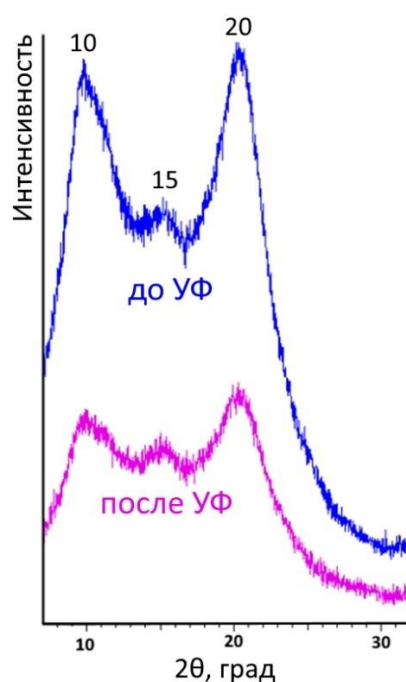


Рисунок 26 – РФА пленки AX10 до и после УФ-облучения

3.3. Трехмерные конструкции, сформированные однофотонной лазерной стереолитографией

В результате экспериментов по подбору скорости ЛИ установлено, что формирование стабильных при отмывке полимерных структур возможно без применения дополнительных сшивающих агентов для производных хитозана со степенью замещения 47–50% (АХ50). При СЗ равной 8–10 и 17–20% структуры сформированы лишь при низких скоростях ЛИ 2–4 мм/с, однако, при отмывке они растворялись в течение 1 суток. Показано, что чем меньше скорость ЛИ, тем более четкий контур имеют тестовые структуры (Рисунок 27) [221].

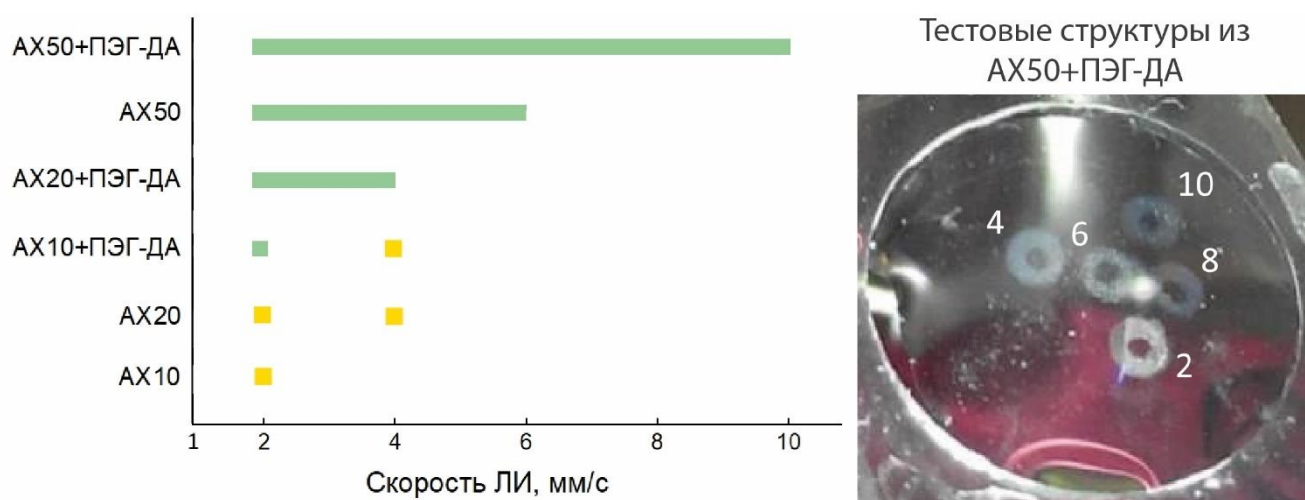


Рисунок 27 – Подбор скорости ЛИ для ФПК из производных хитозана (слева) и фотография тестовых структур из ФПК на основе АХ50+ПЭГ-ДА (справа). Зеленым обозначены скорости ЛИ, при которых получены стабильные при отмывке структуры; желтым – структуры сформированы, однако, при отмывке растворялись в течение суток. ФПК расположены в порядке от «лучшей» (наиболее широкий диапазон скоростей ЛИ) к «худшей». Цифрами на фотографии тестовых структур обозначены скорости ЛИ, при которых они получены

Добавление в фотополимерные композиции ПЭГ-ДА в качестве сшивающего агента позволило сформировать для каждого производного хитозана стабильные при отмывке структуры. Фотосшитый материал только на основе хитозана

обладает недостаточной прочностью, что в дальнейшем может привести к растворению трехмерной структуры еще до момента восстановления анатомической целостности тканей. Введение сшивающих агентов также как, например, использование дополнительных армирующих конструкций и включение различных органических/неорганических добавок в гидрогелевый материал является способом улучшения механических свойств трехмерных структур [249, 250]. Таким образом, чем выше СЗ и больше количество реакционноспособных групп ($C=C$ связей), тем шире диапазон оптимальных скоростей ЛИ и более устойчива в водных средах формируемая трехмерная конструкция.

В последующих экспериментах использовали ФПК из смеси АХ с ПЭГ-ДА. Полученные методом лазерной стереолитографии конструкции имеют желтый цвет, после захвата и сжатия хирургическим пинцетом конструкции полностью восстанавливают исходную форму (Рисунок 28) [211, 218–220].



Рисунок 28 – Трехмерные конструкции из ФПК на основе АХ10 (а) и АХ20 (б, в)

В случае пластин с отверстиями (Рисунок 29а) толщина образцов достигала заданных значений 1 либо 2 мм, т.е. в общей сложности 6 либо 12 слоев сшиты друг с другом. Преимущество лазерной стереолитографии как способа структурирования производных хитозана заключается в возможности изготовления трехмерных конструкций для восстановления тканевых дефектов критического размера (от 1 см) [62]. При незначительных дефектах и травмах кожа, печень, кости могут восстановиться самостоятельно [251], в иных случаях, когда для восстановления требуется имплантация материалов биомедицинского назначения, используют понятие «дефекта критического размера». Например, в

случае сегментарных костных повреждений критическим размером является пятимиллиметровый дефект [252].

Прозрачность трехмерных структур на основе хитозана позволяет использовать для их стерилизации широко доступный метод УФ-облучения [253], также упрощает визуализацию культивируемых на их поверхности клеток [254]. Кроме того, подобранный состав ФПК и параметры структурирования позволили получить гибкую хитозановую конструкцию, которую можно скручивать в трубку (Рисунок 29а). Однако, в подобных конструкциях нет внутренних пор, наличие которых необходимо учитывать при разработке материалов биомедицинского назначения: поры нужны для диффузии кислорода и питательных веществ, для вывода продуктов жизнедеятельности клеток [255], для клеточной пролиферации [256].

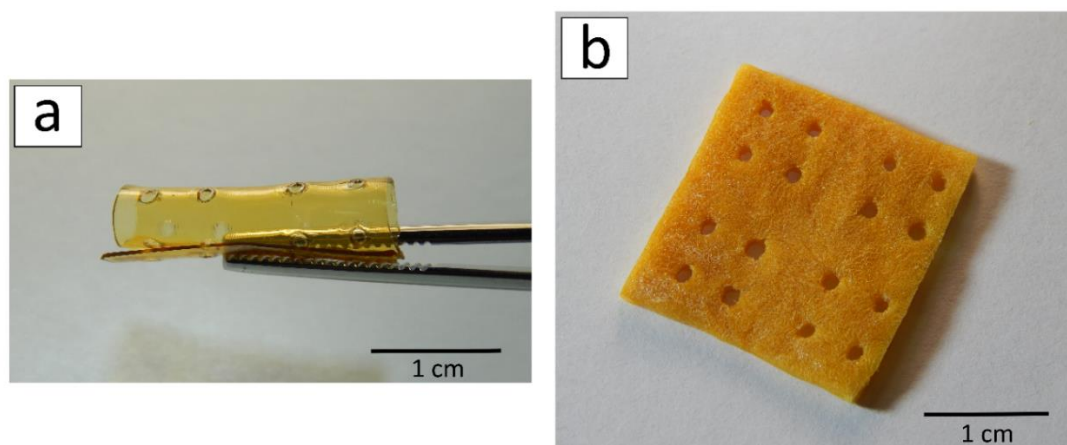


Рисунок 29 – Трехмерные конструкции на основе AX50 после лазерной стереолитографии (а) и после лиофильного осушения (b)

Для формирования пористых конструкций на основе хитозана использовали лиофильную сушку [62]. Лيوфильное осушение не связано с химической реакцией, следовательно, отсутствует этап очистки материала от каких-либо реагентов и побочных продуктов. Из Рисунка 29b видно, что после лиофильного осушения у трехмерной конструкции сохраняется заданная архитектура, конструкцию можно заново регидрировать. При этом материал теряет прозрачность, что

происходит по причине фазового разделения во время замораживания растворителя, в результате которого формируются макропоры и плотно сшитые стенки пор [257, 258]. В целом, механические свойства трехмерной конструкции позволяют прокалывать ее хирургической иглой.

Оценка характерной поры из микрофотографий СЭМ (Рисунок 30а) показала, что поверхность, занимаемая порами, составляет порядка 30% от общей площади поверхности трехмерной конструкции, причем 66% пор имеют размер 3–6 мкм. Вероятно, что на поверхностную пористость повлияло УФ-облучение конструкций после стереолитографии. УФ-облучение может привести к сшиванию оставшихся фоточувствительных фрагментов полимера и, как следствие, к формированию более часто сшитых полимерных сеток на поверхности конструкции.

При оценке среза трехмерной конструкции (Рисунок 30b) установлено, что характерный размер пор составляет 20–60 мкм. Более толстые параллельные друг другу стенки, вероятно, соответствуют местам перекрытия соседних слоев, где при лазерном воздействии формируется более плотно сшитый в сравнении с остальной конструкцией материал. Пористость трехмерной конструкции, а также введение гидрофобного аллильного фрагмента в структуру хитозана в дальнейшем могут обеспечить эффективность импрегнированных лекарственных форм в течение длительного времени [62].

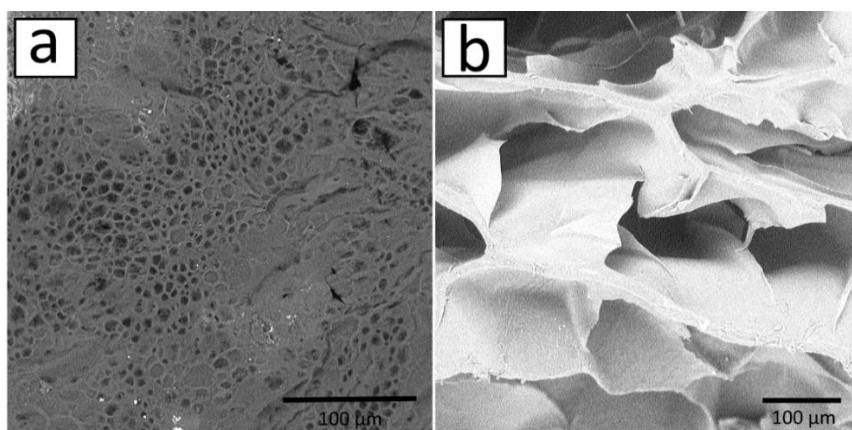


Рисунок 30 – Микрофотографии СЭМ поверхности (а) и среза (b) трехмерной конструкции после лиофильной сушки

3.4. Степень набухания и смачиваемость трехмерных конструкций

Контролируемыми параметрами полимерных материалов медицинского назначения являются степень и кинетика набухания: при имплантации трехмерные конструкции могут не только служить механической опорой для поврежденных тканей и стимулировать процесс их заживления, но и снижать отечность, забирая из места травмы скопившуюся жидкость [259, 260].

Трехмерные структуры на основе хитозана характеризуются степенью набухания (англ. swelling ratio, **SWR**) в интервале 490–650%. Максимальные значения SWR получены для образцов, помещенных в ФСБ и воду, также в ФСБ после выдерживания в этаноле (Рисунок 31).

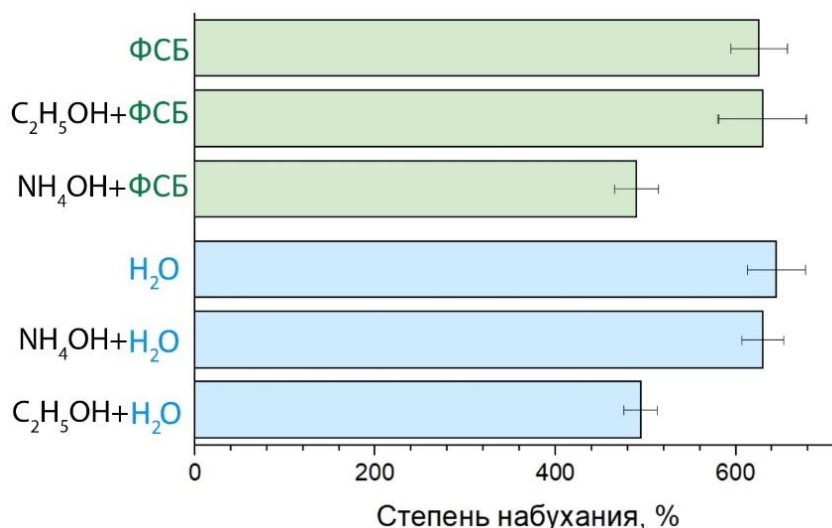


Рисунок 31 – Степень набухания трехмерных структур в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, зеленые бары) и дистиллированной воде (голубые бары) без и после предварительной обработки этанолом или аммиаком

Для снижения SWR в ФСБ структуры обрабатывали аммиаком, чтобы перевести хитозан в основную форму. Отсутствие ацетатного противоиона на аминогруппе уменьшало сорбционную способность структур, тем самым помогая снизить их набухание в ФСБ. Отметим, что SWR в воде для трехмерных структур, где хитозан находится в основной форме (Рисунок 31, бар «NH₄OH+H₂O»), оказалась такой же высокой как для хитозана в солевой форме. Вероятно,

определяющим в этом случае является ионная сила и pH растворителя [211].

Минимальное значение SWR получено также для трехмерных структур, набухших в дистиллированной воде после предварительного выдерживания в этиловом спирте (Рисунок 31, бар « $C_2H_5OH+H_2O$ »). Этанол сжимает трехмерную структуру (Рисунок 32, № 4) в сравнении со структурами, обработанными аммиаком (№ 3) и без обработки (№ 2).

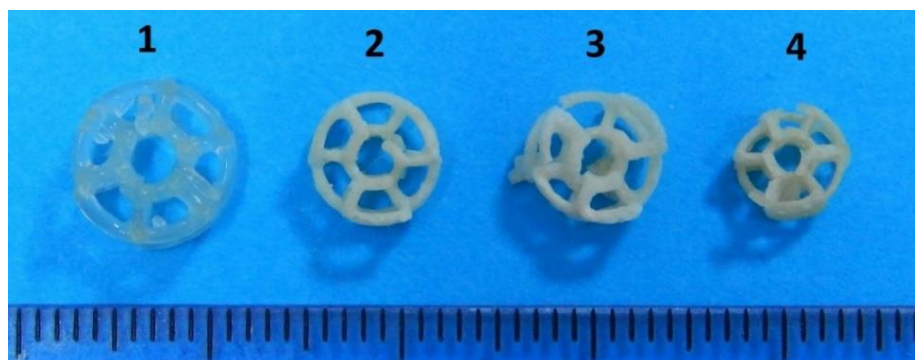


Рисунок 32 – Исходная трехмерная структура (1); лиофилизированные трехмерные структуры после набухания в воде (2), NH_4OH и воде (3), C_2H_5OH и воде (4); 1 деление линейки равняется 1 мм

На Рисунке 33 приведены фотографии каплей жидкости на поверхности полимерных структур, где хитозан находится в солевой и основной формах. Перевод хитозана в основную форму приводит к увеличению контактного угла смачивания с 66° до 94° . После поглощения капли жидкости толщина материала на участке контакта с каплей увеличилась на 133% и 87% для основной и солевой формы соответственно [219].

Поверхность полимерной структуры из хитозана в солевой форме является более гидрофильной: уже на 140 с происходит полное поглощение помещенной на поверхность капли, тогда как для основной формы полное поглощение капли происходит лишь после 325 с. Из тангенсов углов наклона следует, что изменение угла смачивания для основной формы происходит медленнее примерно в 1,6 раза (Рисунок 34) [219].

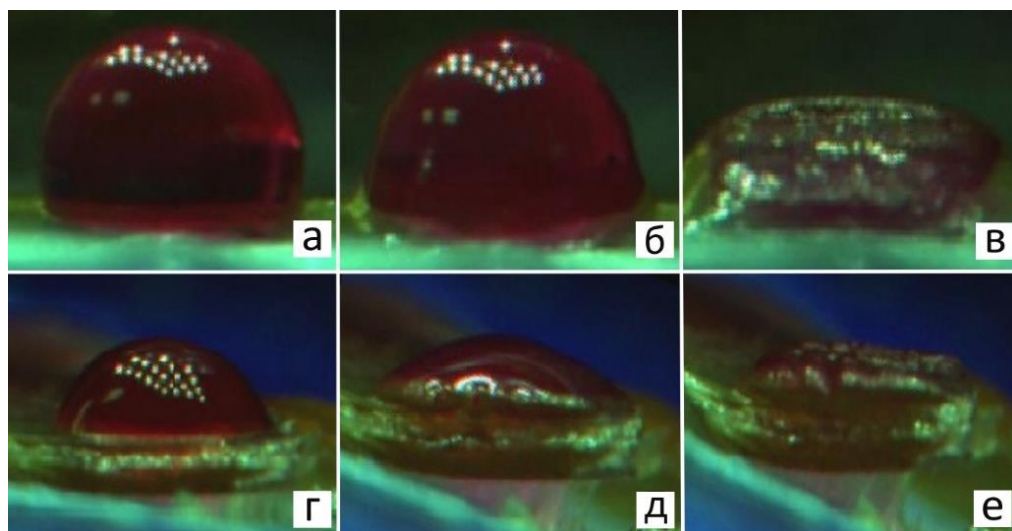


Рисунок 33 – Изменение краевого угла смачивания для полимерных структур из хитозана в основной (а, б, в) и солевой (г, д, е) формах. а – основная форма в момент касания жидкости поверхности полимерной структуры, $\theta = 94^\circ$; основная форма через 60 секунд, $\theta = 77^\circ$ (б) и через 325 секунд, $\theta = 0^\circ$ (в); г – солевая форма в момент касания жидкости поверхности полимерной структуры, $\theta = 66^\circ$; солевая форма через 60 секунд, $\theta = 30^\circ$ (д) и через 140 секунд, $\theta = 0^\circ$ (е)

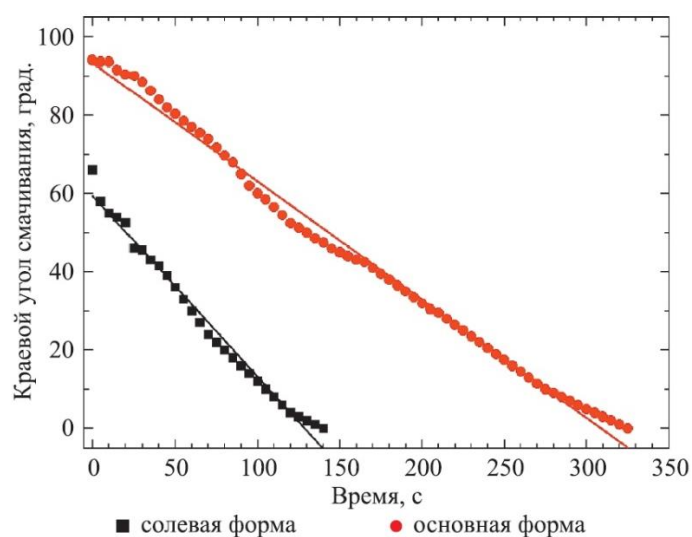


Рисунок 34 – Кинетические кривые смачивания трехмерных структур из AX10

Трехмерная конструкция из хитозана в основной форме демонстрирует худшее смачивание поверхности в сравнении с солевой формой, что можно объяснить отсутствием полярной карбоксильной группы, которая обеспечивает

сродство поверхности полимерного материала к воде, а также затрудненным проникновением воды в поры трехмерной конструкции. Изменение смачиваемости, вероятно, будет влиять на распластывание клеток на поверхности полимерной конструкции и двигательную активность клеток, что в дальнейшем может определять скорость деградации конструкций [261]. Следовательно, выбор формы хитозана позволит регулировать скорость биodeградации имплантируемых материалов на его основе.

3.5. Полимерные конструкции после обработки сверхкритическим диоксидом углерода. Локальный модуль упругости

Обработка scCO_2 не влияла на заданную компьютерной моделью архитектуру полимерной конструкции [219]. Материал сохранял характерную для необработанной конструкции упругость, изменение линейных размеров на 3–5% могло быть вызвано экстракцией несвязанной воды и несшитой ФПК. Для прояснения последнего утверждения материалы исследованы спектрометрическими методами.

На ИК-спектре ФПК (1) острые пики при 1638 и 1645 см^{-1} соответствуют валентным колебаниям двойных $\text{C}=\text{C}$ связей в ПЭГ-ДА и АХ, из-за сильного вклада воды присутствуют на фоне широкой интенсивной полосы (зеленая область на Рисунке 35). Дополнительный вклад в интенсивность полосы вносит поглощение остаточных ацетамидных групп хитина (полоса Амид I при 1660 см^{-1} [262]) и деформационные колебания первичных аминогрупп хитозана при 1580–1600 см^{-1} [212]. Следует отметить, что винильным группам обычно соответствует область 1667–1640 см^{-1} . Проявление полосы ненасыщенных связей при более низких частотах в этом случае может быть обусловлено сопряжением с карбонильной группой в ПЭГ-ДА.

На спектре (2) полимерной конструкции после стереолитографии интенсивность полосы существенно снижается (зеленая область на Рисунке 35), также уменьшается интенсивность полосы при 1410 см^{-1} (синяя область на Рисунке

35) и 810 см^{-1} (соответствуют колебаниям ненасыщенных двойных связей в ПЭГ-ДА [263]). В результате фотосшивания растет интенсивность полосы около $1140\text{--}1045\text{ см}^{-1}$ (красная область на Рисунке 35, спектр (2)). Эта область чувствительна к структурным изменениям [264] и, вероятно, соответствует полосе C–O–C растяжения для алкилзамещенных эфиров [265]. Увеличение интенсивности и появление острых пиков в этой области демонстрирует усложнение полимерной структуры в результате фотосшивания.

Эти факты указывают, *во-первых*, на конверсию двойных C=C связей в процессе фотосшивания, что подтверждает смещение полосы поглощения карбонильной группы, сопряженной с винилом: в спектре ФПК (1) полоса с максимумом при 1711 см^{-1} смещается в область 1730 см^{-1} (спектр (2)). Об этом также свидетельствует отсутствие для сшитых конструкций острых пиков в районе 920 см^{-1} (внеплоскостные деформационные колебания алкеновых связей).

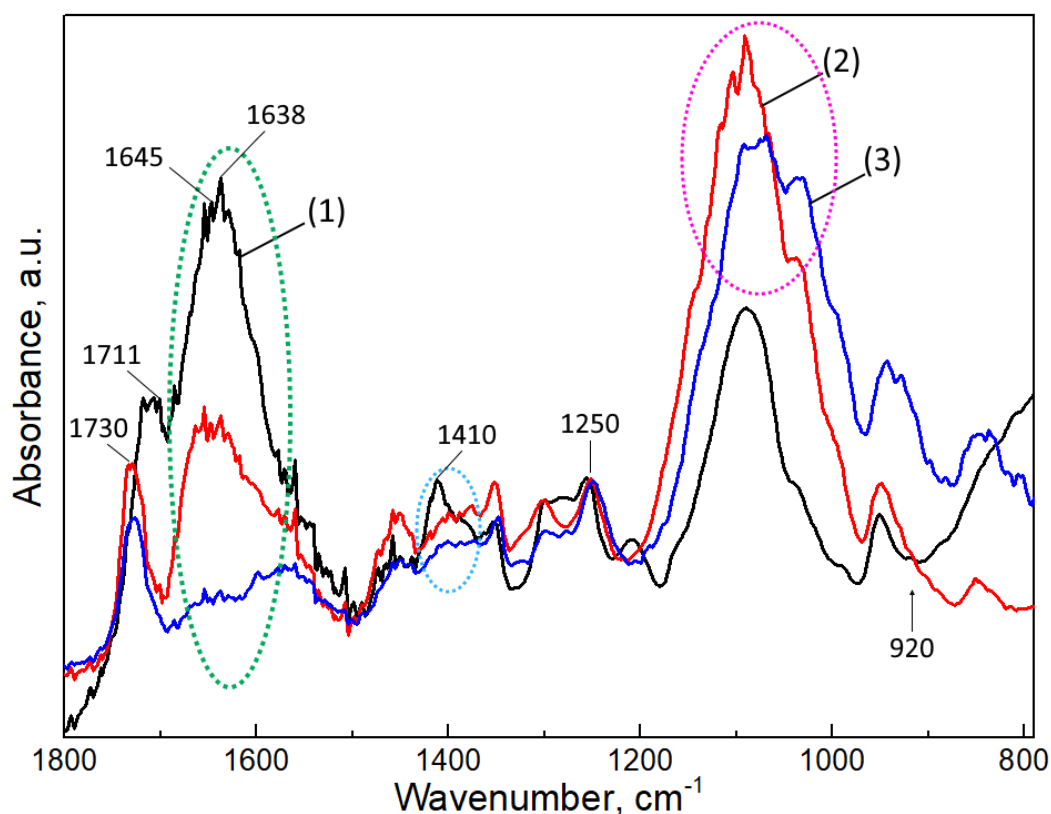


Рисунок 35 – ИК-спектры: (1) – ФПК, (2) – необработанная трехмерная структура, (3) – трехмерная структура после scCO_2 обработки

Во-вторых, обработка в среде скСО_2 приводит к очистке полимерных конструкций от непрореагировавших компонентов ФПК, что отображают изменения в спектре (3) (зеленая область на Рисунке 35). Для установления экстрагируемых из полимерных конструкций компонентов ФПК проведен масс-спектрометрический анализ пробы воды, через которую пропускали скСО_2 после обработки конструкций. Сравнив полученные масс-спектры с масс-спектрами исходных компонентов ФПК, сделан вывод, что при скСО_2 обработке из полимерных конструкций десорбируется ПЭГ-ДА (Рисунок 36). Отметим, что в промывочных жидкостях для конструкций без скСО_2 обработки ПЭГ-ДА не был найден. Таким образом, обработку в среде скСО_2 можно рассматривать как метод предстерилизационной очистки полимерных материалов от непрореагировавших компонентов, тогда как стандартная процедура отмывки в растворителях не позволяет очистить от них материал.

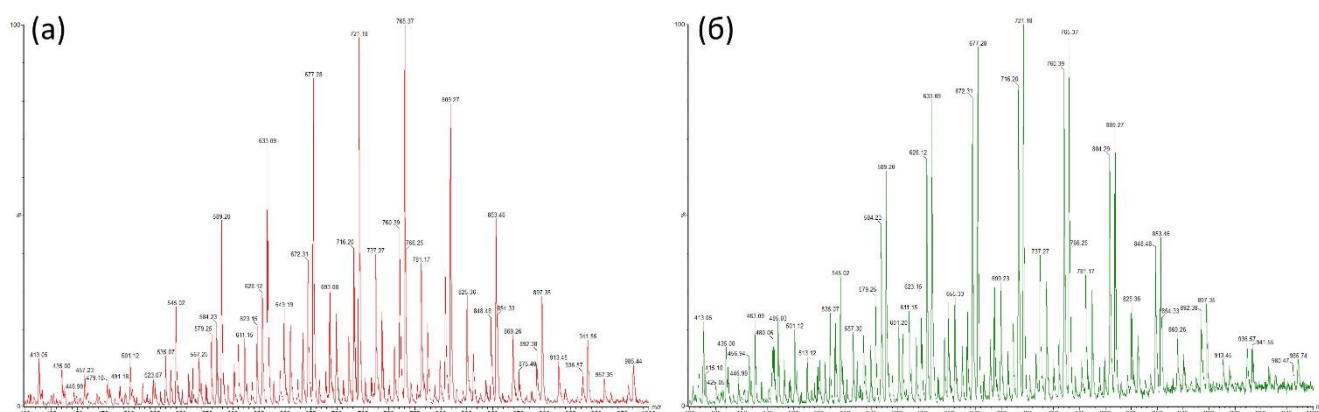


Рисунок 36 – Масс-спектры воды (а), через которую пропускали скСО_2 после обработки полимерных структур и ПЭГ-ДА (700 Да) в качестве эталона (б)

Обработка скСО_2 может приводить к изменению поверхностных характеристик полимерных конструкций: механических и гидрофильно-гидрофобных свойств, поверхностной энергии, топографии. Действительно, локальный модуль упругости трехмерных конструкций увеличивается на 1–2 порядка в зависимости от режима скСО_2 обработки (Таблица 3, Рисунок 37). Отмечено различие в механических свойствах между боковой стороной и

основанием трехмерной конструкции, что, скорее всего, связано с ограничением метода лазерной стереолитографии: более плотно сшитая полимерная сеть формируется в направлении лазерного воздействия, чем в плоскости, перпендикулярной оси лазерного луча [218, 222].

Таблица 3 – Локальный модуль упругости полимерных конструкций до и после обработки scCO_2

Поверхность конструкции*	Локальный модуль упругости, кПа		
	Исходная конструкция	Конструкция после scCO_2	
		Статический режим	Проточный режим
Боковая	$3,3 \pm 0,6$	$30,2 \pm 5,7$	$397,2 \pm 79,4$
Основание		$54,9 \pm 10,9$	$604,0 \pm 108,1$

*компьютерная модель трехмерной конструкции приведена на Рис. 21

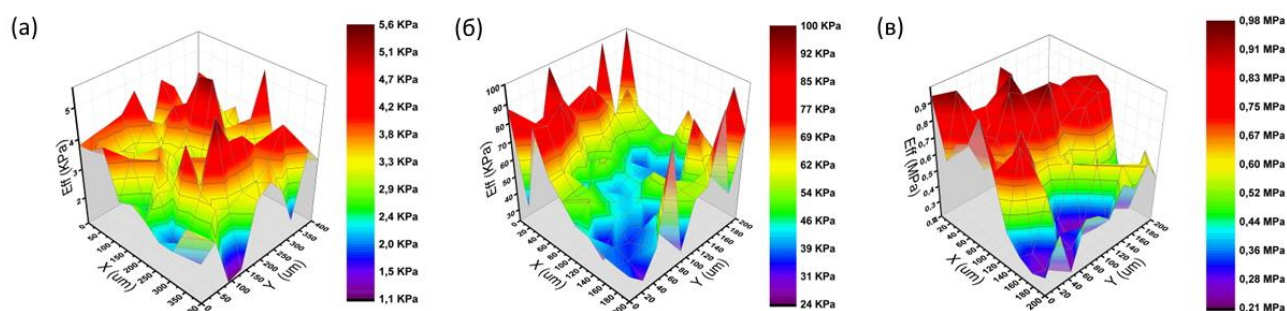


Рисунок 37 – Поверхностное распределение модуля упругости: а – исходная полимерная конструкция; б – конструкция после scCO_2 обработки в статическом режиме; в – конструкция после scCO_2 обработки в проточном режиме

Высокий модуль упругости для трехмерных структур после проточного режима scCO_2 обработки вероятно обусловлен более полной десорбцией как свободной, так и внутрипоровой воды, которая находится в ловушке между полимерными цепями [266], а также удалением непрореагировавших компонентов ФПК. Примечательно, что для конструкции, обработанной в проточном режиме, модуль упругости оказался выше, чем для лиофилизированной конструкции (модуль упругости равен $252,1 \pm 33,8$ кПа) [220, 222].

Таким образом, используя scCO_2 обработку, можно в широких пределах варьировать механические свойства трехмерных структур, состоящих из одного и того же фоточувствительного полимера, причем, в отличие от распространённого метода лиофильной сушки, сохранять гелевую структуру материала, что в дальнейшем может обеспечить благоприятные условия для роста и размножения клеток. Более того, полученные результаты интересны тем, что изменение модуля упругости происходит без применения каких-либо армирующих конструкций, которые при имплантации могут значительно замедлять скорость деградации *in vivo* [267]. Другой альтернативный способ повышения прочности – замешивание в композицию дополнительных компонентов – часто сопровождается возрастанием токсичности получаемого материала биомедицинского назначения.

3.6. Шероховатость, энергетические свойства поверхности трехмерных конструкций после обработки сверхкритическим диоксидом углерода

При исследовании поверхности полимерных конструкций АСМ показано, что средняя шероховатость исходной, необработанной конструкции составляет 81 ± 42 нм. После обработки scCO_2 средняя шероховатость конструкции уменьшилась до $20,7 \pm 3,0$ нм (Рисунок 38).

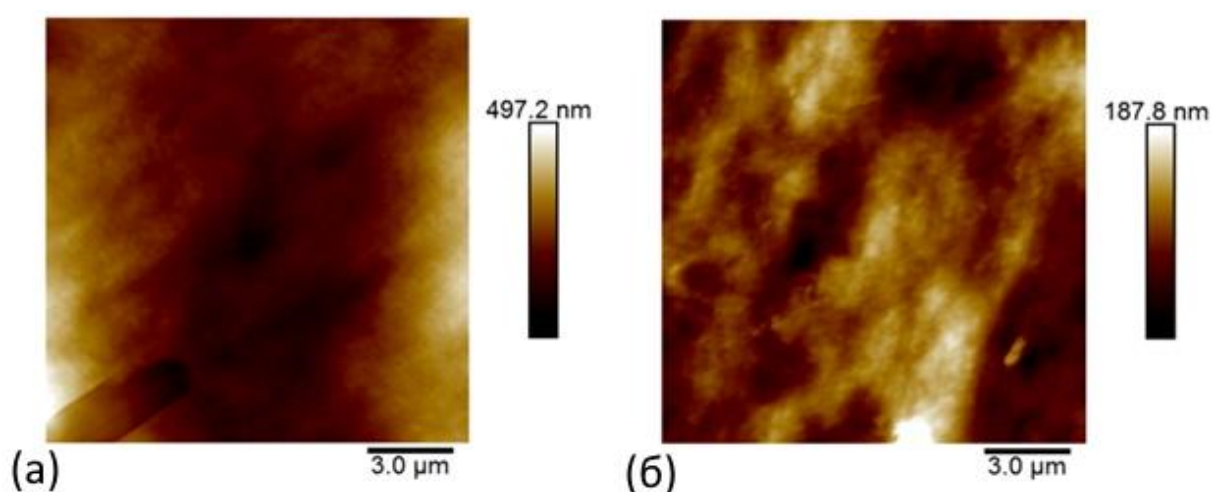


Рисунок 38 – АСМ поверхности исходной полимерной конструкции (а) и конструкции после обработки scCO_2 (б)

Вероятно, сглаживание поверхности происходит в результате десорбции непрореагировавших компонентов ФПК из менее сшитых, периферийных слоев и также несвязанной воды, что приводит к сжатию трехмерной конструкции. Подобное изменение нанотопографии в значительной степени может влиять на клеточную адгезию и рост, например в случае эндотелиальных и нейрональных клеток [31].

Адгезия клеток к полимерным материалам зависит от гидрофильности поверхности и ее энергетических свойств. Сформированные трехмерные конструкции обладают гидрофильной поверхностью, однако для конструкций, обработанных scCO_2 , контактный угол смачивания оказался выше (Рисунок 39а, б).

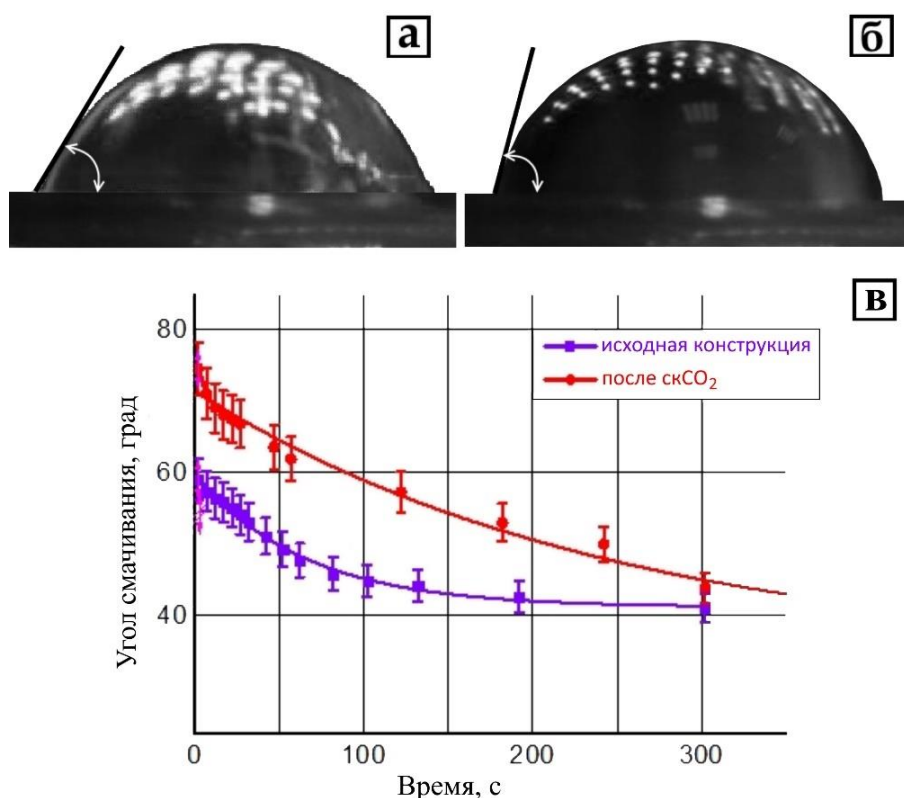


Рисунок 39 – Краевые углы смачивания дистиллированной водой поверхности исходных полимерных конструкций (а) и конструкций после обработки scCO_2 (б);

в – Кинетика смачивания водой для конструкций на основе AX50 до и после обработки scCO_2

Процесс смачивания исходной полимерной конструкции водой (Рисунок 39в) представляет собой медленно убывающую степенную функцию, при этом примерно за 180 с угол смачивания достигает 40° и дальше остается неизменным, следовательно, можно говорить о так называемом равновесном значении краевого угла смачивания. Ранее (Рисунок 34, раздел 3.4), для полимерных конструкций на основе AX10 получены схожие значения контактных углов смачивания, при этом равновесная степень набухания не наблюдалась, и сорбция воды происходила с большей скоростью. Вероятно, подобная разница гидрофобно-гидрофильных свойств определяется как большим количеством гидрофобных аллильных фрагментов, введенных в структуру хитозана, так и увеличением плотности сшивки в случае конструкций на основе AX50.

Обработка скCO_2 делает поверхность более гидрофобной, смачивание происходит с большей скоростью, равновесное значение угла смачивания достигается в среднем за 300 с. Кроме того, обработка скCO_2 снижает значения поверхностной энергии и также приводит к изменению доминирующей составляющей: преобладает дисперсионная компонента (и в случае проточной и статической обработки), полярность полимерной конструкции уменьшается $\sim$ в 2 раза (Таблица 4) [218].

Таблица 4 – Углы смачивания. Поверхностные энергетические характеристики трехмерных структур

	Угол смачивания, θ , градусы (вода/этиленгликоль)	Поверхностная энергия и ее составляющие, мДж/м ²			Полярность, σ_s^p / σ_s
		Полярная, σ_s^p	Дисперсионная, σ_s^d	Поверхностная энергия, $\sigma_s = \sigma_s^p + \sigma_s^d$	
Исходная структура	$(60 \pm 5)/(48 \pm 6)$	35 ± 3	7 ± 1	42 ± 3	0,8
скCO ₂ статич. режим	$(77 \pm 3)/(53 \pm 5)$	11 ± 1	20 ± 2	32 ± 3	0,3
скCO ₂ проточ. режим	$(79 \pm 4)/(53 \pm 5)$	9 ± 1	22 ± 2	24 ± 2	0,4

Уменьшение полярности и различия в смачиваемости для конструкций после скСО_2 обработки могут быть связаны с изменением топографии поверхности и бóльшим количеством полярных групп в случае необработанной трехмерной конструкции, что должно обеспечивать, согласно уравнению Дюпре-Юнга, более сильное межмолекулярное взаимодействие полимерных молекул с молекулами воды, а в последующем и с культурой клеток. Следовательно, обработка скСО_2 может быть интересна с точки зрения регулирования клеточной адгезии и скорости деградации полимерной конструкции.

При этом отметим, что правило «больше гидрофобность поверхности – меньше клеточная адгезия» выполнимо с исключениями. Действительно, для остеобластов отмечается уменьшение адгезии к поверхности с увеличением контактного угла смачивания с 0° до 106° [31]. Для нервных клеток меньшая гидрофобность не только способствует клеточному прикреплению, но также усиливает дальнейшую дифференцировку клеток [268]. Фибробласты в свою очередь имеют максимальное приращение и высокие скорости пролиферации при контактном угле 55° – 60° [269, 270]. Если для полимерной конструкции нужно повысить клеточную адгезию, то часто используют модификацию поверхности различными протеинами. В этом случае преимущество будут иметь более гидрофобные поверхности, которые имеют тенденцию адсорбировать больше белков [271].

3.7. Биосовместимость хитозановых конструкций

Исследование метаболической активности фибробластов линии NCTC L929 в присутствии трехсуточных вытяжек из полимерных конструкций на основе AX10 и AX10 с ПЭГ-ДА показало *отсутствие водорастворимых токсических компонентов* (Рисунок Л.1). Исследование морфологических особенностей и жизнеспособности МСК человека, культивируемых на поверхности конструкций на основе AX10 и AX10 с ПЭГ-ДА, показало, что количество клеточной гибели не превышает 1–2%. Клетки распластываются и пролиферируют на поверхности

исследуемых материалов, морфология клеток не имеет существенных отличий с контролем (Рисунки Л.2, Л.3) [211].

Исследование адгезионных характеристик пленочных образцов хитозана и АХ показало, что гидрофобная модификация хитозана путем введения аллильных групп приводит к изменению свойств поверхности с гидрофильных на умеренно-гидрофобные. Если пленочные образцы из *немодифицированного* хитозана *не поддерживают адгезию и распластывание фибробластов* (происходит округление клеток и формирование клеточных агрегатов), то на образцах из АХ10 и АХ20 наблюдается *оптимальная адгезия* (Рисунок Л.4).

Наблюдение за клеточным ростом на трехмерных структурах из АХ50 до и после scCO_2 обработки показало *отсутствие цитотоксического действия* на культуру фибробластов мыши линии NIH 3T3 (Рисунок М.1, Таблица М.1). Незначительное цитотоксическое действие исходной трехмерной структуры может быть вызвано присутствием в материале остатков ФПК, которые могут быть эффективно удалены методом сверхкритической флюидной экстракции [218, 219].

3.8. Имплантация и гистология хитозановых конструкций

Резюмируя полученные результаты (подробности даны в Приложении Н и в [62]), отметим, что тканевая реакция на имплантацию полимерных пленок и трехмерных конструкций характеризуется формированием вокруг образцов реакции типа инородных тел с развитием грануляционной ткани, васкуляризации и фиброза, и в целом схожа с результатами морфологических исследований других авторов [272–278]. Однако, при имплантации не обнаружено ни некротических, ни выраженных островоспалительных изменений тканей о которых сообщается в ряде работ по имплантации хитозановых материалов [272, 274, 276, 277].

3.8.1. Внутренняя структура плёночных образцов

Для характеристики микроструктуры пленки хитозана, контрастированной пикросириусом красным, использовали метод вейвлет-анализа [62]. Метод вейвлет-анализа предлагают использовать для клинической интерпретации

гистологических изображений: например, авторы работы [279] рассматривали вейвлеты Хаара и Добеши в качестве диагностического инструмента для выявления и классификации опухолей молочных желез. При этом нет работ по материаловедению, в которых бы сообщалось о применении вейвлет-преобразований для выявления внутренней структуры трехмерных конструкций, подвергшихся деградации *in vivo*.

Для фрагмента ткани с хитозановым образцом (Рисунок 40а) построена вейвлетограмма структурных оптических неоднородностей – желтых (пикринофильных) фрагментов и коричнево-красных полос. На Рисунке 40b на вейвлетограмме видны вертикальные полосы в диапазоне периодов от 5 до 100 мкм. Часть этих полосок соединяется между собой, образуя так называемую «древовидную структуру», другие полосы расположены отдельно от других – «травовидная структура». Также в центре вейвлетограммы наблюдается большая «древовидная структура», занимающая диапазон от 5 до 500 мкм.

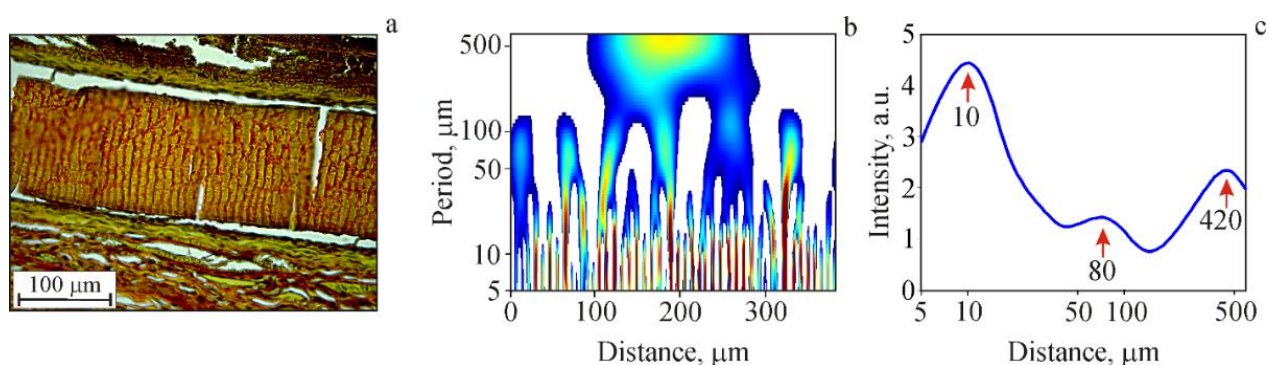


Рисунок 40 – Срез ткани с пленкой хитозана (а), вейвлетограмма (b) и обобщенный пространственный спектр структурных оптических неоднородностей среза пленки в направлении ее поверхности (с)

С помощью вейвлетограмм можно получить обобщенный спектр (Рисунок 40с), который характеризует наиболее сильные периодичности для всего обрабатываемого изображения. Для этого производится усреднение вейвлетограммы по оси абсцисс (расстоянию). На обобщенном спектре выделяются три ярких максимума с пространственной периодичностью 10, 80 и 420

мкм. Таким образом, можно заключить, что визуализируемая пикросириусом красным поперечная исчерченность, а именно очаги деградации хитозановых конструкций, располагаются периодически, а не хаотично [62].

Отметим, что темно-красное окрашивание хитозановых материалов выявлено в работах [272–274], в то время как, например, у Н. Park и соавторов [280] при окраске пикросириусом красным хитозан пикринофилен. Вероятнее всего, разница в окраске хитозана в этих работах объясняется неодинаковой степенью деградации материалов, а также различными кристаллическими формами используемого хитозана. Известно, что хитозан может существовать в двух различных кристаллических формах, в зависимости от соотношения этих форм будет меняться картина РФА [238]. Сравнивая обобщенный пространственный спектр структурных неоднородностей среза пленки (Рисунок 40с) и рентгенограммы для пленок на основе модифицированного хитозана в области 2θ от 7° до 30° (см. раздел 3.2, Рисунок 26), можно отметить факт «обратного» подобия полученных спектров. Этот эффект свидетельствует о распределении кристаллитов по всему объему пленок (дальний порядок) и наиболее вероятно является причиной появления структурных оптических неоднородностей (коричнево-красных полос) при окрашивании пикросириусом красным. То есть деградация пленочных образцов на первом этапе происходит через менее упорядоченные аморфные области, когда из-за произошедшего расщепления $\beta(1\rightarrow4)$ -гликозидных связей (деполимеризация) [64], происходит увеличение степени деацетилирования хитозана. Образующиеся после расщепления основные группы вступают в реакцию с сульфидными группами в пикросириусе красном. Это и приводит к появлению коричнево-красных полос на 30 сутки имплантации пленок и к росту областей красного окрашивания для трехмерных конструкций с 60 суток после имплантации (Рисунки Н.4, Н.5) [62].

ГЛАВА 4. ГУБЧАТЫЕ ГИБРИДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

4.1. Параметры лазерного воздействия. Формирование полилактидных шаблонов

При постоянной интенсивности лазерного излучения и площади лазерного пятна на поверхности образца энергия, которую поглотит образец, будет определяться временем облучения [281]. Следовательно, регулируя скорость ЛИ, можно получить оптимальные для клеточной адгезии и роста размеры армирующих линий (толщину и высоту), также снизить или полностью устранить деструктивное влияние лазерного излучения на материал.

Для формирования полилактидных шаблонов на поверхности коллагеновой губки – *губчатого гибридного материала (ГГМ)* – подбирали скорость ЛИ, исходя из формы и размера фотосшитых линий полилактида, их стабильности после отмывки от несшитой ФПК. Дополнительно подбирали расстояние между линиями, регулируя плотность заливки линиями (количество лин./мм).

В случае скорости ЛИ 3 мм/с толщина полученных линий армирования составила 150 ± 30 мкм. Расстояние между соседними линиями – коллагеновый материал, не подвергшийся воздействию лазера – менялось от 40 до 70 мкм в зависимости от плотности заливки армирующими линиями (Рисунок 41).

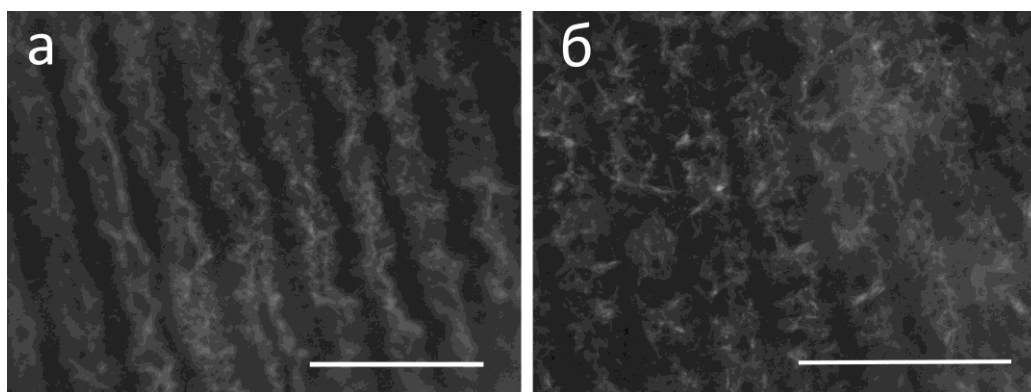


Рисунок 41 – Фотосшитые линии (светлые области), полученные при скорости ЛИ 3 мм/с и плотности заливки 5 лин./мм (а), 6 лин./мм (б). Фотографии сделаны после отмывки и стерилизации образцов. Бар 600 мкм

Для скорости ЛИ 5 мм/с толщина линий армирования равнялась 100 ± 21 мкм. Расстояние между соседними линиями менялось от 70 до 100 мкм в зависимости от плотности заливки армирующими линиями (Рисунок 42). После отмывки и стерилизации образцов отчетливо видны границы между областями, которые подверглись воздействию лазера, т.е. где произошло сшивание фоточувствительного полилактида, и между необработанным коллагеновым материалом. Отсутствие флуоресценции у необлученных областей ГМ свидетельствует о полноте отмывки от несшитой ФПК, т.к. исходная ФПК флуоресцирует. Отметим, что очистка ГМ от несшитой ФПК необходима не только для разграничения армирующего шаблона (фотосшитых полилактидных линий) от необлученных областей ГМ, но также для биосовместимости получаемой конструкции, т.к. при неполной отмывке несшитые мономеры и фотоинициатор могут высвобождаться из конструкции и влиять на ее цитотоксичность [282, 283].

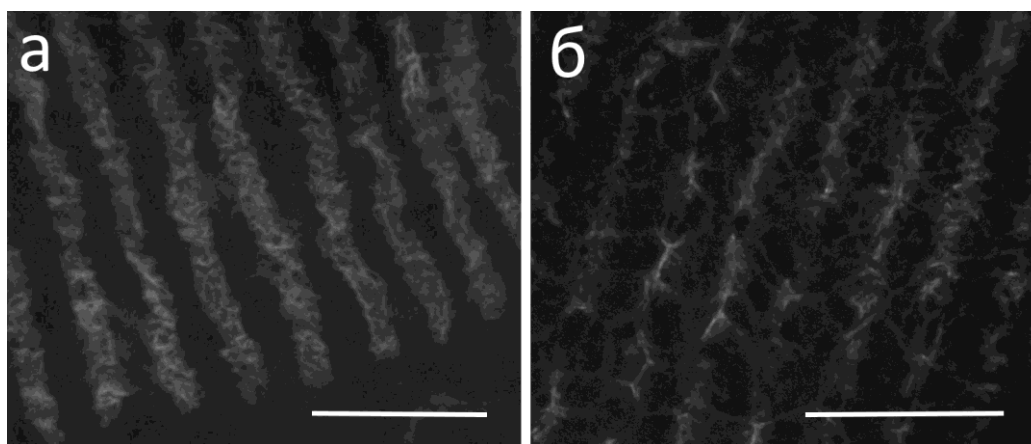


Рисунок 42 – Фотосшитые линии (светлые области), полученные при скорости ЛИ 5 мм/с и плотности заливки 5 лин./мм (а), 6 лин./мм (б). Фотографии сделаны после отмывки и стерилизации образцов. Бар 500 мкм

При плотности заливки 6 лин./мм (Рисунки 41б и 42б) границы армирующих линий прерывисты, со слабой флуоресценцией, что вероятно обусловлено высокой плотностью мощности излучения, когда возможна деструкция уже фотосшитой линии. Таким образом, на коллагеновой губке получено два типа шаблонов: с

широкими и близкорасположенными линиями (скорость ЛИ 3 мм/с) и с тонкими и удаленными линиями (скорость ЛИ 5 мм/с) (Таблица 5).

Таблица 5 – Размеры армирующих шаблонов в зависимости от скорости ЛИ

Скорость ЛИ, мм/с	Ширина линии, мкм	Расстояние между линиями*, мкм
3	150 ± 30	(40 ± 6) и (70 ± 4)
5	100 ± 21	(70 ± 7) и (100 ± 5)

*плотность заливки 6 и 5 лин./мм соответственно

Для предварительной оценки способности ГГМ регулировать клеточное поведение провели эксперименты по культивированию фибробластов линии NIH 3T3. Для ГГМ, сформированных при скорости ЛИ 3 мм/с, структурированность поверхности не выражена, направленное распределение клеток на материале не наблюдалось (Рисунок 43а). Вероятно, после нескольких циклов стерилизации и отмывки фотосшитый материал деградировал. При этом для ГГМ, сформированных при скорости ЛИ 5 мм/с, обнаружено заметное сродство клеток NIH 3T3 к фотосшитым линиям полилактида (Рисунок 43, б–г), причем сродство клеток наблюдалось на обеих сторонах материала.

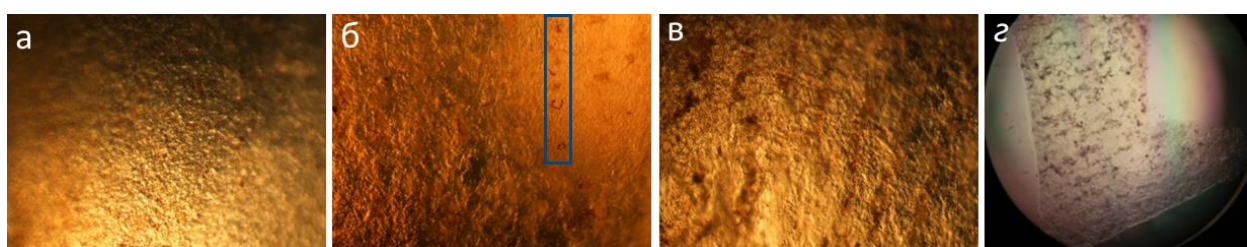


Рисунок 43 – Поверхность ГГМ через 48 ч культивирования фибробластов линии NIH 3T3. Скорость ЛИ 3 мм/с (а) и 5 мм/с (б–г). Световая микроскопия

В итоге для формирования ГГМ использовали параметры: скорость ЛИ 5 мм/с, плотность заливки 5 лин./мм. При этих параметрах армированные

коллагеновые материалы сохраняли гибкость, свойственную исходной коллагеновой губке (Рисунок 44).

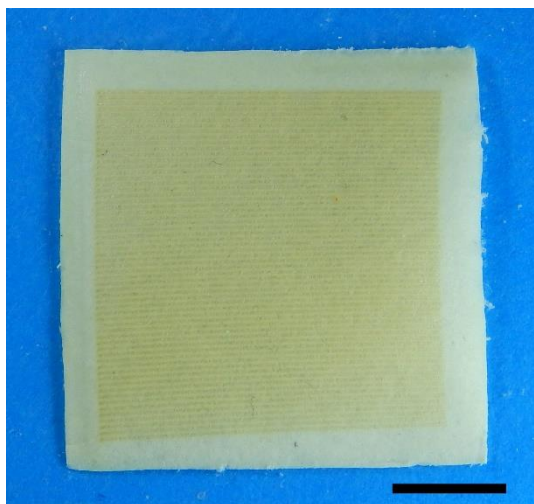


Рисунок 44 – Фотография губчатого гибридного материала (ГГМ) после лазерного структурирования. Бар 5 мм

4.2. СЭМ и ИК-спектроскопия

В результате нанесения армирующего полилактидного шаблона поверхность, занимаемая порами, сократилась в 2 раза: с 43% до 22% (Рисунок 45). При этом ГГМ сохранял свою форму и возможность манипуляций после нахождения в ФСБ в течение 2 недель, в отличие от исходной коллагеновой губки, которая за это время набухла и распадалась на отдельные волокна [216].

Большая стабильность ГГМ в ФСБ может быть вызвана несколькими причинами. Во-первых, добавление фотосшитого полилактидного шаблона приводит к образованию композитного материала, проявляющего синергетические механические свойства в сравнении с исходной необработанной коллагеновой губкой. Во-вторых, следует также учесть способ нанесения ФПК на коллагеновый материал, когда для удаления излишков фотополимера коллагеновая губка прессуется между двумя стеклами. Последнее приводит к образованию более плотной коллагеновой основы конструкции, уменьшение пористости замедляет набухание образца. В [284, 285] сообщается об использовании метода пластического сжатия (англ. plastic compression) для удаления излишков жидкости

из коллагеновых гелей, с образованием коллагеновых пластин толщиной 100–200 мкм. Коллагеновые материалы после воздействия сжимающей нагрузки демонстрируют увеличение модуля упругости на порядок в сравнении с необработанными образцами.

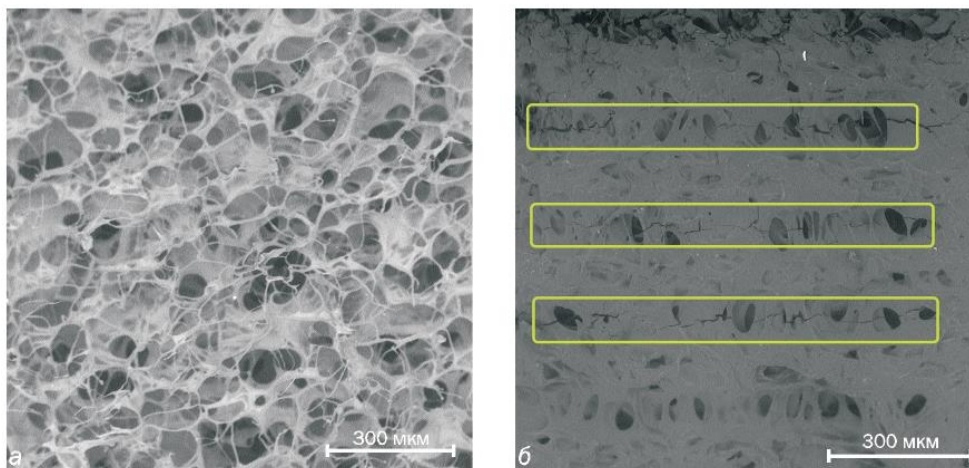


Рисунок 45 – Микрофотография СЭМ исходной коллагеновой губки (а) и ГГМ после лазерного структурирования (б). Дополнительно выделены линии полилактидного шаблона

Для обнаружения возможных изменений структуры коллагена после лазерного воздействия использовали ИК-спектроскопию. На ИК-спектрах (Рисунок 46) проявляются характерные для коллагена частоты колебаний гидроксильных групп ($3200\text{--}3700\text{ см}^{-1}$; на спектрах не приведена) и пептидных связей: Амид I, II и III ($1200\text{--}1700\text{ см}^{-1}$) [216]. При денатурации коллагена происходит раскручивание тройной спирали с образованием случайных клубков пептидных связей, что должно приводить к изменению колебаний Амид I и III, наиболее чувствительных к таким конформационным переходам [286, 287]. Неизменность частоты колебаний Амид I и III может указывать на отсутствие трансформаций коллагенового волокна при лазерном нагреве. Сдвиг полосы Амид II в низкочастотную область (с 1546 к 1538 см^{-1}) вероятно свидетельствует об увеличении доли водородных связей между соседними пептидными цепями после отмывки конструкции от несшитой ФПК [288, 289].

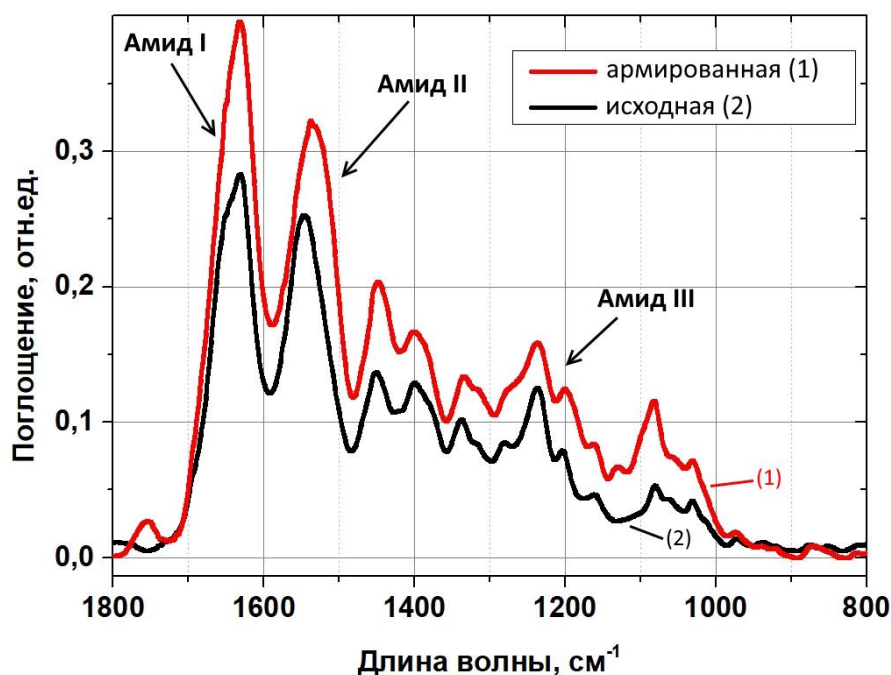


Рисунок 46 – ИК-спектры армированной (1) и исходной (2) коллагеновой конструкции

4.3. Механические свойства коллагеновых материалов

Помимо ценных для тканевой инженерии свойств, коллагеновые материалы характеризуются низкой механической прочностью (следовательно, высокой скоростью разложения) и высокой степенью усадки [290]. Так, например, по данным АСМ для клинического использования в инженерии костной и хрящевой ткани коллагеновые материалы должны иметь модуль упругости выше 25 кПа [291]. Основным фактором, влияющим на жесткость коллагеновой матрицы, является плотность поперечных связей, количество которых можно увеличить, сшив коллаген с помощью УФ-облучения в присутствии флавинмононуклеотида (ФМН).

Испытания на растяжение исходной коллагеновой губки и образцов после УФ-облучения показали рост модуля упругости примерно в 2 раза (Таблица 6). Увеличение времени облучения не привело к резкому росту модуля упругости: вероятно, поперечно-сшитая сеть, сформированная на поверхности губки, уменьшает глубину проникновения УФ-излучения. Как и ожидалось, после

облучения образцы демонстрировали меньшее относительное удлинение в сравнении с исходной коллагеновой губкой.

Таблица 6 – Механические свойства коллагеновых губок до и после облучения в присутствии ФМН

	σ , МПа	ε , %
Исходная губка	$3,2 \pm 0,2$	6 ± 1
Коллагеновая губка после 15 мин облучения	$5,7 \pm 0,3$	5 ± 2
Коллагеновая губка после 30 мин облучения	$6,1 \pm 0,3$	3 ± 1

Нанесение армирующего шаблона на поверхность коллагеновой губки приводит к формированию анизотропного материала, что может иметь решающее значение в таких приложениях, как регенерация нервной ткани или стимулирование ангиогенеза [291]. В результате лазерного воздействия среднее значение локального модуля упругости для армированного коллагенового материала возросло примерно в 7 раз в сравнении с необработанными образцами (Таблица 7; Рисунок 47) [216].

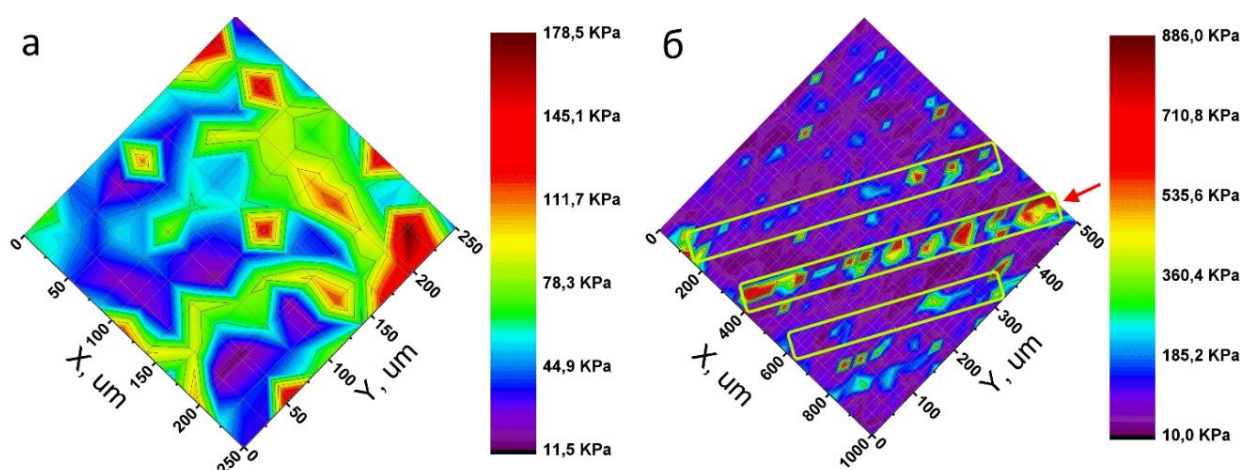


Рисунок 47 – Поверхностное распределение локального модуля упругости для исходной (а) и армированной коллагеновой губки (б). На (б) дополнительно выделены линии полилактидного шаблона

Таблица 7 – Средние значения локального модуля упругости

Исходная губка	ГГМ*
$77,6 \pm 55,3$ кПа	$520,8 \pm 201,2$ кПа

**приведено среднее значение модуля упругости армирующих линий*

Периодичность появления высоких (относительно необработанного коллагена) значений локального модуля упругости сопоставима с размерами нанесенного полилактидного шаблона, при этом на Рисунке 47б отчетливо наблюдается лишь одна из армирующих линий, тогда как остальные линии не прослеживаются столь же явно. Это может быть обусловлено особенностями фотосшивания коллагенового образца: в областях губки, не совпадающих с плоскостью перетяжки лазерного пучка, фотосшивание не происходит, либо формируются линии из редкосшитого полилактида, которые могут вымываться во время отмывки и стерилизации ГГМ.

4.4. Биосовместимость губчатых гибридных материалов, их способность поддерживать адгезию и пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека

Методом МТТ-анализа показано (Рисунок 48а), что добавление полилактидного шаблона не увеличивает цитотоксичность коллагеновых губок. На Рисунках 48б и 48с приведены изображения МСК костного мозга человека, окрашенных гомодимером бромистого этидия (оранжевый цвет). Фиолетовым цветом отражена автофлуоресценция участков ГГМ с полилактидным шаблоном по которой можно судить о локализации клеток преимущественно на шаблоне.

На Рисунках 49а и 49б даны прижизненные изображения МСК костного мозга человека на ГГМ. Видна активная пролиферация МСК к сроку 4 недели, причем клетки захватывают центральную часть фрагмента ГГМ как по поверхности, так и в глубину. Таким образом, армирование коллагеновых губок не влияет на их цитотоксичность. ГГМ обеспечивает адгезию и направленную пролиферацию МСК костного мозга человека [216].

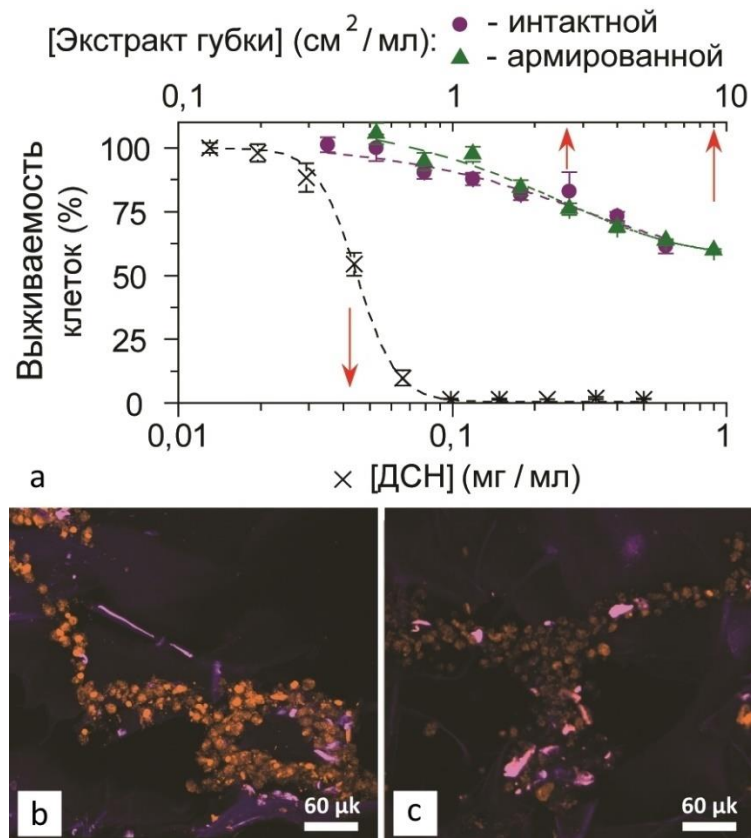


Рисунок 48 – Оценка биосовместимости ГГМ: (а) МТТ-анализ экстрактов исходной коллагеновой губки и ГГМ. Додецилсульфат натрия (ДСН) использован в качестве положительного контроля. Изображения МСК после культивирования в течение 1 (b) и 2 (c) месяцев. Окрашивание гомодимером бромистого этидия.

Конфокальная микроскопия

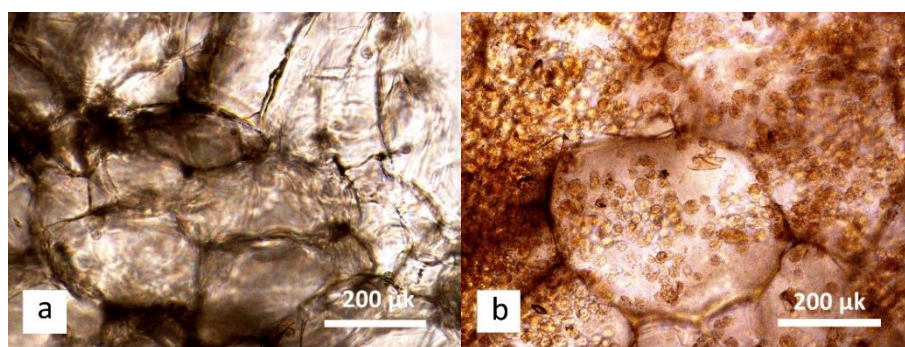


Рисунок 49 – Прижизненные изображения МСК костного мозга человека на ГГМ. Сроки культивирования: 1 неделя (а); 4 недели (b). Световая микроскопия

ГЛАВА 5. ПЛЕНОЧНЫЕ ГИБРИДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

5.1. Фотохимическое сшивание коллагена

Концентрация фотоинициатора и доза излучения, поглощённая материалом, определяют как механические свойства формируемой конструкции [292], так и жизнеспособность культивируемых на ее поверхности клеток [293]. Цитотоксический эффект при фотосшивании в присутствии ФМН вызван окислительным повреждением клеток активными формами кислорода (перекись водорода, супероксидный радикал, синглетный кислород), которые генерируются УФ-излучением и обладают высокой реакционной способностью [294].

В результате спектрофотометрического анализа показано, что в коллагеновый образец импрегнировано около 0,26 мМ фотоинициатора ФМН [215]. Как продемонстрировано в работе [295] для успеха инъекционной терапии с применением коллагеновых гидрогелей при восстановлении фиброзного кольца межпозвонкового диска для фотосшивания достаточно низких концентраций рибофлавина (0,03–0,1 мМ). В другой работе [7] авторы связывают уменьшение жизнеспособности клеток с высокой концентрацией рибофлавина, которую они использовали (0,5 мМ) и отмечают необходимость работать с меньшими концентрациями фотоинициатора. Таким образом, используемая в экспериментах концентрация ФМН является достаточной для фотосшивания коллагеновых образцов и не должна в итоге негативно влиять на их биосовместимость.

Далее с помощью наноиндентирования определяли изменение локального модуля упругости коллагеновых пленок после УФ-облучения. Фотосшивание в присутствии ФМН увеличило локальный модуль упругости коллагена примерно в 2,6 раза: за 20 минут облучения модуль упругости вырос с $64,5 \pm 14,1$ кПа (необлученный коллаген) до $156,8 \pm 40,4$ кПа (Рисунок 50а) [215]. Согласно [101] такое же увеличение модуля упругости для коллагеновых образцов можно получить при использовании комбинации фотохимического сшивания и метода пластического сжатия. Также в работах [296, 297] сообщается о росте модуля

упругости примерно в 2,5 раза при облучении при схожих условиях энуклеированных свиных глаз и склеры кролика.

За 20 минут облучения образцы коллагена получают дозу около $4,7 \text{ Дж/см}^2$. Как показано в работах [121, 298] такой дозы при выбранной концентрации фотоинициатора достаточно для получения фотосшитых гидрогелей. Отметим, что в работах по лечению кератоконуса (дегенеративное заболевание невоспалительного характера, при котором роговица глаза истончается и принимает конусообразную форму) с помощью УФ-облучения и рибофлавина сообщается о пространственной неоднородности фотосшивания коллагена роговицы, когда максимальная плотность сшивки наблюдается в пределах 300 мкм от верхней поверхности облучаемого материала [299]. Здесь обнаружено, что распределение локального модуля упругости по поверхности фотосшитых коллагеновых пленок является однородным (Рисунок 50b). Этому способствует прозрачность коллагеновой пленки, а также проведение фотосшивания с двух сторон образца. В последующих экспериментах облучение образцов осуществляли в течение 30 минут [215].

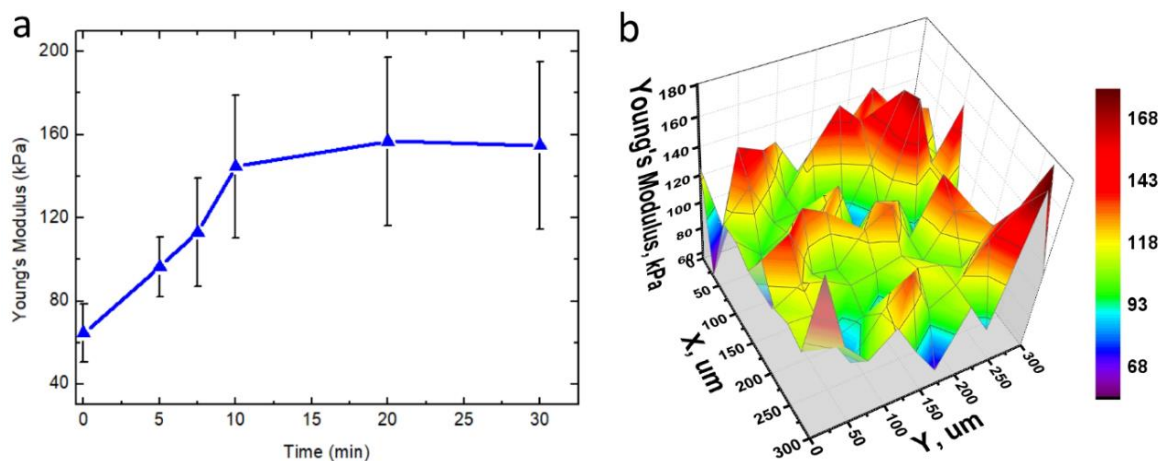


Рисунок 50 – а) Изменение локального модуля упругости коллагеновых пленок в зависимости от времени УФ-облучения; б) Пример распределения локального модуля упругости по поверхности пленки, облученной в течение 7,5 мин

5.2. Параметры лазерного воздействия. Формирование армирующих полилактидных шаблонов

Подбор скорости ЛИ производили исходя из оценки формы и размеров сформированных линий. Кроме того, учитывали стабильность (целостность) нанесенных армирующих линий после отмытки конструкции от несшитой ФПК.

Для минимальной скорости ЛИ 1 мм/с (Рисунок 51а) различимо углубление, а также трещина в структурированной линии полилактида, которая наблюдается и для скорости ЛИ 2 мм/с (Рисунок 51б). Углубление уменьшается при увеличении скорости ЛИ и при скорости ЛИ более 3 мм/с исчезает (Рисунок 51в, г) [215].

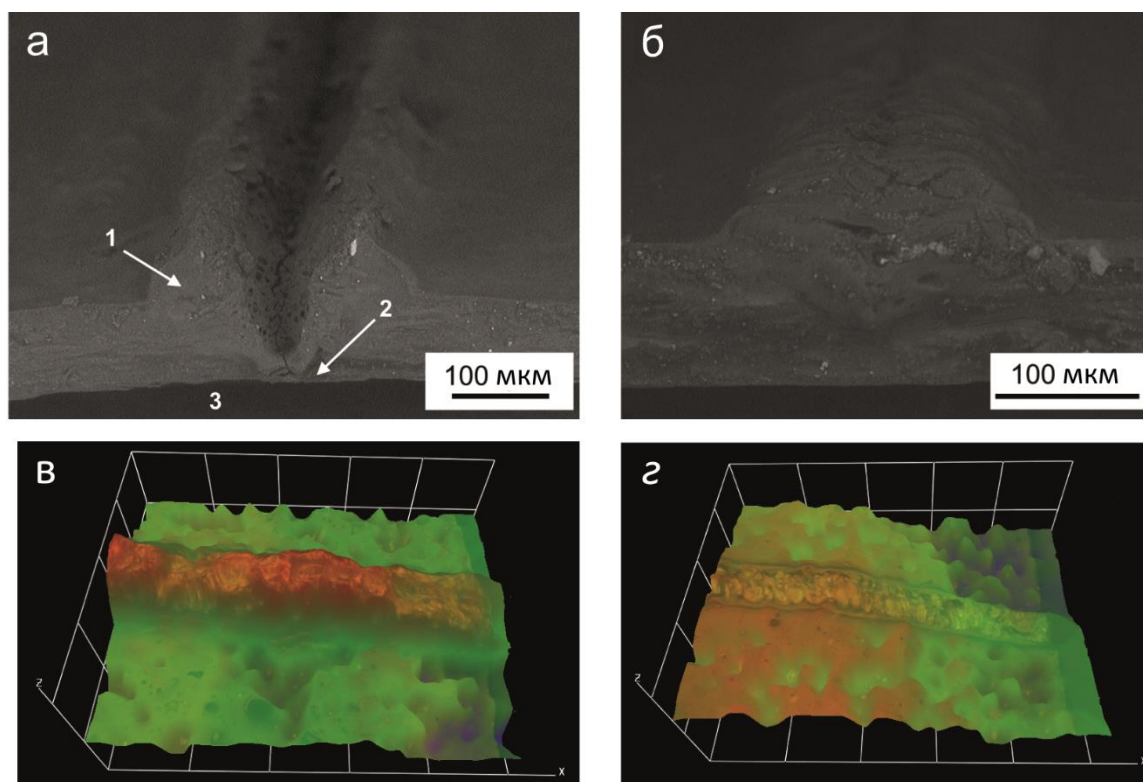


Рисунок 51 – СЭМ линий полилактида при скорости ЛИ 1 мм/с (а) и 2 мм/с (б). На (а) обозначены: 1 – линия отвержденного полилактида; 2 – коллагеновая пленка; 3 – подложка. Внешний вид полилактидных линий при скорости ЛИ 4 мм/с (в) и 10 мм/с (г). Масштаб клетки по ХУ 150 мкм, по Z 50 мкм

Появление трещин и деструкция полилактидных линий наиболее вероятно связаны с длительностью лазерного воздействия, когда возможна абляция сшитого

полимера. Использование при лазерном структурировании в качестве основного компонента ФПК тетрафункционального полилактида приводит к образованию сетчатых полимеров, которые не только теряют способность к растворению, но и становятся хрупкими по причине уменьшения их молекулярной подвижности, что в результате чрезмерного лазерного воздействия может приводить к образованию микротрещин [300]. Среди причин усадки поверхностного слоя и образования микротрещин в полимерных образцах называют также накопление термомеханических напряжений и изменение конформации макромолекул [301], образование газообразных продуктов в результате разрыва углеродных и кислородных связей в полимерах [302, 303]. Отметим, что лазерное воздействие высокой интенсивности может приводить не только к деструкции отвержденного полилактида, но и к созданию шероховатой поверхности при образовании пузырей (bubble formation) [304].

С увеличением скорости ЛИ до 10–20 мм/с фотоотвержденная линия становится менее равномерной по высоте. При 20 мм/с визуально практически отсутствует след от воздействия лазера: линия тонкая, на некоторых участках коллагеновой пленки отсутствует или плохо различима. Менее интенсивное лазерное воздействие приводит к образованию редкосшитых полимерных сеток. Их образование будет происходить в основном за счет «быстрой» стадии полимеризации [305], когда преобладает диффузия и рост «малых» подвижных радикалов. При отмывке конструкций молекулы растворителя могут разрушать редкосшитые участки армирующих линий, что иллюстрирует Рисунок 52: ширина сформированных полилактидных линий после отмывки от несшитой ФПК уменьшается примерно в 2 раза для скоростей ЛИ 10–20 мм/с. Минимальное вымывание фотосшитых линий наблюдается для скоростей ЛИ 1–5 мм/с [215].

Для дальнейших экспериментов по формированию армирующих полилактидных шаблонов на коллагеновых образцах выбраны скорости ЛИ 15 мм/с и 3 мм/с. В первом случае с высокой производительностью будет сформирован полилактидный шаблон, состоящий из тонких и частых фотоотвержденных линий, во втором случае – из широких, но удаленных друг от друга линий.

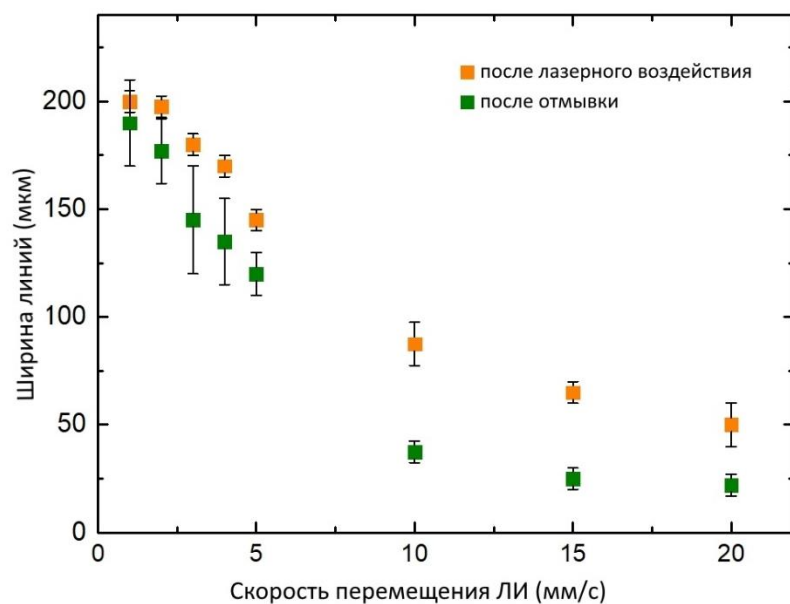


Рисунок 52 – Ширина полилактидных линий сразу после лазерного воздействия и после отмывки от несшитой ФПК в зависимости от скорости ЛИ

На коллагеновом материале после лазерного структурирования (Рисунок 53а) различимы фотосшитые линии из полилактида: области, подвергшиеся воздействию лазера, непрозрачны. После фотоотверждения образец теряет пластичность, свойственную исходной коллагеновой пленке, что обусловлено наличием несшитой ФПК на поверхности коллагенового образца. При этом, после отмывки манипуляционные свойства ПГМ близки к свойствам исходной коллагеновой пленки: ПГМ восстанавливает свою форму после манипуляций пинцетом, может принимать как желобчатую, так и трубчатую формы. Также на макрофотографии различим трехмерный рельеф сформированного полилактидного шаблона (Рисунок 53b).

Для контроля полноты отмывки ПГМ от несшитой ФПК построены ИК-карты его поверхности (Рисунок 54). Светлые области на ИК-картах показывают, где присутствует коллагеновый материал, следовательно, темные – где коллаген покрыт фотосшитым полилактидом. Для полосатого шаблона наблюдается хорошая отмывка от фоточувствительного материала, а в случае сетчатых шаблонов, напротив, показано, что отмывка не позволяет полностью удалить несшитую ФПК [215].

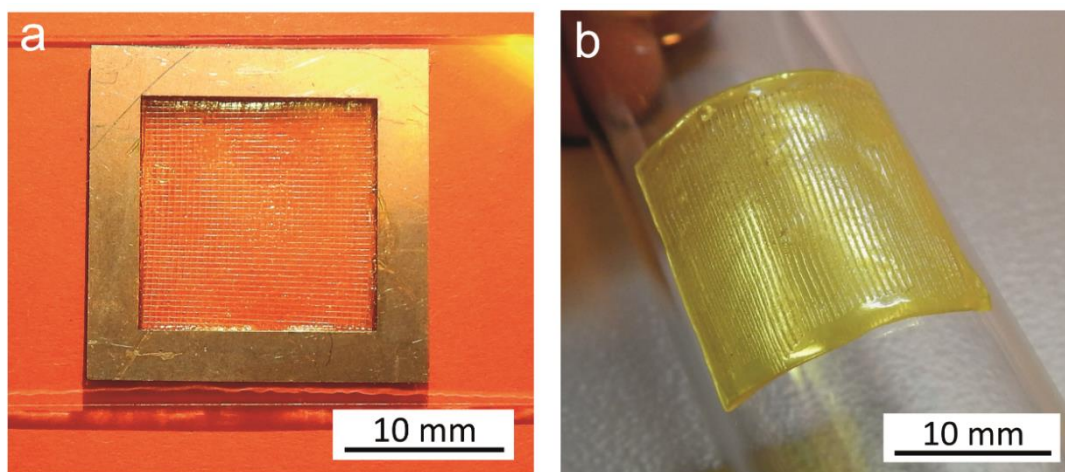


Рисунок 53 – Макрофотографии пленочных гибридных материалов (ПГМ), полученных при скорости ЛИ 3 мм/с: а – шаблон в виде сетки после лазерного структурирования (алюминиевое окно использовали для закрепления образца); б – шаблон в виде полосок после отмытки от несшитой ФПК

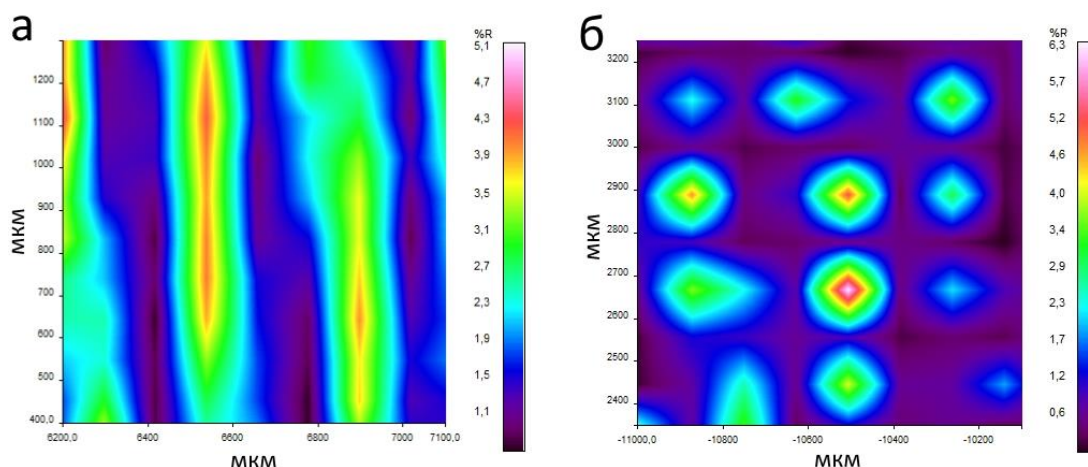


Рисунок 54 – ИК-карты ПГМ (скорость ЛИ 3 мм/с), перестроенные по длине волны 1547 см^{-1} (Амид II). Шаблон в виде полосок (а) и в виде сетки (б)

5.3. ИК-спектроскопия

ИК-спектр (1) фотосшитого полилактида (Рисунок 55) имеет типичные для цепей лактида полосы поглощения, а именно: 1746 см^{-1} – валентные колебания карбонильной группы $\text{C}=\text{O}$, 1456 и 1385 см^{-1} – деформационные колебания CH_3 -групп, 1185 см^{-1} – полоса асимметричного растяжения $\text{C}-\text{O}-\text{C}$, 1083 см^{-1} – симметричное растяжение CH_3 , 1045 см^{-1} – растяжение $\text{C}-\text{CH}_3$ [214].

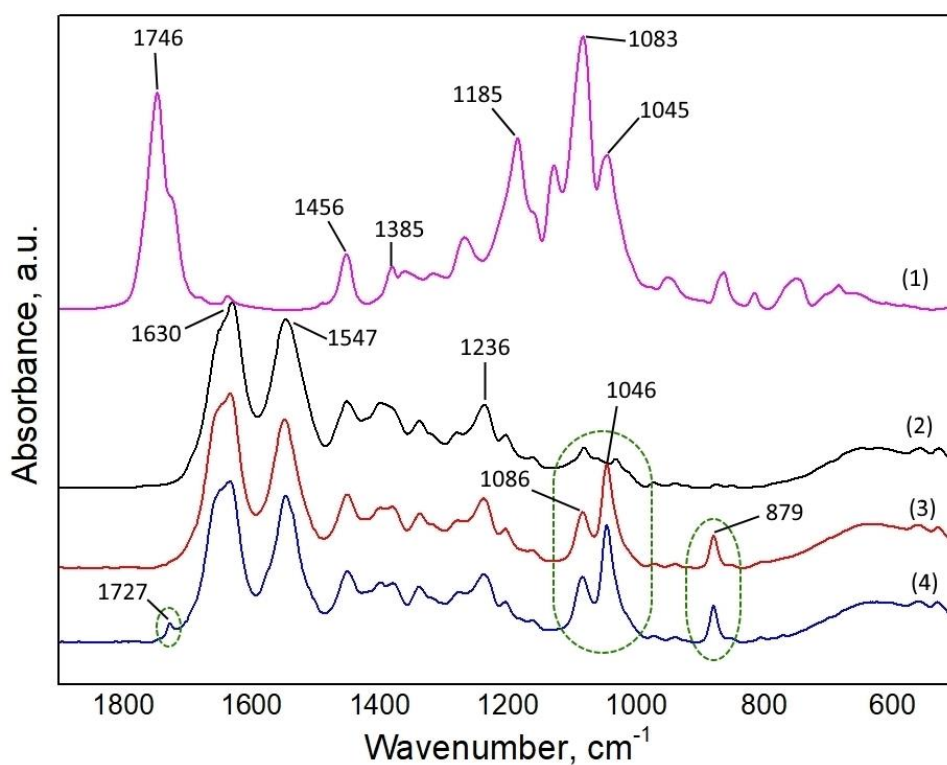


Рисунок 55 – ИК-спектры: 1 – фотосшитый полилактид; 2 – исходная коллагеновая пленка; 3 – фотосшитая коллагеновая пленка; 4 – армирующий шаблон на коллагене

Спектры (2), (3), (4) на Рисунке 55, как и ожидалось, получены с характерными для коллагена полосами пептидных связей [101], а именно: Амид I при 1630 см^{-1} (валентные вибрационные колебания C=O-связи), Амид II при 1547 см^{-1} (плоскостные деформационные колебания N-H-связи и вибрационные колебания C-N-связи) и триплета из более слабых полос Амид III с максимумом при 1236 см^{-1} (вибрационные колебания C-N-связи и плоскостное колебание C-N-H). Отметим, что в спектре (3) для фотосшитой коллагеновой пленки и в спектре (4) для армирующего шаблона (Рисунок 55) частота колебаний Амид I увеличивается до 1633 см^{-1} . Это могло бы указывать на денатурацию коллагена после облучения и лазерного воздействия. Однако не происходит изменение интенсивности полосы Амид I и остаются неизменными частоты Амид III, которые также чувствительны к денатурации и конформационным переходам молекул коллагена. Следовательно, сдвиг полосы Амид I, скорее всего, происходит в

результате увеличения количества водородных связей при гидратации макромолекул коллагена [215].

В спектрах (3) и (4) облученной коллагеновой пленки и армирующего полилактидного шаблона присутствуют пики при 1086, 1046 и 879 см^{-1} , которые не наблюдаются в исходной коллагеновой пленке. Отметим также, что у полилактидного шаблона на коллагене пик при частоте 1046 см^{-1} обладает большей интенсивностью в сравнении с облученной пленкой, что может быть связано с добавлением в систему полилактида. С полилактидом также связываем появление пика при 1727 см^{-1} от карбонильных групп, привитых согласно работе [217]. Изменения при 1086 и 879 см^{-1} , наблюдаемые после облучения коллагена (спектры (3) и (4)), вероятно относятся к колебаниям эфирной и эпокси групп [215].

5.4. Топография и свойства поверхности пленочного гибридного материала

На микрофотографиях армирующих шаблонов (Рисунок 56а, с) можно наблюдать более яркие области в местах, где произведено лазерное воздействие и, следовательно, произошло фотосшивание полилактида. Измерение спектров флуоресценции показало, что сформированные шаблоны обладают интенсивной флуоресценцией с максимумом 520 нм при длине возбуждения 410 нм (Рисунок 57). Коллагеновые образцы после УФ-облучения флуоресценцией не обладали. Формирование конструкций с флуоресцирующими участками является достоинством предлагаемого способа обработки коллагеновых материалов, т.к. в дальнейшем позволит исследовать их биodeградацию *in vivo* без необходимости разрабатывать сложные гистологические процедуры и жертвовать экспериментальными животными.

Неоднородность и зернистость сформированных полилактидных шаблонов сохраняются после отмывки (Рисунок 56b, d), особенно для ПГМ, сформированных при скорости ЛИ 3 мм/с. Подобный рельеф может быть обусловлен не только образованием пузырей при высокой интенсивности лазерного воздействия [304], но и также разрушением редкосшитых участков полилактидного шаблона при его отмывке [215].

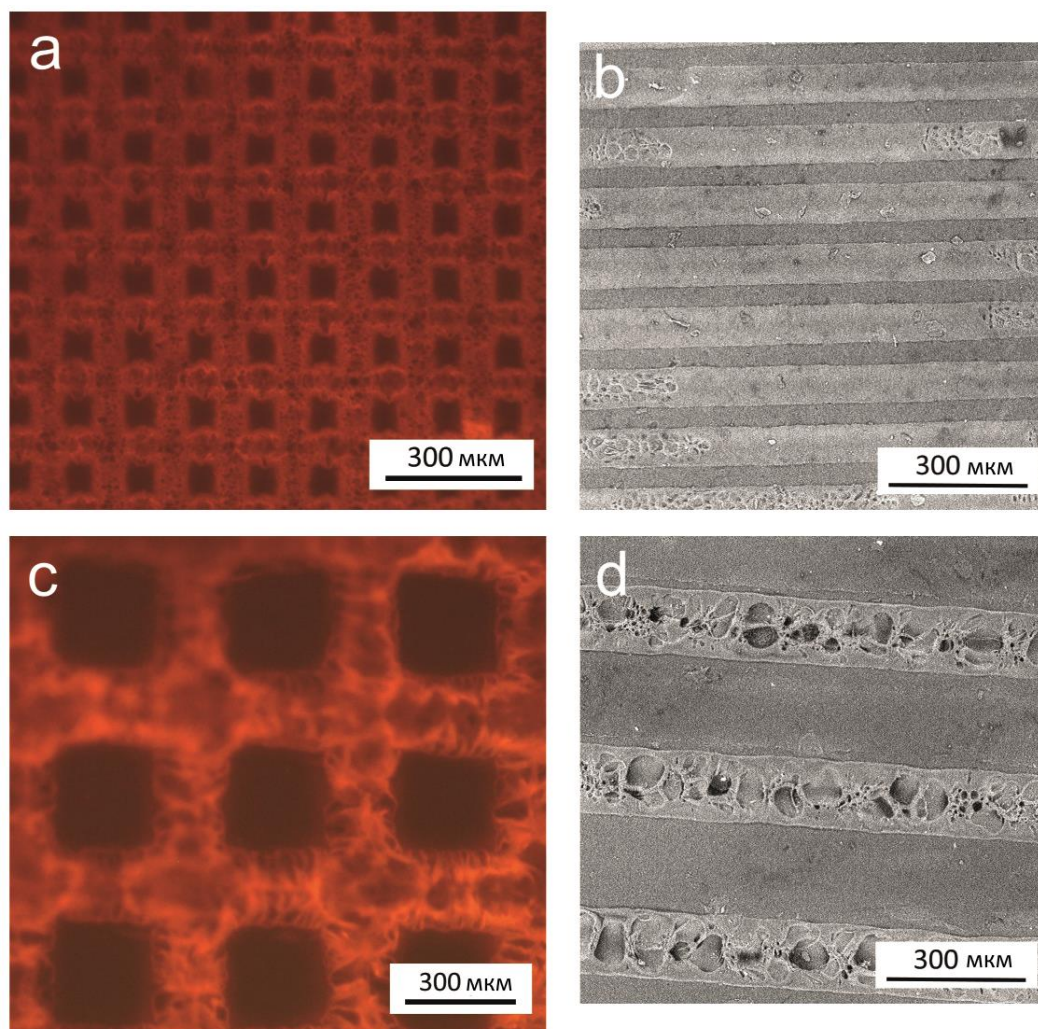


Рисунок 56 – Микрофотографии и СЭМ полилактидных шаблонов, сформированных при скорости ЛИ 15 мм/с (а, b) и 3 мм/с (с, d)

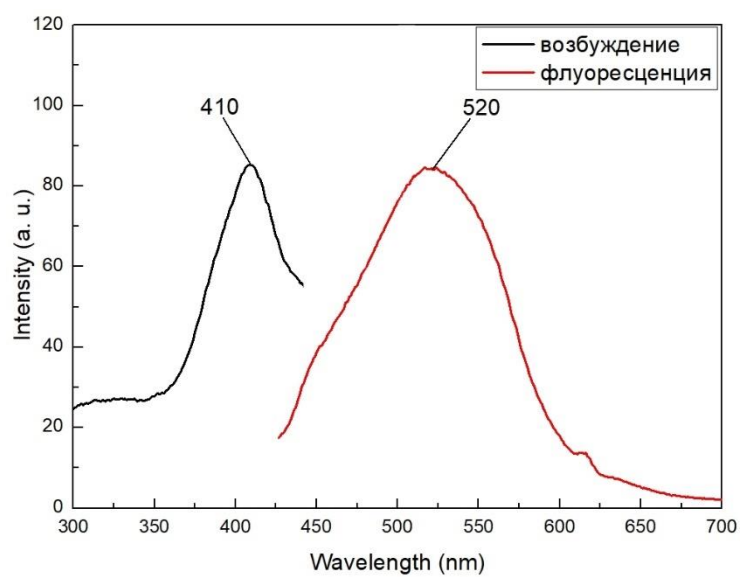


Рисунок 57 – Спектры возбуждения и флуоресценции полилактидных шаблонов

3D-изображения ПГМ (Рисунок 58) демонстрируют хорошую воспроизводимость заданной геометрии шаблона. Армирование произведено равномерно практически по всей поверхности коллагеновых пленок. Размеры полилактидных шаблонов даны в Таблице 8. Ширина фотоотвержденных линий зависит от плотности энергии лазерного излучения, распределение интенсивности которого хорошо аппроксимируется функцией Гаусса. При малых скоростях ЛИ сечение фотоотверждаемой области больше, так как сказывается более интенсивное лазерное воздействие, вызывающее сшивание ФПК [215].

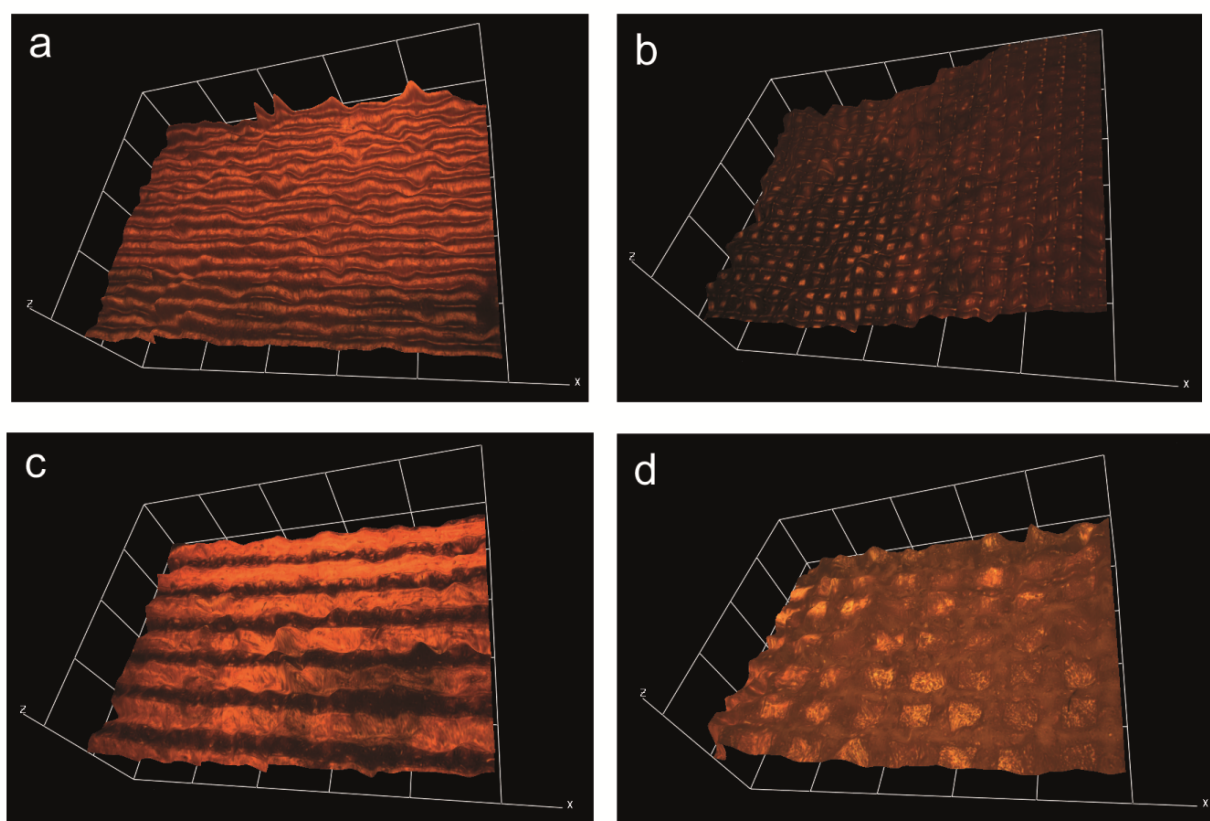


Рисунок 58 – 3D-микроскопия ПГМ, сформированных при скорости ЛИ 15 мм/с (a, b) и 3 мм/с (c, d). Масштаб: клетка со стороной 500 мкм

Таблица 8 – Размеры армирующих шаблонов, исходя из данных 3D-микроскопа

Скорость ЛИ, мм/с	Ширина линии, мкм	Расстояние между линиями, мкм
3	97 ± 23	175 ± 23
15	23 ± 12	70 ± 12

5.5. Механические свойства пленочного гибридного материала

Средний локальный модуль упругости для армирующего полилактидного шаблона равен $580,2 \pm 142,1$ кПа (Рисунок 59). Таким образом, области с фотоотвержденным полилактидом по механическим характеристикам практически в 4 раза превосходят неармированный коллагеновый образец. Схожее значение модуля упругости получено для шаблона на коллагеновой губке ($520,8 \pm 201,2$ кПа; раздел 4.3, Таблица 7), следовательно, можно сделать вывод, что механические свойства армирующих линий главным образом определяются составом ФПК, а не материалом подложки.

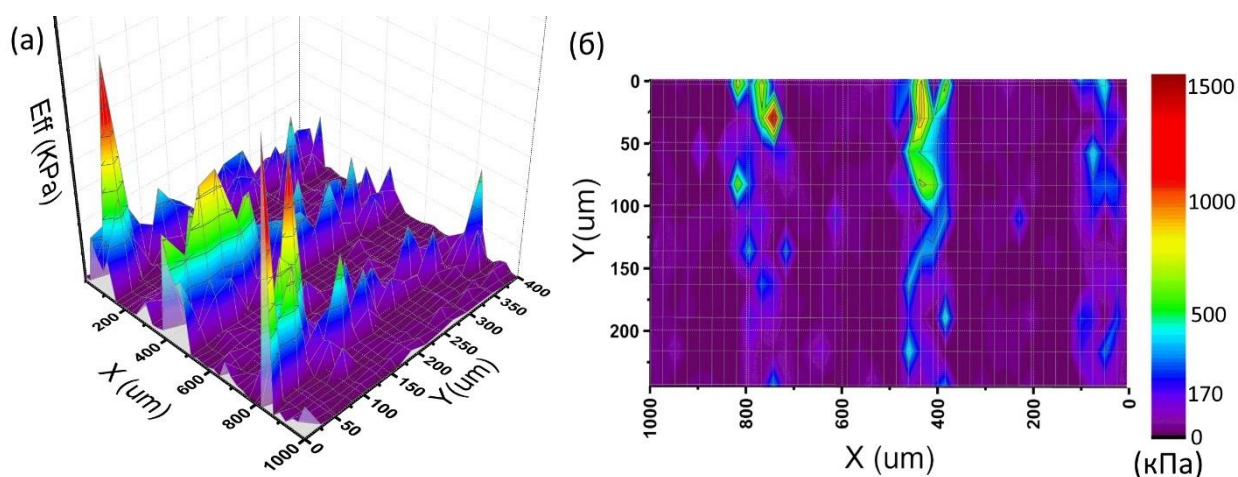


Рисунок 59 – Распределение значений локального модуля упругости для ПГМ:
3D-график (а); фрагмент вида сверху (б)

Модуль упругости для ПГМ на 1–2 порядка превосходит полученные значения для фотосшитой коллагеновой пленки (Таблица 9). Для скорости ЛИ 15 мм/с модуль упругости ПГМ не зависит от геометрической конфигурации полилактидного шаблона. Для более низкой скорости ЛИ 3 мм/с модуль упругости, напротив, увеличивается в 6 раз: с $2,1 \pm 0,2$ МПа до $13,5 \pm 1,5$ МПа для «сетчатых» и «полосатых» образцов, соответственно. Разница в механических свойствах для скорости ЛИ 3 мм/с для различных геометрических конфигураций шаблона, вероятнее всего, определяется влиянием термомеханических напряжений, образующихся в фотосшитом полимере при длительном воздействии лазера. Чем

больше площадь материала, подвергшаяся воздействию лазера, тем больше должно быть микротрещин в структуре образца. Так, из результатов расчета (использовали данные Таблицы 8) следует, что при этой скорости ЛИ для «сетчатой» конфигурации шаблона примерно 63% площади поверхности материала занимает фотосшитый полилактид. Для «полосатой» конфигурации эта величина составляет около 39% площади поверхности [215].

Таблица 9 – Результаты механических испытаний коллагеновых материалов

	Конфигурация шаблона	σ , МПа	ϵ , %
Фотосшитая коллагеновая пленка	нет	$0,15 \pm 0,02$	23 ± 3
ПГМ, скорость ЛИ 15 мм/с	«сетка»	$49,5 \pm 6,4$	17 ± 2
	«полоска»	$51,2 \pm 5,6$	16 ± 2
ПГМ, скорость ЛИ 3 мм/с	«сетка»	$2,1 \pm 0,2$	55 ± 6
	«полоска»	$13,5 \pm 1,5$	33 ± 4

Удлинение при разрыве коллагеновых материалов также зависит от параметров лазерного воздействия, а для скорости ЛИ 3 мм/с зависит и от конфигурации шаблона (Таблица 9). При скорости ЛИ 3 мм/с в процессе полимеризации, вероятно, начинают участвовать большие недиффузионные радикалы [305], когда образуется больше связей с участием длинных полимерных цепочек. Полилактид в ПГМ выполняет роль своеобразного пластификатора, когда увеличение длины углеродной цепи пластификатора приводит к значительному росту относительного удлинения [215].

5.6. Биосовместимость пленочного гибридного материала, адгезия и направленная пролиферация фибробластов

Анализ цитотоксичности для коллагеновых образцов до и после армирования не выявил каких-либо дозозависимых различий между экстрактами. Раствор додецилсульфата натрия, который использовали в качестве положительного контроля, вызвал значительную гибель клеток (Рисунок 60а, b).

Направленный рост фибробластов на ПГМ показан на Рисунке 60с. Живые клетки, окрашенные в зеленый цвет, свидетельствуют о высокой биосовместимости ПГМ. Стоит отметить, что для коллагеновых образцов без армирующего шаблона селективная адгезия к поверхности не наблюдалась, фибробласты равномерно покрывали поверхность образцов (Рисунок О.1).

Таким образом, исследования *in vitro* не выявили признаков цитотоксичности ПГМ. Показана высокая адгезия ПГМ в отношении первичных мышинных фибробластов, а также направленная пролиферация клеток [215].

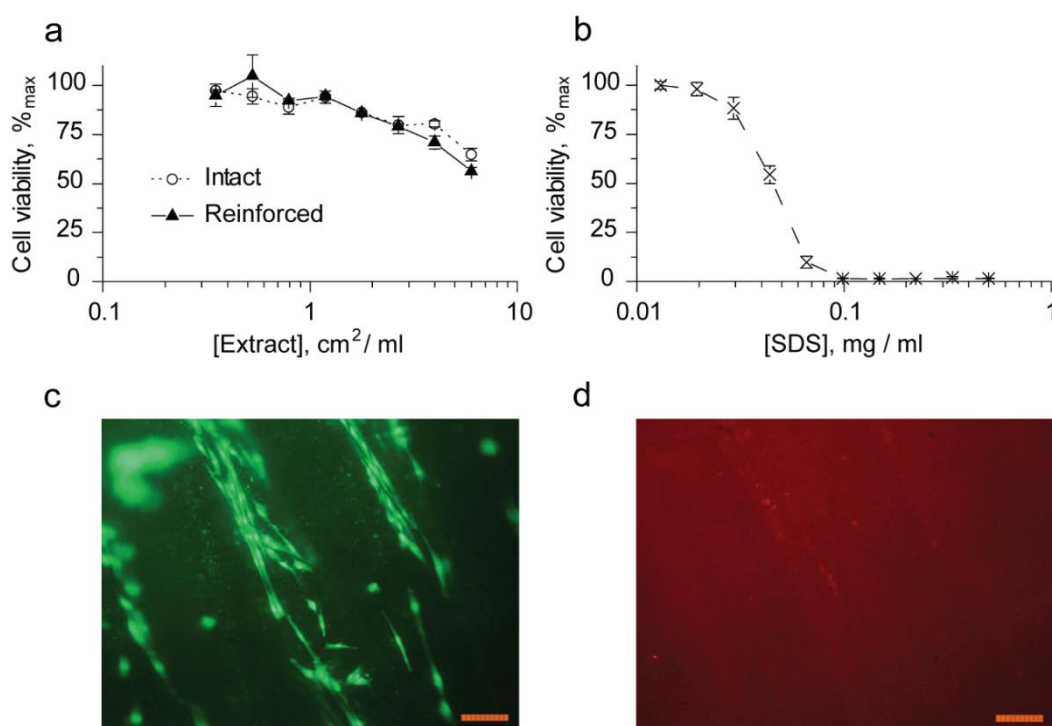


Рисунок 60 – Оценка цитотоксичности интактных и армированных коллагеновых образцов: (a) и (b) – кривые выживаемости мышинных фибробластов линии 3ТЗ после воздействия экстрактов из образцов; измерение активности МТТ-редуктазы (a); додецилсульфат натрия (SDS) используется в качестве положительного (цитотоксического) контроля (b). Визуализация живых (c) и мертвых (d) фибробластов на ПГМ. Масштаб 100 мкм

ГЛАВА 6. МИКРОСТРУКТУРИРОВАНИЕ ФОТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Разработанные ФПК на основе производных хитозана и ФПК из разветвленного полилактида послужили основой для формирования трехмерных структур методом лазерной микростереолитографии, основанной на *двухфотонной полимеризации* (метод **2ФП**) [213, 214, 217, 306–308, 310]. Для лазерного излучения ($\lambda = 525$ нм) разработанные ФПК прозрачны, однако, из-за высокой плотности мощности в области фокусировки возможно протекание нелинейного процесса – одновременного поглощения двух фотонов молекулой фотоинициатора. Это соответствует поглощению одного фотона с длиной волны $\lambda = 263$ нм, как в случае традиционной однофотонной полимеризации (Рисунок 61).

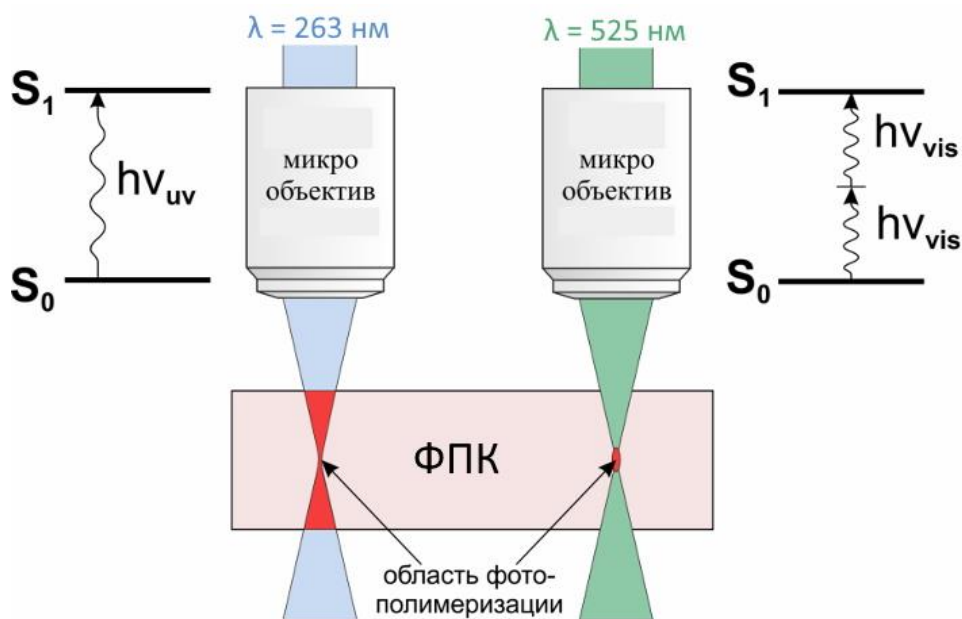


Рисунок 61 – Схема процессов однофотонной полимеризации (слева) и двухфотонной полимеризации (2ФП) (справа)

На первом этапе для каждой ФПК подобраны параметры структурирования с помощью массива структурных элементов (Рисунки 62а, 63а) [307]. Результативность подбора параметров оценивали, используя три критерия:

- (1) наличие отклика на лазерный луч (наблюдается непрерывная фотосшитая линия);
- (2) воспроизведение заданной компьютерной модели (диаметр полученных структур и их пористость соответствуют модели);
- (3) механическая стабильность (целостность) трехмерной структуры после отмывки от непрореагировавшей ФПК.

Изменение параметров структурирования **Z-slice** и **XY-hatch**, т.е. расстояния, на которое смещается лазерный луч в вертикальной Z-плоскости и в горизонтальной плоскости ХУ, позволило контролировать такие свойства трехмерных структур (Рисунки 62б, 63б) как плотность сшивки, следовательно, набухание, топографию поверхности и производительность 2ФП процесса. Например, увеличение XY-hatch и Z-slice с 5 до 7 мкм для ФПК на основе ХЛ привело к уменьшению времени для формирования единичной структуры с 5 до 1,5 мин.

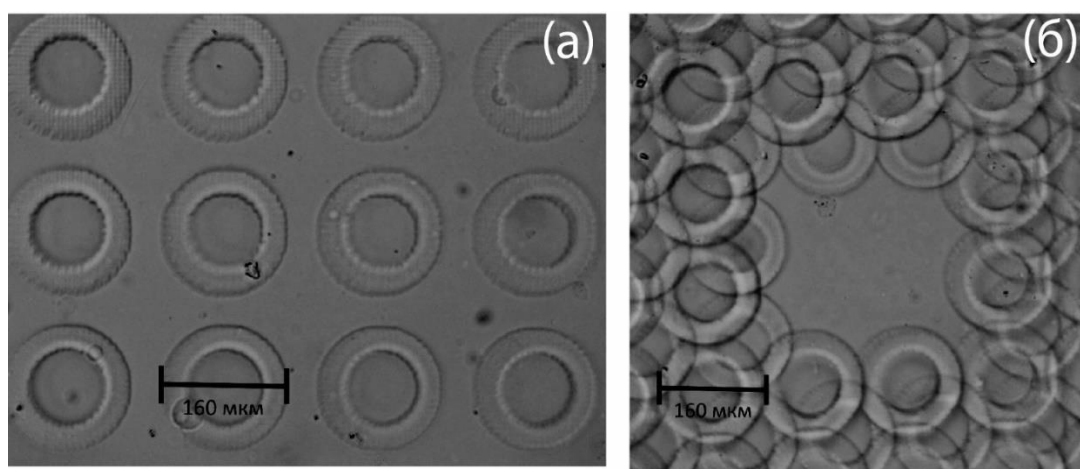


Рисунок 62 – Массив структурных элементов для подбора параметров (а) и трехмерная структура при двухфотонной полимеризации ФПК на основе АХ (б).

На (а) по оси абсцисс изменяется расстояние между слоями структурных элементов (от 9 до 4 мкм слева направо) (параметр Z-slice); по оси ординат – расстояние между отдельными проходами лазерного луча в горизонтальной плоскости ХУ (от 4 до 9 мкм снизу вверх) (параметр XY-hatch) [307]

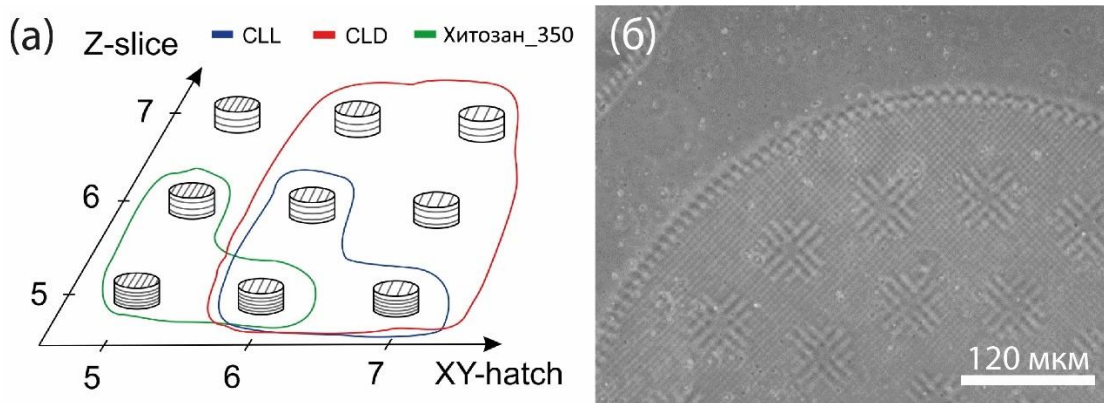


Рисунок 63 – (а): Оптимальные параметры 2ФП для ФПК на основе сополимеров ХЛ: CLL – сополимер хитозана с олиго(L,L-лактидом), CLD – сополимер хитозана с олиго(L,D-лактидом). Хитозан_350 – хитозан с ММ 350 кДа. Для синтеза CLL и CLD использовали хитозан с ММ 80 кДа. (б): Микрофотография трехмерной структуры на основе CLL (Z-Slice 5, XY-hatch 7)

Отметим, что в отличие от **Хитозан_350** (ММ 350 кДа; СА 0,14), ФПК на основе *немодифицированного* хитозана с более низкими значениями ММ 80 кДа и СА 0,11 не могли обеспечить достаточную реакционную способность при лазерном воздействии, даже для получения непрерывной фотосшитой линии. Использование сополимера хитозана с олиго(L,L-лактидом) (**CLL**) позволило сформировать структуры (Рисунок 63б), которые, однако, показали довольно низкую воспроизводимость компьютерной модели (не пропечатывались поры) и неудовлетворительные механические свойства при отмывке от несшитой ФПК (структура растворялась в течение суток).

Наиболее удачной с точки зрения подбора параметров структурирования методом 2ФП и стабильности микроструктур после отмывки оказалась ФПК на основе сополимера хитозана с олиго(L,D-лактидом) (**CLD**), что позволило сформировать трехмерные структуры при XY-hatch 6–7 мкм во всем диапазоне Z-slice (Рисунок 63а). На Рисунке 64 представлен пример трехмерной структуры, сформированной методом 2ФП, и используемая компьютерная модель. Полученные полимерные структуры механически стабильны во время отмывки и показали двукратное увеличение объема [214, 310].

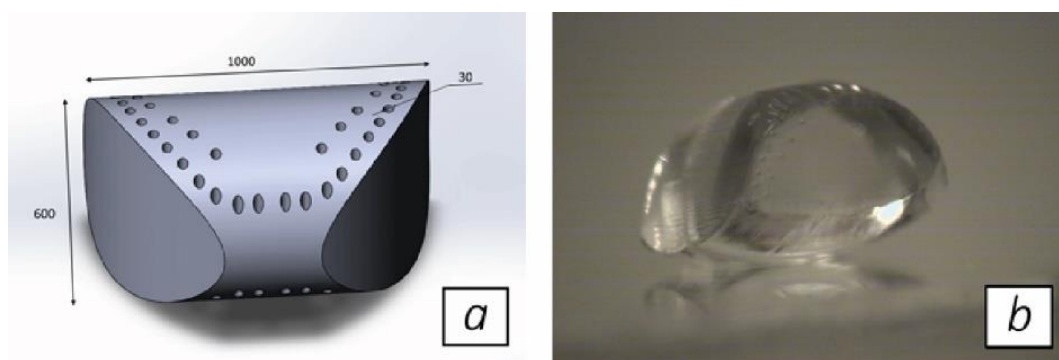


Рисунок 64 – Пример компьютерной модели (а) и трехмерной структуры, полученной из ФПК на основе CLD (b)

CLD представляет собой оптимизированную версию сополимеров хитозана с короткими привитыми олиго(L,D-лактидными) фрагментами, которые рассмотрены в [306] (степень полимеризации была в диапазоне 3–10). В этой диссертации применение сополимера с увеличенной длиной олиголактидной цепи позволило практически в 3 раза уменьшить количество синтетического полимера ПЭГ-ДА в ФПК. Изменение длины и стереохимического состава привитых цепей также может быть полезным с точки зрения таких характеристик полимерной структуры, как биосовместимость, скорость биodeградации, механические свойства.

Механизм сшивки хитозана и его сополимеров с олиго/полилактидами при методе 2ФП может протекать через различные каналы реакции. Предполагается, что ПЭГ-ДА главным образом выполняет роль подвижных проставок между цепями хитозана, поскольку его концентрация в ФПК является недостаточной для достижения монолитной структуры [120].

Как можно видеть из Рисунка 65, самый высокий модуль упругости получен для трехмерных структур на основе CLD (978 ± 176 Па), что может быть вызвано более высокой плотностью сшивания из-за наилучшего ответа на лазерное воздействие. Средние значения модуля упругости для структур на основе CLL и Хитозана_350 были ниже (411 ± 74 Па и 518 ± 93 Па, соответственно), а распределение модуля упругости по поверхности полимерных структур оказалось более узким (Рисунок 65) [214].

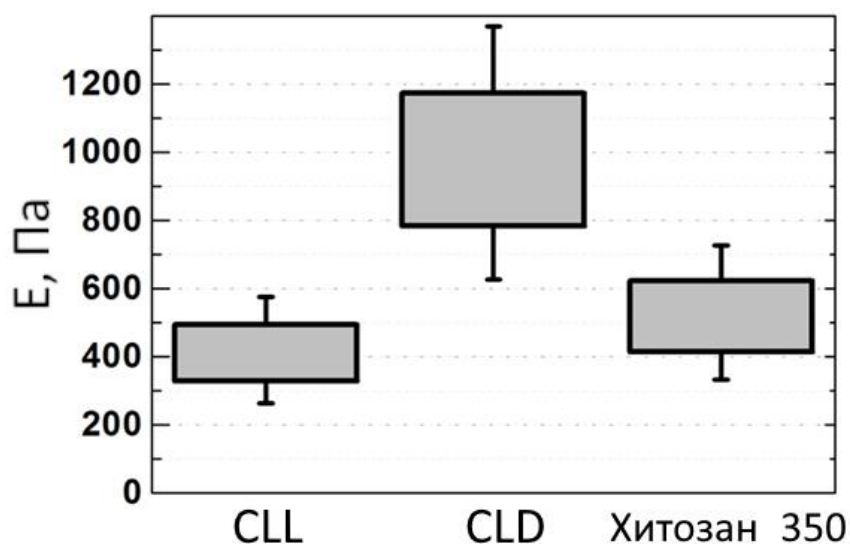


Рисунок 65 – Средние значения локального модуля упругости трехмерных микроструктур на основе хитозана

Для сформированных трехмерных структур на основе производных хитозана проведен комплексный *in vitro* анализ [308, 310, 312]. Показана хорошая совместимость трехмерных структур с первичной культурой гиппокампа и формирование на поверхности материалов морфологически полноценной нейронной сети (Приложение П). Таким образом, полимерные структуры обладают хорошей совместимостью с дифференцированными клетками нервной системы и могут быть использованы при нейротрансплантации.

Для ФПК на основе разветвленного полилактида также сформированы трехмерные микроструктуры (Рисунок 66). Установлено, что значения локального модуля упругости и микротвердости полимерных структур составили 4,11 ГПа (среднеквадратичное отклонение 14%) и 0,36 ГПа (среднеквадратичное отклонение 9%), соответственно [217].

Примечательно, что в составе ФПК не использованы дополнительные наполнители, как например, в [309] вводили в композицию углеродные нанотрубки (модуль упругости достигал 2 ГПа); или в [311] добавляли монтмориллонитовую глину (до 5 ГПа). Введение неорганических наполнителей, с одной стороны, позволяет добиться увеличения модуля упругости структур, формируемых на основе синтетических полимеров (полилактид, полигликолид). С другой стороны,

на этапе деградации полимера будет происходить десорбция наполнителя, что может оказывать негативное влияние на организм человека, приводить к воспалительным реакциям в тканях [313, 314]. Отметим, что использование подобных трехмерных структур может быть интересно с точки зрения замещения костных дефектов и инициирования спонтанной остеогенной дифференцировки (если используются стволовые клетки), где требуется материал с высокой прочностью на разрыв, близкой к нижнему пределу модуля упругости кортикальной кости (~ 10 ГПа) [315, 316].

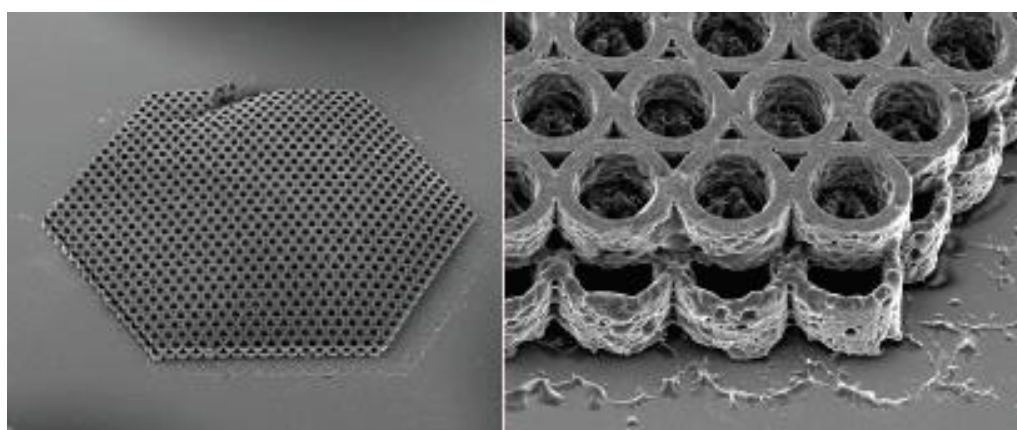


Рисунок 66 – СЭМ трехмерной структуры на основе разветвленного полилактида

Трехмерные микроструктуры на основе разветвленного полилактида поддерживали остеогенную дифференцировку *in vitro* для мезенхимальных стволовых клеток, полученных из жировой ткани человека, и образование кости *in vivo* при имплантации в искусственно созданные дефекты черепной кости мышей [217]. Подробные результаты представлены в Приложении Р.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ключевой задачей современной регенеративной медицины является формирование персонализированных материалов биомедицинского назначения или трехмерных конструкций сложной архитектоники, что подразумевает комплексную работу исследователей по целому ряду направлений.

Так, в этой диссертации решена триада взаимосвязанных задач «состав – форма – свойства» материалов биомедицинского назначения, а именно:

- (1) установлены оптимальные составы фоточувствительных композиций на основе природных и синтетических биodeградируемых полимеров;
- (2) определены параметры лазерного структурирования, сформированы трехмерные конструкции различной конфигурации, предложены схемы их пост-обработки;
- (3) охарактеризованы поверхностные, механические, цитотоксические свойства полученных полимерных материалов, в том числе их долгосрочная стабильность *in vivo* и способность регулировать клеточное поведение.

Результаты, полученные в диссертации, соответствуют приоритетным направлениям из Стратегии научно-технологического развития РФ (Указ Президента Российской Федерации от 01.12.2016 г. № 642), а именно находятся в рамках работ по переходу к новым материалам, персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения.

Научная и практическая значимость работы сформулированы во введении, здесь кратко перечислим перспективы развития темы диссертации. Во-первых, для формирования научной базы, с точки зрения установления взаимосвязей между строением полимеров, их поведением при лазерном воздействии и свойствами получаемой трехмерной конструкции, интересным является исследование других полимеров, модифицированных аналогично хитозану и полилактиду.

Во-вторых, актуальными представляются исследования по формированию армирующих полилактидных шаблонов на децеллюляризованных материалах как с точки зрения их укрепления, так и регулирования клеточного заселения.

Предложенный подход лазерно-индуцированного нанесения полилактидного шаблона можно также рассматривать как метод подготовки различных материалов биомедицинского назначения к *in vivo* экспериментам, что позволит по изменению их флуоресценции исследовать биodeградацию без сложных гистологических процедур и лишних животных жертв. Другие важные приложения сформированных гибридных материалов – это исследования механотрансдукции, взаимодействия гетерогенных клеток при их совместном культивировании, влияния межклеточных контактов на такие функции клеток, как дифференцировка, деление, смерть.

В-третьих, результаты по микроструктурированию методом 2ФП производных хитозана и полилактида помимо регенеративной медицины могут быть использованы для таких областей как фотоника и микрофлюидика.

В-четвертых, для полимерных структур, которые были обработаны scCO_2 , перспективными выглядят дальнейшие исследования с тканеспецифичными клетками, чувствительными к нанотопографии, например, эндотелиальными или нейрональными клетками.

В-пятых, разработанные ФПК возможно использовать для других методов трехмерной печати, которые имеют более высокую производительность структурирования: для цифровой светодиодной проекции (англ. digital light processing (DLP)) и голографической 3D-печати (англ. holographic volumetric 3D-fabrication).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АСМ – атомно-силовая микроскопия
 АХ – аллилхитозан; цифра рядом указывает на степень замещения аминогрупп аллильными фрагментами
 ГГМ – губчатый гибридный материал
 ГПХ – гель-проникающая хроматография
 ДСН – додецилсульфат натрия
 КТ – компьютерная томография
 ЛДГ – лактатдегидрогеназа
 ЛИ – лазерное излучение
 ММ – молекулярная масса
 МП – многофотонные процессы
 МРТ – магнитно-резонансная томография
 МСК – мезенхимальные стволовые клетки
 МСК-Ж – мезенхимальные стволовые клетки человека, полученные из жировой ткани
 МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид
 НПВО метод – метод нарушенного полного внутреннего отражения
 ОВРК метод – метод Оунса, Вендта, Рабеля и Кьельбле
 ПГМ – пленочный гибридный материал
 ПЛА – полилактид
 ПМР – протонный магнитный резонанс
 ПЭГ – полиэтиленгликоль
 ПЭГ-ДА – диакрилат полиэтиленгликоля
 РФА – рентгенофазовый анализ
 СА – степень ацилирования
 СЗ – степень замещения
 скСО₂ – сверхкритический диоксид углерода
 скорость ЛИ – скорость сканирования лазерным излучением
 СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
 ФИ – фотоинициатор
 ФМН – флавиномононуклеотид
 ФПК – фотополимеризующая композиция
 ФСБ – фосфатно-солевой буфер
 Хитозан_350 – немодифицированный хитозан с ММ 350 кДа и СА 0,14
 Хитозан_80 – немодифицированный хитозан с ММ 80 кДа и СА 0,11
 ХЛ – сополимеры хитозана с олиго(L,L-/D,L-лактидом)
 ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка
- 2ФП – двухфотонное поглощение
 CLD – сополимер хитозана с олиго(L,D-лактидом)
 CLL – сополимер хитозана с олиго (L,L-лактидом)
 МНАТ-вейвлет – Mexican НАТ вейвлет
 SWR – степень набухания (swelling ratio)
 Р_{кр} – критическое давление фазового перехода в сверхкритическое состояние
 ρ – коэффициент корреляции Пирсона
 Т_{кр} – критическая температура фазового перехода в сверхкритическое состояние
 XY-hatch – параметр формирования трехмерных структур методом 2ФП; равен расстоянию между отдельными проходами лазерного луча (перемещение луча в горизонтальной плоскости XY)
 Z-slice – параметр формирования трехмерных структур методом 2ФП; равен расстоянию между слоями трехмерной структуры (перемещение луча в вертикальной Z-плоскости)

θ – угол смачивания

λ – длина волны

σ^d и σ^p – дисперсионная и полярная компоненты поверхностной энергии, соответственно

σ – прочность на разрыв

ε – относительное удлинение при разрыве

E – амплитуда напряженности электрического поля излучения

$E_{ат}$ – средняя напряженность внутриатомного электрического поля

СПИСОК ТЕРМИНОВ

Армирующий шаблон – фотоотвержденный полилактид на поверхности коллагенового материала. Представляет собой набор фотосшитых линий с определенным их расположением относительно друг друга.

Гибридный материал – коллагеновый материал с армирующим шаблоном. В зависимости от физической формы коллагенового материала (губка или пленка) в диссертации выделяют *губчатый гибридный материал (ГГМ)* и *пленочный гибридный материал (ПГМ)*, соответственно.

Материал биомедицинского назначения – материал, который используют в контакте с клетками и живыми организмами, например, в имплантатах, системах доставки лекарств, медицинских устройствах. Служит для восстановления тканей и органов, используется в клеточных приложениях.

Конструкции (трехмерные структуры) – трехмерные матрицы (англ. scaffolds), являются подложкой/носителем клеток, вместе с которыми формируют более сложную и многофункциональную тканеинженерную систему.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Croisier F. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering / Croisier F., Jérôme C. // *European Polymer Journal* – 2013. – Т. 49 – № 4 – С.780–792.
2. Peña A. Effects of chitosan on *Candida albicans*: conditions for its antifungal activity. / Peña A., Sánchez N.S., Calahorra M. // *BioMed research international* – 2013. – Т. 2013 – С.527549.
3. Rodríguez-Vázquez M. Chitosan and its potential use as a scaffold for tissue engineering in regenerative medicine / Rodríguez-Vázquez M., Vega-Ruiz B., Ramos-Zúñiga R., Saldaña-Koppel D.A., Quiñones-Olvera L.F. // *BioMed Research International* – 2015. – Т. 2015 – С.1–15.
4. Levengood S.K.L. Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering / Levengood S.K.L., Zhang M. // *Journal of Materials Chemistry B* – 2014. – Т. 2 – № 21 – С.3161–3184.
5. Hao P. Neural repair by NT3-chitosan via enhancement of endogenous neurogenesis after adult focal aspiration brain injury / Hao P., Duan H., Hao F., Chen L., Sun M., Fan K.S., Sun Y.E., Williams D., Yang Z., Li X. // *Biomaterials* – 2017. – Т. 140 – С.88–102.
6. Kim Y.B. Strategy to achieve highly porous/biocompatible macroscale cell blocks, using a collagen/genipin-bioink and an optimal 3D printing process / Kim Y.B., Lee H., Kim G.H. // *ACS Applied Materials and Interfaces* – 2016. – Т. 8 – № 47 – С.32230–32240.
7. Diamantides N. Correlating rheological properties and printability of collagen bioinks: The effects of riboflavin photocrosslinking and pH / Diamantides N., Wang L., Puijsma T., Siemiatkowski J., Dugopolski C., Shortkroff S., Kennedy S., Bonassar L.J. // *Biofabrication* – 2017. – Т. 9 – № 3 – С.034102.
8. Armentano I. Multifunctional nanostructured PLA materials for packaging and tissue engineering / Armentano I., Bitinis N., Fortunati E., Mattioli S., Rescignano N., Verdejo R., López-Manchado M.A., Kenny J.M. // *Progress in Polymer Science* – 2013. – Т. 38 – № 10–11 – С.1720–1747.
9. Murariu M. PLA composites: from production to properties / Murariu M., Dubois P. // *Advanced drug delivery reviews* – 2016. – Т. 107 – С.17–46.
10. Re G. Stereocomplexed PLA nanocomposites: from in situ polymerization to materials properties / Re G., Benali S., Habibi Y., Raquez J.-M., Dubois P. // *European Polymer Journal* – 2014. – Т. 54 – С.138–150.
11. Ghalia M.A. Biodegradable poly(lactic acid)-based scaffolds: synthesis and biomedical applications / Ghalia M.A., Dahman Y. // *Journal of Polymer Research* – 2017. – Т. 24 – № 5.
12. Никитин Л.Н. Сверхкритический диоксид углерода как активная среда для химических процессов с участием фторполимеров / Никитин Л.Н., Галлямов М.О., Саид-Галиев Э.Е., Хохлов А.Р., Бузник В.М. // *Российский химический журнал* – 2008. – Т. 52 – № 3 – С.56–65.
13. Costa V.P. Anti-glaucoma drug-loaded contact lenses prepared using supercritical solvent impregnation / Costa V.P., Braga M.E.M., Duarte C.M.M., Alvarez-Lorenzo C., Concheiro A., Gil M.H., Sousa H.C. de // *The Journal of Supercritical Fluids* – 2010. – Т. 53 – № 1–3 – С.165–173.
14. Cheng N. Photosensitive chitosan to control cell attachment / Cheng N., Cao X. // *Journal of Colloid and Interface Science* – 2011. – Т. 361 – № 1 – С.71–78.
15. Weydert S. A versatile protein and cell patterning method suitable for long-term neural cultures / Weydert S., Girardin S., Cui X., Zürcher S., Peter T., Wirz R., Sterner O., Stauffer F., Aebersold M.J., Tanner S., Thompson-Steckel G., Forró C., Tosatti S., Vörös J. // *Langmuir* – 2019. – Т. 35 – № 8 – С.2966–2975.
16. Ratner B.D. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine / B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons – San Diego, California: Elsevier, 2004. – 864c.
17. Heo J. Riboflavin-induced photo-crosslinking of collagen hydrogel and its application in meniscus tissue engineering / Heo J., Koh R.H., Shim W., Kim H.D., Yim H.G., Hwang N.S. // *Drug Delivery and Translational Research* – 2016. – Т. 6 – № 2 – С.148–158.
18. Hutmacher D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage / Hutmacher D.W. // *Biomaterials* – 2000. – Т. 21 – № 24 – С.2529–2543.
19. Rustamov I.R. Polycyanoacrylate porous material for bone tissue substitution / Rustamov I.R., Dyatlov V.A., Grebeneva T.A., Dyatlov A.V., Zaitsev V.V., Maleev V.I. // *Journal of Materials Chemistry*

В – 2014. – Т. 2 – № 27 – С.4310–4317.

20. Cao X. Chitosan-collagen/organomontmorillonite scaffold for bone tissue engineering / Cao X., Wang J., Liu M., Chen Y., Cao Y., Yu X. // *Frontiers of Materials Science* – 2015. – Т. 9 – № 4 – С.405–412.

21. Волова Т.Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов – Красноярск: ИПК СФУ, 2009. – 262с.

22. Hench L. Biomaterials, artificial organs and tissue engineering / L. Hench, J. Jones – Elsevier, 2005. – 284с.

23. Gunatillake P.A. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering / Gunatillake P.A., Adhikari R. // *Eur Cell Mater* – 2003. – Т. 5 – № 1 – С.1–16.

24. Cai S. Recent advance in surface modification for regulating cell adhesion and behaviors / Cai S., Wu C., Yang W., Liang W., Yu H., Liu L. // *Nanotechnology Reviews* – 2020. – Т. 9 – № 1 – С.971–989.

25. Zhou J. The effects of surface topography of nanostructure arrays on cell adhesion / Zhou J., Zhang X., Sun J., Dang Z., Li J., Li X., Chen T. // *Physical Chemistry Chemical Physics* – 2018. – Т. 20 – № 35 – С.22946–22951.

26. Carré A. How substrate properties control cell adhesion. A physical–chemical approach / Carré A., Lacarrière V. // *Journal of Adhesion Science and Technology* – 2010. – Т. 24 – № 5 – С.815–830.

27. Idaszek J. How important are scaffolds and their surface properties in regenerative medicine / Idaszek J., Kijeńska E., Łojkowski M., Swieszkowski W. // *Applied Surface Science* – 2016. – Т. 388 – С.762–774.

28. Mitra J. Scaffolds for bone tissue engineering: role of surface patterning on osteoblast response / Mitra J., Tripathi G., Sharma A., Basu B. // *Rsc Advances* – 2013. – Т. 3 – № 28 – С.11073–11094.

29. Chehroudi B. The effects of micromachined surfaces on formation of bonelike tissue on subcutaneous implants as assessed by radiography and computer image processing / Chehroudi B., McDonnell D., Brunette D.M. // *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials* – 1997. – Т. 34 – № 3 – С.279–290.

30. Murphy C.M. Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds / Murphy C.M., O'Brien F.J. // *Cell adhesion & migration* – 2010. – Т. 4 – № 3 – С.377–381.

31. Chang H.-I. Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds. London: InTechOpen, 2011.

32. Klawitter J.J. Application of porous ceramics for the attachment of load bearing internal orthopedic applications / Klawitter J.J., Hulbert S.F. // *Journal of biomedical materials research* – 1971. – Т. 5 – № 6 – С.161–229.

33. Griffon D.J. Chitosan scaffolds: interconnective pore size and cartilage engineering / Griffon D.J., Sedighi M.R., Schaeffer D.V., Eurell J.A., Johnson A.L. // *Acta biomaterialia* – 2006. – Т. 2 – № 3 – С.313–320.

34. Engler A.J. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification / Engler A.J., Sen S., Sweeney H.L., Discher D.E. // *Cell* – 2006. – Т. 126 – № 4 – С.677–689.

35. Washburn N.R. High-throughput investigation of osteoblast response to polymer crystallinity: influence of nanometer-scale roughness on proliferation / Washburn N.R., Yamada K.M., Simon Jr C.G., Kennedy S.B., Amis E.J. // *Biomaterials* – 2004. – Т. 25 – № 7–8 – С.1215–1224.

36. Park H. Plasma-treated poly(lactic-co-glycolic acid) nanofibers for tissue engineering / Park H., Lee K.Y., Lee S.J., Park K.E., Park W.H. // *Macromolecular Research* – 2007. – Т. 15 – № 3 – С.238–243.

37. Rigogliuso S. Use of modified 3D scaffolds to improve cell adhesion and drive desired cell responses / Rigogliuso S., Carfi Pavia F., Brucato V., Carrubba V.La, Favia P., Intranuovo F., Gristina R., Gherzi G. // *Chemical Engineering Transactions* – 2012. – Т. 27 – С.415–420.

38. O'Brien F.J. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds / O'Brien F.J., Harley B.A., Yannas I.V., Gibson L.J. // *Biomaterials* – 2005. – Т. 26 – № 4 – С.433–441.

39. Kumar A. Hydroxyapatite-titanium bulk composites for bone tissue engineering applications / Kumar A., Biswas K., Basu B. // *Journal of Biomedical Materials Research Part A* – 2015. – Т. 103 –

№ 2 – C.791–806.

40. Kumar A. Biocompatibility and mechanical behaviour of three-dimensional scaffolds for biomedical devices: Process-structure-property paradigm / Kumar A., Nune K.C., Murr L.E., Misra R.D.K. // *International Materials Reviews* – 2016. – Т. 61 – № 1 – С.20–45.
41. Куртукова М.О. Факторы, регулирующие ангиогенез / Куртукова М.О., Бугаева И.О., Иванов А.Н. // *Современные проблемы науки и образования* – 2015. – № 5 – С.246.
42. Rouwkema J. Vascularization in tissue engineering / Rouwkema J., Rivron N.C., Blitterswijk C.A. van // *Trends in biotechnology* – 2008. – Т. 26 – № 8 – С.434–441.
43. Pereira T.F. Effect of process parameters on the properties of selective laser sintered Poly (3-hydroxybutyrate) scaffolds for bone tissue engineering. / Pereira T.F., Silva M.A.C., Oliveira M.F., Maia I.A., Silva J.V.L., Costa M.F., Thiré R. // *Virtual and Physical Prototyping* – 2012. – Т. 7 – № 4 – С.275–285.
44. Phipps M.C. Increasing the pore sizes of bone-mimetic electrospun scaffolds comprised of polycaprolactone, collagen I and hydroxyapatite to enhance cell infiltration / Phipps M.C., Clem W.C., Grunda J.M., Clines G.A., Bellis S.L. // *Biomaterials* – 2012. – Т. 33 – № 2 – С.524–534.
45. Hutmacher D.W. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling / Hutmacher D.W., Schantz T., Zein I., Ng K.W., Teoh S.H., Tan K.C. // *Journal of Biomedical Materials Research* – 2001. – Т. 55 – № 2 – С.203–216.
46. Sabir M.I. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications / Sabir M.I., Xu X., Li L. // *Journal of materials science* – 2009. – Т. 44 – № 21 – С.5713–5724.
47. Chen F.-M. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. / Chen F.-M., Liu X. // *Progress in polymer science* – 2016. – Т. 53 – С.86–168.
48. Sung H.-J. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis / Sung H.-J., Meredith C., Johnson C., Galis Z.S. // *Biomaterials* – 2004. – Т. 25 – № 26 – С.5735–5742.
49. Hench L.L. Twenty-first century challenges for biomaterials / Hench L.L., Thompson I. // *Journal of the Royal Society Interface* – 2010. – Т. 7 – № 4.
50. Nikolova M.P. Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review / Nikolova M.P., Chavali M.S. // *Bioactive Materials* – 2019. – Т. 4 – С.271–292.
51. Miller P.R. Medical applications of zirconium oxide hybrid materials / Miller P.R., Ovsianikov A., Koroleva A., Gittard S.D., Chichkov B.N., Narayan R.J. // *American Ceramics Society Bulletin* – 2011. – Т. 90 – № 7 – С.24–29.
52. Dhandayuthapani B. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review / Dhandayuthapani B., Yoshida Y., Maekawa T., Kumar D.S. // *International journal of polymer science* – 2011. – Т. 2011.
53. Savioli Lopes M. Poly (lactic acid) production for tissue engineering applications / Savioli Lopes M., Jardim A.L., Maciel Filho R. // *Procedia Engineering* – 2012. – Т. 42 – С.1402–1413.
54. Kim I.-Y. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications / Kim I.-Y., Seo S.-J., Moon H.-S., Yoo M.-K., Park I.-Y., Kim B.-C., Cho C.-S. // *Biotechnology Advances* – 2008. – Т. 26 – № 1 – С.1–21.
55. Muzzarelli R.A.A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone / Muzzarelli R.A.A. // *Carbohydrate polymers* – 2009. – Т. 76 – № 2 – С.167–182.
56. Shukla S.K. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review / Shukla S.K., Mishra A.K., Arotiba O.A., Mamba B.B. // *International Journal of Biological Macromolecules* – 2013. – Т. 59 – С.46–58.
57. Li H. In vivo assessment of guided neural stem cell differentiation in growth factor immobilized chitosan-based hydrogel scaffolds / Li H., Koenig A.M., Sloan P., Leipzig N.D. // *Biomaterials* – 2014. – Т. 35 – № 33 – С.9049–9057.
58. Lam J. Hydrogel design of experiments methodology to optimize hydrogel for iPSC-NPC culture / Lam J., Carmichael S.T., Lowry W.E., Segura T. // *Advanced healthcare materials* – 2015. – Т. 4 – № 4 – С.534–539.
59. Garcia-Fuentes M. Chitosan-based drug nanocarriers: where do we stand? / Garcia-Fuentes M., Alonso M.J. // *Journal of Controlled Release* – 2012. – Т. 161 – № 2 – С.496–504.

60. Kim Y.K. Polymeric nanoparticles of chitosan derivatives as DNA and siRNA carriers / Kim Y.K., Jiang H.L., Choi Y.J., Park I.K., Cho M.-H., Cho C.S. // *Chitosan for Biomaterials I* – 2011. – С.1–21.
61. Thapa B. Mechanism, current challenges and new approaches for non viral gene delivery / Thapa B., Narain R. // *Polymers and Nanomaterials for Gene Therapy* – 2016. – С.1–27.
62. Bardakova K.N. From aggregates to porous three-dimensional scaffolds through a mechanochemical approach to design photosensitive chitosan derivatives / Bardakova K.N., Akopova T.A., Kurkov A.V., Goncharuk G.P., Butnaru D.V., Burdukovskii V.F., Antoshin A.A., Farion I.A., Zharikova T.M., Shekhter A.B., Yusupov V.I., Timashev P.S., Rochev Y.A. // *Marine Drugs* – 2019. – Т. 17 – № 48 – С.1–18.
63. Chedly J. Physical chitosan microhydrogels as scaffolds for spinal cord injury restoration and axon regeneration / Chedly J., Soares S., Montembault A., Boxberg Y. Von, Veron-Ravaille M., Mouffle C., Benassy M.-N., Taxi J., David L., Nothias F. // *Biomaterials* – 2017. – Т. 138 – С.91–107.
64. Szymańska E. Stability of chitosan-a challenge for pharmaceutical and biomedical applications. / Szymańska E., Winnicka K. // *Marine drugs* – 2015. – Т. 13 – № 4 – С.1819–46.
65. Leithner K. Chitosan and derivatives for biopharmaceutical use: mucoadhesive properties / Leithner K., Bernkop-Schnürch A. // *Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics* – 2012. – С.159–180.
66. Semkin V.A. Modern wound dressings in oral surgery / Semkin V.A., Kuzin A.V, Gurin A.N., Bezrukov A.A. // *Stomatologija* – 2016. – Т. 95 – № 4 – С.87–90.
67. Большаков И.Н. Биodeградируемые раневые покрытия на основе полисахаридных полимеров (экспериментальное исследование) / Большаков И.Н., Еремеев А.В., Черданцев Д.В., Каскаев А.В., Кириченко А.К., Власов А.А., Сапожников А.Н. // *Вопросы реконструктивной и пластической хирургии* – 2011. – Т. 2 – № 37 – С.53–65.
68. Пат. 2108114 Российская Федерация, МПК А61L 15/28 (2006.01). Биологическая композиция для лечения ран «Коллахит» / Фрончек, Э.В., Кригер, А.Г., Адамян, А.А., Добыш, С.В., Килимчук, Л.Е., Голованова П.М.; патентообладатель ТОО НПП «Эрлон». – № 96124444/14, заявл. 27.12.1996; опубл. 10.04.1998. – 7 с.
69. Богданов С.Б. Опыт применения раневого покрытия «ХитоПран» при лечении пациента с комбинированной травмой / Богданов С.Б., Каракулев А.В., Гилевич И.В., Мелконян К.И., Поляков А.В., Сотниченко А.С. // *Ортопедия, травматология и восстановительная хирургия детского возраста* – 2020. – Т. 8 – № 3 – С.327–332.
70. Поляков А.В. Использование раневых покрытий на основе хитозана "ХитоПран" в лечении больных с ожоговой травмой / Поляков А.В., Богданов С.Б., Афанасов И.М., Каракулев А.В., Богданова Ю.А., Зиновьев Е.В., Османов К.Ф. // *Инновационная медицина Кубани* – 2019. – № 3 (15) – С.25–31.
71. Ahmed J. Glass transition and phase transitions in food and biological materials / J. Ahmed, Y.H. Roos, S. Rahman, S.S. Ray – John Wiley & Sons, 2017.– 496с.
72. Ball R. Achieving long-term stability of lipid nanoparticles: examining the effect of pH, temperature, and lyophilization / Ball R., Bajaj P., Whitehead K. // *International Journal of Nanomedicine* – 2016. – Т. 12 – С.305–315.
73. Ahmed T. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery / Ahmed T., Aljaeid B. // *Drug Design, Development and Therapy* – 2016. – Т. 10 – С.483.
74. Jana S. Particulate technology for delivery of therapeutics / S. Jana, S. Jana – Springer, 2017.– 451с.
75. Kil'deeva N.R. Biodegradable scaffolds based on chitosan: Preparation, properties, and use for the cultivation of animal cells / Kil'deeva N.R., Kasatkina M.A., Drozdova M.G., Demina T.S., Uspenskii S.A., Mikhailov S.N., Markvicheva E.A. // *Applied biochemistry and microbiology* – 2016. – Т. 52 – № 5 – С.515–524.
76. Giri T.K. Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: present status and applications / Giri T.K., Thakur A., Alexander A., Badwaik H., Tripathi D.K. // *Acta Pharmaceutica Sinica B* – 2012. – Т. 2 – № 5 – С.439–449.
77. Пат. US20070031468A1 США, А6F 2/00 (2006.01). Modified chitosan for vascular embolization /

- Abrahams J., Chen W.; патентообладатель Endomedix, Inc. – № 11A47794, заявл. 06.06.2006; опубл. 08.02.2007. – 13 с.
78. Correa D.S. Two-photon polymerization for fabricating structures containing the biopolymer chitosan / Correa D.S., Tayalia P., Cosendey G., Santos D.S. Dos, Aroca R.F., Mazur E., Mendonca C.R. // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* – 2009. – Т. 9 – № 10 – С.5845–5849.
79. Cheng Y.L. Preparation and characterization of photocured poly (ϵ -caprolactone) diacrylate/poly (ethylene glycol) diacrylate/chitosan for photopolymerization-type 3D printing tissue engineering scaffold application / Cheng Y.L., Chen F. // *Materials Science and Engineering C* – 2017. – Т. 81 – С.66–73.
80. Kufelt O. Water-soluble photopolymerizable chitosan hydrogels for biofabrication via two-photon polymerization. / Kufelt O., El-Tamer A., Sehring C., Meißner M., Schlie-Wolter S., Chichkov B.N. // *Acta biomaterialia* – 2015. – Т. 18 – С.186–195.
81. Cebe T. Novel 3D-printed methacrylated chitosan-laponite nanosilicate composite scaffolds enhance cell growth and biomineral formation in MC3T3 pre-osteoblasts / Cebe T., Ahuja N., Monte F., Awad K., Vyavhare K., Aswath P., Huang J., Brotto M., Varanasi V. // *Journal of Materials Research* – 2020. – Т. 35 – № 1 – С.58–75.
82. Chiono V. Photoactive chitosan switching on bone-like apatite deposition / Chiono V., Gentile P., Boccafocchi F., Carmagnola I., Ninov M., Georgieva V., Georgiev G., Ciardelli G. // *Biomacromolecules* – 2010. – Т. 11 – № 2 – С.309–315.
83. Tsai W.B. RGD-conjugated UV-crosslinked chitosan scaffolds inoculated with mesenchymal stem cells for bone tissue engineering / Tsai W.B., Chen Y.R., Li W.T., Lai J.Y., Liu H.L. // *Carbohydrate Polymers* – 2012. – Т. 89 – № 2 – С.379–387.
84. Роговина С.З. Биоразлагаемые полимерные композиции на основе синтетических и природных полимеров различных классов / Роговина С.З. // *Высокомолекулярные Соединения С* – 2016. – Т. 58 – № 1 – С.68–80.
85. James S.L. Mechanochemistry: opportunities for new and cleaner synthesis / James S.L., Adams C.J., Bolm C., Braga D., Collier P., Frišić T., Grepioni F., Harris K.D.M., Hyett G., Jones W., Krebs A., Mack J., Maini L., Orpen A.G., Parkin I.P., Shearouse W.C., Steed J.W., Waddell D.C. // *Chemical Society reviews* – 2012. – Т. 41 – № 1 – С.413–47.
86. Lyakhov N.Z. Mechanochemical synthesis of organic compounds and composites with their participation / Lyakhov N.Z., Grigorieva T.F., Barinova A.P., Vorsina I.A. // *Russian Chemical Reviews* – 2010. – Т. 79 – № 3 – С.189–203.
87. Prut E.V. Chemical modification and blending of polymers in an extruder reactor / Prut E.V., Zelenetskii A.N. // *Russian Chemical Reviews* – 2001. – Т. 70 – № 1 – С.65–79.
88. Rogovina S.Z. Polysaccharide-based polymer blends: Methods of their production / Rogovina S.Z., Vikhoreva G.A. // *Glycoconjugate Journal* – 2006. – Т. 23 – № 7–8 – С.611–618.
89. Hong S.Y. Chemical transformation of chitosan oligosaccharides via solvent-free mechanochemistry: biomass valorization from ocean-sourced renewable feedstock to biobased platform chemicals: PhD thesis, Mechanical Engineering / Hong Say Yen – McGill University (Canada), 2019. – 148 с.
90. Akopova T.A. Amphiphilic systems based on polysaccharides produced by solid-phase synthesis – A review / Akopova T.A., Demina T.S., Zelenetskii A.N. // *Fibre Chemistry* – 2012. – Т. 44 – № 4 – С.217–220.
91. Ferguson A.N. Focus on chitosan research / A.N. Ferguson, A.G. O'Neill – Nova Science Publishers, 2011. – 477с.
92. Crawford D.E. Recent developments in mechanochemical materials synthesis by extrusion / Crawford D.E., Casaban J. // *Advanced Materials* – 2016. – Т. 28 – № 27 – С.5747–5754.
93. Shoulders M.D. Collagen structure and stability / Shoulders M.D., Raines R.T. // *Annual review of biochemistry* – 2009. – Т. 78 – С.929–958.
94. Yamauchi M. Cross-linking of collagen / Yamauchi M., Mechanic G.L. // *Collagen* – 2018. – С.157–172.
95. Reilly D.M. Skin collagen through the lifestages: Importance for skin health and beauty / Reilly

- D.M., Lozano J. // Plastic and Aesthetic Research – 2021. – T. 8 – № 2.
96. Copes F. Collagen-based tissue engineering strategies for vascular medicine / Copes F., Pien N., Vlierberghe S. Van, Boccafroschi F., Mantovani D. // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* – 2019. – T. 7 – C.1–15.
97. Shekhter A.B. Morphology of collagen matrices for tissue engineering (biocompatibility, biodegradation, tissue response) / Shekhter A.B., Guller A.E., Istranov L.P., Istranova E. V, Butnaru D. V, Vinarov A.Z., Zakharkina O.L., Kurkov A. V, Kantimerov D.F., Antonov E.N. // *Arkhiv patologii* – 2015. – T. 77 – № 6 – C.29–38.
98. Parenteau-Bareil R. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications / Parenteau-Bareil R., Gauvin R., Berthod F. // *Materials* – 2010. – T. 3 – № 3 – C.1863–1887.
99. Chirila T.V. Biomaterials and regenerative medicine in ophthalmology / T.V. Chirila, D.G. Harkin – Woodhead Publishing, 2016. Вып. Second– 483c.
100. Chan E.C. Three dimensional collagen scaffold promotes intrinsic vascularisation for tissue engineering applications / Chan E.C., Kuo S.-M., Kong A.M., Morrison W.A., Disting G.J., Mitchell G.M., Lim S.Y., Liu G.-S. // *PloS one* – 2016. – T. 11 – № 2 – C.e0149799.
101. Rich H. Effects of photochemical riboflavin-mediated crosslinks on the physical properties of collagen constructs and fibrils / Rich H., Odlyha M., Cheema U., Mudera V., Bozec L. // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* – 2014. – T. 25 – № 1 – C.11–21.
102. Engelhardt E.M. Compressed collagen gel: a novel scaffold for human bladder cells / Engelhardt E.M., Stegberg E., Brown R.A., Hubbell J.A., Wurm F.M., Adam M., Frey P. // *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* – 2010. – T. 4 – № 7 – C.123–130.
103. Girton T.S. Confined compression of a tissue-equivalent: collagen fibril and cell alignment in response to anisotropic strain / Girton T.S., Barocas V.H., Tranquillo R.T. // *Journal of Biomechanical Engineering* – 2002. – T. 124 – № 5 – C.568.
104. El-Fiqi A. Collagen hydrogels incorporated with surface-aminated mesoporous nanobioactive glass: Improvement of physicochemical stability and mechanical properties is effective for hard tissue engineering / El-Fiqi A., Lee J.H., Lee E.J., Kim H.W. // *Acta Biomaterialia* – 2013. – T. 9 – № 12 – C.9508–9521.
105. Long K. Improving the mechanical properties of collagen-based membranes using silk fibroin for corneal tissue engineering / Long K., Liu Y., Li W., Wang L., Liu S., Wang Y., Wang Z., Ren L. // *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* – 2015. – T. 103 – № 3 – C.1159–1168.
106. Raftery R.M. Multifunctional biomaterials from the sea: Assessing the effects of chitosan incorporation into collagen scaffolds on mechanical and biological functionality / Raftery R.M., Woods B., Marques A.L.P., Moreira-Silva J., Silva T.H., Cryan S.A., Reis R.L., O'Brien F.J. // *Acta Biomaterialia* – 2016. – T. 43 – C.160–169.
107. Martínez A. Tailoring chitosan/collagen scaffolds for tissue engineering: Effect of composition and different crosslinking agents on scaffold properties / Martínez A., Blanco M.D., Davidenko N., Cameron R.E. // *Carbohydrate Polymers* – 2015. – T. 132 – C.606–619.
108. Ryan A.J. Insoluble elastin reduces collagen scaffold stiffness, improves viscoelastic properties, and induces a contractile phenotype in smooth muscle cells / Ryan A.J., O'Brien F.J. // *Biomaterials* – 2015. – T. 73 – C.296–307.
109. Chen Q. Bio-mechanical properties of novel bi-layer collagen-elastin scaffolds for heart valve tissue engineering / Chen Q., Bruyneel A., Carr C., Czernuszka J. // *Procedia Engineering* – 2013. – T. 59 – C.247–254.
110. Kane R.J. Effects of hydroxyapatite reinforcement on the architecture and mechanical properties of freeze-dried collagen scaffolds / Kane R.J., Roeder R.K. // *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* – 2012. – T. 7 – C.41–49.
111. Baylón K. Past, present and future of surgical meshes: A review / Baylón K., Rodríguez-Camarillo P., Elías-Zúñiga A., Díaz-Elizondo J.A., Gilkerson R., Lozano K. // *Membranes* – 2017. – T. 7 – № 3 – C.1–23.
112. Lee H. Three-dimensional collagen/alginate hybrid scaffolds functionalized with a drug delivery system (DDS) for bone tissue regeneration / Lee H., Ahn S.-H., Kim G.H. // *Chemistry of Materials* –

2012. – Т. 24 – № 5 – С.881–891.

113. Dong C. Application of collagen scaffold in tissue engineering: recent advances and new perspectives / Dong C., Lv Y. // *Polymers* – 2016. – Т. 8 – № 2 – С.42.

114. Heck T. Enzyme-catalyzed protein crosslinking / Heck T., Faccio G., Richter M., Thöny-Meyer L. // *Applied microbiology and biotechnology* – 2013. – Т. 97 – № 2 – С.461–475.

115. Lastowka A. A comparison of chemical, physical and enzymatic cross-linking of bovine type I collagen fibrils / Lastowka A., Maffia G.J., Brown E.M. // *Journal of American Leather Chemists' Association* – 2005. – Т. 100 – С.196–202.

116. Nashchekina Y.A. Chemical cross-linking agents for collagen: Interaction mechanisms and perspectives for regenerative medicine / Nashchekina Y.A., Lukonina O.A., Mikhailova N.A. // *Tsitologiya* – 2020. – Т. 62 – № 7 – С.459–472.

117. Davidenko N. Optimisation of UV irradiation as a binding site conserving method for crosslinking collagen-based scaffolds / Davidenko N., Bax D.V., Schuster C.F., Farndale R.W., Hamaia S.W., Best S.M., Cameron R.E. // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* – 2016. – Т. 27 – № 1 – С.1–17.

118. Васильев А.В. Разработка нового класса остеоиндуктивных костно-пластических материалов на основе отверждаемых гидрогелей для применения в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии (экспериментальное исследование): дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.14 / Васильев Андрей Вячеславович – М., 2021. – 292 с.

119. Liu X. Reinforcement of a porous collagen scaffold with surface-activated PLA fibers / Liu X., Huang C., Feng Y., Liang J., Fan Y., Gu Z., Zhang X. // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* – 2010. – Т. 21 – № 6–7 – С.963–977.

120. Savelyev A.G. Flavin mononucleotide photoinitiated cross-linking of hydrogels: Polymer concentration threshold of strengthening / Savelyev A.G., Bardakova K.N., Khaydukov E. V., Generalova A.N., Popov V.K., Chichkov B.N., Semchishen V.A. // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* – 2017. – Т. 341 – С.108–114.

121. Batchelor R.R. (–)-Riboflavin (vitamin B2) and flavin mononucleotide as visible light photo initiators in the thiol–ene polymerisation of PEG-based hydrogels / Batchelor R.R., Kwandou G., Spicer P.T., Stenzel M.H. // *Polymer Chemistry* – 2017. – Т. 8 – № 6 – С.980–984.

122. Yao S. Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. / Yao S., Chen S., Clark J., Hao E., Beattie G.M., Hayek A., Ding S. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2006. – Т. 103 – № 18 – С.6907–12.

123. Grivennikov I.A. Embryonic stem cells and the problem of directed differentiation. / Grivennikov I.A. // *Biochemistry* – 2008. – Т. 73 – № 13 – С.1438–52.

124. Gentile P. An overview of poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering / Gentile P., Chiono V., Carmagnola I., Hatton P.V // *International journal of molecular sciences* – 2014. – Т. 15 – № 3 – С.3640–3659.

125. Hu Y. Newly developed techniques on polycondensation, ring-opening polymerization and polymer modification: Focus on poly(lactic acid) / Hu Y., Daoud W.A., Cheuk K.K.L., Lin C.S.K. // *Materials* – 2016. – Т. 9 – № 3.

126. Sikhosana T.S. Poly(lactic acid) and its composites as functional materials for 3-D scaffolds in biomedical applications: A mini-review of recent trends / Sikhosana T.S., Gumede T.P., Malebo N.J.J., Ogundeji A. // *eXPRESS Polymer Letters* – 2021. – Т. 15 – № 6 – С.568–580.

127. Donate R. Additive manufacturing of PLA-based scaffolds intended for bone regeneration and strategies to improve their biological properties / Donate R., Monzón M., Alemán-Domínguez M.E. // *E-Polymers* – 2020. – Т. 20 – № 1 – С.571–599.

128. Singhvi M.S. Polylactic acid: synthesis and biomedical applications / Singhvi M.S., Zinjarde S.S., Gokhale D.V. // *Journal of Applied Microbiology* – 2019. – Т. 127 – № 6 – С.1612–1626.

129. Sungsanit K. Physical and rheological properties of plasticized linear and branched PLA / Sungsanit K., Kao N., Bhattacharya S.N., Pivsaart S. // *Korea-Australia Rheology Journal* – 2010. – Т. 22 – № 3 – С.187–195.

130. Kim E.S. Structural effect of linear and star-shaped poly (L-lactic acid) on physical properties / Kim E.S., Kim B.C., Kim S.H. // *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* – 2004. – T. 42 – № 6 – C.939–946.
131. Storey R.F. Synthesis of bioabsorbable networks from methacrylate-endcapped polyesters / Storey R.F., Warren S.C., Allison C.J., Wiggins J.S., Puckett A.D. // *Polymer* – 1993. – T. 34 – № 20 – C.4365–4372.
132. Helminen A.O. Cross-linked poly (ϵ -caprolactone/d, l-lactide) copolymers with elastic properties / Helminen A.O., Korhonen H., Seppälä J.V // *Macromolecular Chemistry and Physics* – 2002. – T. 203 – № 18 – C.2630–2639.
133. Rämö V. Preparation of aqueous crosslinked dispersions of functionalized poly (d, l-lactic acid) with a thermomechanical method / Rämö V., Anghelescu-Hakala A., Nurmi L., Mehtiö T., Salomäki E., Härkönen M., Harlin A. // *European polymer journal* – 2012. – T. 48 – № 8 – C.1495–1503.
134. George K.A. Effects of crosslink density on hydrolytic degradation of poly (L-lactide)-based networks / George K.A., Chirila T.V, Wentrup-Byrne E. // *Polymer degradation and stability* – 2012. – T. 97 – № 6 – C.964–971.
135. Das S. Recent Advances in Hydrogels for Biomedical Applications / Das S., Kumar V., Tiwari R., Singh L., Singh S. // *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* – 2018. – T. 11 – № 11 – C.62.
136. Janoušková O. Synthetic Polymer Scaffolds for Soft Tissue Engineering / Janoušková O. // *Physiological research* – 2018. – T. 67.
137. Zhang X. Polyethylene glycol diacrylate scaffold filled with cell-laden methacrylamide gelatin/alginate hydrogels used for cartilage repair / Zhang X., Yan Z., Guan G., Lu Z., Yan S., Du A., Wang L., Li Q. // *Journal of Biomaterials Applications* – 2022. – T. 36 – № 6 – C.1019–1032.
138. Zhu J. Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering / Zhu J. // *Biomaterials* – 2010. – T. 31 – № 17 – C.4639–4656.
139. Sala Della F. Mechanical behavior of bioactive poly(ethylene glycol) diacrylate matrices for biomedical application / Sala Della F., Biondi M., Guarnieri D., Borzacchiello A., Ambrosio L., Mayol L. // *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* – 2020. – T. 110 – C.103885.
140. Munoz-Pinto D.J. Characterization of sequential collagen-poly (ethylene glycol) diacrylate interpenetrating networks and initial assessment of their potential for vascular tissue engineering / Munoz-Pinto D.J., Jimenez-Vergara A.C., Gharat T.P., Hahn M.S. // *Biomaterials* – 2015. – T. 40 – C.32–42.
141. Nachlas A.L.Y. Human iPSC-derived mesenchymal stem cells matured into valve interstitial-like cells using PEGDA hydrogels / Nachlas A.L.Y., Li S., Jha R., Singh M., Xu C., Davis M.E. // *Acta biomaterialia* – 2018. – T. 71 – C.235.
142. Frost B. Gradient poly(ethylene glycol) diacrylate and cellulose nanocrystals tissue engineering composite scaffolds via extrusion bioprinting / Frost B., Sutliff B.P., Thayer P., Bortner M.J., Foster E.J. // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* – 2019. – T. 7 – C.280.
143. Nazarov R. Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin / Nazarov R., Jin H.-J., Kaplan D.L. // *Biomacromolecules* – 2004. – T. 5 – № 3 – C.718–726.
144. Billiet T. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering / Billiet T., Vandenhaute M., Schelfhout J., Vlierberghe S. Van, Dubruel P. // *Biomaterials* – 2012. – T. 33 – № 26 – C.6020–6041.
145. Koo S. Laser-assisted biofabrication in tissue engineering and regenerative medicine / Koo S., Santoni S.M., Gao B.Z. // *Journal of Materials Research* – 2017. – T. 32 – № 1 – C.128–142.
146. Wang J. Phage nanofibers induce vascularized osteogenesis in 3D printed bone scaffolds / Wang J., Yang M., Zhu Y., Wang L., Tomsia A.P., Mao C. // *Advanced materials* – 2014. – T. 26 – № 29 – C.4961–4966.
147. Novakova-Marcincinova L. Basic and advanced materials for fused deposition modeling rapid prototyping technology / Novakova-Marcincinova L., Kuric I. // *Materials Science* – 2012. – T. 11 – № 1 – C.24–27.
148. Choi G. Recent advances in the development of nature-derived photocrosslinkable biomaterials for

- 3D printing in tissue engineering / Choi G., Cha H.J. // *Biomaterials Research* – 2019. – Т. 23 – № 1 – С.1–7.
149. Lam C.X.F. Scaffold development using 3D printing with a starch-based polymer / Lam C.X.F., Mo X.M., Teoh S.-H., Hutmacher D.W. // *Materials Science and Engineering: C* – 2002. – Т. 20 – № 1–2 – С.49–56.
150. Jeong H.J. 3D bioprinting strategies for the regeneration of functional tubular tissues and organs / Jeong H.J., Nam H., Jang J., Lee S.J. // *Bioengineering* – 2020. – Т. 7 – № 2 – С.1–24.
151. Billiet T. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering / Billiet T., Vandenhaute M., Schelfhout J., Vlierberghe S. Van, Dubruel P. // *Biomaterials* – 2012. – Т. 33 – № 26 – С.6020–6041.
152. Bahraminasab M. Challenges on optimization of 3D-printed bone scaffolds / Bahraminasab M. // *BioMedical Engineering Online* – 2020. – Т. 19 – № 1 – С.1–33.
153. Евсеев А.В. Оперативное формирование трехмерных объектов методом лазерной стереолитографии / Евсеев А.В., Камаев В.С., Коцюба Е.В., Марков М.А., Новиков М.М., Панченко В.Я. // *Современные лазерно-информационные и лазерные технологии*. М: Интерконтакт Наука – 2005. – С.26–40.
154. Mankovich N.J. Surgical planning using three-dimensional imaging and computer modeling / Mankovich N.J., Samson D., Pratt W., Lew D., Beumer III J. // *Otolaryngologic Clinics of North America* – 1994. – Т. 27 – № 5 – С.875–889.
155. Weisgrab G. 3D Printing of large-scale and highly porous biodegradable tissue engineering scaffolds from poly (trimethylene-carbonate) using two-photon-polymerization / Weisgrab G., Guillaume O., Guo Z., Heimel P., Slezak P., Poot A., Grijpma D., Ovsianikov A. // *Biofabrication* – 2020. – Т. 12 – № 4 – С.45036.
156. Koroleva A. Laser microstructured biodegradable scaffolds / Koroleva A., Kufelt O., Schlie-Wolter S., Hinze U., Chichkov B. // *Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering* – 2013. – Т. 58 – № 5.
157. Leach J.B. Development of photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol-peptide composite hydrogels for soft tissue engineering. / Leach J.B., Bivens K. a, Collins C.N., Schmidt C.E. // *Journal of biomedical materials research. Part A* – 2004. – Т. 70 – № 1 – С.74–82.
158. Koroleva A. Fabrication of fibrin scaffolds with controlled microscale architecture by a two-photon polymerization-micromolding technique / Koroleva A., Gittard S., Schlie S., Deiwick A., Jockenhoevel S., Chichkov B. // *Biofabrication* – 2012. – Т. 4 – № 1.
159. Kieffer J.C. Short-pulse laser absorption in very steep plasma density gradients / Kieffer J.C., Audebert P., Chaker M., Matte J.P., Pépin H., Johnston T.W., Maine P., Meyerhofer D., Delettrez J., Strickland D. // *Physical review letters* – 1989. – Т. 62 – № 7 – С.760.
160. Угрюмов М.В. Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма / Угрюмов М.В. // М.: Научный мир – 2014. – Т. 1 – С.580.
161. Бонч-Бруевич А.М. Многофотонные процессы / Бонч-Бруевич А.М., Ходовой В.А. // *Успехи физических наук* – 1965. – Т. 85 – № 1 – С.5–64.
162. Saeta P. Ultrafast electronic disordering during femtosecond laser melting of GaAs / Saeta P., Wang J.-K., Siegal Y., Bloembergen N., Mazur E. // *Physical review letters* – 1991. – Т. 67 – № 8 – С.1023.
163. Toriumi A. Reflection confocal microscope readout system for three-dimensional photochromic optical data storage / Toriumi A., Kawata S., Gu M. // *Optics letters* – 1998. – Т. 23 – № 24 – С.1924–1926.
164. Sun H.-B. Arbitrary-lattice photonic crystals created by multiphoton microfabrication / Sun H.-B., Xu Y., Juodkazis S., Sun K., Watanabe M., Matsuo S., Misawa H., Nishii J. // *Optics Letters* – 2001. – Т. 26 – № 6 – С.325–327.
165. Minoshima K. Photonic device fabrication in glass by use of nonlinear materials processing with a femtosecond laser oscillator / Minoshima K., Kowalewicz A.M., Hartl I., Ippen E.P., Fujimoto J.G. // *Optics Letters* – 2001. – Т. 26 – № 19 – С.1516–1518.
166. Koroleva A. Two-photon polymerization-generated and micromolding-replicated 3D scaffolds for peripheral neural tissue engineering applications / Koroleva A., Gill A.A., Ortega I., Haycock J.W., Schlie S., Gittard S.D., Chichkov B.N., Claeysens F. // *Biofabrication* – 2012. – Т. 4 – № 2 – С.025005.

167. Ovsianikov A. Investigation of two-photon polymerization technique for applications in photonics and biomedicine / A. Ovsianikov – Cuvillier Verlag, 2009. – 99c.
168. Raimondi M.T. Two-photon laser polymerization: from fundamentals to biomedical application in tissue engineering and regenerative medicine / Raimondi M.T., Eaton S.M., Nava M.M., Laganà M., Cerullo G., Osellame R. // *Journal of applied biomaterials & functional materials* – 2012. – T. 10 – № 1 – C.56–66.
169. Stampfl J. Multiphoton lithography: Techniques, materials, and applications / J. Stampfl, R. Liska, A. Ovsianikov – John Wiley & Sons, 2016. – 408c.
170. Heller C. One-and two-photon activity of cross-conjugated photoinitiators with bathochromic shift / Heller C., Pucher N., Seidl B., Kalinyaprak-Icten K., Ullrich G., Kuna L., Satzinger V., Schmidt V., Lichtenegger H.C., Stampfl J. // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* – 2007. – T. 45 – № 15 – C.3280–3291.
171. Bobula T. A novel photopolymerizable derivative of hyaluronan for designed hydrogel formation / Bobula T., Buffa R., Hermannová M., Kohutová L., Procházková P., Vágnerová H., Čepa M., Wolfová L., Židek O., Velebný V. // *Carbohydrate polymers* – 2017. – T. 161 – C.277–285.
172. Bencherif S.A. Influence of the degree of methacrylation on hyaluronic acid hydrogels properties / Bencherif S.A., Srinivasan A., Horkay F., Hollinger J.O., Matyjaszewski K., Washburn N.R. // *Biomaterials* – 2008. – T. 29 – № 12 – C.1739–1749.
173. Gallagher P.K. Handbook of thermal analysis and calorimetry / P. K. Gallagher, M. E. Brown – Elsevier Science BV, 2002. – 828c.
174. Tibbitt M.W. Mechanical properties and degradation of chain and step-polymerized photodegradable hydrogels / Tibbitt M.W., Kloxin A.M., Sawicki L.A., Anseth K.S. // *Macromolecules* – 2013. – T. 46 – № 7 – C.2785–2792.
175. Pereira R.F. 3D Photo-fabrication for tissue engineering and drug delivery / Pereira R.F., Bártolo P.J. // *Engineering* – 2015. – T. 1 – № 1 – C.090–112.
176. Qin X.H. Additive manufacturing of photosensitive hydrogels for tissue engineering applications / Qin X.H., Ovsianikov A., Stampfl J., Liska R. // *BioNanoMaterials* – 2014. – T. 15 – № 3–4 – C.49–70.
177. Oster G. Photochemistry of riboflavin / Oster G., Bellin J.S., Holmström B. // *Experientia* – 1962. – T. 18 – № 6 – C.249–253.
178. Ionita G. Application of riboflavin photochemical properties in hydrogel synthesis IntechOpen: London, UK, 2019. – 14c.
179. Insińska-Rak M. Riboflavin degradation products combined photochemical and mass spectrometry approach / Insińska-Rak M., Pukała D., Golczak A., Fornal E., Sikorski M. // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* – 2020. – T. 403 – C.112837.
180. Mu X. Photo-crosslinked silk fibroin for 3d printing / Mu X., Sahoo J.K., Cebe P., Kaplan D.L. // *Polymers* – 2020. – T. 12 – № 12 – C.1–18.
181. Hovakimyan M. Collagen cross-linking: current status and future directions / Hovakimyan M., Guthoff R.F., Stachs O. // *Journal of ophthalmology* – 2012. – T. 2012.
182. Scaiano J.C. Photochemical Norrish type I reaction as a tool for metal nanoparticle synthesis: importance of proton coupled electron transfer / Scaiano J.C., Stamplecoskie K.G., Hallett-Tapley G.L. // *Chemical Communications* – 2012. – T. 48 – № 40 – C.4798–4808.
183. Liu M. Time-resolved spectroscopic and density functional theory study of the photochemistry of irgacure-2959 in an aqueous solution / Liu M., Li M.-D., Xue J., Phillips D.L. // *The Journal of Physical Chemistry A* – 2014. – T. 118 – № 38 – C.8701–8707.
184. Bryant S.J. Encapsulating chondrocytes in degrading PEG hydrogels with high modulus: engineering gel structural changes to facilitate cartilaginous tissue production / Bryant S.J., Bender R.J., Durand K.L., Anseth K.S. // *Biotechnology and bioengineering* – 2004. – T. 86 – № 7 – C.747–755.
185. Burdick J.A. Delivery of osteoinductive growth factors from degradable PEG hydrogels influences osteoblast differentiation and mineralization / Burdick J.A., Mason M.N., Hinman A.D., Thorne K., Anseth K.S. // *Journal of Controlled Release* – 2002. – T. 83 – № 1 – C.53–63.
186. Ovsianikov A. Laser fabrication of three-dimensional CAD scaffolds from photosensitive gelatin for applications in tissue engineering / Ovsianikov A., Deiwick A., Vlierberghe S. Van, Dubruel P.,

- Möller L., Dräger G., Chichkov B. // *Biomacromolecules* – 2011. – T. 12 – № 4 – C.851–858.
187. Kämpylä E. Direct laser writing of synthetic poly (amino acid) hydrogels and poly (ethylene glycol) diacrylates by two-photon polymerization / Kämpylä E., Sedláček T., Aydogan D.B., Viitanen J., Rypáček F., Kellomäki M. // *Materials Science and Engineering: C* – 2014. – T. 43 – C.280–289.
188. Baier Leach J. Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: natural, biodegradable tissue engineering scaffolds / Baier Leach J., Bivens K.A., Patrick Jr C.W., Schmidt C.E. // *Biotechnology and bioengineering* – 2003. – T. 82 – № 5 – C.578–589.
189. Tomal W. Water-soluble photoinitiators in biomedical applications / Tomal W., Ortyl J. // *Polymers* – 2020. – T. 12 – № 5 – C.1073.
190. Schroeder W.F. Efficiency of 4,4'-bis(N,N-diethylamino) benzophenone for the polymerization of dimethacrylate resins in thick sections / Schroeder W.F., Asmussen S.L., Cook W.D., Vallo C.I. // *Polymer International* – 2011. – T. 60 – № 9 – C.1362–1369.
191. Lee D.H. The effect of 4,4'-bis(N, N-diethylamino) benzophenone on the degree of conversion in liquid photopolymer for dental 3D printing / Lee D.H., Mai H.N., Yang J.C., Kwon T.Y. // *Journal of Advanced Prosthodontics* – 2015. – T. 7 – № 5 – C.386–391.
192. Claeysens F. Three-dimensional biodegradable structures fabricated by two-photon polymerization / Claeysens F., Hasan E.A., Gaidukeviciute A., Achilleos D.S., Ranella A., Reinhardt C., Ovsianikov A., Shizhou X., Fotakis C., Vamvakaki M. // *Langmuir* – 2009. – T. 25 – № 5 – C.3219–3223.
193. Parkatzidis K. Multi-photon polymerization of bio-inspired, thymol-functionalized hybrid materials with biocompatible and antimicrobial activity / Parkatzidis K., Chatzinikolaidou M., Koufakis E., Kaliva M., Farsari M., Vamvakaki M. // *Polymer Chemistry* – 2020. – T. 11 – № 25 – C.4078–4083.
194. Terzaki K. Pre-osteoblastic cell response on three-dimensional, organic-inorganic hybrid material scaffolds for bone tissue engineering / Terzaki K., Kissamitaki M., Skarmoutsou A., Fotakis C., Charitidis C.A., Farsari M., Vamvakaki M., Chatzinikolaidou M. // *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* – 2013. – T. 101 A – № 8 – C.2283–2294.
195. Atala A. Essentials of 3D biofabrication and translation / A. Atala, J. J. Yoo – Academic Press, 2015.– 440c.
196. Purto J. Improved development procedure to enhance the stability of microstructures created by two-photon polymerization / Purto J., Verch A., Rogin P., Hensel R. // *Microelectronic Engineering* – 2018. – T. 194 – C.45–50.
197. Shin C.-S. Alleviating distortion and improving the Young's modulus in two-photon polymerization fabrications / Shin C.-S., Li T.-J., Lin C.-L. // *Micromachines* – 2018. – T. 9 – № 12 – C.615.
198. Steyrer B. Visible light photoinitiator for 3D-printing of tough methacrylate resins / Steyrer B., Neubauer P., Liska R., Stampfl J. // *Materials* – 2017. – T. 10 – № 12 – C.1445.
199. Bose S. Surface modification of biomaterials and biomedical devices using additive manufacturing / Bose S., Robertson S.F., Bandyopadhyay A. // *Acta biomaterialia* – 2018. – T. 66 – C.6–22.
200. Alekseev E.S. Supercritical fluids in chemistry / Alekseev E.S., Alentiev A.Y., Belova A.S., Bogdan V.I., Bogdan T. V., Bystrova A. V., Gafarova E.R., Golubeva E.N., Grebenik E.A., Gromov O.I. // *Russian Chemical Reviews* – 2020. – T. 89 – № 12 – C.1337.
201. Zhang X. Applications of supercritical carbon dioxide in materials processing and synthesis / Zhang X., Heinonen S., Levänen E. // *RSC Advances* – 2014. – T. 4 – № 105 – C.61137–61152.
202. Киселёв М.Г. Применение сверхкритического диоксида углерода в текстильной промышленности / Киселёв М.Г., Кумеева Т.Ю., Пуховский Ю.П. // *Российский химический журнал* – 2002. – T. 46 – № 1 – C.116–120.
203. Fleming O.S. Polymer processing with supercritical fluids / Fleming O.S., Kazarian S.G. // *Supercritical Carbon Dioxide: in Polymer Reaction Engineering* – 2006. – T. 42 – № 1 – C.205–238.
204. Beckman E.J. Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing / Beckman E.J. // *Journal of Supercritical Fluids* – 2004. – T. 28 – № 2–3 – C.121–191.
205. Melnik G.E. Supercritical carbon dioxide in vegetable oil production / Melnik G.E., Volkov S.M., Fedorov A.V. // *Processes and Food Production Equipment* – 2016. – C.3–14.

206. Baldini T. Effect of a novel sterilization method on biomechanical properties of soft tissue allografts / Baldini T., Caperton K., Hawkins M., McCarty E. // *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* – 2016. – T. 24 – № 12 – C.3971–3975.
207. Balestrini J.L. Sterilization of lung matrices by supercritical carbon dioxide / Balestrini J.L., Liu A., Gard A.L., Huie J., Blatt K.M.S., Schwan J., Zhao L., Broekelmann T.J., Mecham R.P., Wilcox E.C. // *Tissue Engineering Part C: Methods* – 2016. – T. 22 – № 3 – C.260–269.
208. Imashiro C. Cell patterning method on a clinically ubiquitous culture dish using acoustic pressure generated from resonance vibration of a disk-shaped ultrasonic transducer / Imashiro C., Kurashina Y., Kuribara T., Hirano M., Totani K., Takemura K. // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* – 2018. – T. 66 – № 1 – C.111–118.
209. Funano S. User-friendly cell patterning methods using a polydimethylsiloxane mold with microchannels / Funano S., Tanaka N., Tanaka Y. // *Development, growth & differentiation* – 2020. – T. 62 – № 3 – C.167–176.
210. Martinez-Rivas A. Methods of micropatterning and manipulation of cells for biomedical applications / Martinez-Rivas A., González-Quijano G.K., Proa-Coronado S., Séverac C., Dague E. // *Micromachines* – 2017. – T. 8 – № 12.
211. Timashev P.S. Novel biocompatible material based on solid-state modified chitosan for laser stereolithography / Timashev P.S., Bardakova K.N., Demina T.S., Pudovkina G.I., Novikov M.M., Markov M.A., Asyutin D.S., Pimenova L.F., Svidchenko E.M., Ermakov A.M., Selezneva I.I., Popov V.K., Konovalov N.A., Akopova T.T., Solovieva A.B., Panchenko V.Y., Bagratashvili V.N. // *Sovremennye Tehnologii v Medicine* – 2015. – T. 7 – № 3 – C.20–29.
212. Akopova T.A. Solvent-free synthesis and characterization of allyl chitosan derivatives / Akopova T.A., Demina T.S., Cherkaev G. V., Khavpachev M.A., Bardakova K.N., Grachev A.V., Vladimirov L. V., Zelenetskii A.N., Timashev P.S. // *RSC Advances* – 2019. – T. 9 – № 36 – C.20968–20975.
213. Akopova T.A. Solid-state synthesis of unsaturated chitosan derivatives to design 3D structures through two-photon-induced polymerization / Akopova T.A., Timashev P.S., Demina T.S., Bardakova K.N., Minaev N.V., Burdukovskii V.F., Cherkaev G.V., Vladimirov L.V., Istomin A.V., Svidchenko E.A., Surin N.M., Bagratashvili V.N. // *Mendeleev Communications* – 2015. – T. 25 – № 4 – C.280–282.
214. Demina T.S. Two-photon-induced microstereolithography of chitosan-g-oligolactides as a function of their stereochemical composition / Demina T.S., Bardakova K.N., Minaev N.V., Svidchenko E.A., Istomin A.V., Goncharuk G.P., Vladimirov L.V., Grachev A.V., Zelenetskii A.N., Timashev P.S., Akopova T.A. // *Polymers* – 2017. – T. 9 – № 7 – C.302.
215. Bardakova K.N. Tailoring the collagen film structural properties via direct laser crosslinking of star-shaped polylactide for robust scaffold formation / Bardakova K.N., Grebenik E.A., Minaev N.V., Churbanov S.N., Moldagazyeva Z. // *Materials Science & Engineering C* – 2020. – T. 107 – C.110300.
216. Bardakova K.N. Reinforced hybrid collagen sponges for tissue engineering / Bardakova K.N., Grebenik E.A., Istranova E.V., Istranov L.P., Gerasimov Y.V., Grosheva A.G., Zharikova T.M., Minaev N.V., Shavkuta B.S., Dudova D.S., Kostyuk S.V., Vorob'eva N.N., Bagratashvili V.N., Timashev P.S., Chailakhyan R.K. // *Cell Technologies in Biology and Medicine* – 2018. – T. 165 – № 1 – C.141–147.
217. Timashev P. Novel biodegradable star-shaped polylactide scaffolds for bone regeneration fabricated by two-photon polymerization / Timashev P., Kuznetsova D., Koroleva A., Prodanets N., Deiwick A., Piskun Y., Bardakova K., Dzhoyashvili N., Kostjuk S., Zagaynova E., Rochev Y., Chichkov B., Bagratashvili V. // *Nanomedicine* – 2016. – T. 11 – № 9 – C.1041–1053.
218. Lazhko A.E. Supercritical fluid treatment of three-dimensional hydrogel matrices obtained from allylchitosan by laser stereolithography / Lazhko A.E., Bardakova K.N., Shavkuta B.S., Churbanov S.N., Markov M.A., Akopova T.A., Parenago O.O., Grigoryev A.M., Timashev P.S., Lunin V.V. // *Russian Journal of Physical Chemistry B* – 2018. – T. 12 – № 7 – C.1144–1151.
219. Timashev P.S. Supercritical fluid treatment of three-dimensional hydrogel matrices, composed of chitosan derivatives / Timashev P.S., Bardakova K.N., Churbanov S.N., Krotova L.I., Grigoriev A.M., Novikov M.M., Lakeev S.G., Sevastianov V.I., Bagratashvili V.N. // *Vestnik Transplantologii i Iskusstvennykh Organov* – 2016. – T. 18 – № 3 – C.85–93.

220. Пат. 2648514 Российская Федерация, МПК А61К 9/00 (2006.01). Способ получения структурированных гидрогелей / Тимашев П.С., Бардакова К.Н., Акованцева А.А., Юсупов В.И., Баграташвили В.Н.; заявитель и патентообладатель ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН. – № 2016110444, заявл. 22.03.2016; опубл. 27.09.2017, Бюл. № 27. – 7 с.
221. Dudova D.S. Features of structures formation on the basis of chitosan derivatives by a prototype of 263 nm laser stereolithograph / Dudova D.S., Bardakova K.N., Akopova T.A., Timashev P.S., Minaev N.V. // *Journal of Physics: Conference Series* – 2016. – Т. 737 – № 1 – С.012046.
222. Пат. 2660588 Российская Федерация, МПК А61L 15/10 (2006.01). Способ упрочнения гидрогелей / Лажко А.Э., Бардакова К.Н., Шавкута Б.С., Паренаго О.О., Тимашев П.С., Свистушкин М.В., Юсупов В.И., Баграташвили В.Н.; заявитель и патентообладатель ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН. – № 2017125524, заявл. 18.07.17; опубл. 06.07.2018, Бюл. № 19. – 6 с.
223. Yuan Y. Contact angle and wetting properties // *Surface science techniques*. – Berlin, Heidelberg: Springer, 2013. – 34с.
224. Rulison C. Two-component surface energy characterization as a predictor of wettability and dispersability / Rulison C. // *KRUSS Application note AN213* – 2000. – С.1–22.
225. Rogowska R. Surface free energy of thin-layer coatings deposited by means of the arc-vacuum method / Rogowska R. // *Problemy Eksploatacji* – 2006. – С.193–203.
226. Repeta V. Influence of surface energy of polymer films on spreading and adhesion of UV-Flexo inks / Repeta V. // *Acta graphica: znanstveni časopis za tiskarstvo i grafičke komunikacije* – 2013. – Т. 24 – № 3–4 – С.79–84.
227. Serra J.P. Image analysis and mathematical morphology. Volume 2: Theoretical Advances. / J. P. Serra – Academic Press, 1988. – 411с.
228. Breel E. Characterizing the micro-mechanical properties of immersed hydrogels by nanoindentation / E. Breel – Technical Report. January 2015. doi: 10.13140/2.1.3580.9606, 2015.
229. Astaf'eva N.M. Wavelet analysis: basic theory and some applications / Astaf'eva N.M. // *Uspekhi Fizicheskikh Nauk* – 1996. – Т. 166 – № 11 – С.1145.
230. Bagratashvili V.N. Laser-induced atomic assembling of periodic layered nanostructures of silver nanoparticles in fluoro-polymer film matrix / Bagratashvili V.N., Rybaltovsky A.O., Minaev N.V., Timashev P.S., Firsov V.V., Yusupov V.I. // *Laser Physics Letters* – 2010. – Т. 7 – № 5 – С.401–404.
231. Philippova O.E. Charge-induced microphase separation in polyelectrolyte hydrogels with associating hydrophobic side chains: Small-angle neutron scattering study / Philippova O.E., Andreeva A.S., Khokhlov A.R., Islamov A.K., Kuklin A.I., Gordeliy V.I. // *Langmuir* – 2003. – Т. 19 – С.7240–7248.
232. Kurisawa M. Transfection efficiency increases by incorporating hydrophobic monomer units into polymeric gene carriers. / Kurisawa M., Yokoyama M., Okano T. // *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* – 2000. – Т. 68 – № 1 – С.1–8.
233. Popa-Nita S. Continuum of structural organization from chitosan solutions to derived physical forms / Popa-Nita S., Alcouffe P., Rochas C., David L., Domard A. // *Biomacromolecules* – 2010. – Т. 11 – № 1 – С.6–12.
234. Ottøy M.H. Preparative and analytical size-exclusion chromatography of chitosans / Ottøy M.H., Vårum K.M., Christensen B.E., Anthonsen M.W., Smidsrød O. // *Carbohydrate Polymers* – 1996. – Т. 31 – № 4 – С.253–261.
235. Schatz C. Static light scattering studies on chitosan solutions: from macromolecular chains to colloidal dispersions / Schatz C., Pichot C., Delair T., Viton C., Domard A. // *Langmuir* – 2003. – Т. 19 – № 23 – С.9896–9903.
236. Sogias I.A. Exploring the factors affecting the solubility of chitosan in water / Sogias I.A., Khutoryanskiy V.V., Williams A.C. // *Macromolecular Chemistry and Physics* – 2010. – Т. 211 – № 4 – С.426–433.
237. Qin C. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity / Qin C., Li H., Xiao Q., Liu Y., Zhu J., Du Y. // *Carbohydrate Polymers* – 2006. – Т. 63 – № 3 – С.367–374.
238. Souza B.W.S. Influence of electric fields on the structure of chitosan edible coatings / Souza

- B.W.S., Cerqueira M.A., Martins J.T., Casariego A., Teixeira J.A., Vicente A.A. // *Food Hydrocolloids* – 2010. – T. 24 – № 4 – C.330–335.
239. Khan M.A. Improvement of physico-mechanical properties of chitosan films by photocuring with acrylic monomers / Khan M.A., Ferdous S., Mustafa A.I. // *Journal of Polymers and the Environment* – 2005. – T. 13 – № 2 – C.193–201.
240. Martins J.T. Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films / Martins J.T., Cerqueira M.A., Vicente A.A. // *Food Hydrocolloids* – 2012. – T. 27 – № 1 – C.220–227.
241. Kim K.M. Properties of Chitosan Films as a Function of pH and Solvent Type / Kim K.M., Son J.H., Kim S.-K., Weller C.L., Hanna M.A. // *Journal of Food Science* – 2006. – T. 71 – № 3 – C.E119–E124.
242. Dong Y. Multiple crystalline morphologies of N-Alkyl chitosan solution cast films / Dong Y., Sakurai K., Wu Y., Kondo Y. // *Polymer Bulletin* – 2002. – T. 49 – № 2 – C.189–195.
243. Rivero S. Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films / Rivero S., García M.A., Pinotti A. // *Innovative Food Science and Emerging Technologies* – 2010. – T. 11 – № 2 – C.369–375.
244. Bangyekan C. Preparation and properties evaluation of chitosan-coated cassava starch films / Bangyekan C., Aht-Ong D., Srikulkit K. // *Carbohydrate Polymers* – 2006. – T. 63 – № 1 – C.61–71.
245. Rotta J. Determination of structural and mechanical properties, diffractometry, and thermal analysis of chitosan and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol / Rotta J., Minatti E., Barreto P.L.M. // *Ciência e Tecnologia de Alimentos* – 2011. – T. 31 – № 2 – C.450–455.
246. Modrzejewska Z. Determination of hydrogel chitosan membrane structure / Modrzejewska Z., Maniukiewicz W., Wojtasz-Pająk A. // *Polish Chitin Society, Monograph XI* – 2006. – C.113–121.
247. Wan Y. Biodegradable polylactide/chitosan blend membranes / Wan Y., Wu H., Yu A., Wen D. // *Biomacromolecules* – 2006. – T. 7 – № 4 – C.1362–1372.
248. Yahya M.Z.A. XRD and surface morphology studies on chitosan-based film electrolytes / Yahya M.Z.A., Harun M.K., Ali A.M.M., Mohammad M.F., Hanafiah M.A., Ibrahim S.C., Latif F. // *Journal of Applied Sciences* – 2006. – T. 6 – № 15 – C.3150–3154.
249. Huang T. A novel hydrogel with high mechanical strength: a macromolecular microsphere composite hydrogel / Huang T., Xu H.G., Jiao K.X., Zhu L.P., Brown H.R., Wang H.L. // *Advanced Materials* – 2007. – T. 19 – № 12 – C.1622–1626.
250. Gamboa-Martínez T.C. Crosslinked fibrin gels for tissue engineering: two approaches to improve their properties / Gamboa-Martínez T.C., Luque-Guillén V., González-García C., Gomez Ribelles J.L., Gallego-Ferrer G. // *Journal of Biomedical Materials Research Part A* – 2015. – T. 103 – № 2 – C.614–621.
251. Melo Pereira D. Biomineralization-inspired material design for bone regeneration / Melo Pereira D., Habibovic P. // *Advanced Healthcare Materials* – 2018. – T. 7 – № 22 – C.1800700.
252. Dimitriou R. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence / Dimitriou R., Mataliotakis G.I., Calori G.M., Giannoudis P. V // *BMC medicine* – 2012. – T. 10 – № 1 – C.1–24.
253. Dai Z. Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications / Dai Z., Ronholm J., Tian Y., Sethi B., Cao X. // *Journal of tissue engineering* – 2016. – T. 7 – C.2041731416648810.
254. Chung K. Structural and molecular interrogation of intact biological systems / Chung K., Wallace J., Kim S.Y., Kalyanasundaram S., Andelman A.S., Davidson T.J., Mirzabekov J.J., Zalocusky K.A., Mattis J., Denisin A.K., Pak S., Bernstein H., Ramakrishnan C., Grosenick L., Gradinaru V., Deisseroth K. // *Nature* – 2013. – T. 497 – № 7449 – C.332–337.
255. Do A. 3D Printing of scaffolds for tissue regeneration applications / Do A., Khorsand B., Geary S.M., Salem A.K., Therapeutics E., City I. // *Advanced healthcare materials* – 2015. – T. 4 – № 12 – C.1742–1762.
256. Loh Q.L. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size / Loh Q.L., Choong C. // *Tissue Engineering Part B: Reviews* – 2013. – T. 19 – № 6 – C.485–502.
257. Bencherif S.A. Injectable preformed scaffolds with shape-memory properties / Bencherif S.A.,

- Sands R.W., Bhatta D., Arany P., Verbeke C.S., Edwards D.A. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2012. – Т. 109 – С.19590–19595.
258. Zhang H. Aligned two- and three-dimensional structures by directional freezing of polymers and nanoparticles / Zhang H., Hussain I., Brust M., Butler M.F., Rannard S.P., Cooper A.I. // *Nature materials* – 2005. – Т. 4 – № 10 – С.787–793.
259. Tollar M. Surgical suture materials coated with a layer of hydrophilic Hydron gel / Tollar M., Štol M., Kliment K. // *Journal of biomedical materials research* – 1969. – Т. 3 – № 2 – С.305–313.
260. Kerker J.T. Cartilage repair: synthetics and scaffolds: basic science, surgical techniques, and clinical outcomes / Kerker J.T., Leo A.J., Sgaglione N.A. // *Sports medicine and arthroscopy review* – 2008. – Т. 16 – № 4 – С.208–216.
261. Шишацкая Е.И. Клеточные матриксы из резорбируемых полигидроксиалканоатов / Шишацкая Е.И. // *Гены и клетки* – 2007. – Т. 2 – № 2 – С.68–75.
262. Cárdenas G. Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD, and ¹³C cross polarization/mass angle spinning NMR / Cárdenas G., Cabrera G., Taboada E., Miranda S.P. // *Journal of Applied Polymer Science* – 2004. – Т. 93 – № 4 – С.1876–1885.
263. Cosola A. Gelatin type A from porcine skin used as co-initiator in a radical photo-initiating system / Cosola A., Chiappone A., Martinengo C., Grützmacher H., Sangermano M. // *Polymers* – 2019. – Т. 11 – № 11 – С.1901.
264. Тарасевич Б.Н. ИК спектры основных классов органических соединений / Тарасевич Б.Н. // М.: МГУ – 2012. – 55с.
265. Coates J. Interpretation of infrared spectra, a practical approach // *Encycl. Anal. Chem. Appl. theory Instrum.* – 2000. – 10815–10837с.
266. Pasqui D. Polysaccharide-based hydrogels: The key role of water in affecting mechanical properties / Pasqui D., Cagna M. De, Barbucci R. // *Polymers* – 2012. – Т. 4 – № 3 – С.1517–1534.
267. Тимашев П.С. Сверхкритическая флюидная обработка трехмерных гидрогелевых матриксов, полученных из производных хитозана / Тимашев П.С., Бардакова К.Н., Чурбанов С.Н., Кротова Л.И., Григорьев А.М., Новиков М.М., Лакеев С.Г., Севастьянов В.И., Баграташвили В.Н. // *Вестник трансплантологии и искусственных органов* – 2016. – Т. 18 – № 3 – С.85–93.
268. Sedaghati T. Nanotechnology and bio-functionalisation for peripheral nerve regeneration / Sedaghati T., Seifalian A.M. // *Neural regeneration research* – 2015. – Т. 10 – № 8 – С.1191.
269. Khang G. Interaction of fibroblast cells on poly (lactide-co-glycolide) surface with wettability chemogradient / Khang G., Lee S.J., Lee J.H., Kim Y.S., Lee H.B. // *Bio-medical materials and engineering* – 1999. – Т. 9 – № 3 – С.179–187.
270. Kim S.H. Correlation of proliferation, morphology and biological responses of fibroblasts on LDPE with different surface wettability / Kim S.H., Ha H.J., Ko Y.K., Yoon S.J., Rhee J.M., Kim M.S., Lee H.B., Khang G. // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* – 2007. – Т. 18 – № 5 – С.609–622.
271. Wei J. Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts / Wei J., Igarashi T., Okumori N., Igarashi T., Maetani T., Liu B., Yoshinari M. // *Biomedical Materials* – 2009. – Т. 4 – № 4 – С.45002.
272. Farrugia B.L. The localisation of inflammatory cells and expression of associated proteoglycans in response to implanted chitosan / Farrugia B.L., Whitelock J.M., Jung M., McGrath B., O'Grady R.L., McCarthy S.J., Lord M.S. // *Biomaterials* – 2014. – Т. 35 – № 5 – С.1462–1477.
273. Kwak B.K. Chitin-based embolic materials in the renal artery of rabbits: pathologic evaluation of an absorbable particulate agent / Kwak B.K., Shim H.J., Han S.-M., Park E.S. // *Radiology* – 2005. – Т. 236 – № 1 – С.151–158.
274. VandeVord P.J. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. / VandeVord P.J., Matthew H.W.T., DeSilva S.P., Mayton L., Wu B., Wooley P.H. // *Journal of biomedical materials research* – 2002. – Т. 59 – № 3 – С.585–90.
275. Kim H. Chitosan implants in the rat spinal cord: Biocompatibility and biodegradation / Kim H., Tator C.H., Shoichet M.S. // *Journal of Biomedical Materials Research Part A* – 2011. – Т. 97A – № 4 – С.395–404.

276. Peluso G. Chitosan-mediated stimulation of macrophage function / Peluso G., Petillo O., Ranieri M., Santin M., Ambrosic L., Calabró D., Avallone B., Balsamo G. // *Biomaterials* – 1994. – T. 15 – № 15 – C.1215–1220.
277. Tomihata K. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. / Tomihata K., Ikada Y. // *Biomaterials* – 1997. – T. 18 – № 7 – C.567–75.
278. Barbosa J.N. Evaluation of the effect of the degree of acetylation on the inflammatory response to 3D porous chitosan scaffolds / Barbosa J.N., Amaral I.F., Águas A.P., Barbosa M.A. // *Journal of Biomedical Materials Research Part A* – 2009. – T. 93 – № 1 – C.20–28.
279. Hwang H.-G. Multi-resolution wavelet-transformed image analysis of histological sections of breast carcinomas. / Hwang H.-G., Choi H.-J., Lee B.-I., Yoon H.-K., Nam S.-H., Choi H.-K. // *Cellular oncology : the official journal of the International Society for Cellular Oncology* – 2005. – T. 27 – № 4 – C.237–44.
280. Park H. Anionic carbohydrate-containing chitosan scaffolds for bone regeneration / Park H., Choi B., Nguyen J., Fan J., Shafi S., Klokkevold P., Lee M. // *Carbohydrate Polymers* – 2013. – T. 97 – № 2 – C.587–596.
281. Антонова А.В. Изучение механизмов внутриклеточного оксидативного стресса при облучении ВКР-лазером с рабочей длиной волны 1265 нм раковых клеток линии HELA / Антонова А.В., Глушченко Е.С., Золотовский И.О., Курков А.С., Саенко Ю.В., Светухин В.В. // *Прикладная фотоника* – 2014. – Т. 1 – № 2 – C.107–122.
282. Olsen M.H. Two-photon polymerization of immune cell scaffolds: PhD thesis, Materials Science, Engineering, Medicine / Olsen Mark Holm – DTU Nanotech, 2013. – 120 c.
283. Wüst S. Controlled positioning of cells in biomaterials – approaches towards 3D tissue printing / Wüst S., Müller R., Hofmann S. // *Journal of Functional Biomaterials* – 2011. – T. 2 – № 3 – C.119–154.
284. Kim O. V. Compression-induced structural and mechanical changes of fibrin-collagen composite / Kim O. V., Litvinov R.I., Chen J., Chen D.Z., Weisel J.W. // *Matrix Biology* – 2017. – T. 60 – C.141–156.
285. Brown B.R.A. Ultrarapid engineering of biomimetic materials and tissues: Fabrication of nano-and microstructures by plastic compression / Brown B.R.A., Wiseman M., Chuo C.B., Cheema U., Nazhat S.N. // *Advanced Functional Materials* – 2005. – T. 15 – № 11 – C.1762–1770.
286. Rabotyagova O. Collagen structural hierarchy and susceptibility to degradation by ultraviolet radiation / Rabotyagova O., Cebe P., Kaplan L. // *Materials Science and Engineering: C*. – 2008. – T. 28 – № 8 – C.1420- 1429.
287. Riaz T. FTIR analysis of natural and synthetic collagen / Riaz T., Zeeshan R., Zarif F., Ilyas K., Safi S.Z., Rahim A., Rizvi S.A.A., Ur I. // *Applied Spectroscopy Reviews* – 2018. – T. 53 – № 9 – C.703–746.
288. Chuaychan S. Characteristics of acid-and pepsin-soluble collagens from scale of seabass (*Lates calcarifer*) / Chuaychan S., Benjakul S., Kishimura H. // *LWT-Food Science and Technology* – 2015. – T. 63 – № 1 – C.71–76.
289. Zhong M. Isolation and characterization of collagen from the body wall of sea cucumber *Stichopus monotuberculatus* / Zhong M., Chen T., Hu C., Ren C. // *Journal of food science* – 2015. – T. 80 – № 4 – C.C671–C679.
290. Nicodemus G.D. Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications / Nicodemus G.D., Bryant S.J. // *Tissue Engineering Part B: Reviews* – 2008. – T. 14 – № 2 – C.149–165.
291. Sarrigiannidis S.O. A tough act to follow: Collagen hydrogel modifications to improve mechanical and growth factor loading capabilities / Sarrigiannidis S.O., Rey J.M., Dobre O., González-García C., Dalby M.J., Salmeron-Sanchez M. // *Materials Today Bio* – 2021. – T. 10 – C.100098.
292. Mironi-Harpaz I. Photopolymerization of cell-encapsulating hydrogels: Crosslinking efficiency versus cytotoxicity / Mironi-Harpaz I., Wang D.Y., Venkatraman S., Seliktar D. // *Acta Biomaterialia* – 2012. – T. 8 – № 5 – C.1838–1848.
293. Holmes R. Thiol-ene photo-click collagen-PEG hydrogels: Impact of water-soluble photoinitiators

- on cell viability, gelation kinetics and rheological properties / Holmes R., Yang X. Bin, Dunne A., Florea L., Wood D., Tronci G. // *Polymers* – 2017. – T. 9 – № 6.
294. Wollensak G. Corneal endothelial cytotoxicity of riboflavin/UVA treatment in vitro / Wollensak G., Spörl E., Reber F., Pillunat L., Funk R. // *Ophthalmic Research* – 2003. – T. 35 – № 6 – C.324–328.
295. Borde B. Injectable, high-density collagen gels for annulus fibrosus repair: An in vitro rat tail model / Borde B., Grunert P., Härtl R., Bonassar L.J. // *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* – 2015. – T. 103 – № 8 – C.2571–2581.
296. Liu T.X. Collagen crosslinking of porcine sclera using genipin / Liu T.X., Wang Z. // *Acta Ophthalmologica* – 2013. – T. 91 – № 4 – C.253–257.
297. Zhang Y. Comparison of riboflavin/ultraviolet-A cross-linking in porcine, rabbit, and human sclera / Zhang Y., Li Z., Liu L., Han X., Zhao X., Mu G. // *BioMed Research International* – 2014. – T. 2014.
298. Tirella A. Riboflavin and collagen: New crosslinking methods to tailor the stiffness of hydrogels / Tirella A., Liberto T., Ahluwalia A. // *Materials Letters* – 2012. – T. 74 – C.58–61.
299. Hapach L.A. Manipulation of in vitro collagen matrix architecture for scaffolds of improved physiological relevance / Hapach L.A., Vanderburgh J.A., Miller J.P., Reinhart-King C.A. // *Physical Biology* – 2015. – T. 12 – № 6 – C.61002.
300. Awaja F. The investigation of inner structural damage of UV and heat degraded polymer composites using X-ray micro CT / Awaja F., Nguyen M.T., Zhang S., Arhatari B. // *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* – 2011. – T. 42 – № 4 – C.408–418.
301. Xiang J. Formation mechanism of microvoids and microcracks of poly(vinyl chloride) under an artificial aging environment / Xiang J., Wang J., Chen X., Lei J. // *Journal of Applied Polymer Science* – 2012. – T. 125 – № 1 – C.291–299.
302. Lafarie-Frenot M.C. Comparison of damage development in C/epoxy laminates during isothermal ageing or thermal cycling / Lafarie-Frenot M.C., Rouquié S., Ho N.Q., Bellenger V. // *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* – 2006. – T. 37 – № 4 – C.662–671.
303. Decelle J. Oxidation induced shrinkage for thermally aged epoxy networks / Decelle J., Huet N., Bellenger V. // *Polymer Degradation and Stability* – 2003. – T. 81 – № 2 – C.239–248.
304. Lawrence J. *Advances in laser materials processing: technology, research and applications* / J. Lawrence – Woodhead Publishing, 2017. – 848c.
305. Pikulin A. Spatial resolution in polymerization of sample features at nanoscale / Pikulin A., Bityurin N. // *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics* – 2007. – T. 75 – № 19 – C.1–11.
306. Demina T.S. Fabrication of microstructured materials based on chitosan and D,L-lactide copolymers using laser-induced microstereolithography / Demina T.S., Bardakova K.N., Svidchenko E.A., Minaev N.V., Pudovkina G.I., Novikov M.M., Butnaru D.V., Surin N.M., Akopova T.A., Bagratashvili V.N., Zelenetskii A.N., Timashev P.S. // *High Energy Chemistry* – 2016. – T. 50 – № 5 – C.389–394.
307. Timashev P.S. Fabrication of microstructured materials based on chitosan and its derivatives using two-photon polymerization / Timashev P.S., Demina T.S., Minaev N. V., Bardakova K.N., Koroleva A. V., Kufelt O.A., Chichkov B.N., Panchenko V.Y., Akopova T.A., Bagratashvili V.N. // *High energy chemistry* – 2015. – T. 49 – № 4 – C.300–303.
308. Timashev P.S. Compatibility of cells of the nervous system with structured biodegradable chitosan-based hydrogel matrices / Timashev P.S., Bardakova K.N., Minaev N.V., Demina T.S., Mishchenko T.A., Mitroshina E.V., Akovantseva A.A., Koroleva A.V., Asyutin D.S., Pimenova L.F., Konovalov N.A., Akopova T.A., Solov'eva A.B., Mukhina I.V., Vedunova M.V., Chichkov B.N., Bagratashvili V.N. // *Applied Biochemistry and Microbiology* – 2016. – T. 52 – № 5 – C.508–514.
309. Lahiri D. Boron nitride nanotube reinforced polylactide–polycaprolactone copolymer composite: Mechanical properties and cytocompatibility with osteoblasts and macrophages in vitro / Lahiri D., Rouzaud F., Richard T., Keshri A.K., Bakshi S.R., Kos L., Agarwal A. // *Acta biomaterialia* – 2010. – T. 6 – № 9 – C.3524–3533.
310. Bardakova K.N. 3D printing biodegradable scaffolds with chitosan materials for tissue engineering / Bardakova K.N., Demina T.S., Grebenik E.A., Minaev N.V., Akopova T.A., Bagratashvili V.N., Timashev P.S. // *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* – 2018. – T. 347 – № 1 –

C.12009.

311. Zaidi L. Relationship between structure and rheological, mechanical and thermal properties of polylactide/Cloisite 30B nanocomposites / Zaidi L., Bruzard S., Bourmaud A., Médéric P., Kaci M., Grohens Y. // *Journal of Applied Polymer Science* – 2010. – Т. 116 – № 3 – С.1357–1365.
312. Revkova V.A. Chitosan-g-oligo(L,L-lactide) Copolymer Hydrogel Potential for Neural Stem Cell Differentiation / Revkova V.A., Grebenik E.A., Kalsin V.A., Demina T.S., Bardakova K.N., Shavkuta B.S., Melnikov P.A., Samoilova E.M., Konoplyannikov M.A., Efremov Y.M., Zhang C., Akopova T.A., Troitsky A.V., Timashev P.S., Baklaushev V.P. // *Tissue Engineering - Part A* – 2020. – Т. 26 – № 17–18 – С.953–963.
313. Manke A. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity / Manke A., Wang L., Rojanasakul Y. // *BioMed research international* – 2013. – Т. 2013.
314. Bussy C. Critical role of surface chemical modifications induced by length shortening on multi-walled carbon nanotubes-induced toxicity / Bussy C., Pinault M., Cambedouzou J., Landry M.J., Jegou P., Mayne-l'Hermite M., Launois P., Boczkowski J., Lanone S. // *Particle and fibre toxicology* – 2012. – Т. 9 – № 1 – С.1–15.
315. Sun H. Controlling stem cell-mediated bone regeneration through tailored mechanical properties of collagen scaffolds / Sun H., Zhu F., Hu Q., Krebsbach P.H. // *Biomaterials* – 2014. – Т. 35 – № 4 – С.1176–1184.
316. Currey J.D. Mechanical properties of vertebrate hard tissues / Currey J.D. // *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* – 1998. – Т. 212 – № 6 – С.399–411.
317. Хайрутдинов В.Ф. Термодинамические основы и технологические закономерности процессов диспергирования, экстракции и пропитки с использованием сверхкритических флюидных сред применительно к задачам полимерной химии, фармацевтики и нефтехимии: дис. ... д-ра тех. наук: 01.04.1 / Хайрутдинов Венер Фаилевич – К., 2019. – 399 с.
318. Rogovina S.Z. Investigation of properties of chitosan obtained by solid-phase and suspension methods / Rogovina S.Z., Akopova T.A., Vikhoreva G.A. // *Journal of Applied Polymer Science* – 1998. – Т. 70 – № 5 – С.927–933.
319. Nud'ga L.A. Effect of allyl substitution in chitosan on the structure of graft copolymers / Nud'ga L.A., Petrova V.A., Lebedeva M.F. // *Russian Journal of Applied Chemistry* – 2003. – Т. 76 – № 12 – С.1978–1982.
320. Akopova T.A. Solid state synthesis and modification of chitosan / Akopova T.A., Zelenetskii A.N., Ozerin A.N. // *Focus on Chitosan Research* – 2011. – С.223–253.
321. Duarte M.L. An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy / Duarte M.L., Ferreira M.C., Marvao M.R., Rocha J. // *International Journal of Biological Macromolecules* – 2002. – Т. 31 – № 1–3 – С.1–8.
322. Pan P. Temperature-variable FTIR and solid-state ¹³C NMR investigations on crystalline structure and molecular dynamics of polymorphic poly (L-lactide) and poly (L-lactide)/poly (D-lactide) stereocomplex / Pan P., Yang J., Shan G., Bao Y., Weng Z., Cao A., Yazawa K., Inoue Y. // *Macromolecules* – 2012. – Т. 45 – № 1 – С.189–197.
323. Krikorian V. Crystallization behavior of poly (L-lactic acid) nanocomposites: nucleation and growth probed by infrared spectroscopy / Krikorian V., Pochan D.J. // *Macromolecules* – 2005. – Т. 38 – № 15 – С.6520–6527.
324. Filippov Y. Reaction-associated resorbable phosphate materials: production and testing in vitro / Filippov Y., Larionov D.S., Putlyaev V.I., Sokolov A.V., Koval'kov V.K., Agakhi K.A., Selezneva I.I., Nikonova Y.A. // *Glass and Ceramics* – 2013. – Т. 70 – № 7 – С.306–310.
325. Selezneva I.I. Immobilization and long-term culturing of mouse embryonic stem cells in collagen-chitosan gel matrix / Selezneva I.I., Savintseva I.V., Vikhlyantseva E.F., Davydova G.A., Gavriluk B.K. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* – 2006. – Т. 142 – № 1 – С.119–122.
326. Vedunova M. Seizure-like activity in hyaluronidase-treated dissociated hippocampal cultures / Vedunova M., Sakharova T., Mitroshina E., Perminova M., Zakharov Y., Pimashkin A., Dityatev A., Mukhina I. // *Frontiers in cellular neuroscience* – 2013. – Т. 7 – С.149.

327. Vedunova M.V. TrkB-mediated neuroprotective and antihypoxic properties of brain-derived neurotrophic factor / Vedunova M.V., Mishchenko T.A., Mitroshina E.V., Mukhina I.V. // *Oxidative medicine and cellular longevity* – 2015. – Т. 2015.
328. Gruene M. Adipogenic differentiation of laser-printed 3D tissue grafts consisting of human adipose-derived stem cells / Gruene M., Pflaum M., Deiwick A., Koch L., Schlie S., Unger C., Wilhelmi M., Haverich A., Chichkov B.N. // *Biofabrication* – 2011. – Т. 3 – № 1.
329. Перова Н.В. Оценка биологического действия медицинских изделий (токсикологические исследования) / Перова Н.В., Довжик И.А., Севастьянов В.И. // *Вестник Росздравнадзора* – 2015. – № 3 – С.26–28.
330. Hartl L. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential / Hartl L., Zach S., Seidl-Seiboth V. // *Applied Microbiology and Biotechnology* – 2012. – Т. 93 – № 2 – С.533–543.
331. Park C.J. The effect of chitosan on the migration of neutrophil-like HL60 cells, mediated by IL-8 / Park C.J., Gabrielson N.P., Pack D.W., Jamison R.D., Wagoner Johnson A.J. // *Biomaterials* – 2009. – Т. 30 – № 4 – С.436–444.
332. Simard P. Neutrophils exhibit distinct phenotypes toward chitosans with different degrees of deacetylation: implications for cartilage repair / Simard P., Galarneau H., Marois S., Rusu D., Hoemann C.D., Poubelle P.E., El-Gabalawy H., Fernandes M.J. // *Arthritis Research & Therapy* – 2009. – Т. 11 – № 3 – С.R74.
333. Nishimura K. Immunological activity of chitin and its derivatives. / Nishimura K., Nishimura S., Nishi N., Saiki I., Tokura S., Azuma I. // *Vaccine* – 1984. – Т. 2 – № 1 – С.93–9.
334. Wagenaar D.A. An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures / Wagenaar D.A., Pine J., Potter S.M. // *BMC neuroscience* – 2006. – Т. 7 – № 1 – С.1–18.
335. Zhu N. A study on the in vitro degradation of poly (l-lactide)/chitosan microspheres scaffolds / Zhu N., Cooper D., Chen X.-B., Niu C.H. // *Frontiers of Materials Science* – 2013. – Т. 7 – № 1 – С.76–82.
336. Oliveira Renó C. Study of in vitro degradation of brushite cements scaffolds / Oliveira Renó C., Pereta N.C., Bertran C.A., Motisuke M., Sousa E. // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* – 2014. – Т. 25 – № 10 – С.2297–2303.
337. Cheung H.-Y. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development / Cheung H.-Y., Lau K.-T., Lu T.-P., Hui D. // *Composites Part B: Engineering* – 2007. – Т. 38 – № 3 – С.291–300.
338. Zhang Y. Non-invasive in vitro and in vivo monitoring of degradation of fluorescently labeled hyaluronan hydrogels for tissue engineering applications / Zhang Y., Rossi F., Papa S., Violatto M.B., Bigini P., Sorbona M., Redaelli F., Veglianesi P., Hilborn J., Ossipov D.A. // *Acta biomaterialia* – 2016. – Т. 30 – С.188–198.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю благодарность всем сотрудникам ИФТ ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН (г. Троицк) и Института регенеративной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова за помощь в проведении исследований как по теме диссертационной работы, так и в рамках других совместных работ. Особенно признательна своему научному руководителю – д.х.н. Петру Сергеевичу Тимашеву.

Огромная благодарность коллегам из дружественных институтов:

- д.х.н. Соловьевой А.Б., Каплину В.С. (ФИЦ ХФ им. Н.Н. Семенова РАН);
- д.х.н. Деминой Т.С., д.х.н. Акоповой Т.А., д.х.н. Зеленецкому А.Н. (ИСПМ им. Н.С. Ениколопова РАН);
- к.х.н. Пискун Ю.А., д.х.н. Костюку С.В. (НИИ ФХП Белорусский государственный университет);
- Маркову М.А., Новикову М.М. (ИПЛИТ РАН);
- Лажко А.Э. (МГУ им. М.В. Ломоносова);
- Фенину А.А. (РХТУ им. Д.И. Менделеева);
- к.х.н. Фариону И.А., д.х.н. Бурдуковскому В.Ф. (БИП СО РАН);
- PhD Королевой А., проф. Чичкову Б.Н. (Ганноверский университет им. Лейбница);
- к.ф.-м.н. Селезневой И.И. (Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН);
- к.б.н. Кузнецовой Д.С. (Приволжский исследовательский медицинский университет);
- к.б.н. Мищенко Т.А., д.б.н. Мухиной И.В., д.б.н. Ведуновой М.В. (ННГУ им. Н.И. Лобачевского);
- к.б.н. Григорьеву А.М., д.б.н. Севастьянову В.И. (ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава РФ)
- д.б.н. Герасимову Ю.В., д.м.н. Чайлахяну Р.К. (ФГБУ «НИЦЭМ им. ак. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ)

Отдельная благодарность к.х.н. Сазонову А.Б. (НИЦ Курчатовский институт), Ситину А.Г. (РХТУ им. Д.И. Менделеева) и Артёму Груничеву за необходимые для меня слова в нужное время.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

Дополнительные рисунки к Главе 1

Biomaterials for 3D scaffolds production together with their common application and fabrication methods.

	Class biomaterial		Application	Fabrication
Biomaterial for 3D scaffolds	CERAMICS	(HA, β -TCP, α -TCP, ZrO ₂ , TiO ₂ , porous bioglass, calcium silicate, calcium sulphate, etc.)	Hard tissue replacement Orthodontic application	- Binder jetting/inkjet printing - Extrusion - Stereolithography - SLS - Laser aid gelling - FDM - Polymer sponge replica - Salt leaching - Dual-phase leaching - Gel casting
	POLYMERS	Natural Proteins (<i>silk, collagen, gelatin, fibrinogen, actin, keratin</i>)	Connective and hard tissue application	- Solvent casting - Inkjet printing
		Polysaccharides (<i>alginate, chitosan, cellulose, dextran, chitin, glycosaminoglycan, hyaluronic acid, agarose</i>)	Decellularized living tissues/organs Drug delivery Hard and soft tissue on applicants Gene therapy	- Particle aggregation - Micro moulding - Photolithography - Emulsification - Electrospinning - Cryo-gelation - Sol-gel
		Polynucleotides (<i>DNA, RNA</i>)		- SLA - SLS/SLM - EBM
	POLYMERS	Synthetic Degradable (<i>polyesters, polyorthoesters, polylactones, polycarbonates, polyanhydrides, polyphosphazenes, etc.</i>)	Drug-delivery systems Implants	- FDM - Polyjet - Electrospinning - Phase separation - Freeze drying - Gas foaming - Inverse opal hydrogelation - Self-assembly
		Non-degradable (<i>PE, PTFE, PMA, PAA, PU, polyether, polysiloxanes, etc.</i>)	Orthopaedic implants	- SLA - SLM - SLS - EBM - Powder metallurgy - Vacuum foaming - Directional solidification - Textile base fabrication - Laminated object manufacturing (LOM) - FDM - SLA - Freeze-drying method
	METALS & ALLOYS	(Co-Cr, Ti, Ti-6Al-4V, stainless steel etc.)	Orthopaedic and dental application Artificial hearing	
	COMPOSITES	Blends of polymers and ceramics/metals	Orthopaedic and dental application	

Рисунок А.1 – Классификация материалов биомедицинского назначения по химическому составу, примеры их применения и технологии формирования. Взято из [50]

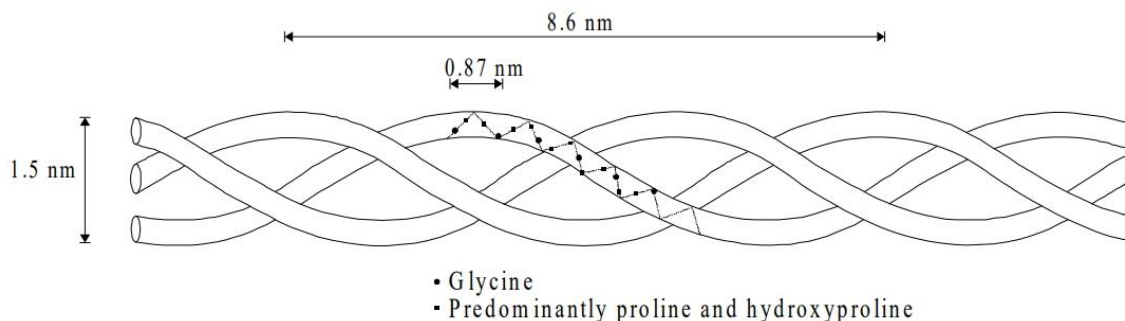


Рисунок А.2 – Строение тройной спирали коллагена. Взято из [94]

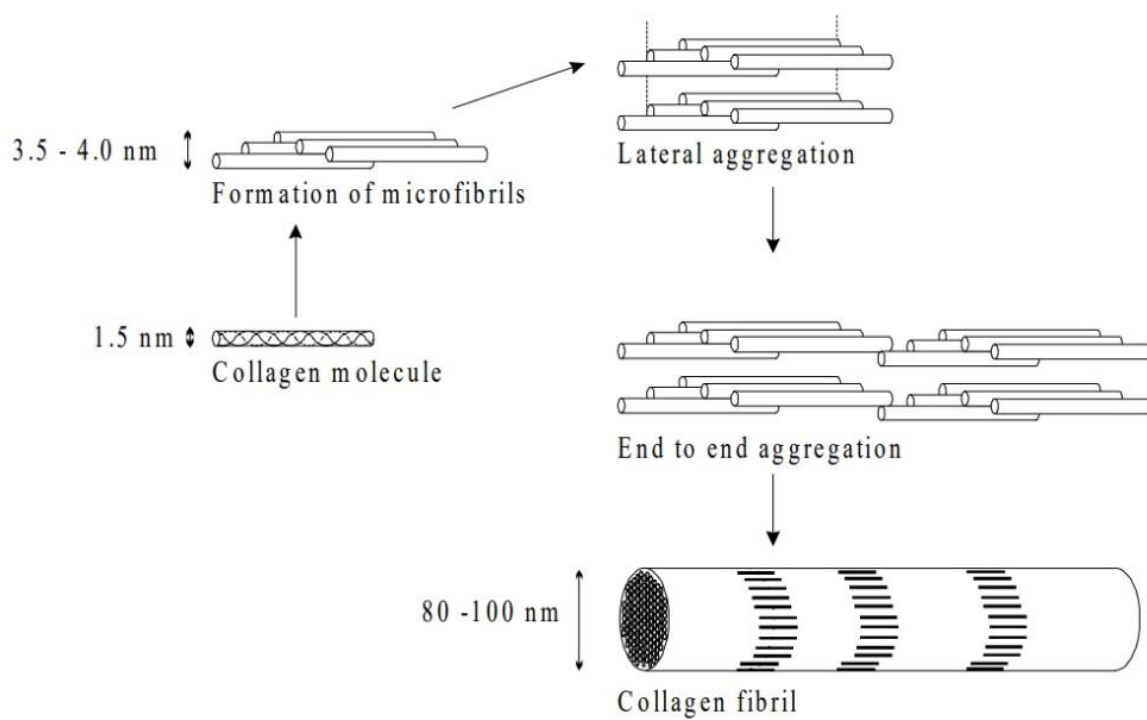


Рисунок А.3 – Образование микрофибрилл и фибрилл коллагена. Взято из [94]

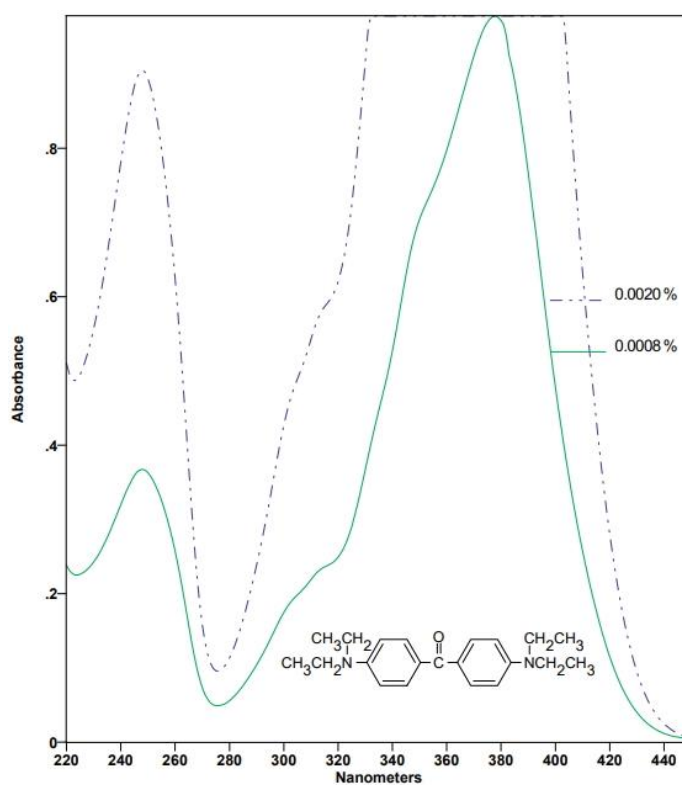


Рисунок А.4 – Спектры абсорбции растворов 4,4'-бис(диэтиламино)бензофенона в метиловом спирте

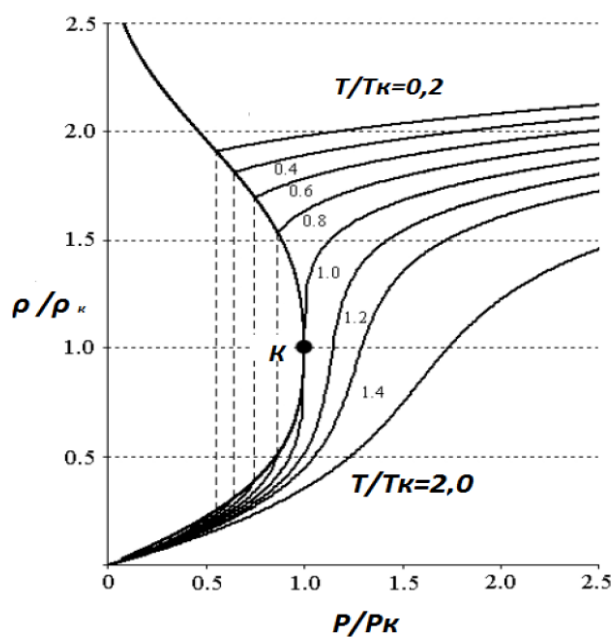


Рисунок А.5 – Зависимость плотности диоксида углерода от параметров состояния: T_k – критическая температура, P_k – критическое давление, ρ_k – плотность в критической точке (0,467 г/мл) [317]

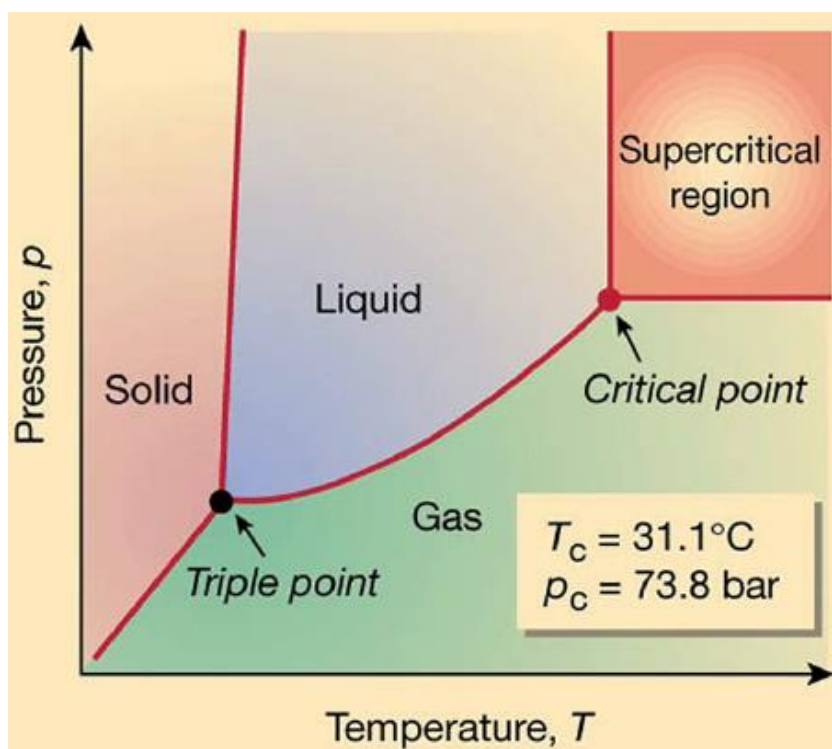


Рисунок А.6 – Фазовая диаграмма диоксида углерода [201]

Приложение Б

Синтез и свойства производных хитозана

а) Синтез аллилзамещенных производных хитозана [62]

Синтез аллилзамещенных производных хитозана (Рисунок Б.1) осуществляли при обработке порошков хитозана с бромистым аллилом в отсутствие растворителей в условиях сдвиговых деформаций в опытно-промышленном двухшнековом экструдере («Berstorff ZE 40», Германия) при охлаждении рабочих зон экструдера до -5°C .

Экструдер оснащен однонаправленно вращающимися силовыми элементами шнеков, обеспечивающими сжатие и сдвиг материала в тонком слое. Химическое взаимодействие компонентов в состоянии вынужденного пластического течения в этих условиях приводит к образованию продуктов с высоким выходом [87].

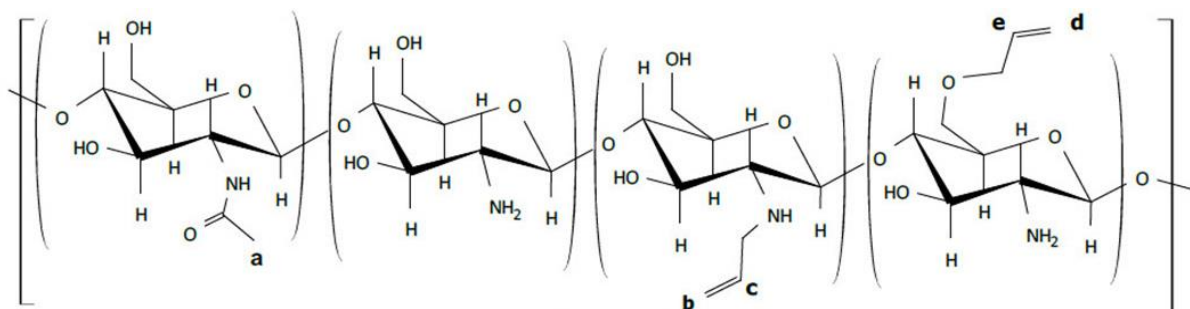


Рисунок Б.1 – Строение синтезированных аллилзамещенных производных хитозана

Количество молей бромистого аллила по отношению к элементарному звену хитозана в реакционных смесях составляло 0,5 (образец АХ10), 1,0–1,5 (образец АХ20) и 2,0 (образец АХ50). Для синтеза образцов АХ получали хитозан методом механохимического щелочного деацетилирования хитина краба (Xiamen Fine Chemical Import & Export CO., Китай) при 3-кратном мольном избытке едкого натра согласно опубликованной процедуре [318]. В этом случае реакционная смесь содержала помимо бромистого аллила гидроксид натрия (2 моля на звено хитозана), а исходный хитозан имел следующие характеристики: степень ацилирования (СА) = 15 мол.% (определено потенциометрическим титрованием солянокислого раствора образца и ЯМР спектроскопией), молекулярная масса (ММ) = 80 кДа (определено вискозиметрическим методом). Продукты реакции очищали экстракцией непрореагировавшего бромистого аллила изопропанолом с последующим удалением щелочных примесей диализом против дистиллированной воды до нейтральной реакции промывных вод. Очищенные продукты сушили лиофильно.

Спектры протонного магнитного резонанса (ПМР) записывали на приборе «Bruker-Avance II-300» с рабочей частотой 300 МГц в растворах D_2O при температуре 90°C . Для калибровки шкалы химических сдвигов использовали сигнал дейтерированного диметилсульфоксида ($\delta = 2,5$ м.д.). Содержание аллильных групп в модифицированном хитозане определяли путем измерения и сравнения интегральных интенсивностей сигналов протонов в структурных фрагментах: $>\text{CH}-\text{NH}_2$ (при 3,0–3,2 м.д.); $\text{H}_3\text{C}-\text{CONH}-$ (Рисунок Б.1, а, 1,9 м.д.); $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NH}-$ (Рисунок Б.1, с и b, 5,3–5,5 м.д.); $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-$ (Рисунок Б.1, е и d, 5,1–5,2 м.д.).

б) Свойства аллилзамещенных производных хитозана [62]

Расчеты по данным спектров ПМР показали, что суммарная степень замещения (на 100 звеньев полимера) в образце АХ10 составляла 8–10% и возрастала с увеличением бромистого аллила в исходных смесях: от 17–20% в образцах АХ20 до 47–50% в образце АХ50. При этом в щелочной среде образовывались неизбирательно, но преимущественно О-замещенные продукты. Наблюдаемая структура полученных производных хорошо согласуется с различием в

нуклеофильности гидроксильных и аминогрупп полимера в условиях каталитической реакции. Для образцов модифицированного гидрофобными аллильными фрагментами хитозана растворимость в 2%-й уксусной кислоте – традиционном растворителе хитозана – снижается незначительно (на 1–2%) по сравнению с исходным полимером, что позволило использовать растворные методы при формировании материалов. В целом, проведенные исследования показали, что механическая активация твердых реакционных смесей в выбранных условиях синтеза производных хитозана позволяет существенно снизить расход реагентов, продолжительность (до нескольких минут) и температуру процесса по сравнению с аналогичным процессом в среде органического растворителя (изопропиловый спирт, 70°C, 1–4 ч) [319].

в) Синтез сополимеров хитозан-со-олиго(L,L-/L,D-лактидов) [214, 306]

Хитозан-со-олиго(L,L-/L,D-лактиды) получены в результате механохимической обработки твердых порошковых смесей хитозана и олиго(L,L-лактида) или олиго(L,D-лактида) в опытно-промышленном двухшнековом экструдере («Berstorff ZE 40», Германия) при 55°C (Рисунок Б.2).

Для синтеза использовали два вида хитозана: хитозан со средней ММ = 350 кДа (**Хитозан_350**) и степенью ацетилирования СА = 0,14 (Sonat, Россия); хитозан с ММ = 80 кДа (**Хитозан_80**) и СА = 0,11 получали из хитина панцирей краба (Xiameп, Китай) путем твердофазного синтеза в ИСПМ РАН (Москва, Россия), как сообщалось ранее [91, 320].

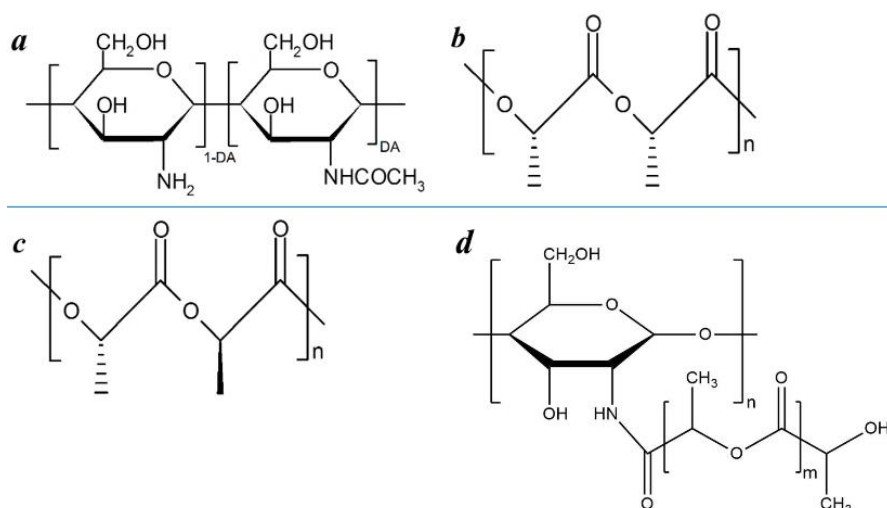


Рисунок Б.2 – Химические формулы исходного хитозана (a); олиго(L,L-лактида) (b); олиго(L,D-лактида) (c); хитозан-со-олиго(L,L-/D,L-лактида) (d)

Полукристаллический олиго(L,L-лактид) и аморфный олиго(L,D-лактид) с ММ = 5000 Да синтезированы из соответствующих молочных кислот (Panreac, Испания), в качестве катализатора использовали 0,001% SnCl₂. Условия твердофазного синтеза хитозан-со-олиго(L,L-/L,D-лактидов) приведены в Таблице Б.1.

г) Характеризация сополимеров хитозан-со-олиго(L,L-/D,L-лактидов) [214]

Поскольку синтезированные продукты состоят из гидрофильных и гидрофобных цепей, полученные сополимеры обладают амфифильными свойствами и имеют сродство как к водным, так и к хлорированным растворителям. Растворение образцов в классических олиго/полилактидных растворителях, таких как хлороформ или дихлорметан, привели к их набуханию и образованию ультратонких стабильных дисперсий. В связи с этим очистку образцов от непрореагировавших олиголактидов проводили с использованием ацетона, который служил хорошим растворителем для олиго/полилактидов и в качестве осаждающего агента для хитозана.

Расчетные значения количеств прореагировавшего олиголактида и соответствующих степеней прививки приведены в Таблице Б.1. Наименьшая реакционная способность обнаружена

для системы на основе Хитозан_350, тогда как образцы, состоящие из хитозана с более низкой ММ (Хитозан_80), показали более высокие степени прививки, которые сопоставимы в случае L,L- или L,D-олиголактидов. Различие в реакционной способности как функция молекулярной массы хитозана может быть вызвано доступностью функциональных групп хитозана при твердофазной механохимической обработке.

Таблица Б.1 – Хитозан-со-олиголактиды: условия обработки и выход сополимеров [214]

Образец	Компоненты	Соотношение компонентов, мас./мас.	Относительные количества прореагировавшего олиголактида*, мас.%	Степень прививки**, %
CLL_350	Хитозан_350/ олиго(L,L-лактид)	50/50	5,4	5,4
CLL	Хитозан_80/ олиго(L,L-лактид)	40/60	23,4	35,1
CLD	Хитозан_80/ олиго(L,D-лактид)	40/60	24,5	36,7

* Количество прореагировавшего лактида оценивали как отношение к исходно взятому для синтеза количеству лактида.

** Степень прививки (%) рассчитывали согласно: $((W_{\text{хл}} - W_{\text{х}}) / W_{\text{х}}) \times 100$, где $W_{\text{хл}}$ – это масса сополимера после очистки от непрореагировавшего олиголактида, $W_{\text{х}}$ – масса хитозана, взятого первоначально для синтеза.

СА коммерческого хитозана (Хитозан_350) существенно выше, чем у Хитозан_80, что видно при сравнении интенсивностей полос Амида I (1653 см^{-1}) с полосами изгибающих колебаний групп NH_2 (1590 см^{-1}) в спектрах исходных образцов хитозана (Рисунок Б.3) [321]. Это хорошо согласуется с данными СА, полученными с использованием потенциометрического титрования и ^1H ЯМР.

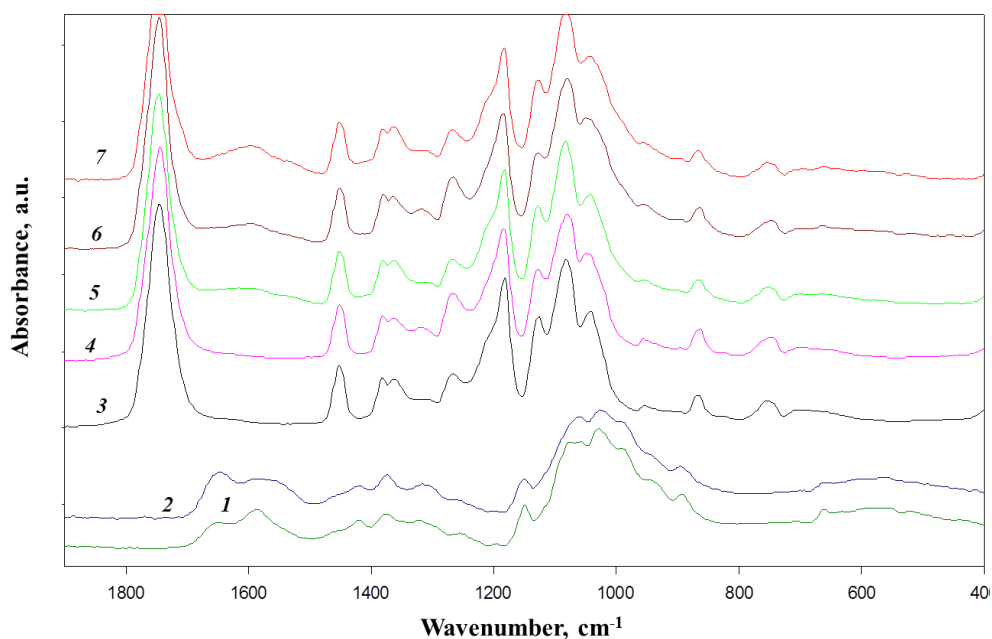


Рисунок Б.3 – ИК-спектры образцов Хитозан_80 (1), Хитозан_350 (2), олиго(L,L-лактида) (3), олиго(L,D-лактида) (4), CLL_350 (5), CLD (6), CLL (7)

ИК-спектры олиголактоидов и сополимеров содержат полный набор полос, характерных для цепей лактида, наиболее типичные из которых: 1747 см^{-1} – растяжение сложноэфирной $\text{C}=\text{O}$ группы; дублет 1380 и 1363 см^{-1} – с высоким вкладом симметричных деформационных колебаний групп CH_3 ; 1183 см^{-1} – относительно сильная полоса асимметричного растяжения $\text{C}-\text{O}-\text{C}$; 1083 см^{-1} – симметричное растяжение CH_3 и растяжение $\text{C}-\text{C}$ при 1063 см^{-1} [322]. Полоса при 1452 см^{-1} может быть отнесена к асимметричным деформационным колебаниям групп CH_3 и почти нечувствительна к физическому состоянию цепи лактида и, таким образом, может быть использована в качестве внутреннего стандарта для оценки степени кристалличности [323].

Изучение кристаллизации поли(Л-молочной кислоты) выявило группу полос (1363 и 1210 см^{-1}), обладающих самой высокой чувствительностью к его степени кристалличности. Полоса 1210 см^{-1} является комбинацией асимметричных $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ и асимметричных качательных колебаний группы CH_2 . Видно, что олиго(Л,Д-лактид) (Рисунок Б.3, спектр 4) является полностью аморфным, тогда как олиго(Л,Л-лактид) (Рисунок Б.3, спектр 3) обладает довольно низкой степенью кристалличности. Кристаллические особенности исходных олиголактоидов остаются неизменными после твердофазной модификации: олиголактоидные прививки образца CLL_350 (Рисунок Б.3, спектр 5) имеют более высокую кристалличность, тогда как олиголактоидные цепи CLD (Рисунок Б.3, спектр 6) являются полностью аморфными.

Различия в ИК-спектрах сополимеров в сравнении со спектрами соответствующих исходных олиголактоидов наиболее ярко проявляются в спектре CLL (Рисунок Б.3, спектр 7), в частности, при появлении низкочастотного плеча около 1710 см^{-1} , приписываемого полосам карбоксильных групп, и слабой широкой полосы с максимумом около 1600 см^{-1} . В этом частотном диапазоне лежат полосы асимметричных растягивающих колебаний COO -групп, а также деформационные колебания NH_3^+ групп. Большая (около 80 см^{-1}) полуширина этой полосы предполагает, что упомянутые полосы накладываются друг на друга. Таким образом, вероятно, что полоса при 1600 см^{-1} отражает образование солевой формы $\text{COO}-\text{NH}_3^+$.

Прививка олиго(Л,Л-лактида) к основной цепи Хитозан_350 не приводила к каким-либо значительным изменениям в УФ-спектрах (Рисунок Б.4), что согласуется с низкой степенью прививки, в то время как прививка обоих олиголактоидов к цепям Хитозан_80 приводила к увеличению интенсивности полос в диапазоне $200\text{--}400\text{ нм}$. Ранее в [78] показано, что эти изменения следует отнести к прореагировавшим аминогруппам хитозана. По сравнению с немодифицированным хитозаном коротковолновая полоса ($< 250\text{ нм}$) появляется в спектрах сополимеров из-за значительного количества олиголактоида, включенного в структуру Хитозан_80 (Таблица Б.1). Полоса при 320 нм , которая обнаружена в образцах на основе олиго(Л,Л-лактида), может быть отнесена к взаимодействию между полукристаллическими фрагментами.

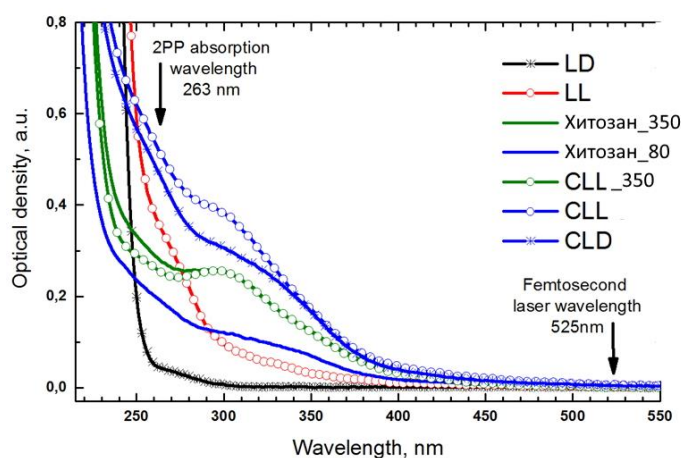


Рисунок Б.4 – УФ-спектры поглощения 1 мас.% растворов олиго(Л,Д-лактида) и олиго(Л,Л-лактида) в CH_2Cl_2 ; немодифицированные Хитозан_350 и Хитозан_80; сополимеры CLL_350, CLL и CLD в $0,1\text{ М HCl}$

Приложение В

Выделение коллагена. Подготовка коллагеновых губок и пленок

Для приготовления раствора коллагена использовали средний слой дермы крупного рогатого скота, который разрезали на кусочки размером около 5×5 см. Кусочки дермы помещали в раствор, содержащий 2,5 М NaOH и 0,85 М Na_2SO_4 . Длительность экспозиции кусочков дермы составила 48 ч при 20°C при периодическом перемешивании. Затем кусочки дермы промывали в 0,85 М растворе Na_2SO_4 в течение 6 ч, после чего перемещали в 4%-й раствор борной кислоты, в котором выдерживали до полной нейтрализации щелочи на срезе. Степень нейтрализации определяли качественно с помощью реакции с фенолфталеином. Нейтрализованные образцы промывали дистиллированной водой до получения отрицательной пробы на наличие сульфат-ионов, после чего их помещали в 0,5 М раствор уксусной кислоты до полного растворения. Полученный раствор очищали осаждением коллагена 12%-м раствором NaCl, осадок отделяли центрифугированием (20 мин, 3000 об./мин) и повторно растворяли в 0,25 М растворе уксусной кислоты. Для освобождения от солей полученный раствор диализовали 24 ч против 0,25 М уксусной кислоты [216].

Для получения *коллагеновой губки* раствор коллагена в концентрации 0,7 мг/мл ($\text{pH} = 2,9$) разливали в кюветы толщиной слоя 3 мм, замораживали при -30°C и подвергали сублимационной сушке. Толщина сформированной губки равнялась 1 см [216].

Для получения *коллагеновой пленки* раствор коллагена (1 мас.%) наливали в полистирольные кюветы толщиной слоя 10 мм и высушивали при температуре $22\text{--}24^\circ\text{C}$ до остаточной влажности 10–12%. Толщина сформированной пленки равнялась 100 мкм [215].

Приложение Г

Синтез и свойства фоточувствительного полилактида

Все реакции проводили по стандартной методике Шленка в атмосфере аргона. Протокол синтеза состоит из двух этапов: синтез и метакрилирование тетрафункционального поли(D,L-лактида) (Рисунок Г.1) [217].

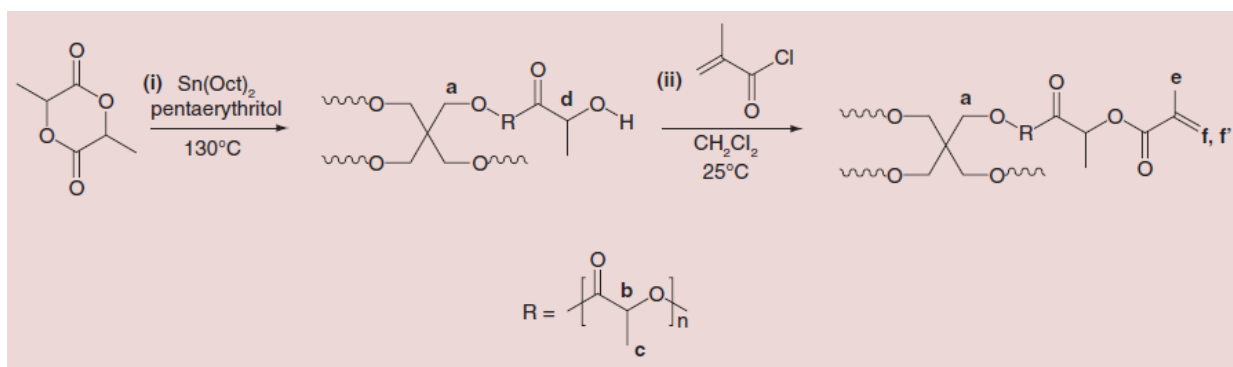


Рисунок Г.1 – Этапы синтеза тетрафункционального поли(D,L-лактида) [217]

Тетрафункциональный поли(D,L-лактид) синтезировали полимеризацией D,L-лактида с раскрытием цикла в присутствии октоата олова $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CO}_2]_2\text{Sn}$ (Sigma-Aldrich, США) в качестве катализатора и пентаэритрита в качестве инициатора. Типичная процедура синтеза заключалась в следующем. Расплав пентаэритрита (0,23 г; $1,7 \times 10^{-3}$ моль) в 5 г D,L-лактида готовили в пробирке. В реактор Шленка загружали раствор катализатора (1 М) в толуоле (0,56 мл; $5,6 \times 10^{-4}$ моль). После удаления под вакуумом дихлорметана в реактор добавляли расплав пентаэритрита в D,L-лактиде. Затем реакционный сосуд погружали в масляную баню, предварительно нагретую до 130°C , на 15 мин для полимеризации с получением разветвленного поли(D,L-лактида).

Реакцию концевых гидроксильных групп тетрафункционального поли(D,L-лактида) с метакрилоил хлоридом проводили в присутствии пиридина в пробирке Шленка. Тетрафункциональный поли(D,L-лактид) (5 г) растворяли в дихлорметане (35 мл) и затем добавляли пиридин (0,31 мл; $3,8 \times 10^{-3}$ моль). После этого реакционный сосуд охлаждали до 0°C и медленно добавляли в реактор метакрилоил хлорид (0,37 мл; $3,8 \times 10^{-3}$ моль). Реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 24 часов. Полученные продукты охлаждали в течение 12 ч при -30°C (для осаждения соли пиридиния), затем фильтровали, очищали колоночной хроматографией с использованием силикагеля и выпаривали CH_2Cl_2 на ротонном испарителе с получением тетрафункционального поли(D,L-лактида) с концевыми метакрилатными группами. Функциональность полимера определяли с помощью спектроскопии ЯМР ^1H и рассчитывали по уравнению:

$$F_n = \frac{I[=\text{CH}_2]_{\text{MAX}}}{I[-\text{CH}_2 - \text{O}-]_{\text{ПЭ}}},$$

где $I[=\text{CH}_2]_{\text{MAX}}$ – интенсивность резонанса протона головной группы полимера (при 6,25–5,6 м.д.); $I[-\text{CH}_2 - \text{O}-]_{\text{ПЭ}}$ – интенсивность резонанса протона концевой группы полимера (при 4,16 м.д.). Спектры ЯМР ^1H растворов полимеров в CDCl_3 (концентрация 0,015 г/мл) снимали на приборе Bruker AC-400 при 25°C с рабочей частотой 400 МГц.

Среднечисловую, средневесовую молекулярные массы, а также степень полидисперсности синтезированных полимеров определяли методом гель-проникающей хроматографии (ГПХ). В качестве растворителя использовали тетрагидрофуран со скоростью элюирования 1 мл/мин при температуре 30°C . M_n и M_w/M_n полимеров рассчитывали по кривым элюирования, основываясь на калибровочных зависимостях, полученных с применением полистирольных стандартов с $M_w/M_n \leq 1,05$.

В спектре поли(D,L-лактида), модифицированного метакрилоил хлоридом (Рисунок Г.2, а) сигналы, соответствующие гидроксиметиновой группе отсутствуют, тогда как хорошо разрешены сигналы протонов концевой метакрилатной группы (при 5,5 м.д. (g) и 6,1 м.д. (h)).

Типичный спектр ЯМР ^1H поли(D,L-лактида) с концевыми гидроксильными группами (Рисунок Г.2, б), который характеризуется наличием хорошо разрешенных сигналов протонов, соответствующих метиновой (5,14–5,2 м.д. (b)) и метильной (1,5 м.д. (c)) группам основной цепи. В спектре присутствуют также резонансы меньшей интенсивности, соответствующие концевой гидроксиметиновой группе (4,35 м.д. (i)) и головной оксиметиленовой группе (4,15 м.д. (a)).

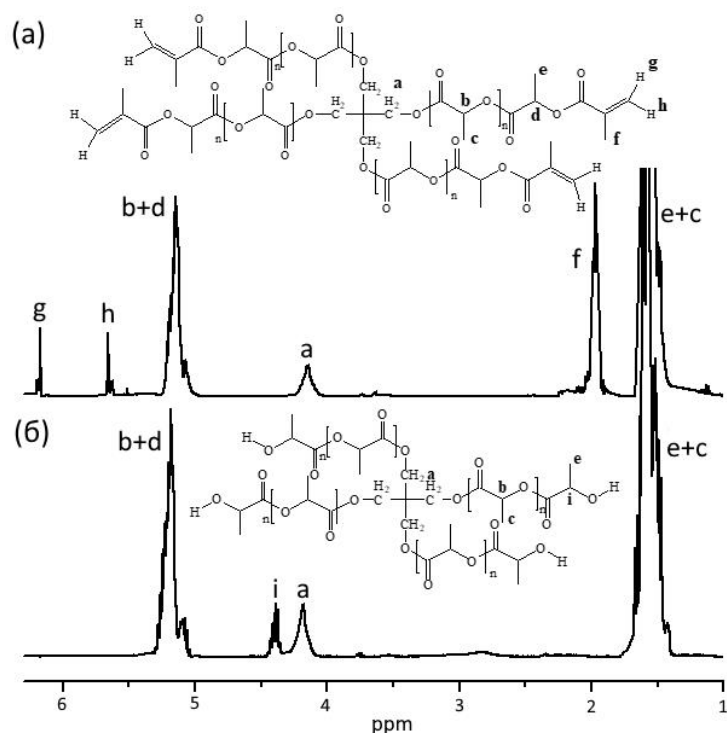


Рисунок Г.2 – Спектры ЯМР ^1H : (а) модифицированного метакрилоил хлоридом поли(D,L-лактида); (б) тетрафункционального поли(D,L-лактида)

Кривые ГПХ (Рисунок Г.3) смещаются в высокомолекулярную область после модифицирования. Среднечисловая масса модифицированного образца хорошо согласуется с теоретически рассчитанной приняв, что все гидроксильные концевые группы в ходе реакции были замещены на метакрилатные, а побочные процессы практически отсутствуют.

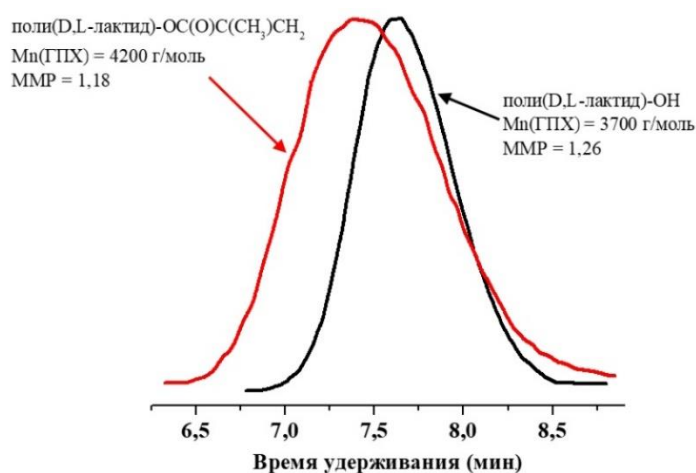


Рисунок Г.3 – Кривые ГПХ полученных тетрафункциональных поли(D,L-лактидов)

Приложение Д

Установки лазерной стереолитографии

Для подбора скорости печати [221] использовали ультрафиолетовый твердотельный лазер с диодной накачкой: длина волны 263 нм, мощность 25 мВт, длительность импульса 4 нс, частота до 4 кГц, диаметр лазерного пятна 100 мкм, интенсивность излучения на поверхности ФПК 0,2 Вт/см². Для перемещения лазерного пятна по поверхности ФПК использовали двухзеркальный гальваносканер LScanH-10 (Атеко, Россия), поле сканирования равнялось 11×11 мм (Рисунок Д.1).

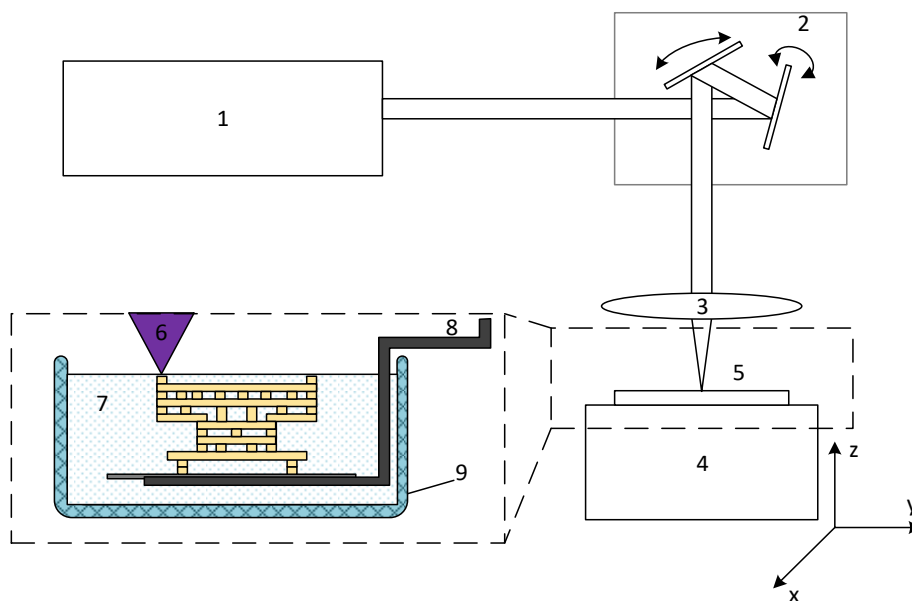


Рисунок Д.1 – Схема лазерного стереолитографа для подбора скорости печати: 1 – лазер, 2 – двухзеркальный гальваносканер, 3 – линза, 4 – трехкоординатный стол, 5 – кварцевая подложка, 6 – сфокусированный лазерный луч, 7 – ФПК, 8 – Z-подвижка, 9 – кварцевая кювета

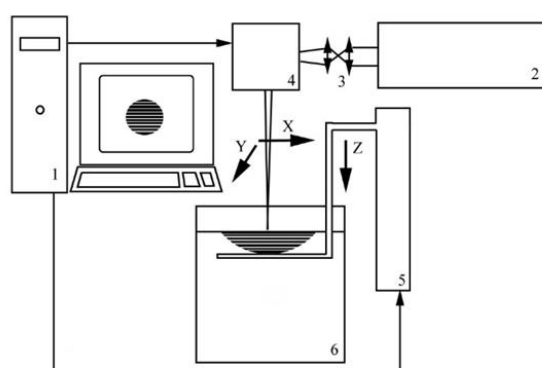


Рисунок Д.2 – Схема и фотография лазерного стереолитографа ЛС120: 1 – управляющий компьютер, 2 – HeCd лазер (длина волны 325 нм), 3 – оптическая система, 4 – сканатор, 5 – устройство вертикального перемещения платформы, 6 – емкость с ФПК

Приложение Е

Клеточные испытания материалов на основе хитозана

Исследование биосовместимости в условиях *in vitro* проводили с использованием вытяжек и путем культивирования клеток на поверхности материалов. В качестве модельной среды для приготовления вытяжек использовали культуральную среду ДМЕМ/F-12 с добавлением 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Вытяжки готовили с соблюдением асептики в течение трех суток при 37°C, на каждый материал делали три пробы. Соотношение площади поверхности материала и объема модельной среды составляло 1,13 см²/1000 мл среды. Цитотоксическое действие растворимых примесей, содержащихся в вытяжках материалов, на фибробласты линии NCTC L929 оценивали с помощью МТТ-теста согласно описанной процедуре [324].

Для определения адгезионных характеристик материалов и их взаимодействия с субстратзависимыми клетками использованы МСК, выделенные из абортивного аутопсийного материала плодов человека по методике, разработанной ранее [325]. Культивирование клеток проводили в среде ДМЕМ/F-12 (1:1, Life technologies, США), содержащей также 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США), 2 ммоль L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, раствор витаминов (ПанЭко, Россия) при 37°C в атмосфере 5% CO₂. По мере роста и достижения субконфлюэнтного состояния клетки обрабатывали 0,25% раствором трипсин-ЭДТА и производили их пересев (пассаж) в новые флаконы (клеточную массу одного флакона разделяли на два флакона). Для исследований использовали клетки на четвертом пассаже. Клетки высевали на поверхность исследуемых образцов с плотностью 50 тыс./см² и культивировали в течение 7 и 23 дней. Оценку морфологии и жизнеспособности клеток проводили на микроскопе Axiovert 200 (Karl Zeiss, Германия) с использованием флюоресцентного окрашивания набором красителей L-7007 LIVE/DEAD Bac Light Bacterial Viability Kit (Invitrogen, США).

По завершении культивирования проводили подготовку образцов для исследования с помощью СЭМ, для чего образцы промывали в 0,1 М ФСБ (рН = 7,4) и фиксировали 12 ч при 5°C в 2,5%-м забуференном растворе глutarового альдегида. После фиксации образцы промывали ФСБ и дегидратировали при 4°C последовательно в батарее водного раствора этанола возрастающей концентрации: 50, 75, 80, 90% и в абсолютном этаноле на заключительном этапе. На каждой стадии образцы дважды погружали на 5 мин в соответствующий раствор этилового спирта. Для удаления спирта образцы переносили на 30 мин в гексаметилдисилазан, после чего высушивали на воздухе [211].

Исследования цитотоксичности *in vitro* для трехмерных структур до и после скCO₂ проводили следующим образом. Перед экспериментом фибробласты мыши линии NIH 3T3 культивировали в культуральной среде, состоящей из 10% ДМЕМ/F-12, 50 мкг/мл гентамицина, 2 mM L-глутамин и 1 mM буферного агента HEPES. Готовили суспензию клеток с концентрацией 10⁵ клеток/мл. Планшеты с клетками инкубировали (36 ± 2) ч при 37°C во влажной атмосфере, содержащей (5 ± 1)% CO₂, до образования клетками (80 ± 10)% монослоя. Уровень конфлюэнтности (доли поверхности подложки, которую занимают клетки) монослоя оценивали с помощью оптической системы IncuCyte Zoom.

Конфлюэнтность клеточного слоя в лунках, а также отсутствие контаминации клеток, оценивали через 36 ч с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti (Nikon, Япония). Из лунок удаляли среду, помещали образец непосредственно на клеточный слой в середине лунки, после чего добавляли по 0,5 мл свежей среды. Планшеты инкубировали в течение 24 ч при 37°C во влажной атмосфере, содержащей (5 ± 1)% CO₂. Через 24 ± 2 ч инкубации из лунок удаляли содержимое и промывали сбалансированным солевым раствором Хенкса. Затем в каждую лунку добавляли 0,1% раствор витального красителя трипанового синего. Через 1–2 мин краситель удаляли из лунок, аккуратно промывали лунки раствором Дюльбекко, после чего сразу же производили оценку культуры на наличие морфологических изменений и/или уменьшения

плотности клеток. Полученные результаты интерпретировали с помощью Таблицы Е.1 [218].

Таблица Е.1 – Степень реакции клеток

Степень реакции	Реакция	Описание реакционной зоны
0	Отсутствует	Нет никакой реакции клеток вокруг образца и под ним
1	Незначительная	Некоторые клетки под образцом имеют измененную морфологию или разрушены
2	Нерезкая	Зона разрушения (лизиса) клеток ограничивается площадью под образцом
3	Умеренная	Зона лизиса распространяется на 1 см вокруг образца
4	Резкая	Зона лизиса распространяется больше, чем на 1 см вокруг образца

Приложение Ж

Имплантация и гистологический анализ материалов на основе хитозана

Имплантация пленочных образцов и 3D-структур (толщиной 2 мм) выполнена белым крысам линии Vistar (средний вес = 450 г) под кожу межлопаточной области. Использовано по 5 животных на каждый тип образца. Все манипуляции над животными выполняли под анестезией. Для премедикации использовали 0,03 мл раствора Атропина (0,1%), 0,02 мл раствора Димедрола (10 мг/мл) в комбинации с 0,05 мл раствора Дроперидола (2,5 мг/мл) внутримышечно одномоментно (правое бедро). В качестве наркоза использовали 0,06 мл раствора Золетила (100 мг/мл) в сочетании с 0,04 мл раствора Ксила (20 мг/мл) внутримышечно одномоментно (левое бедро). Образцы размером 0,8×0,8 см вводили под кожу и фиксировали нерассасывающимися швами (пролен 5–0) за 4 угла образца к мышцам межлопаточной области. Животных выводили из эксперимента путем прямого введения в сердце 10 мл 2,5%-го раствора новокаина на 30 суток для пленочных образцов и на 30, 60 и 90-е сутки для 3D-структур. Затем производили иссечение участка ткани размером 2×2 см из межлопаточной области, ориентируясь на нерассасывающиеся метки по углам образцов.

Фрагменты тканей фиксировали в растворе 10%-го нейтрального формалина, далее готовили парафиновые блоки по стандартной методике. Поперечные серийные срезы образцов окрашивали гематоксилином, эозином и пикросириусом красным на коллагеновые волокна. Препараты изучали при помощи световой, фазово-контрастной и поляризационной микроскопии. Исследование, анализ и фотографирование гистологических препаратов проводили с использованием микроскопа «LEICA DM4000 B LED» (Leica Microsystems, Швейцария).

В ходе гистологического исследования проведена морфометрия толщины капсулы вокруг образцов, а также полуколичественная оценка степени изменения тинкториальных свойств и резорбции материала образцов, зрелости соединительнотканной капсулы вокруг них, интенсивности макрофагальной и гигантоклеточной инфильтрации. Для пористых 3D-структур производили оценку степени прорастания пор соединительнотканными прослойками и степени их васкуляризации. Оценка толщины капсулы производилась путем морфометрического исследования 10 выбранных точек на равном расстоянии друг от друга, при этом учитывались участки с наибольшей и наименьшей толщиной капсулы. При полуколичественной оценке использовали четырехбалльную систему: 0 баллов соответствовало отсутствию изменений, 1 – минимальным изменениям, 2 – изменениям умеренной степени выраженности, 3 – максимальным изменениям. Данные проверяли на нормальное распределение методами Shapiro-Wilk и D'Agostino&Pearson normality test. Различия в группах считали достоверными при значении коэффициента корреляции Пирсона $p < 0,05$.

Приложение 3

Клеточные испытания гибридных материалов

а) МТТ-тест [215, 216]

Тест на экстракцию основан на измерении МТТ-редуктазной активности мышинных фибробластов линии NIH 3T3, подверженных воздействию экстрактов интактных и армированных пленок и губок. Экстракты готовили путем 24-часовой инкубации стерилизованных 70% этанолом образцов (общая площадь поверхности 6 см²) в 1 мл культуральной среды DMEM/F-12 с добавлением 100 ед./мл стрептомицина, 100 мкг/мл пенициллина, 1 об.% ГлутаМАКСа (Gibco) и 5 об.% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, HyClone). Мышине фибробласты линии NIH 3T3 высаживали в 96-луночные планшеты в концентрации 5000 клеток на лунку и культивировали в увлажненном инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C в культуральной среде с добавлением 10 об.% ЭТС в течение 24 часов.

После этого культуральную среду отбрасывали и в лунки добавляли серийные разведения экстрактов на 24 ч. Затем оценивали МТТ-редуктазную активность клеток по отношению к необработанным клеткам (отрицательный контроль). Раствор додецилсульфата натрия (ДСН) использовали в качестве положительного контроля в диапазоне концентраций от 5 до 200 мкг/мл для пленочных образцов и от 13 до 500 мкг/мл для губчатых образцов. Для МТТ-теста экстракты и контрольную среду заменяли 100 мкл раствора МТТ (0,5 мг/мл в среде без добавок) с последующей 3-часовой инкубацией в CO₂-инкубаторе при 37°C. После удаления раствора МТТ во все лунки добавляли 100 мкл алиquot диметилсульфоксида и перемешивали. Полученный цвет определяли количественно путем измерения оптической плотности при 550 нм с использованием фотометра для микропланшетов Multiscan FC.

б) Исследование направленного роста клеток на ПГМ [215]

Для изучения адгезивности и характера роста клеток на поверхности ПГМ использовали культуру фибробластов, полученных из кожно-мышечной ткани 13-дневных эмбрионов мышей линии C57BL/6-Tg(ACTbEGFP)1Osb/J. Клетки культивировали в среде DMEM/F-12 (1:1) с добавлением 10% ЭТС и 100 ед./мл пенициллина/стрептомицина при 37°C в атмосфере 5% CO₂. На пятом пассаже клетки высаживали на поверхность ПГМ, предварительно стерилизованных в 70%-м растворе этанола и помещенных в питательную среду. Спустя 72 часа культивирования проводили оценку морфологии и жизнеспособности клеток с помощью микроскопа Axiovert 200 (Karl Zeiss, Германия). Для визуализации клеток образец окрашивали витальными красителями: иодидом пропидия и SYTO 9 (Invitrogen, США).

в) Культивирование МСК на ГГМ [216]

Для изучения адгезивности и роста клеток на ГГМ использовали МСК костного мозга человека 4-го пассажа. ГГМ предварительно стерилизовали и помещали в среду. Нарезали фрагменты размером 3×3 мм, в течение 15 мин обрабатывали ЭТС. Шприцем заполняли образец клетками в концентрации 10⁶ в 0,5 мл культуральной среды. Адгезию клеток проводили при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 1,5 ч. Затем в культуральный сосуд добавляли полный объем среды с сывороткой и продолжали культивировать на протяжении 2 месяцев при регулярной смене среды.

Заселение ГГМ клетками изучали с помощью конфокального микроскопа «Nikon A1 Multiphoton» и светового инвертированного микроскопа «Nikon Eclipse TS 100». При конфокальной микроскопии для визуализации клеток образец фиксировали 4%-м раствором формалина, ядра окрашивали гомодимером бромистого этидия (ThermoFisher Scientific).

Приложение И

Формирование трехмерных микроструктур методом двухфотонной стереолитографии

В качестве источника лазерного излучения использовали вторую гармонику иттербиевого фемтосекундного лазера «ТеМа-100» (Avesta-Project, Россия) с длиной волны 525 нм, длительностью импульса 200 фс и частотой 70 МГц. Оптический затвор (Рисунок И.1(b)) действует как акустооптический модулятор, позволяя включать и выключать лазер с частотой более 1 МГц. Для управления мощностью лазерного излучения использовали полуволновую пластину, расположенную на моторизованной вращающейся подвижке, и поляризационный светоделительный кубик. Для непрерывного контроля мощности лазера применяли измеритель мощности (Рисунок И.1(c)). Для доставки излучения в заданную область ФПК использовали систему, состоящую из гальвосканера, с установленным на нем микроскопическим объективом (4× или 20×). Гальвосканер обеспечивает высокоскоростное перемещение излучения в плоскости действия объектива (диаметр около 1000 мкм для объектива 4× и 200 мкм для 20×). Образец помещали на XY-координатный столик, лазерный луч был сфокусирован в вокселе (трехмерном пикселе), который имеет форму эллипсоида: диаметр по XY около 6 мкм и высота около 15 мкм для объектива 4×; 2 и 5 мкм соответственно для объектива 20×.

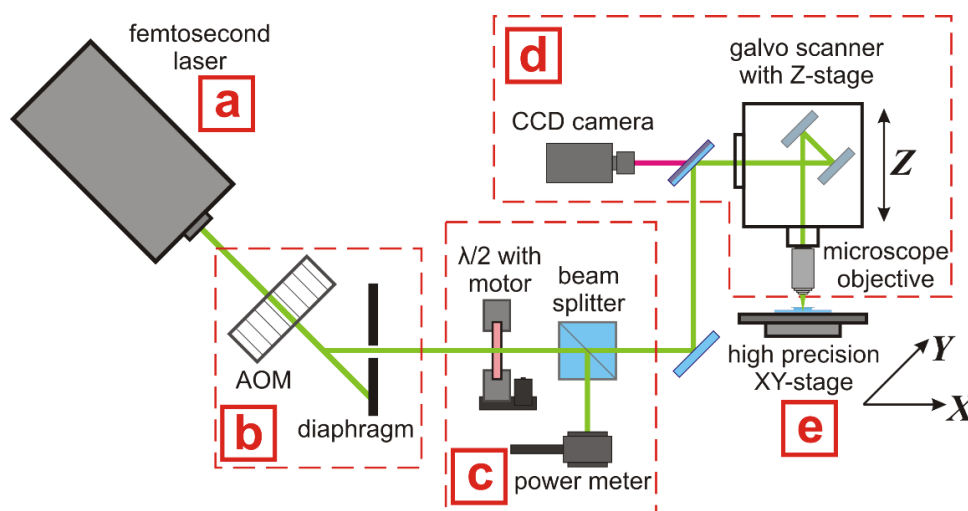


Рисунок И.1 – Схема установки 2ФП стереолитографии [214]

Каждый слой трехмерной структуры формировали перпендикулярно предыдущему, при этом делали нахлест слоев друг на друга (Рисунок И.2). Величину нахлеста варьировали путем изменения параметра Z-Slice – вертикального расстояния между центрами вокселей. Каждый слой состоял из параллельных линий, которые были сформированы с использованием различных значений параметра XY-hatch – горизонтального расстояния между центрами вокселей.

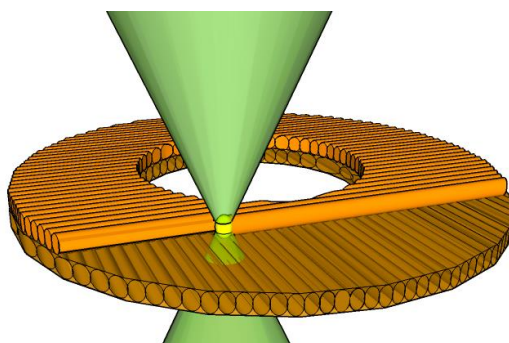


Рисунок И.2 – Послойное формирование единичного элемента трехмерных структур

Для формирования полимерных структур собирали систему, изображенную на Рисунке И.3 (а). Для оценки влияния параметров Z-Slice и XY-hatch на механические свойства полимерных структур формировали образцы в виде цилиндров диаметром 1 мм, высотой 0,5 мм и диаметром пор 50 мкм (Рисунок И.3б) [214]. Кроме того, использовали модель трехмерной структуры с элементом в виде цилиндра высотой 200 мкм, с внешним диаметром 250 мкм, диаметром отверстия 150 мкм (Рисунок И.3в). После изготовления первого слоя над ним формировали второй слой с нахлестом 20 мкм и смещением в горизонтальной плоскости на 50 мкм.

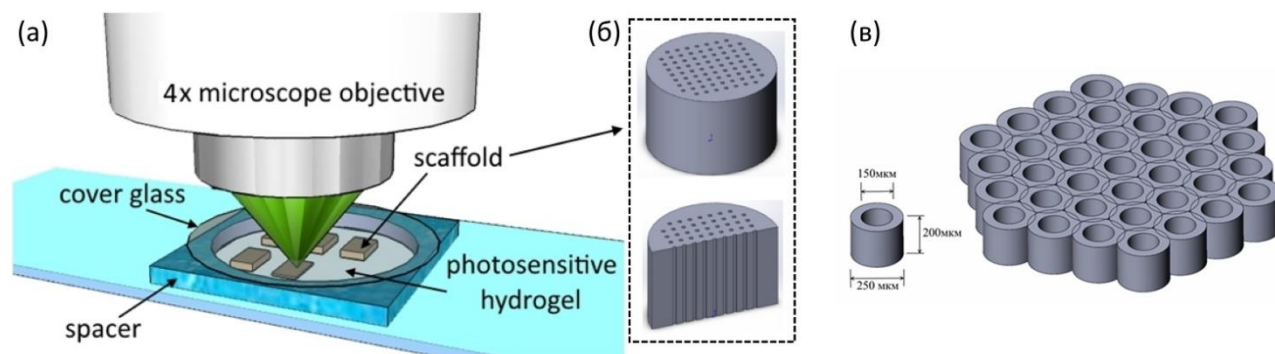


Рисунок И.3 – Экспериментальная система для формирования трехмерных структур (а) и примеры компьютерных моделей трехмерных структур (б, в)

3D-структуры на основе АХ и ХЛ отмывали от несшитого материала в деионизированной воде в течение 4–5 часов. Для трехмерных структур из полилактида проводили циклическую отмывку в хлороформе в течение суток.

Приложение К

Методики клеточных и *in vivo* экспериментов для трехмерных микроструктур

а) Культивирование первичных культур клеток гиппокампа и оценка их жизнеспособности на трехмерных структурах из хитозана

Первичные культуры получали путем обработки эмбриональной ткани гиппокампа мыши (линия C57BL/6) 0,25%-м раствором трипсина («Invitrogen», Россия) по методу, разработанному в [326].

На образцах из АХ культивировали диссоциированные клетки в количестве 9000 клеток/мм², среда – Neurobasal («Invitrogen», Россия), содержащая биоактивную добавку B27, L-глутамин и эмбриональную телячью сыворотку («ПанЭко», США). В качестве контроля культивировали первичные гиппокампальные культуры на покровных стеклах (18×18 мм). Особенности формирования нейронных сетей первичных культур гиппокампа на трехмерных структурах оценивали в течение 30 сут культивирования *in vitro* с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа DMIL HC («Leica», Германия).

Для определения жизнеспособности клеток проводили окрашивание первичных культур флуоресцентными красителями – пропидий йодидом («Sigma», США) и бис-бензими́дом («Sigma», США), позволяющими детектировать соответственно ядра погибших клеток и общее количество клеток в культуре [327]. Количество погибших клеток рассчитывали как отношение клеток, окрашенных пропидий йодидом, к клеткам, окрашенным бис-бензими́дом, по формуле:

$$NM = (N_{\text{propidiumiodide}}/N_{\text{bisbenzimidide}}) \times 100\%.$$

Полученные результаты статистически обработаны, различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

б) Эксперименты in vitro с полилактидными структурами

Мезенхимальные стволовые клетки человека, полученные из жировой ткани (МСК-Ж) выделены и культивированы как описано в [328]. Для трехмерных структур использовали клетки 6–7 пассажей. Стерилизацию проводили УФ-светом в течение 30 мин до культивирования. Каждый образец засеивали 10⁵ клеток/см² в 48-луночном планшете. Остеогенно индуцирующая среда состояла из ДМЕМ/F-12 с добавлением 10%-й фетальной бычьей сыворотки, 1 мкМ дексаметазона, 50 мкМ аскорбат-2-фосфата и 10 мМ β-глицерофосфата. Срок эксперимента – 28 дней. Для анализа образцов с клетками использовали инвертированный флуоресцентный микроскоп (Carl Zeiss, Германия).

в) Эксперименты in vivo с полилактидными структурами

Эксперименты *in vivo* проводили на 4-недельных мышах-самцах C57/Bl6. Мышей анестезировали Золетилом (80 мг/кг). Дефекты критического размера диаметром четыре миллиметра созданы в черепной кости каждого животного с использованием стоматологического бора. Сразу после формирования дефекта производили имплантацию трехмерных структур с и без МСК-Ж (контроль). Для анализа костеобразования кости черепа извлекали через 5 или 10 недель после имплантации. Для оценки остеогенеза использовали окраску ализарином красным С (Sigma Aldrich, Германия).

Приложение Л

Биосовместимость и биологическая активность трехмерных структур на основе производных хитозана

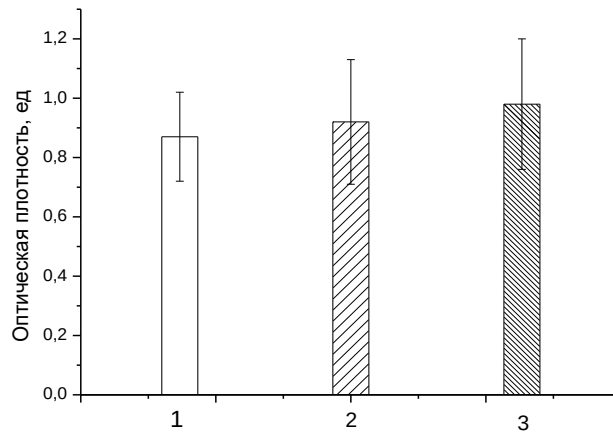


Рисунок Л.1 – Метаболическая активность фибробластов линии NCTC L929 по результатам МТТ-теста при инкубации 48 ч с трехсуточными вытяжками из материалов: 1 – AX10; 2 – AX10+ПЭГ-ДА; 3 – на поверхности покровного стекла

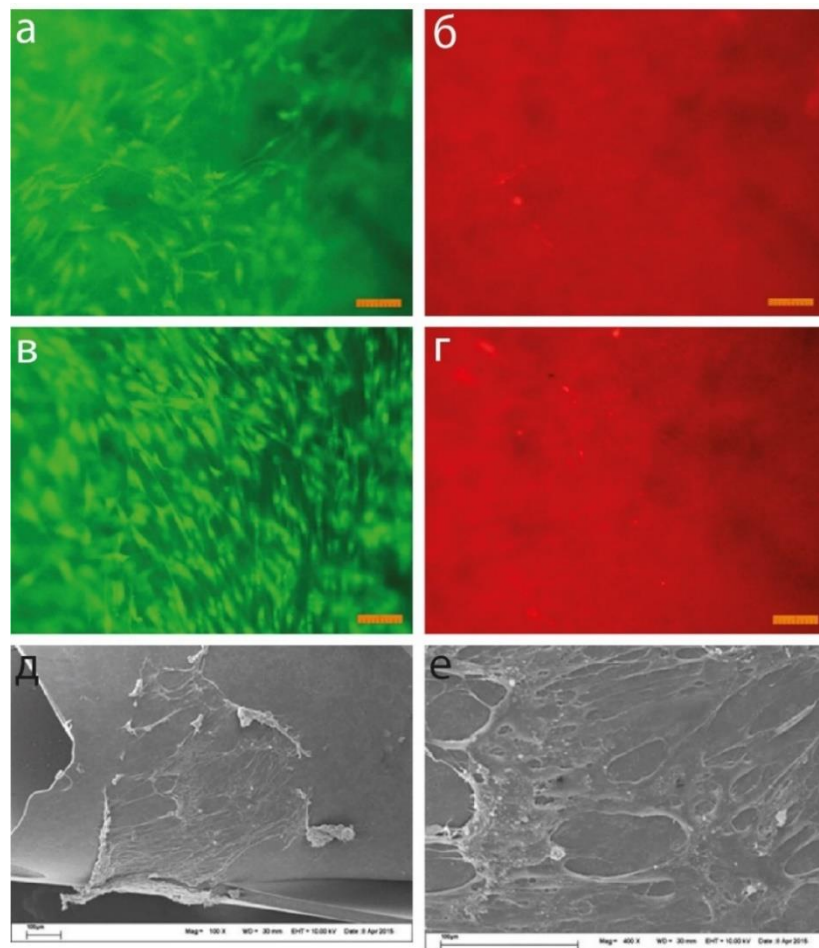


Рисунок Л.2 – Внешний вид МСК человека при инкубации на поверхности образца из AX10: 1-е сутки инкубации (а, б); 7-е сутки инкубации (в–е). Окраска клеток Syto 9 (а, в); окраска мертвых клеток пропидий йодом (б, г); микрофотографии СЭМ (д, е)

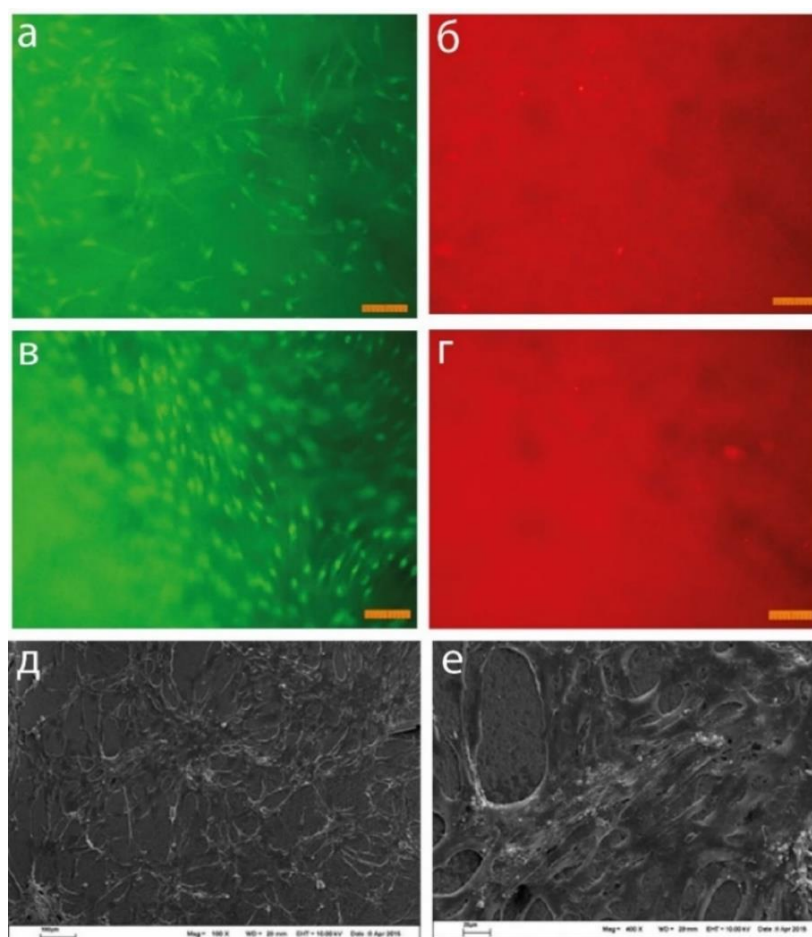


Рисунок Л.3 – Внешний вид МСК человека при инкубации на поверхности образца из AX10+ПЭГ-ДА: 1-е сутки инкубации (а, б); 7-е сутки инкубации (в–е). Окраска клеток Syto 9 (а, в); окраска мертвых клеток пропидий йодом (б, г); микрофотографии СЭМ (д, е)

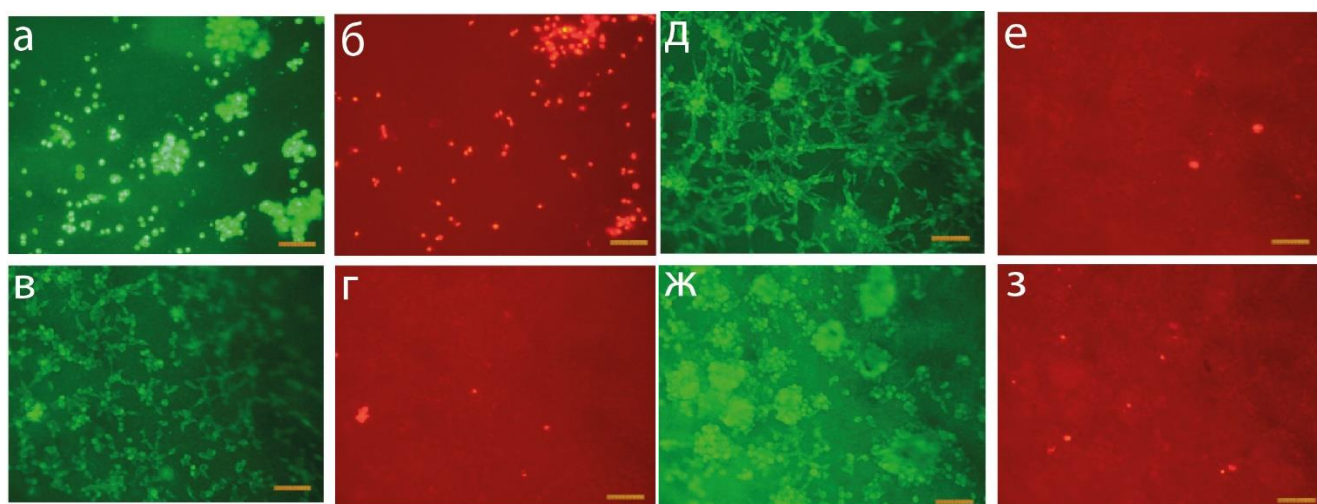


Рисунок Л.4 – Внешний вид фибробластов линии NCTC L929 на поверхности образцов на основе немодифицированного хитозана (а, б); AX10 (в, г); AX20 (д, е); AX50 (ж, з). Окраска клеток Syto 9 (зеленый); окраска мертвых клеток пропидий йодом (красный). Линейка 100 мкм

Приложение М

Биосовместимость трехмерных структур до и после обработки сверхкритическим диоксидом углерода

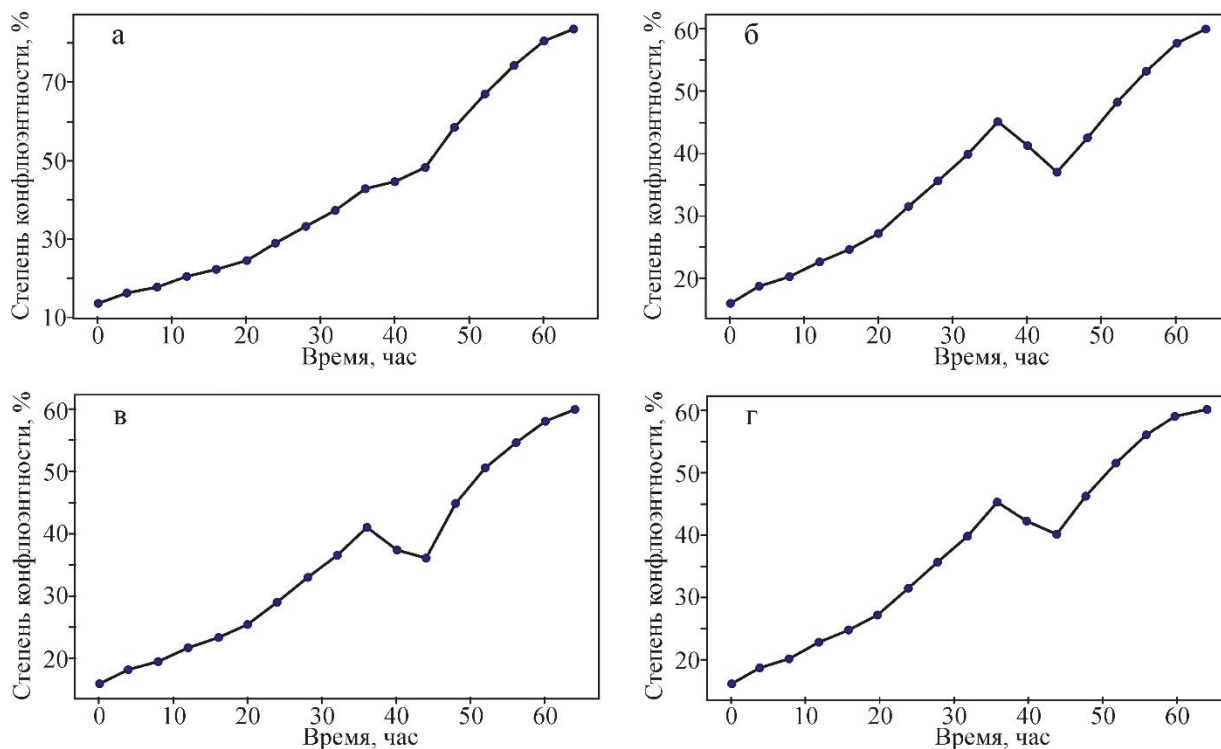


Рисунок М.1 – Изменение степени конфлюэнтности клеточного слоя: а – контроль; б – исходная необработанная структура; в – структура после статического режима scCO_2 обработки; г – структура после проточного режима scCO_2 обработки

Через 36 ч после начала культивирования наблюдается резкое падение степени конфлюэнтности, связанное с исключением из расчета площади под образцом и гибелью части клеток вследствие механического воздействия при замене культуральной среды (Рисунок М.1, б–г). После 44 ч эксперимента рост клеток продолжился для всех образцов, однако к 64 ч культивирования достигнуты различные уровни конфлюэнтности. Максимальный уровень 67% получен для образцов после scCO_2 обработки в статическом режиме, для остальных образцов этот показатель находился на уровне 60%.

Для исходной трехмерной структуры реакция клеток оценена как незначительная, согласно принятой шкалы оценки [329], т.е. лишь некоторые клетки имели измененную морфологию или были разрушены. Наблюдалась некоторая неоднородность проявления цитотоксического эффекта по всей границе трехмерной структуры. На некоторых участках исходного образца цитотоксический эффект не проявлялся вообще. Образцы после scCO_2 обработки не оказывали цитотоксического действия на клетки (Таблица М.1) [218].

Таблица М.1 – Степень реакции фибробластов линии NIH 3T3 на полимерные структуры

	Реакция	Выводы
Исходная структура	Незначительная	Цитотоксично
Структура; статический режим scCO_2	Отсутствует	Не цитотоксично
Структура; проточный режим scCO_2	Отсутствует	Не цитотоксично
Отрицательный контроль	Отсутствует	Не цитотоксично
Положительный контроль	Резкая	Цитотоксично

Приложение Н

Результаты имплантации и гистологии материалов на основе хитозана

На 30-е сут после имплантации пленок и 3D-структур признаки их биodeградации отсутствуют, а тинкториальные и светооптические свойства образцов близки (Рисунки Н.1, а, б; Н.2; Н.3). При поляризационной микроскопии пленки и 3D-структуры изотропны (нет двойного лучепреломления), при окраске гематоксилином и эозином имеют гомогенную структуру. При окраске пикросириусом красным материалы пикринофильны, при этом в пленках определяется четкая периодичная структура, а в 3D-структурах она выражена крайне слабо. Все образцы имплантированных материалов окружены двухслойной соединительнотканной капсулой неравномерной толщины. Внутренний слой капсулы состоит из незрелой соединительной ткани с макрофагами и гигантскими клетки типа инородных тел, внешний слой капсулы – из более зрелой соединительной ткани. Достоверные различия в тканевой реакции на пленки и 3D-структуры на этом сроке отсутствуют (Рисунки Н.1, а, б; Н.2, а, б, г–е; Н.3, а, б). В связи с наблюдаемой в ходе эксперимента хрупкостью пленок (Рисунки Н.1, а; Н.2, а, б) для дальнейшего изучения долгосрочной стабильности использовали только пористые 3D-структуры.

На 60-е и 90-е сут после имплантации макроскопические признаки биodeградации материалов отсутствуют. Усиливается гигантоклеточная реакция, соединительная ткань вокруг и внутри 3D-структур становится более зрелой, прорастает глубже, но не занимает полностью все поры материала. Вышеперечисленные проявления тканевой реакции на образцы, достоверно не отличаются между сроками после имплантации, за исключением уменьшения максимальной толщины капсулы на 90-е сутки и достоверно большей степенью ее зрелости по сравнению с 30-ми сутками (Рисунки Н.1, в, г; Н.4; Н.5). Кроме того, отмечаются положительные корреляции между сроком после имплантации и степенью зрелости соединительной ткани капсулы (коэффициент = 0,74 ($p = 0,0017$)), степенью прорастания пор образца (коэффициент = 0,55 ($p = 0,00346$)) и васкуляризацией (коэффициент = 0,55 ($p = 0,00346$)). О созревании капсулы также свидетельствуют отрицательные корреляции между сроком после имплантации и ее толщиной (коэффициенты $-0,53$ ($p = 0,0429$) для минимальной толщины капсулы и $-0,54$ ($p = 0,0398$) для максимальной). Начиная с 60-х сут, в основном вблизи макрофагов и гигантских клеток, в материале септ образцов отмечаются фокальные изменения тинкториальных свойств (базофилия при окраске гематоксилином и эозином, появление красного окрашивания при окраске пикросириусом красным) в сочетании с единичными, мелкими участками лизиса септ. Эти изменения подтверждаются наличием положительных корреляций между вышеуказанными изменениями и сроком после имплантации (коэффициенты 0,88 ($p < 0,00001$) для изменений тинкториальных свойств и 0,52 ($p = 0,0471$) для лизиса септ). Однако, достоверные различия между 60 и 90 сут по степени выраженности этих изменений отсутствуют.

Резорбция хитозановых материалов в виде появления базофилии показана также в работах [273, 275]. Авторы [275] использовали окраску гематоксилином и эозином в сочетании с красителем Luxol fast blue и предположили, что при деградации хитозана лизоцимом гидролизованная $\beta(1\rightarrow4)$ -гликозидная связь приводит к образованию свободной аномерной гидроксильной группы на расщепленном остатке, которая вместе с C2-аминогруппой способна к образованию комплекса с алюминийсодержащим гематоксилиновым красителем. По-видимому, введение аллильных групп не закрывает доступ ферментов (лизоцима, хитиназы, хитозаназы, глюкозаминидазы), способных к расщеплению гликозидных связей в хитозане [330]. Детальное исследование взаимосвязи тинкториальных и физико-химических характеристик хитозана относительно других красителей в работах отсутствует.

В работе при имплантации обоих типов образцов не обнаружено ни некротических, ни выраженных островоспалительных изменений о которых сообщается в ряде работ по имплантации хитозановых материалов [272, 274, 276, 277]. Вероятнее всего, на подавление нейтрофильной инфильтрации сказалось введение аллильных групп в структуру хитозана, что привело к повышению основных свойств фрагментов молекулы хитозана, что по сути схоже с увеличением концентрации аминогрупп, которое предлагается в работах [276, 278, 331–333].

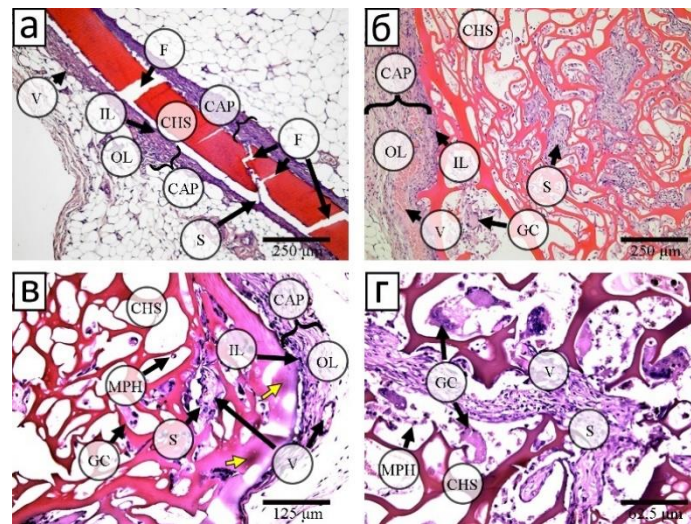


Рисунок Н.1 – Тканевая реакция при имплантации пленок (CHF), (а) и 3D-структур (CHS), (б)–(г). Здесь и далее на Рисунках Н.2–Н.4: CAP – соединительнотканная капсула (внутренний (IL) и наружный (OL) слои); S – соединительнотканые перегородки; V – кровеносные сосуды; GC – гигантские клетки; окраска гематоксилином и эозином; (а) 30 сут: F – разломы и врастание соединительной ткани, 100×; (б) 30 сут: материал оксифилен, 100×; (в) 60 сут: в септах фокусы базофилии (острия стрелок), 200×; (г) 90 сут: большинство септ умеренно базофильны, 400×

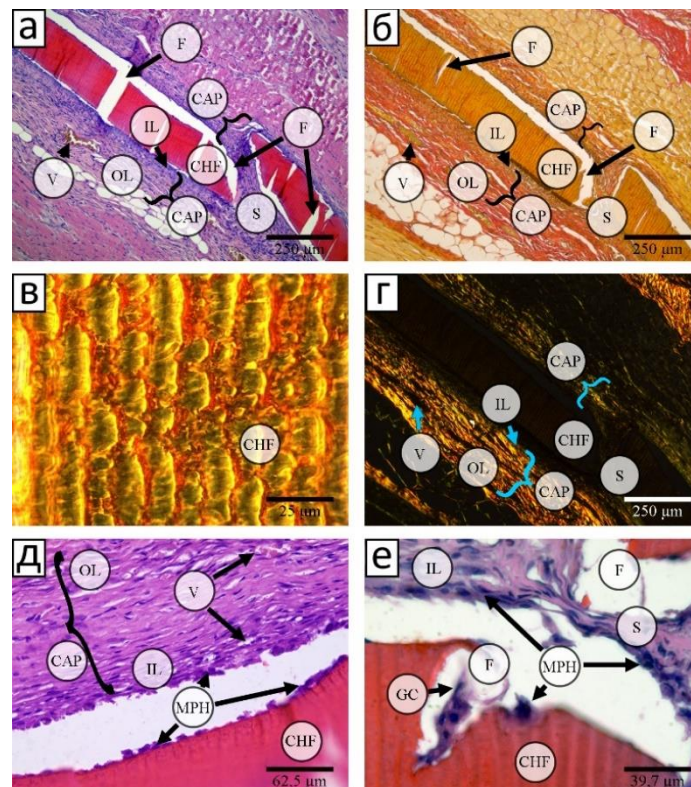


Рисунок Н.2 – Тканевая реакция при имплантации пленок (CHF) (30 сут). MPH – макрофаги; разломы образца, окраска гематоксилином и эозином (а), 100×; окраска пикросириусом красным (б)–(г): периодичная структура материала, 100× (б); фазово-контрастная микроскопия, 1000× (в); (г) в наружном слое капсулы наиболее выраженная анизотропия коллагеновых волокон (желтое и оранжевое свечение), слабая анизотропия (зеленое свечение) во внутреннем слое и в соединительнотканной септе, поляризационная микроскопия, 100×; (д), (е) многочисленные макрофаги и единичные гигантские клетки покрывают снаружи образец: (д) 400×; (е) 630×

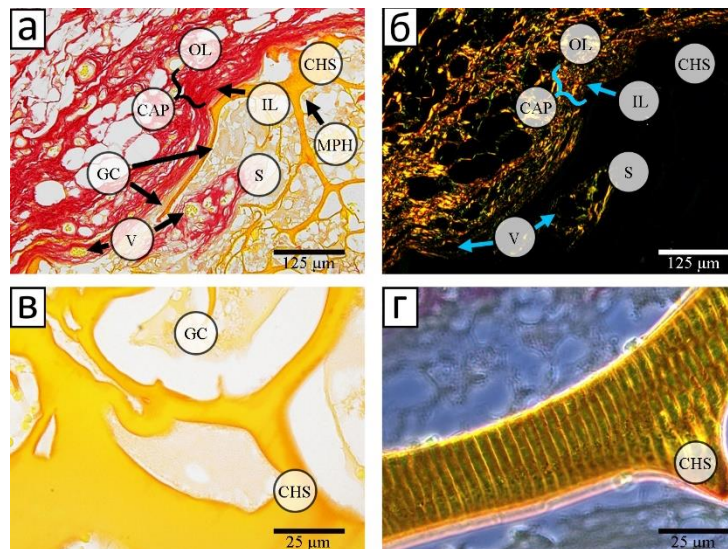


Рисунок Н.3 – Тканевая реакция при имплантации 3D-структур (CHS) (30 сут); окраска пикросириусом красным; (а) материал пикринофилен, гомогенный, в капсуле и в соединительнотканых прослойках значительное количество коллагеновых волокон, кровеносные сосуды в умеренном количестве, 200×; (б) фрагмент предыдущего препарата: материал изотропен, коллагеновые волокна капсулы и септ анизотропны, поляризационная микроскопия, 200×; (в) септы гомогенны, пикринофильны; адгезия к септам гигантских клеток, 1000×; (г) фрагмент Рис. Н.1, а: поперечная исчерченность материала определяется в единичных септах лишь при использовании фазово-контрастной микроскопии, 1000×

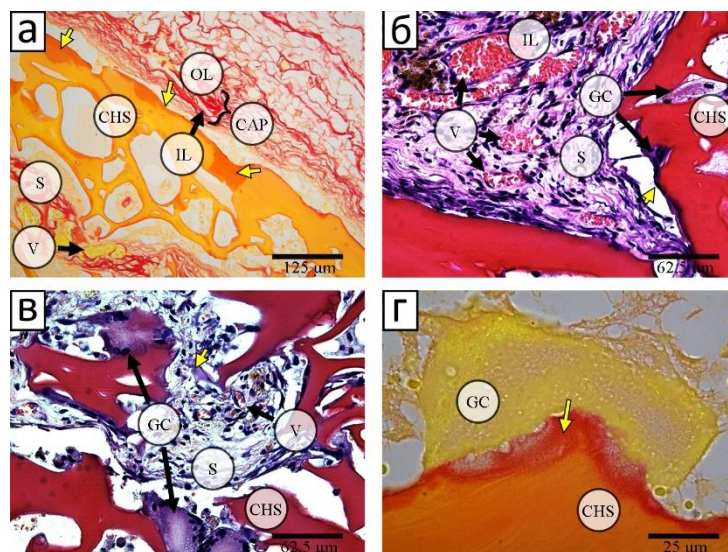


Рисунок Н.4 – Тканевая реакция при имплантации 3D-структур (CHS) (60 сут); участки изменения тинкториальных свойств образцов (острия стрелок): (а), (г) – окраска пикросириусом красным; (б), (в) – окраска гематоксилином и эозином: (а) многочисленные фокусы красного окрашивания материала, в соединительнотканых септах многочисленные кровеносные сосуды, 200×; (б) гигантские клетки на поверхности образца, в крупной соединительнотканной прослойке многочисленные кровеносные сосуды, 400×; (в) в центре истонченная септа образца с резкой базофилией материала; многочисленные гигантские клетки, адгезированные к поверхности материала, 400×; (г) фокус красного окрашивания и признаки резорбции образца в месте адгезии гигантской клетки, 1000×

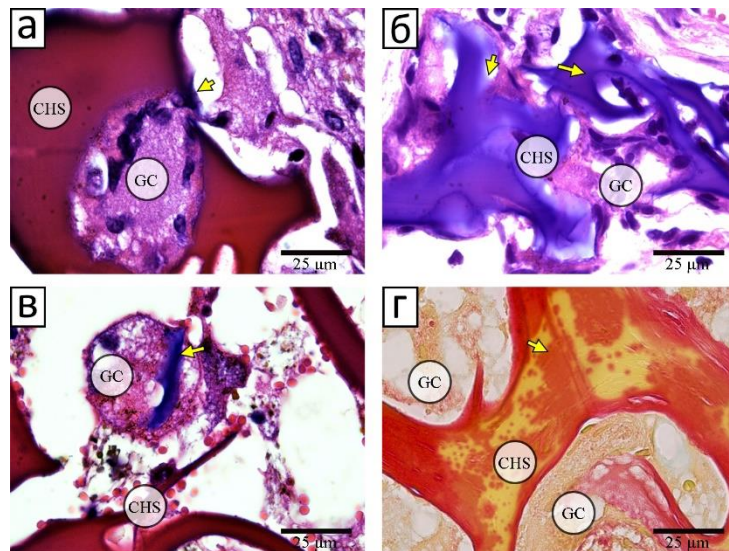


Рисунок Н.5 – Тканевая реакция при имплантации 3D-структур (CHS) (90 сут): GC – гигантские клетки; участки изменения тинкториальных свойств структур (острия стрелок); (а)–(в) – окраска гематоксилином и эозином, (г) – окраска пикросириусом красным, 1000×: (а) материал септы образца с незначительной базофилией, наиболее выраженной в поверхностных отделах, пора образца заполнена гигантской клеткой; (б) резко выраженная базофилия септ, местами видны участки лизиса материала; по периферии гигантские клетки; (в) гигантская клетка с базофильным материалом септы в цитоплазме; (г) фокусы красного окрашивания материала, вблизи гигантских клеток местами видны участки лизиса септ образца; в цитоплазме гигантских клеток мелкие фрагменты материала красного цвета

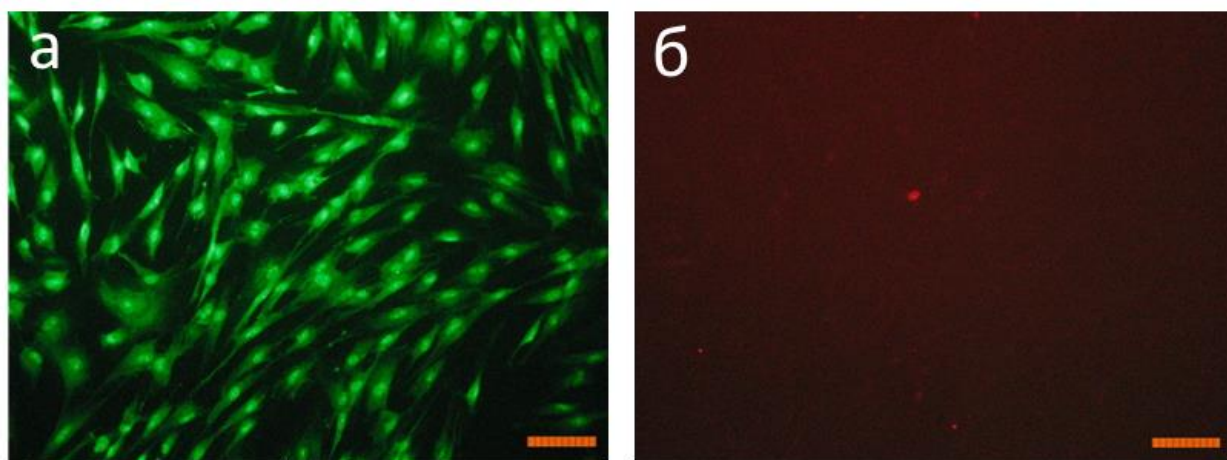
Приложение О**Флуоресцентная микроскопия фибробластов на коллагеновых образцах без полилактидного шаблона**

Рисунок О.1 – Визуализация живых (а) и мертвых (б) мышинных фибробластов линии 3Т3, культивированных на поверхности коллагеновых образцов без армирующего полилактидного шаблона. Масштаб 100 мкм

Приложение II

Биосовместимость трехмерных микроструктур на основе производных хитозана

При исследовании морфологии первичной культуры клеток гиппокампа обнаружено, что в конце первых суток их культивирования с полимерной структурой наблюдалось интенсивное приращение на нее жизнеспособных диссоциированных клеток гиппокампа. Количество приращенных клеток совпадало с контролем и составляло 535 ± 54 клеток в поле зрения. Клетки при приращении имели округлую форму, а после культивирования в течение первых суток начинали формировать отростки. В дальнейшем на поверхности полимерной структуры наблюдалось образование сложных сплетений отростков нервных и глиальных клеток, свидетельствующее об активации процессов формирования сетевой структуры. Таким образом, выбранная архитектура полимерной структуры благоприятствовала формированию морфологически полноценных нейрон-глиальных сетей (Рисунок П.1).

В течение всего периода наблюдения, как нейроны, так и глиальные клетки сохраняли типичные морфологические особенности. Нейроны сохраняли разветвленное дендритное дерево, формирующее многочисленные контакты между клетками. Активный рост клеток наблюдали не только на исследуемом материале, но и рядом с ним на культуральном пластике.

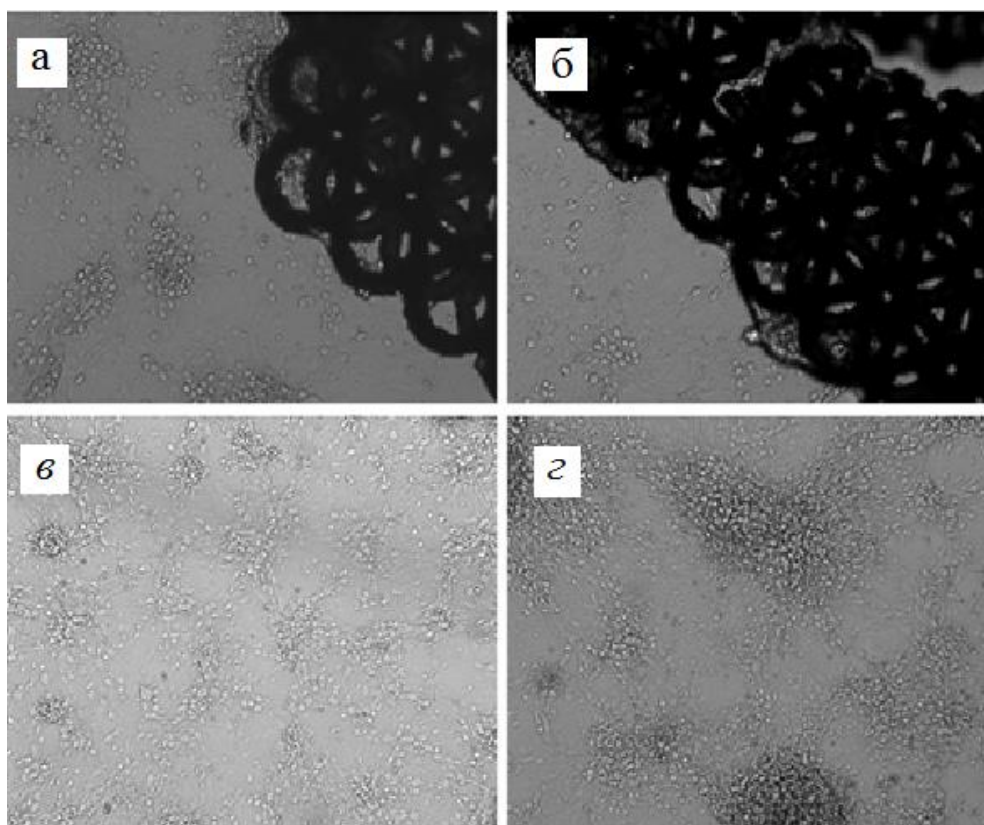


Рисунок П.1 – Микрофотографии диссоциированных клеток гиппокампа, культивируемых на трехмерной структуре на основе аллилхитозана (а и б – 14 и 30 суток, соответственно) и контроля (в, г) на чашке Петри, покрытой полиэтиленимином

Цитотоксичность материала полимерных структур определяли *in vitro* на 7, 14, 21 и 28-й день развития клеток гиппокампа. Оказалось, что клетки первичных культур образовывали после 14 суток конгломераты, характерные для нормального онтогенеза первичных культур. Равномерный рост клеток на всей поверхности полимерных структур сохранялся на протяжении всего периода наблюдения (Рисунок П.2). Установлено, что материал полимерных структур имел высокое сродство к клеткам нервной системы (нейронам и астроцитам). На протяжении всего

периода наблюдения число клеток в культурах, выращенных на полимерных структурах, было равно количеству клеток в контрольных культурах, выращенных на стеклах, покрытых полиэтиленгликолем. Это свидетельствовало о том, что полимерные структуры представляют собой благоприятный носитель для поддержания роста и функционирования нейронных сетей. При этом доля погибших клеток в культуре не превышала 3,5% при всех исследованных сроках культивирования. Таким образом, материал полимерных структур нетоксичен для клеток центральной нервной системы.

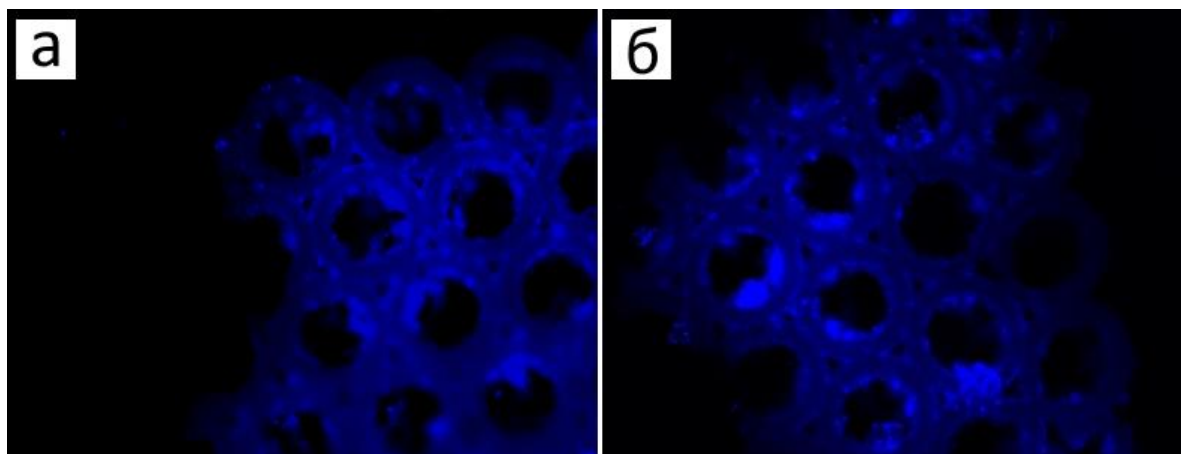


Рисунок П.2 – Микрофотографии окрашенных бис-бензимидами культур диссоциированных клеток гиппокампа, культивируемых на трехмерной структуре на основе аллилхитозана в течение 14 (а) и 28 суток (б)

Приложение Р

Результаты *in vitro* и *in vivo* экспериментов для микроструктур на основе разветвленного полилактида

При посеве МСК-Ж показали высокое сродство к сформированным полимерным структурам, большинство клеток прикрепились и равномерно заселило всю их поверхность (Рисунок Р.1). Несмотря на то, что образцы имеют сильную флуоресценцию по всем каналам, флуоресцентное окрашивание живых и мертвых клеток через 24 ч после посева позволило различить очень небольшое количество мертвых клеток на образцах. Эти результаты указывают на нетоксический характер сформированных трехмерных структур [217].

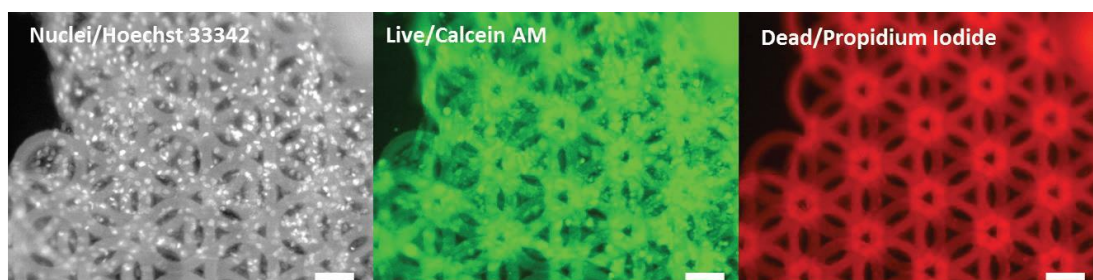


Рисунок Р.1 – Анализ цитотоксичности трехмерных структур на основе полилактида с помощью Live/Dead окрашивания. Окрашивание пропидий йодидом (правое изображение, красная флуоресценция) показало только несколько мертвых клеток на образце

Окрашивание ализариновым красным С проводили непосредственно в лунках для культивирования. При культивировании МСК-Ж в остеогенных условиях происходит отложение минерализованного матрикса как на самом образце из полилактида, так и на всей площади лунки вокруг него (Рисунок Р.2а). В контрольных условиях без остеогенной стимуляции МСК-Ж откладывали минерализованный матрикс только на полилактидном материале и минимально в лунке вокруг. Анализ экспрессии остеокальцина использовали для подтверждения остеогенной дифференцировки МСК-Ж на трехмерных структурах. Иммуногистохимическое окрашивание проводили на 28 день дифференцировки *in vitro* (Рисунок Р.2d, e). Хотя МСК-Ж на образцах, культивируемых в остеогенных условиях, демонстрировали заметно более сильную экспрессию остеокальцина, клетки, культивируемые в контрольных условиях, также были остеокальцин-положительными [217].

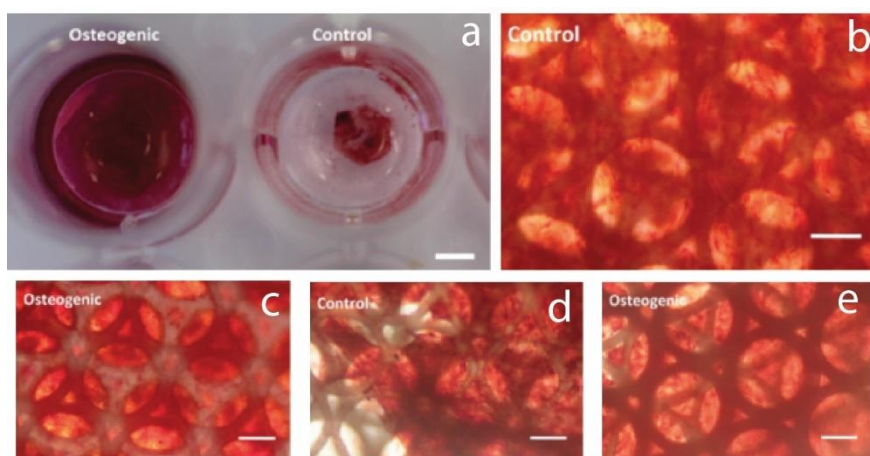


Рисунок Р.2 – Окрашивание полимерных образцов ализариновым красным С (а–с) и остеокальцином (d, e) на 28 день *in vitro* дифференциации

В случае использования биodeградируемых полимерных структур важным является контроль скорости биodeградации. Несмотря на большое количество исследований, где деградация полимерных структур оценивается *in vitro* [335–337], существует лишь небольшой пул работ, предлагающих неинвазивные методы контроля скорости деградации *in vivo* [338]. В случае структурирования методом 2ФП флуоресцентные нетоксичные фрагменты входят в состав образца, что обеспечивает неинвазивный длительный метод оценки скорости деградации образца и замены его нативной тканью *in vivo*. Для сформированных микроструктур продемонстрирована отличная биосовместимость *in vivo* (Рисунок Р.3): при имплантации отсутствовал некроз и воспалительные реакции окружающих тканей (результаты гистологии подробно представлены в опубликованной работе [217]).

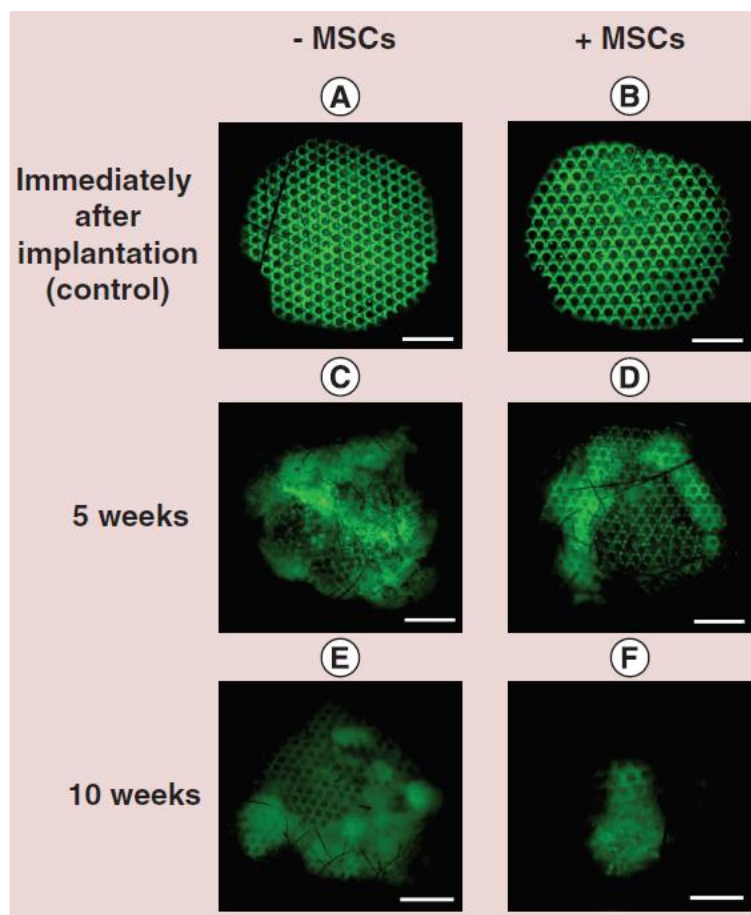


Рисунок Р.3 – Флуоресценция трехмерных микроструктур после имплантации мышам. (А) МСК(–) структуры сразу после имплантации; (В) МСК(+) структуры сразу после имплантации; (С) МСК(–) структуры через 5 недель; (D) МСК(+) структуры через 5 недель; (Е) МСК(–) структуры через 10 недель; (F) МСК(+) структуры через 10 недель. Масштабная линейка для всех изображений 1 мм