

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
**Первый Московский государственный медицинский
Университет имени И.М.Сеченова**
Министерство здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

на тему: «Создание и исследование электроспиннинговых скаффолдов с добавлением секрета для регенеративной медицины»

Направление подготовки

30.05.02 «Медицинская биофизика»

Студент группы 715–01

Упатова Антонина Геннадьевна

Руководитель от структурного подразделения,
младший научный сотрудник

отдела современных биоматериалов

Института Регенеративной медицины

Тугаева Гиляна Константиновна

Научный консультант,

Заведующий отделом современных биоматериалов

Института Регенеративной медицины

Ефремов Юрий Михайлович

Москва, 2026

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОСНОВНЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В СКАФФОЛДИНГЕ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ	10
1.1 Тканевая инженерия	10
1.2 Скаффолды.....	10
1.2.1 Требования к скаффолдам	11
1.2.2 Материалы для скаффолдов	13
1.2.3 Методы создания скаффолдов для доставки секрета МСК.....	14
1.3 Электроспиннинг	18
1.3.1 Параметры, влияющие на эффективность электроспиннинга.....	19
1.4 Материалы для создания скаффолдов	21
1.4.1 Поликапролактон	21
1.4.2 Дихлорметан	23
1.4.3 Секретом МСК	24
1.5 Стратегии загрузки секрета МСК в электроспиннинговые скаффолды	26
2 МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЭЛЕКТРОСПИННИНГОВЫХ СКАФФОЛДОВ НА ОСНОВЕ ПКЛ С ДОБАВЛЕНИЕМ СЕКРЕТОМА МСК	32
2.1 Объекты исследования	32
2.2 Получение рсМСК.....	33
2.3 Получение растворов для электроспиннинга.....	34
2.4 Процесс электроспиннинга	34
2.5 Измерение вязкости растворов	35

2.6 Сканирующая электронная микроскопия	36
2.7 Измерение контактного угла смачивания	36
2.8 Механические испытания	36
2.9 Биodeградация в растворе фосфатно-солевого буфера	37
2.10 Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье	37
2.11 Модель теста на хориоаллантаоисной мембране куриного яйца на эмбрионах Gallus gallus для изучения кровотока и ангиогенного ответа на биоматериалы	37
2.12 Цитотоксичность материала	38
2.13 Контактная цитотоксичность скаффолдов	40
2.14 Оценка пролиферативной и метаболической активности методом окраски Alamar Blue	41
2.15 Микроскопия визуализации времени жизни флуоресценции	42
2.16 Статистический анализ.....	43
3 РЕЗУЛЬТАТЫ	44
3.1 Исследование влияния концентрации и массового соотношения ПКЛ и секрета МСК на реологические характеристики раствора.	44
3.2 Анализ физико-химических и биологических свойств однослойных скаффолдов с хаотичной укладкой	46
3.2.1 Анализ поверхностных свойств.....	46
3.2.2 Анализ механических характеристик	51
3.2.3 Оценка цитотоксичности материалов	53
3.2.4 Оценка ангиогенного потенциала	54
3.3 Анализ физико-химических и биологических свойств двухслойных скаффолдов с различными типами укладки	58
3.3.1 Анализ поверхностных свойств.....	58
3.3.2 Анализ механических характеристик	67

3.3.3 Оценка скорости биodeградации	70
3.3.4 Контактная цитотоксичность.....	72
3.3.5 Оценка пролиферативной активности	74
3.3.6 Оценка результатов микроскопии визуализации времени жизни флуоресценции	76
ВЫВОДЫ.....	80
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	82

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПКЛ – Поликапролактон

pcМСК – раствор секрета мезенхимных стволовых клеток

КУС – Контактный угол смачивания

СЭМ – Сканирующая электронная микроскопия

ФСБ – Фосфатно-солевой буфер

ДСН – Додецилсульфат натрия

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день электроспиннинг является многообещающим методом для создания каркасов для тканевой инженерии [1]. Современные исследования показывают, что потенциал использования скаффолдов высок и такие матрицы можно использовать для восстановления дефектов различных тканей: костной при репарации критических по размеру дефектов, хрящевой, эндотелия сосудов, нервной, дермы и мышечной ткани, для которой имитация внеклеточного матрикса имеет наибольшую важность ввиду большого содержания коллагеновых и фибриновых волокон непосредственно в ткани. [2-7].

С помощью изменения полимерного состава раствора для электроспиннинга возможно получение различных по биосовместимости и цитотоксичности каркасов, что также помогает регулировать скаффолды под нужды каждой ткани индивидуально [8]. За счет схожести с внеклеточным матриксом, регулируемых пористости и диаметра волокна скаффолды способны имитировать микроокружение для клеток любой ткани организма, а изменение параметров плетения позволяет добиться различных механических свойств матрицы. Так с увеличением диаметра сопла увеличивается и толщина волокна, а расстояние между соплом и коллектором и скорость вращения самого коллектора позволяют регулировать хаотичность образуемой микроструктуры. Скорость выдувания раствора также влияет на микроструктуру скаффолда, контролируя пористость напыленного материала [9].

Добавление секрета в скаффолд является перспективным направлением в регенеративной медицине, так как это позволит улучшить качество и скорость заживления дефектов, а также позволит направлять развитие стволовых клеток по определенному пути. Однако для реализации этого метода необходимо найти оптимальный способ загрузки, а также подходящие материалы и структуры, чем и занимаются ученые на сегодняшний день.

Решение этих проблем позволит улучшить качество лечения пациентов и сократить время восстановления поврежденных тканей.

Цель работы – исследовать взаимосвязь между химическими особенностями и функциональными свойствами электроспиннинговых поликапролактоновых скаффолдов, содержащих раствор секрета мезенхимальных стволовых клеток (pcMSC).

Задачи исследования:

1. Установить влияние содержания pcMSC в формовочном растворе на формирование однослойных электроспиннинговых скаффолдов на основе ПКЛ с хаотичной укладкой волокон и на их поверхностные свойства.
2. Определить закономерности изменения механических характеристик однослойных скаффолдов в зависимости от состава формовочного раствора и структуры волокнистой матрицы
3. Оценить влияние состава однослойных скаффолдов на цитотоксичность материалов и ангиогенный ответ в модели хориоаллантоисной мембраны куриного эмбриона.
4. Установить влияние комбинированной архитектуры волокон на поверхностные свойства двухслойных электроспиннинговых скаффолдов, полученных при различном содержании pcMSC в формовочном растворе.
5. Выявить взаимосвязь между составом, архитектурой и механическими свойствами двухслойных скаффолдов и определить параметры, обеспечивающие наиболее сбалансированные механические характеристики.
6. Оценить биологический потенциал двухслойных скаффолдов *in vitro* с учетом их состава, архитектуры и физико-химических свойств.

Научная новизна работы состоит в следующем:

1. Выявлено влияния соотношения ПКЛ и pcMSC на реологические свойства растворов, получаемых для электроспиннинга, и на основании комплекса реометрических исследований получены условия, обеспечивающие стабильность и однородность формируемых волокон.

2. Проведен комплексный физико-химический анализ полученных скаффолдов. Установлены оптимальные параметры соотношения растворов полимеров, обеспечивающие баланс между стабильностью структуры и сохранением биоактивных свойств исходных полимеров.

3. Получены новые данные, согласно которым гидрофильность и биосовместимость скаффолдов коррелируют с изменениями поверхностных свойств за счет модификации ПКЛ-матриц рсМСК.

Практическая значимость работы заключается в том, что разработанные электроспиннинговые скаффолды на основе ПКЛ и раствора секрета МСК, обладают оптимальными физико-химическими и биологическими характеристиками, обеспечивающими эффективную клеточную адгезию и пролиферацию. Это позволяет рекомендовать предложенные материалы для применения в тканевой инженерии, в частности для создания новых материалов, способных эффективно удерживать терапевтические клетки и биологически активные вещества в зоне поражения.

Личный вклад автора в предоставляемую работу состоит в:

1. Анализе и критическом обзоре современных литературных данных, формулировании целей, задач и направлений исследования.
2. Приготовлении и оптимизации всех растворов для электроспиннинга, формировании скаффолдов методом электроспиннинга.
3. Самостоятельном выполнении физико-химических исследований (реологических и механических) по оценке разработанных материалов.
4. Самостоятельной работе с клеточными культурами при проведении исследований по оценке биосовместимости и цитотоксичности полученных материалов.
5. Обработке экспериментальных данных, выполнении их комплексного анализа, обобщении и формулировании научно обоснованных выводов.

Работа была выполнена на базе Института регенеративной медицины Сеченовского университета.

Автор выражает искреннюю благодарность директору Института регенеративной медицины за наставничество, конструктивную критику и ценные советы — Тимашеву Петру Сергеевичу, своему научному руководителю Тугаевой Гиляне Константиновне — за квалифицированное и внимательное руководство в течение всего периода выполнения работы, а также сотрудникам Института регенеративной медицины за консультации при выполнении экспериментальных исследований, а именно Ерохиной Анне Григорьевне, Жуковой Диане Родионовне и Аксеновой Надежде Анатольевне. Особую благодарность автор выражает своему научному консультанту Ефремову Юрию Михайловичу за наставничество, подробные рекомендации и помощь в организации научных исследований.

1 ОСНОВНЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В СКАФФОЛДИНГЕ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

1.1 Тканевая инженерия

Тканевая инженерия — это современный подход к регенерации тканей, основанный на создании искусственной среды, максимально приближенной к естественному внеклеточному матриксу [10]. Достижения в области наноматериалов позволили создать инновационные биоматериалы, которые более точно имитируют структуру и функции живых тканей [11].

Основными компонентами тканевой инженерии являются матрицы, клетки и факторы роста. Скаффолды представляют собой трехмерные структуры, которые обеспечивают опору для клеток и создают условия для их роста и взаимодействия. Для их создания используются биосовместимые материалы, обладающие необходимыми механическими и биологическими свойствами. Клетки служат основой для формирования новой ткани и могут быть получены из различных типов стволовых клеток [12]. Факторы роста и биофизические стимулы регулируют процессы роста и дифференцировки клеток [13].

1.2 Скаффолды

Скаффолд — это трехмерный каркас, предназначенный для засеивания клетками. Он оказывает в первую очередь поддерживающую функцию, позволяя клеткам закрепляться в объеме и разрастаться, заполняя дефект ткани. Ценность любого скаффолда заключается не только в его составе, но и в том, насколько хорошо он сочетает в себе биологическую хрупкость с тканеспецифическими требованиями. Для восстановления кости и хряща требуются жесткие остеокондуктивные матрицы, способствующие минерализации [2, 3]. Регенерация нервов требует выровненных волокнистых матриц, направляющих рост аксонов [5]. Заживлению кожи способствуют мягкие, приспособливающиеся носители, которые быстро передают противовоспалительные сигналы, в то время как восстановление сердца и

сосудов зависит от эластичных конструкций, выдерживающих циклические нагрузки [4, 6]. Исследован широкий спектр платформ, включая конструкции, напечатанные на 3Д- и 4Д-принтерах, гидрогели, губки, микросферы, ксенотрансплантаты, керамику, металлы и электроформованные волокна. Основная задача заключается в балансировании структурных требований и сохранения добавок, встроенных в полимерные волокна скаффолдов. Конструкции, разработанные для высокой механической прочности или химической стабильности, часто дестабилизируют экзосомы и микроРНК, в то время как матрицы, достаточно мягкие для их защиты, как правило, быстро разлагаются или высвобождают загруженные компоненты неконтролируемым всплеском. Белковые факторы более устойчивы, однако они также теряют свою функцию при слишком быстром высвобождении или воздействии денатурирующих условий. Электроспиннинговые волокна уже выделяются как наиболее многообещающий вариант, поскольку имитируют архитектуру внеклеточного матрикса и позволяют осуществлять точный контроль на уровне волокон. Однако даже эта платформа сталкивается с нерешенными проблемами в плане баланса между архитектурой, химическими свойствами и биологической стабильностью. Ни одна технология создания скаффолда не способна одновременно обеспечить механические характеристики, контроль деградации и молекулярную стабилизацию. Это ограничение объясняет, почему большинство существующих систем остаются на стадии подтверждения концепции и почему гибридные стратегии, сочетающие взаимодополняющие носители, все чаще рассматриваются как единственный реалистичный путь к клиническому применению.

1.2.1 Требования к скаффолдам

Для того чтобы клеточные скаффолды могли считаться пригодными для регенеративной медицины, они должны соответствовать определенным критериям, которые различаются в зависимости от предполагаемого использования и типа ткани. При создании скаффолдов необходимо принимать во внимание ряд факторов.

Для тканевой инженерии необходим скаффолд, который должен обладать определенными характеристиками:

1. Механическая прочность, позволяющая, сохранить каркасную функцию скаффолда и дать клеткам опору для роста.
2. Биосовместимость и низкая цитотоксичность для снижения рисков отторжения и иммунных реакций.
3. Пористая структура, которая позволит клеткам проникать внутрь скаффолда [14].

Скаффолд предназначенный для направленной доставки секрета МСК, должен соответствовать определенным требованиям:

1. Равномерное распределение биоактивных молекул по толще скаффолда для однородного релиза факторов в течение продолжительного времени.
2. Низкая степень биodeградации в условиях нахождения в организме для пролонгированного высвобождения релиз-факторов и длительного терапевтического эффекта.
3. Сохранение прочности каркаса для механической стимуляции пролиферации и дифференцировки клеток за счет направленности и структуры волокон.

Биоразлагаемость является одним из ключевых факторов при разработке скаффолдов. Для лучшего терапевтического действия скаффолд должен разлагаться так, чтобы поврежденная ткань с каркасом-трансплантатом успевала заменяться созревшей новой тканью организма. Это свойство помогает в регенерации тканей, сводя к минимуму необходимость удаления скаффолда или вторичных операций. Отходы, образующиеся в результате разрушения каркаса, должны быть нетоксичными и выводиться без ущерба для окружающих органов [15].

Пористость поверхности. Структура пор в каркасах, включая их размер, количество и связь между ними, играет важную роль в процессах выживания клеток, их пролиферации и появлению дополнительного секрета,

улучшающего репарацию [16]. Крупные поры, размер которых подбирается индивидуально для каждого типа клеток, способствуют проникновению клеток в толщу скаффолда, эффективной доставке питательных веществ, диффузии газов и выведению метаболитических отходов. Однако они также могут снижать способность клеток прикрепляться к поверхности и передавать сигналы внутри клеток [17]. Маленькие же поры без разветвленной сети мешают обмену внеклеточных стимулов и замедляют регенерацию тканей, что приводит к снижению скорости заживления повреждений.

Биосовместимость обеспечивает низкую иммуногенность и риск отторжения скаффолда [18]. При отсутствии токсичных продуктов распада полимеров нагрузка на иммунитет снижается и увеличивается скорость репарации тканей, что ведет к улучшению эффективности заживления [19].

1.2.2 Материалы для скаффолдов

Полимеры, из которых создаются скаффолды, делятся на натуральные и искусственные. Каждая из этих групп имеет свои недостатки и преимущества. Натуральные полимеры имеют высокую гидрофильность, что обеспечивает лучшую адгезию клеток и, как следствие, более высокую скорость пролиферации. Благодаря своему сходству с внеклеточным матриксом натуральные полимеры также имеют сниженную иммуногенность [20]. Биополимеры, которые клинически используются для изготовления скаффолдов, включают белки (например, фиброин шелка, коллаген, желатин, кератин, фибриноген, эластин и актин), полисахариды (например, хитозан, хитин, альгинат, геллановую камедь и их производные) и гликозаминогликаны (например, гиалуроновую кислоту) [21]. Однако, несмотря на эти преимущества, натуральные полимеры обладают механическими характеристиками, которые не соответствуют механическим характеристикам тканей, и имеют высокую скорость биodeградации, что накладывает ограничения на сферы их применения в регенеративной медицине.

Синтетические полимеры, с другой стороны, обладают хорошими механическими характеристиками и показывают медленную биodeградацию, позволяют клеткам сформировать зрелую ткань до исчезновения каркаса [22]. Однако многие из них могут вызывать иммунный ответ или быть токсичными, особенно в сочетании с другими полимерами, что затрудняет их интеграцию в ткани организма [23]. Наиболее распространенными синтетическими полимерами являются полигликолид, полилактид, полилактид-ко-гликолид, поли-D,L-молочная кислота, полиэтиленгликоль и поликапролактон (ПКЛ) [24].

Из-за особенностей этих двух групп полимеров часто применяются гибридные смеси из натуральных и синтетических полимеров, что позволяет нивелировать недостатки обеих групп полимеров и получить скаффолды с высокими механическими и биологическими характеристиками.

1.2.3 Методы создания скаффолдов для доставки секрета МСК

Способы создания скаффолдов могут быть различными и определяются специфическими характеристиками, необходимыми для использования в восстановлении тканей и других медицинских процедурах.

Ксенокости, металлические и керамические платформы. Ксенотрансплантаты, в частности костные матрицы, сохраняют естественную архитектуру и биохимические сигналы, способствующие интеграции в организм реципиента. Тем не менее, их использование для доставки секрета МСК значительно ограничено. Обработка часто разрушает коллагеновые сети и удаляет биологически активные молекулы, что снижает сродство к белкам и экзосомам и приводит к быстрому вымыванию с нестабильным высвобождением [25]. Иммуногенность и строгие регуляторные барьеры еще больше ограничивают путь внедрения ксеногенных материалов. В результате их ценность остается ограниченной узкими клиническими нишами, такими как замена кости, где естественная архитектура является преимуществом. Керамика на основе фосфата кальция, напротив, остается эталоном для восстановления кости. Она обеспечивает высокую osteoconductive,

надежно адсорбирует белки, такие как костные морфогенетические белки, и обеспечивает наиболее воспроизводимые результаты при белковой регенерации [26]. Однако керамика демонстрирует низкую эффективность, когда терапевтическая цель смещается в сторону секретома, богатого везикулами или микроРНК. Металлические матрицы обеспечивают высокую механическую поддержку и долговечность. В то же время их инертные и нерезорбируемые поверхности не создают благоприятной среды для удержания секретома [27]. В целом эти платформы демонстрируют четкие функциональные ограничения. Ни один из методов создания скаффолда не может обеспечить универсальную платформу для доставки секретома, и более широкое применение в регенеративной медицине будет зависеть от гибридизации с защитными носителями, такими как гидрогели или электроспиннинговые волокна, которые могут защищать везикулы и микроРНК, одновременно добавляя функции контролируемого высвобождения.

3Д- и 4Д-печать. 3Д печать обеспечивает точный контроль над геометрией и пористостью, а также позволяет создавать каркасы, индивидуально адаптированные к конкретному пациенту [28, 29]. 4Д печать расширяет эти возможности за счет добавления реакции на стимулы окружающей среды, такие как температура, pH или влажность, что может улучшить адаптацию к ткани реципиента [30–32]. Эти возможности делают печать привлекательной для адаптации конструкций к индивидуальной геометрии дефектов и хирургическим потребностям. Однако технология не преодолевает ключевые биологические ограничения. Печатные каркасы не обладают наноразмерным разрешением, сопоставимым с внеклеточным матриксом, а их низкая эластичность и прочность ограничивают их использование в механически динамичных тканях. Для доставки секретома МСК это создает проблемы. Крупные поры и гладкие поверхности демонстрируют низкую аффинность к белкам, в то время как экзосомы и микроРНК быстро диффундируют наружу и теряют биологическую

активность. Большинство описанных применений остаются на стадии доказательства концепции и ограничиваются простыми геометрическими формами, которые демонстрируют осуществимость, но не достигают клинической значимости. Истинная практическая ценность 3Д- и 4Д-печати заключается в индивидуальной точности для каждого пациента, но этот потенциал реализуется только тогда, когда напечатанный каркас сочетается с защитными носителями, такими как гидрогели, микросферы или электроспиннинговые волокна. В таких интегрированных системах печать обеспечивает анатомическую подгонку, а добавленные носители стабилизируют экзосомы и микроРНК и регулируют их высвобождение.

Гидрогели и коллагеновые губки. Гидрогели и коллагеновые губки привлекают внимание в качестве средств доставки секрета МСК, поскольку высокое содержание воды и пористость способствуют диффузии белков и цитокинов [33–35]. Помогает и их распространенность в клинической практике, поскольку эти материалы уже используются в качестве повязок и кровоостанавливающих губок, что снижает барьеры для тестирования. Однако в качестве векторов для доставки секрета гидрогели и коллагеновые губки имеют несколько критических недостатков. Гидрогели часто теряют внутреннюю стабильность и разлагаются, что приводит к быстрому вымыванию и слабому удержанию экзосом и микроРНК. Коллагеновые губки биосовместимы и легко формуются, однако они разрушаются и высвобождают факторы коротким и неконтролируемым всплеском. Сшивание может замедлить деградацию, но создает новые риски. Химические агенты, такие как глутаровый альдегид или карбодиимиды, повреждают мембраны везикул и снижают активность белков, в то время как физические методы обеспечивают лишь умеренную стабильность. Второе ограничение носит аналитический характер. В большинстве исследований проводится количественная оценка общего количества белка, но не измеряется количество везикул или целостность РНК, что оставляет сохранность экзосом и микроРНК неопределенной. Сохранение белков часто интерпретируется как

доказательство стабильности секретома, но это маскирует быстрое вымывание экзосом и микроРНК, которое редко отслеживается. В результате гидрогели и губки обеспечивают лишь кратковременные паракринные сигналы вместо устойчивой поддержки. Они остаются полезными, когда достаточно кратковременного стимула, например, на ранних стадиях ангиогенеза или иммунной модуляции. При длительном использовании они демонстрируют наилучшие результаты в качестве адаптивных промежуточных слоев в сочетании с дополнительными носителями, такими как микросферы или электроспиннинговые волокна, которые защищают белки, сохраняют экзосомы и микроРНК, а также обеспечивают более предсказуемое регулирование их высвобождения.

Микросферы. Биоразлагаемые микросферы, как правило, размером 5–10 мкм, широко используются для инкапсуляции биологически активных молекул и пролонгированного высвобождения [36]. Для доставки секретома МСК они обеспечивают частичную защиту белков и факторов роста, но экзосомы и микроРНК гораздо более уязвимы. Везикулы подвергаются сдвиговому напряжению во время инкапсуляции, а деградация полимеров приводит к образованию кислых побочных продуктов, которые дестабилизируют мембраны и разрушают РНК. Биологическая активность часто снижается до того, как секретом МСК достигает тканей-мишеней. Распределение — еще одно нерешенное ограничение. Микросферы редко распределяются равномерно внутри дефекта, что приводит к неоднородным локальным концентрациям факторов секретома МСК. Такие градиенты создают зоны высокой и низкой экспозиции, что создает риск локальной токсичности или неадекватной стимуляции. Этим носителям также не хватает структурной основы, поэтому они не могут направлять адгезию или миграцию и плохо функционируют в качестве независимых матриц. Встраивание микросфер в гидрогели или волокнистые композиты может обеспечить ступенчатое высвобождение, и несколько исследований *in vivo* продемонстрировали, что последовательная доставка улучшает

регенеративные результаты, например, усиленное костеобразование в моделях синус-лифтинга [37]. Однако эти преимущества остаются неустойчивыми, поскольку вариабельность эффективности инкапсуляции от партии к партии часто снижает воспроизводимость, поэтому одна и та же формула может хорошо работать в одних условиях, но не обеспечивать стабильную кинетику в других. Микросферы обладают определенным потенциалом для клинического применения. Препараты на основе микросфер для низкомолекулярных лекарственных средств одобрены со стороны регулирующих органов. Однако их адаптация для использования с экзосомами и микроРНК сталкивается с особыми препятствиями, поскольку везикулы имеют большие размеры, обладают мембранной оболочкой и чрезвычайно чувствительны к нагрузкам, которые переносят обычные лекарственные препараты. По этой причине микросферы лучше всего рассматривать как модульные защитные элементы, встроенные в более крупные конструкции, где гидрогели или волокна обеспечивают структурную целостность, пространственное распределение и равномерность дозирования. Таким образом, микросферы остаются наиболее эффективными в качестве модульных защитных элементов, обычно встроенных в более крупные конструкции, такие как гидрогели или электроспиннинговые волокна, которые обеспечивают структуру и равномерность дозирования.

1.3 Электроспиннинг

Электроспиннинг — процесс плетения волокон из полимеров путем действия электростатических сил на раствор (Рисунок 1). Благодаря такому подходу капля раствора, вытягиваемая через тонкое сопло за счет электрического поля, застывает на коллекторе и превращается в волокно нано- или микроразмера. Кроме небольших размеров волокна также образуют поры, которые позволяют еще лучше имитировать внеклеточный матрикс, позволяя посаженным клеткам развиваться в условиях, приближенных к оригинальным [1]. Таким образом, путем изменения параметров спиннинга, например,

скорости подачи раствора, диаметра сопла и других, можно добиться изменения морфологии волокон и их укладки: более узкое сопло и высокая скорость подачи раствора способствуют образованию тонкого волокнистого каркаса, в то время как широкое сопло, наоборот, приводит к образованию утолщенных волокон. При оптимальных параметрах раствора, электроспиннинга и условий внешней среды можно добиться различных вариантов скаффолдов, которые могут служить разнообразным целям [9].

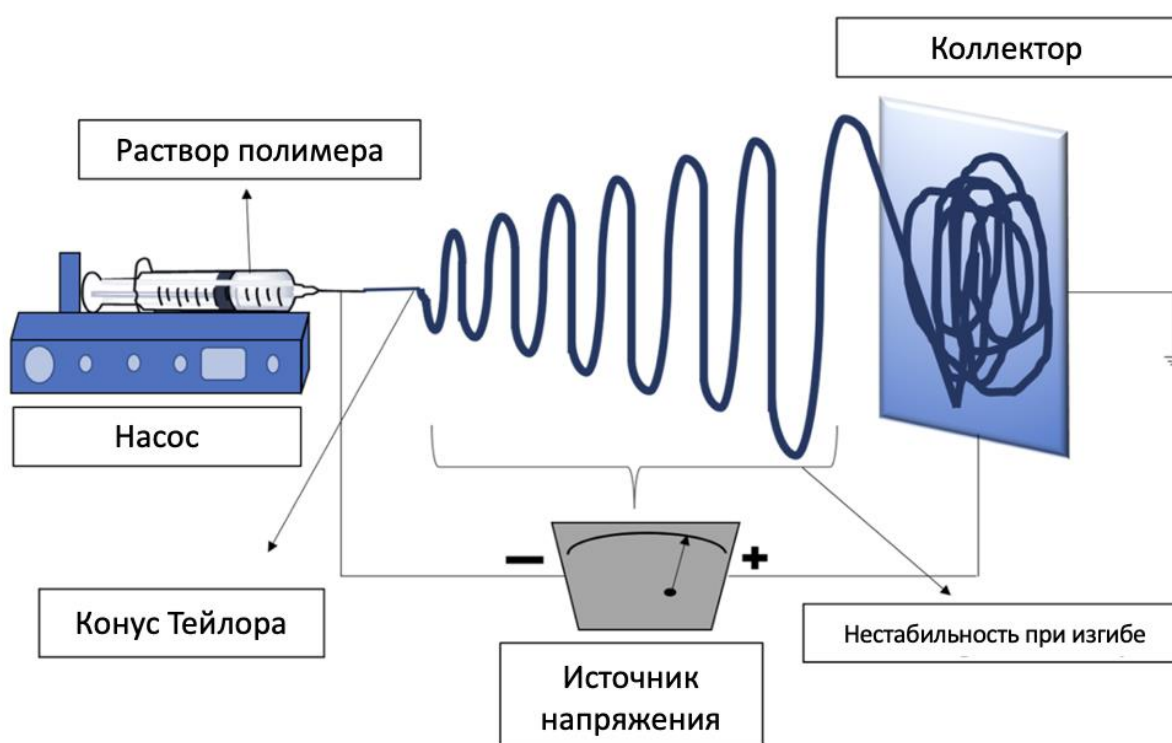


Рисунок 1. Схема создания электроспиннинговых скаффолдов.

1.3.1 Параметры, влияющие на эффективность электроспиннинга

Концентрация и вязкость растворов являются основополагающими параметрами в процессе электроспиннинга, так как именно эти свойства оказывают влияние на возможность формирования электроспиннинговых скаффолдов. При низкой концентрации и низкой вязкости растворов невозможно сформировать волокна, что приводит к получению электроспрея. Для получения стабильных однородных волокон необходимо добиться такой концентрации и, соответственно, вязкости раствора, чтобы цепи полимера имели достаточную степень запутанности [38]. На эти параметры также влияет

и молекулярная масса выбранного полимера: высокая молекулярная масса обеспечивает более высокую вязкость и, как следствие, упрощает процесс формирования электроспиннинговых волокон и снижает вероятность дефектов [39].

При получении диапазона подходящих значений динамической вязкости растворов происходит расчет диапазона напряжений, задаваемых на приборе, для формирования электроспиннинговых волокон. Чем выше напряжение в камере, тем тоньше получаются волокна и тем сильнее становится растяжение струи. Однако повышение напряжения повышает нестабильность раствора и ухудшает однородность получения волокон.

Другим важным фактором при получении электроспиннинговых волокон является скорость подачи раствора. Низкая скорость подачи раствора может привести к прерывистым волокнам, но такой уровень параметра обеспечивает полное испарение растворителя из скаффолда, в то время как высокая скорость подачи может привести к нахождению остаточного растворителя в электроспиннинговой матрице [40].

Расстояние между наконечником шприца и коллектором также влияет на наличие остаточного растворителя. Если расстояние мало, то волокна не успевают затвердеть до того, как достигнут коллектора, из-за того, что растворитель не успевает испариться, поэтому образуются волокна с большим средним диаметром, которые могут слипаться между собой [41]. С другой стороны, если расстояние между иглой и коллектором большое, то могут образовываться более тонкие волокна, однако может нарушаться стабильность струи [42].

Кроме того, важными аспектами в формировании электроспиннинговых скаффолдов являются тип и скорость вращения коллектора. Статичные коллекторы позволяют формировать хаотичные скаффолды, в то время как вращающиеся коллекторы формируют волокна с превалирующим направлением вдоль оси вращения. Увеличение скорости вращения

коллектора также увеличивает долю направленных волокон, формируя параллельную укладку волокон.

Важным параметром при создании полимерных волокон являются условия внешней среды. Высокая влажность отрицательно влияет на время затвердевания, поэтому она затрудняет процесс прядения и продлевает процесс выхода струи, а также она может способствовать фазовому разделению материалов при композитном составе волокон [43]. При этом низкая влажность позволяет добиться более быстрого испарения остаточного растворителя и способствует формированию более гладких волокон.

1.4 Материалы для создания скаффолдов

Ключевым требованием к материалам для их создания являются биосовместимость, биоразлагаемость и способность имитировать естественный внеклеточный матрикс. Наиболее высокую биосовместимость показывают натуральные полимеры [44], тогда как матрицы из искусственных полимеров обладают высокими механическими характеристиками [33]. Таким образом часто оптимальным вариантом является использование композитных скаффолдов.

Встраивание в синтетические полимеры биологически активных молекул, как, например, молекулы секрета МСК, способствует пролонгированному выходу релиз-факторов в ходе пролиферации клеток, а также улучшению биосовместимости скаффолдов, что помогает более быстрой и качественной регенерации поврежденных тканей.

1.4.1 Поликапролактон

ПКЛ представляет собой синтетический биоразлагаемый алифатический полиэфир, широко применяемый в тканевой инженерии. В настоящее время полимер рассматривается как один из наиболее перспективных для создания скаффолдов для регенерации тканей [45].

Химическая структура полимера определяет его основные свойства: высокую пластичность, сравнительно низкую температуру плавления (около 55–65°C), хорошую растворимость в ряде органических растворителей и способность к медленной гидролитической деградации. Благодаря этим особенностям ПКЛ легко применим для электроспиннинга и является золотым стандартом для получения синтетических каркасов.

Одним из ключевых преимуществ ПКЛ является его биосовместимость. При деградации материал распадается на нетоксичные продукты, которые метаболизируются организмом без выраженной воспалительной реакции. Полная деградация материала в организме может занимать от нескольких месяцев до нескольких лет [46].

Также ПКЛ обладает высокими механическими характеристиками (прочность, модуль Юнга, растяжение). Каркасы из этого полимера обеспечивают поддержку клеточной адгезии, пролиферации и дифференцировки. Наиболее активно ПКЛ применяется при разработке конструкций для регенерации костной, хрящевой, сосудистой и нервной тканей.

Несмотря на многочисленные преимущества, ПКЛ имеет ряд ограничений. К ним относится, в первую очередь, низкая гидрофильность поверхности (~120°). Для устранения этого недостатка активно разрабатываются композитные материалы и сополимеры на основе ПКЛ. Добавление секретомы МСК в ПКЛ позволяет уменьшить эти недостатки и сохранить основные преимущества этого синтетического полимера.

Взаимодействие молекул секретомы МСК и ПКЛ происходит за счет:

- гидрофобного эффекта: адсорбция секретомы на поверхность ПКЛ за счет взаимодействия гидрофобных участков белков с гидрофобным ПКЛ;

- водородных связей: карбонильная группа (C=O) ПКЛ выступает акцептором электронов для амино- (-NH₂) и гидроксильных (-OH) групп белков;
- заряда молекул: создание на поверхности ПКЛ заряженных групп белков может привлекать другие молекулы.

Но растворитель дихлорметан конкурирует с белками секретома за электроны карбонильной группы ПКЛ. Взаимодействие молекул в растворе представлено на Рисунке 2.

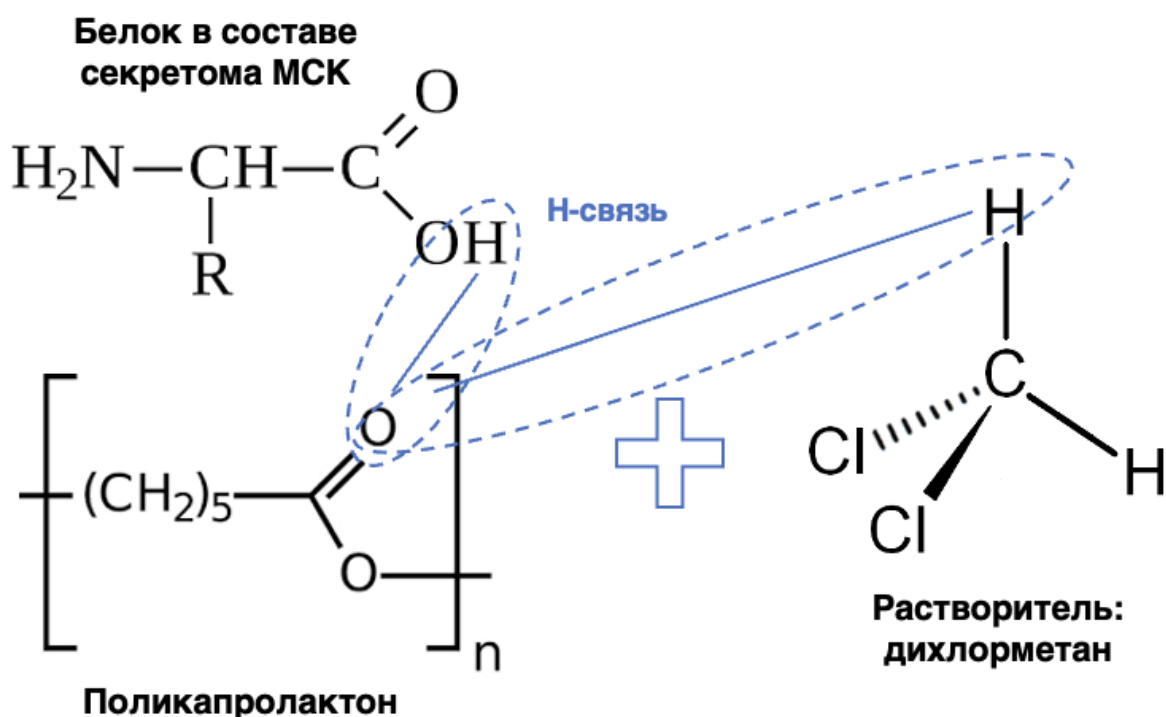


Рисунок 2. Схема взаимодействия молекул в растворе.

1.4.2 Дихлорметан

С осторожностью необходимо подходить к выбору растворителей для полимерного раствора — часть растворителей вступает в реакцию с белковыми молекулами, входящими в состав секретома, что приводит к разрушению молекул и снижению биологической активности секретома на клетки. Ввиду этого может снизиться и эффект заживления, что нивелирует пользу добавления секретома в скаффолды. В качестве растворителей необходимо подбирать менее агрессивные агенты, так как есть вероятность повредить секретом [33].

Дихлорметан является летучим органическим растворителем, широко применяемым в технологиях получения полимерных материалов. Важным преимуществом дихлорметана является его низкая температура кипения ($\sim 40^{\circ}\text{C}$), обеспечивающая быстрое испарение при формировании пленок, волокон и пористых структур [47]. Дихлорметан часто применяется в методах электроспиннинга, поскольку позволяет получать однородные полимерные системы с контролируемой морфологией.

1.4.3 Секретом МСК

Секретом — ряд биоактивных молекул, выделяемых преимущественно стволовыми клетками [48]. Цитокины, хемокины, факторы роста, экзосомы, ангиогенные факторы, представляющие собой секретом, обладают рядом свойств [49-51] (Рис. 3):

- противовоспалительное (например, IL-10, влияющий на экспрессию других цитокинов и состояние В-клеток) [52],
- антиапоптозное (например, BCL-2 регулирует апоптоз за счет влияния на проницаемость митохондриальной мембраны) [44],
- противоопухолевое (например, TGF- β оказывает ингибирующий эффект на рост опухолевых клеток за счет изменения сигнальных путей, а также улучшает восстановление внеклеточного матрикса) [53],
- регенеративное (например, VEGF усиливает миграцию и митоз клеток эндотелия, активирует ангиогенез) [54].

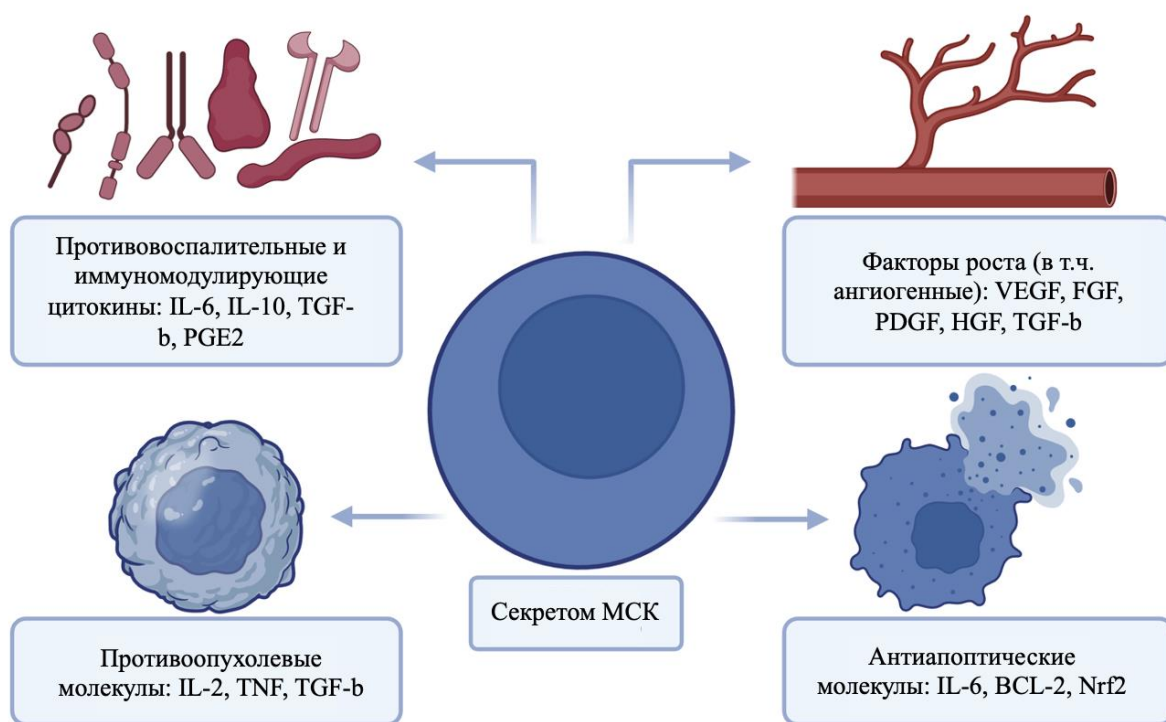


Рисунок 3. Свойства секретома.

Многообразие секретома заключается и в его размерах: в состав результата паракринной деятельности клеток входят как мелкие пептиды и небольшие молекулы, так и крупные белковые комплексы. Таким образом, размеры молекул в секретоме могут колебаться примерно от 1 кДа до более чем 1000 кДа в зависимости от типа и функциональности молекул. Стоит отметить, что так как разные молекулы, входящие в состав секретома, оказывают разное влияние на путь развития стволовых клеток, зачастую влияя на их дифференцировку [34, 35], проводить подбор состава секретома для использования в восстановлении различных тканей следует с осторожностью — различные молекулярные паттерны по-разному запускают каскад реакций сигнальных путей и направляют клетки по определенному ростку дифференциации [55] (Рис. 4). Однако есть молекулы, обеспечивающие условия, полезные для любой ткани: хемокины и цитокины, отвечающие за снижение воспалительных процессов, не влияют на дифференциацию стволовых клеток, однако защищают клетки от микробного влияния [56, 57].

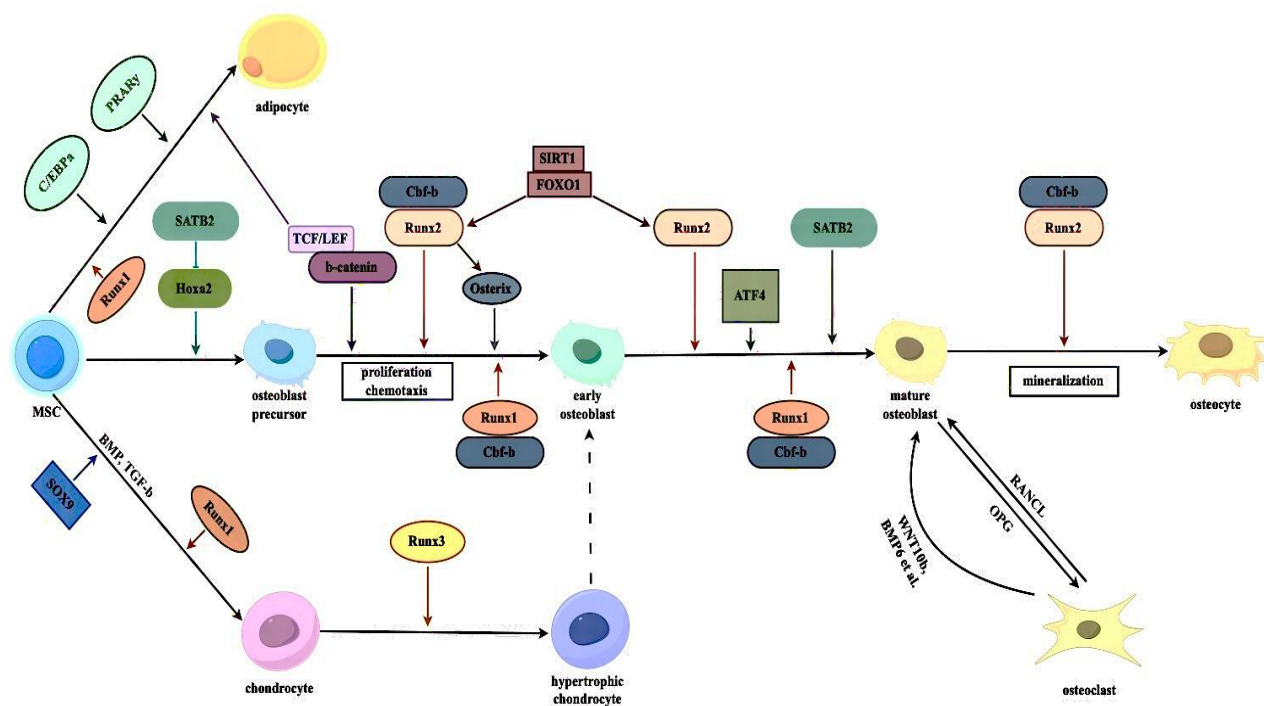


Рисунок 4. Сигнальные пути для дифференцировки МСК

1.5 Стратегии загрузки секрета МСК в электроспиннинговые скаффолды

Способ внедрения секрета, полученного из МСК, в матрицу не менее важен, чем основной полимер, из которого сделан скаффолд. В отличие от отдельных факторов роста, секретом представляет собой нестабильную смесь белков, РНК и внеклеточных везикул, активность которых зависит от того, насколько хорошо они сохраняются в процессе изготовления и насколько стабильно высвобождаются впоследствии. В связи с этим было изучено несколько взаимодополняющих стратегий. Самые простые из них основаны на замачивании после изготовления, что позволяет избежать использования агрессивных растворителей, но дает кратковременный релиз компонентов, не оказывая пролонгированного действия. Более комплексные подходы включают секретом МСК непосредственно в матрицу или связывают его посредством ковалентных или аффинных взаимодействий, обеспечивая более строгий контроль за счет потенциального повреждения молекул. Инкапсуляция в микросферы сохраняет структуру молекул и обеспечивает

продолжительное высвобождение, в то время как посев МСК превращает скаффолд в живой источник паракринных факторов. Каждый вариант по-своему уравнивает стабильность, кинетику высвобождения и техническую сложность.

Замачивание скаффолдов в растворе секрета МСК. Замачивание и связанные с ним методы после изготовления, такие как распыление, остаются наиболее простыми способами введения секрета, полученного из МСК, в скаффолды. Их преимущество заключается в том, что они позволяют избежать использования агрессивных растворителей, тем самым сохраняя хрупкие белки, РНК и внеклеточные везикулы. Тот же метод можно применять к разнообразным материалам, включая электроспиннинговые скаффолды, гидрогели, ксенотрансплантаты и конструкции, напечатанные на 3D-принтере [58]. Однако, поскольку эти методы основаны на пассивной адсорбции и диффузии, степень насыщения в значительной мере зависит от внутренней архитектуры и поверхностных химических свойств скаффолда. Гидрофильные матрицы легко впитывают жидкость, но при этом имеют тенденцию быстро высвобождать наполнитель при попадании в водную среду. Плотные или гидрофобные структуры ограничивают проникновение жидкости периферическими областями, что снижает как равномерность распределения, так и долгосрочное удержание наполнителя. Распыление может обеспечить пространственно-направленную доставку, но дает слабые поверхностные покрытия, в то время как замачивание обеспечивает лучшее покрытие без инфильтрации.

Несмотря на эти ограничения, такая загрузка по-прежнему актуальна в тех случаях, когда требуется лишь кратковременный стимул, например для ускорения заживления ран или модуляции ранних иммунных реакций. Однако биологический эффект таких коротких импульсов ограничен: белки все еще могут инициировать ангиогенез или иммунную модуляцию, но экзосомы и микроРНК гораздо менее стабильны в условиях импульсного высвобождения

и часто теряют функциональную целостность, не достигнув клеток-мишеней. Это делает метод замачивания и связанные с ним методы малопригодными для регенеративных процессов, требующих устойчивой паракринной сигнализации и точного временного контроля.

Загрузка секрета МСК непосредственно в раствор полимера. Включение секрета, полученного из МСК, непосредственно в матрицу каркаса обеспечивает более точный контроль над дозировкой и пространственным распределением, чем методы, применяемые после изготовления. Наиболее простым вариантом является прямое смешивание, при котором лиофилизированный или концентрированный секрет добавляется в раствор полимера перед электроспиннингом. Это обеспечивает однородное наполнение и позволяет проводить систематические исследования «доза-реакция» [59]. Недостатком является воздействие агрессивных растворителей и добавок, таких как хлороформ, уксусная кислота или сульфид натрия. Эти вещества могут денатурировать белки, разрушать нуклеиновые кислоты и дестабилизировать везикулы [60–62]. Лиофилизация помогает уменьшить гидролитическое повреждение, но все равно может привести к разрыву везикул или агрегации белков без адекватной криозащиты [63]. Выбор полимера также ограничен совместимостью с растворителями, что снижает гибкость при проектировании матрицы. Поэтому результаты высвобождения сильно варьируются.

Чтобы избежать повреждений, вызванных растворителем, в стратегиях иммобилизации используются ковалентные или аффинные взаимодействия для закрепления белков и везикул в матрице. Эти системы продлевают продолжительность высвобождения и улучшают удержание, хотя проблемы остаются. Ковалентные связи могут маскировать активные сайты, фотоинициаторы и УФ-излучение могут вызывать радикальное повреждение, а чрезмерно сильное аффинное захватывание может снижать эффективность градиентов. Для внеклеточных везикул и микроРНК эти нагрузки особенно

критичны, поскольку химическая модификация может нарушить целостность мембраны или разрушать микроРНК, в связи с чем оптимизация химических реакций сшивания становится крайне важной для сохранения функциональной активности. На практике загрузка с интеграцией в матрицу хорошо подходит для составов с высоким содержанием белков, которым важна пространственная стабильность и предсказуемая кинетика. Однако при применении секретома с высоким содержанием везикул успех зависит от использования более мягких химических реакций и тщательно проверенных фотохимических процессов, чтобы защитить хрупкие везикулы и РНК.

Инкапсуляция секретома МСК в микросферы. Инкапсуляция в микросферы создает защитную оболочку для секретома МСК, в частности для экзосом и микроРНК, которые быстро разлагаются под воздействием растворителя или в условиях неконтролируемого высвобождения. Полимерные носители размером 5–10 мкм могут быть интегрированы в скаффолды с помощью ко-электроспиннинга, электронапыления или загрузки микросфер в скаффолды после изготовления, причем каждый метод влияет на кинетику высвобождения и пространственные градиенты [64,65]. Физически изолируя везикулы и белки, микросферы защищают их от прямого контакта с агрессивными растворителями и сдвиговыми силами, а в некоторых случаях продукты их деградации служат вторичным триггером высвобождения. Для секретома МСК, богатого везикулами, такая временная структурированность особенно ценна, поскольку микроРНК и мембраносвязанные белки требуют как защиты от денатурации, так и контролируемого представления клеткам-мишеням. Несмотря на эти преимущества, остаются проблемы: гетерогенное распределение частиц, переменная эффективность инкапсуляции и кислотное разложение, которое может нарушить целостность везикул. Тем не менее системы на основе микросфер в настоящее время представляют собой один из наиболее универсальных путей преобразования хрупких составов секретома МСК в управляемые платформы доставки, устраняя разрыв между методами с

кратковременным всплеском высвобождения и более сложными матрицами на основе аффинности или с посевом клеток.

Данный обзор литературы позволяет сделать вывод, что современные тенденции в области скаффолдинга для тканевой инженерии демонстрируют значительный прогресс, обусловленный развитием материаловедения и технологий создания биомиметичных структур. Ключевым аспектом является разработка скаффолдов, способных имитировать внеклеточный матрикс (ВКМ), что обеспечивает оптимальные условия для адгезии, пролиферации и дифференцировки клеток. ПКЛ является одним из самых изученных и механически приспособленных полимеров для создания скаффолдов, а его долгая деградация позволяет длительно обеспечивать терапевтический эффект. Добавление секрета МСК позволяет снизить гидрофобность ПКЛ и улучшить биологические характеристики для заживления повреждений.

Скаффолды должны обладать следующими свойствами для использования в регенеративной медицине: биосовместимость, биоразлагаемость, соответствующие механические характеристики, а также оптимальная архитектура и контролируемая скорость деградации. Данные свойства во многом определяются методом изготовления материала. Одним из наиболее перспективных способов получения скаффолдов является электроспиннинг, так как этот метод способен формировать тонкие нано- и микроразмерные волокна, наиболее близкие по структуре к естественному внеклеточному матриксу. Также этот метод обеспечивает регулирование морфологии и свойств скаффолдов за счет изменения параметров процесса, включая контроль над условиями внешней среды и параметрами установки. Это позволяет контролировать диаметр волокон, пористость и механические свойства получаемых скаффолдов.

Таким образом, анализ основных тенденций в скаффолдинге подтверждает, что загрузка секрета МСК в ПКЛ-матрицы обеспечивает хорошие физико-химические параметры скаффолда и улучшает

биологические эффекты, что позволяет лучше справляться с заживлением различных дефектов благодаря полной имитации микроокружения клеток и с физической, и с биологической точки зрения. Дальнейшие исследования должны быть направлены на углубленное изучение взаимодействия этих материалов с клеточными культурами *in vivo*, а также на разработку стандартизированных протоколов их производства для клинического применения.

2 МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЭЛЕКТРОСПИННИНГОВЫХ СКАФФОЛДОВ НА ОСНОВЕ ПКЛ С ДОБАВЛЕНИЕМ СЕКРЕТОМА МСК

Экспериментальная часть исследования была направлена на подготовку растворов для электроспиннинга, подбор методов загрузки рсМСК и создания разных архитектур скаффолдов, а также на проведение ряда качественных и количественных тестов, направленных на анализ структуры, свойств и цитотоксичности полученных материалов.

2.1 Объекты исследования

Объектами исследования в данной работе были выбраны электроспиннинговые скаффолды на основе ПКЛ в растворе дихлорметана (ДХМ) с однослойной хаотичной и сложной комбинированной укладкой, состоящий из двух слоев: нижнего хаотичного, наплетенного аналогично однослойным хаотичным скаффолдам, и верхнего параллельно ориентированного. Также скаффолды различались по объему рабочего раствора: однослойные скаффолды с простой архитектурой были наплетены из растворов объемом 2 мл, тогда как для скаффолдов с двухслойной комбинированной архитектурой рабочий объем наплетения составил 4 мл, где каждый из слоев был наплетен из 2 мл полимерного раствора. Кроме того скаффолды различались по концентрации рсМСК в полимерном растворе ПКЛ в ДХМ — диапазон концентраций был от 0% (контрольный образец для влияния добавления рсМСК) до 5% по объемной доле в растворе. Состав и основные параметры получения скаффолдов представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Основные характеристики полученных скаффолдов. # — слой хаотичной укладки скаффолдов, || — параллельной.

Маркировка	Концентрация ПКЛ, % (w/v)	Концентрация pcMCK, % (v/v)	Объем рабочего раствора, мл	Скорость цилиндрического коллектора, об/мин	Укладка волокон
0%#	20	0	2	600	хаотичная
2%#	20	2	2	600	хаотичная
3%#	20	3	2	600	хаотичная
4%#	20	4	2	600	хаотичная
5%#	20	5	2	600	хаотичная
0% #	20	0	2	600	комбинированная
			2	1600	
2% #	20	2	2	600	комбинированная
			2	1600	
3% #	20	3	2	600	комбинированная
			2	1600	
3%##	20	3	4	600	хаотичная
4% #	20	4	2	600	комбинированная
			2	1600	
5% #	20	5	2	600	комбинированная
			2	1600	

2.2 Получение pcMCK

MCK из пуповины человека культивировали в полной ростовой среде следующего состава: DMEM/F12 с 2 mM L-глутамином (BioloT, Россия), 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Thermo Fisher, США), инсулин-трансферрин-селенит (1:100, BioloT, Россия), bFGF (20 нг/мл, ProSpec, Израиль), гентамицин (50 мкг/мл, PanEco, Россия). Клетки выращивали при 37 °C в атмосфере 5% CO₂, смену среды проводили каждые 48 ч. При достижении 80% конфлюэнтности клетки пассировали. Через 4 ч после пассирования среду заменяли на свежую. Кондиционированную среду (секретом) собирали на 3-й день культивирования, центрифугировали для удаления клеточного дебриса (режим 500 g, 10 мин) и замораживали при –

80 °С до дальнейшего применения [66]. Концентрацию оценивали по IL-6 и IL-8 методом ИФА. Секретом МСК был получен на базе лаборатории клинических и нанотехнологий института регенеративной медицины Сеченовского университета.

2.3 Получение растворов для электроспиннинга

При проведении исследований использовали следующие материалы: ПКЛ Полиморфус (Китай) 60 кДа,, ДХМ от компании “ХИММЕД” отечественного производства и рсМСК (концентрация секрета в DMEM 300-350 нг/мл), в среде DMEM, полученный в лаборатории клинических смарт-технологий.

ПКЛ в гранулах подвергался растворению в ДХМ для получения 20% по массе растворов. Навески ПКЛ с массой 1,004 г взвешивали на аналитических весах AB304-S/FACT (Mettler Toledo, Швейцария) с точностью до тысячных долей грамма и добавляли в предварительно приготовленный растворитель ДХМ в количестве 5 мл.

Полученные растворы перемешивали в течение 24 часов при комнатной температуре на ротационном смесителе RM1L (SIA ELMi, Латвия), со скоростью вращения 250 оборотов в минуту, до достижения однородности.

В 4 из 5 подготовленных растворов были добавлены 100, 150, 200 и 250 мкл рсМСК, соответственно, для получения 2%, 3%, 4% и 5% по объему растворов. После добавления секрета растворы снова перемешивались при комнатной температуре на ротационном смесителе RM1L (SIA ELMi, Латвия), со скоростью вращения 250 оборотов в минуту, до достижения однородности.

Таким образом, были получены растворы с 20% массовым содержанием ПКЛ в ДХМ с объемной долей 0%, 2%, 3%, 4% и 5% рсМСК.

2.4 Процесс электроспиннинга

Изготовление волокнистых скаффолдов проводили методом электроспиннинга на установке ESR100D NanoNC (Сеул, Южная Корея). В качестве коллектора использовали цилиндрический вращающийся коллектор.

Параметры процесса были следующими: скорость вращения коллектора – 600 об/мин, расстояние между соплом и коллектором – 11 см, угол наклона подачи раствора – 30°, размер сопла – 25G, напряжение – 14 кВ, скорость подачи раствора – 1 мл/ч. Объем полимерного раствора, используемого для каждого эксперимента без добавок, составлял 2 мл. Электроспиннинг проводили при контролируемых условиях с использованием вытяжной вентиляции для обеспечения эффективного испарения растворителя и стабильности формирования волокон. В дальнейшем из описанных растворов были получены скаффолды со сложной архитектурой: первый слой каждого скаффолда объемом 2 мл был наплетен при скорости вращения коллектора 600 об/мин, после чего поверх этого слоя был наплетен слой в 2 мл при скорости вращения коллектора 1600 об/мин для достижения параллельной укладки волокон во втором слое. Для сравнения был подготовлен образец объема 4 мл из раствора с 3% секрета при скорости вращения 600 об/мин. Остальные параметры плетения оставались неизменными.

Полученные образцы скаффолдов сохраняли в условиях контролируемой влажности и температуры до проведения дальнейших исследований.

2.5 Измерение вязкости растворов

Вязкость (η , МПа*с) растворов образцов определяли с помощью реометра Physica MCR 302 (Anton Paar, Грац, Австрия), оснащенного встроенной системой контроля температуры и регулятором зазора при температуре 23°C. Были проведены измерения вязкости в зависимости от скорости сдвига.

По Формуле 1 была рассчитана скорость сдвига, которой подвергнулся раствор в процессе электроспиннинга.

$$\gamma' = \frac{4Q}{\pi r^3}, (1)$$

где γ' — скорость сдвига; Q — скорость подачи раствора, при котором происходило истечение жидкости; r — радиус иглы.

2.6 Сканирующая электронная микроскопия

Морфологический анализ скаффолдов проводился с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi TM4000Plus (Hitachi High-Technologies Corporation, Токио, Япония). Полученные изображения обрабатывались с использованием программного комплекса ImageJ (Национальный институт здоровья, США).

2.7 Измерение контактного угла смачивания

Измерение контактного угла смачивания (КУС) скаффолдов проводилось методом «сидячей капли» с использованием анализатора контактного угла Acam-MSC01 (Apex Instruments, Калькутта, Индия). В качестве смачивающей жидкости использовалась дистиллированная вода, что позволяет объективно оценить гидрофильные свойства поверхности исследуемых образцов. Измерения выполнялись при температуре платформы 37°C, что соответствует температуре человеческого тела. Объем капли воды, наносимой на поверхность образца, составлял 12 мкл при скорости подачи 20 мл/ч. Для стабилизации капли и достижения равновесного состояния интерфейса жидкость-поверхность угол смачивания фиксировался в течение 30 секунд после нанесения капли на образец. Каждый образец тестировался не менее трех раз в различных участках поверхности для обеспечения воспроизводимости результатов и учета возможной неоднородности структуры. Размер исследуемых образцов составлял 50 × 50 мм, а количество образцов в каждой группе было не менее четырех, что обеспечивало статистическую достоверность результатов и минимизацию экспериментальных ошибок.

2.8 Механические испытания

Прочность на разрыв, относительное удлинение при разрыве и модуль упругости (модуль Юнга) скаффолдов исследовали методом одноосного

растяжения на разрывной машине с помощью системы для микромеханических испытаний Mach-1 v500csst (Biomomentum Inc., Laval, QC, Канада). Далее образцы размерами 6×20 мм закреплялись в зажимах машины. Каждая группа состояла из 4 образцов каждого скаффолда.

2.9 Биodeградация в растворе фосфатно-солевого буфера

Для исследования биodeградации образцы скаффолдов размером 10*10 мм помещались в фосфатно-солевой буфер при температуре 37°C для создания условий, приближенным к физиологическим условиям. Для каждого скаффолда отбиралось по 5 образцов 10×10 мм с измеренной массой, которые помещались в 24-луночный планшет и заливались 3 мл фосфатно-солевого буфера. Планшет помещался в инкубатор до следующего взвешивания. Контрольные точки для измерения потери массы — 1, 3 и 8 недель. По истечении времени на каждой контрольной точке скаффолды вынимались из раствора и высушивались на протяжении суток при температуре 37°C, после чего взвешивались на микровесах WXTE (Mettler Toledo, Швейцария). Потеря массы высчитывалась по Формуле 2:

$$x = \frac{m-m_1}{m} 100, (2)$$

где x — потеря массы в процентах, m — масса скаффолда до биodeградации, m₁ — масса после сушки в контрольной точке.

2.10 Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье

ИК-спектры образцов регистрировали на ИК-спектрометре Spectrum Two (PerkinElmer, США) в режиме нарушенного полного внутреннего отражения в диапазоне от 500 до 4500 см⁻¹.

2.11 Модель теста на хориоаллантоисной мембране куриного яйца на эмбрионах Gallus gallus для изучения кровотока и ангиогенного ответа на биоматериалы

Оплодотворенные куриные яйца (*Gallus gallus*) были получены на птицефабрике «Cobb-500» и транспортировались в условиях контролируемой температуры (37°C) для обеспечения жизнеспособности и качества. До начала эксперимента куриные эмбрионы хранились в термостате при 10°C. Инкубацию проводили при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ и относительной влажности воздуха $65 \pm 5 \%$ в горизонтальном положении с помощью автоматического инкубатора.

На третий день эмбрионального развития скорлупу яйца дезинфицировали, а в тупом конце яйца делали окошко. После этого визуально оценивалось выживание эмбриона. Неразвившиеся эмбрионы исключались из эксперимента. По результатам отбраковки в исследования вошли 5 исследуемых групп по 5 эмбрионов в каждой и контрольная группа (5 эмбрионов) без закладки скаффолдов. Мембраны эмбрионов исследуемых групп осторожно удаляли пинцетом и шприцем объемом 5 мл извлекали 3 мл альбумина. Затем эмбрионы инкубировали в неподвижном вертикальном положении до 7-го дня.

На седьмой день стерилизованные биоматериалы помещали на хориоаллантаоидную мембрану. Место имплантации выбирали в соответствии с ключевыми критериями анализа мембраны - посередине между эмбрионом и внешней границей, расположенной между двумя крупными кровеносными сосудами.

На десятый день эмбрионального развития результаты регистрировали с помощью микроскопа и системы Laser Speckle Imaging System. Образование кровеносных сосудов наблюдали с помощью стереомикроскопа Nikon SMZ800N (Nikon, Япония). Подсчет проводился с помощью программного обеспечения ImageJ, Cell Counter Plugin (ImageJ 1.53e, Национальные институты здравоохранения, Бетесда, штат Мэриленд, США).

2.12 Цитотоксичность материала

Для оценки жизнеспособности и пролиферации клеток использовали тест AlamarBlue (на основе реагента резазурина), позволяющий количественно измерить метаболическую активность клеточной культуры. Метод основан на способности жизнеспособных клеток восстанавливать окисленную форму красителя (синюю, нефлуоресцентную) до восстановленной (красной, флуоресцентной) в результате метаболической активности. Изменение цвета среды и флуоресценции позволяет судить о количестве жизнеспособных клеток.

Для проведения теста реагент AlamarBlue предварительно разводили в ростовой среде в соотношении 1:10 (1 часть реагента на 9 частей ростовой среды). Использовали ростовую среду без индикатора фенолового красного для исключения помех при спектрофотометрическом анализе.

В качестве отрицательного контроля использовали клетки, культивируемые в ростовой среде с добавлением 0,1% раствора SDS (додецилсульфат натрия). Максимальную концентрацию SDS использовали 1,5 мг/мл. В анализе использовали подобранные последовательные повторности SDS и экстрактов биоматериалов. В качестве положительного контроля использовали клетки, культивируемые в стандартной среде без добавления исследуемых веществ и токсикантов, что позволило оценить нормальный уровень метаболической активности клеток. Эти значения принимали за 100% жизнеспособности и использовали для калибровки результатов. Экстракты были приготовлены из 0,1-0,2 г каждого биоматериала, которые инкубировали в полной ростовой среде для МСК в стандартных условиях (37 °C, влажность 95%, CO₂ 5%) в течение суток.

Анализ проводили в течение 3-х последовательных дней с применением стандартного протокола оценки цитотоксичности в 96-луночных культуральных планшетах (Corning, Glendale, Arizona, США). В первый день осуществляли засевание планшетов клетками с плотностью 5000 клеток на лунку в 100 мкл ростовой среды, что способствовало равномерной адгезии клеток и формированию монослоя на дне планшета.

На 2-ой день в лунки с монослоем клеток добавляли растворы для тестирования. Для нормального проведения эксперимента и оценки чувствительности культуры клеток применяли отрицательный контроль — специально подобранные разведения додецилсульфата натрия (ДСН), индуцирующего искусственную смертность. В остальные лунки добавляли предварительно приготовленные разведения экстрактов исследуемых биоматериалов. Для обеих серий — как для ДСН, так и для экстрактов — готовили серию разведений от 100% до 0,39% в трех повторностях для каждой точки концентрации. Перед внесением полученных растворов из лунок отбирали ростовую среду, после чего добавляли по 100 мкл соответствующего разведения. Дополнительно для контроля чистоты эксперимента и фона метаболической активности оставляли по 3 лунки с полной ростовой средой в качестве положительного контроля.

После внесения всех растворов планшеты инкубировали в течение 24 часов в стандартных условиях (37 °C, влажность 95%, CO₂ 5%).

На третий день инкубации исследуемое вещество и ДСН аккуратно удаляли из лунок, после чего в каждую лунку добавляли краситель AlamarBlue в разведении 1:10 в свежей среде. Клетки инкубировали с красителем в течение 2 часов при 37 °C и 5% CO₂.

Измерения флуоресценции проводили на спектрофотометре Victor Nivo (PerkinElmer, США) согласно стандартному протоколу прибора. Для каждой лунки спектрофотометр выполнял тройное считывание флуоресцентного сигнала при длине волны возбуждения 560 нм и эмиссии 590 нм, после чего автоматически формировался файл в формате Excel, содержащий числовые значения интенсивности свечения для последующего ручного анализа. Для корректной интерпретации результатов и учета фонового сигнала, в эксперимент закладывали дополнительные лунки, содержащие только AlamarBlue без клеток, что позволяло вычесть вклад фона и повысить точность расчетов.

2.13 Контактная цитотоксичность скаффолдов

Крысиные фибробласты линии REF52 и эпителиальные клетки линии ARPE-19 культивировали в полной ростовой среде DMEM. Для подготовки клеток к посадке на матрицы из флаконов с клеточными линиями удаляли ростовую среду и проводили отмывку трипсином для отделения монослоя клеток с поверхности чашки Петри. К суспензии клеток добавляли DMEM до получения концентрации 3 млн клеток на 1 мл ростовой среды и тщательно пипетировали для получения однородного распределения клеток в суспензии. Для подсчета количества клеток использовалась камера Эунбауэра.

От каждого образца были получены матрицы 10*10 мм, которые были натянуты на инсерты и обработаны УФ-излучением. Инсерты с натянутыми матрицами помещались в 24-луночный стерильный планшет и заполнялись DMEM по 800 мкл в лунку для дальнейших исследований.

В каждую лунку с образцом вносили по 50 мкл суспензии клеток для получения одинакового (~150000 клеток на лунку) количества клеток в лунке. Далее планшет с инсертами помещали в инкубатор (37°C, 5% CO₂) на неделю, после чего меняли среду.

Оценку жизнеспособности клеток на матрицах проводили через неделю после посева с использованием набора для флуоресцентного окрашивания (Хекст 33342, кальцеин-АМ, иодид пропидия, Thermo Fisher, США) согласно инструкции в разведениях 1мкМ для красителей Хекст и кальцеин и 2 мкМ для иодида пропидия. Для этого из каждой лунки отбирали среду и добавляли рабочий раствор красителей в DMEM по 600 мкл в лунку. После добавления красителей в каждую лунку планшет убирали на 30 минут в инкубатор для фиксации окрашивания, после чего матрицы были исследованы на 4-канальном флуоресцентном микроскопе EVOS. Для каждой матрицы получали 4 области сканирования с использованием Z-стека. Количество живых и мертвых клеток рассчитывалось вручную.

2.14 Оценка пролиферативной и метаболической активности методом окраски Alamar Blue

Метаболическую и пролиферативную активность клеток оценивали с помощью красителя Alamar Blue на 7-ые сутки после посева. В качестве контроля использовалась среда DMEM без клеток и лунка, засеянная клетками, без матрицы. Для оценки метаболической активности готовили 10% рабочий раствор красителя в DMEM. Из каждой лунки отбирали среду и добавляли рабочий раствор красителя в DMEM по 600 мкл в лунку, после чего планшет убирали в инкубатор на 3 часа. Далее, после инкубации в стерильный 96-луночный планшет шестикратно отбирали по 100 мкл рабочего раствора из каждой лунки. Флуоресценцию считывали на микропланшетном ридере при длине волны возбуждения 540 нм и испускания 590 нм. Значения флуоресценции от лунки без клеток вычитали из значений опытных лунок. Данные представляли в виде усредненных значений для каждой группы.

2.15 Микроскопия визуализации времени жизни флуоресценции

Для проведения флуоресцентной микроскопии с временным разрешением FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) использована система флуоресцентной двухфотонной микроскопии с функцией визуализации времени затухания флуоресценции для метаболического имиджинга на базе Nikon Ti2-U (Япония). Система оборудована фемтосекундными лазерами FemtoFiber Ultra 780/920 нм (Toptica, Германия), гибридным GaAsP фотодетектором для счета фотонов 300-720 нм HPM-100-40 (Becker Hickl, Германия). Изображения получали с помощью CFI Apochromat LWD Lambda S 40XC WI NA=1.15. Размер поля зрения 330 x 330 мкм, разрешение полученных изображений 512 x 512 пикселей. Накопление фотонов FLIM системой проводили в течение 90 секунд. Длина волны возбуждения составляла 780 нм. Для точной детекции НАДН и избавления от фонового сигнала был использован полосовой фильтр BP445/45 и заграждающий фильтр SP680. Средняя мощность, подаваемая на образцы, составляла 5-10 мВт. Примерная скорость счета фотонов была $1-2 \times 10^5$ фотонов в секунду. Количественную оценку полученных FLIM-данных

проводили в программе SPCLImage (Becker & Nickle GmbH, Германия). Изображение импортировали в программу, выделяли область интереса и оценивали значения времен жизни флуоресценции и процентных вкладов различных компонент в образце. Для анализа данных использовали би-экспоненциальную модель разложения кривой распада флуоресценции НАДН. Таким образом, оценивали следующие значения: t_m (пс) – среднее время жизни флуоресценции НАДН; τ_1 (пс) – время жизни флуоресценции короткой компоненты – свободная форма НАДН; τ_2 (пс) – время жизни флуоресценции длинной компоненты – связанная форма НАДН; α_1 (%) – вклад короткой компоненты; α_2 (%) – вклад длинной компоненты.

2.16 Статистический анализ

Статистический анализ полученных во время экспериментов данных был проведен в программе GraphPad Prism. Для статистического анализа использован критерий Краскела-Уоллиса с последующим множественным сравнением по Данну для доверительных вероятностей - $p \leq 0,05$ и $p < 0,01$ в случае исследований на куриных эмбрионах, а также для доверительных вероятностей $p \leq 0,0332$, $p \leq 0,0021$, $p \leq 0,0002$, и $p \leq 0,0001$ для остальных экспериментов. Для анализа был выбран непараметрический критерий, так как данные распределены отлично от нормального. Данные представлены как медиана и 5-95 процентиля.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Исследование влияния концентрации и массового соотношения ПКЛ и секрета МСК на реологические характеристики раствора.

Динамическая вязкость определяется как способность материала сопротивляться течению и деформации при механических колебаниях в зависимости от температуры, частоты, состава полимерного раствора и других параметров.

Полимерные растворы для электроспиннинга зачастую состоят из крупных молекул, которые путем взаимодействия друг с другом образуют сложные пространственные структуры. За счет этих взаимодействий изменяется и вязкость растворов, что приводит к возникновению неньютоновской жидкости – жидкости, не подчиняющейся уравнению Ньютона для вязкой жидкости.

При таких условиях сила внешнего воздействия электрического поля в камере для электроспиннинга идет не только на преодоление вязкости раствора, но и на разрушение структуры.

Для исследования вязкости были взяты 5 растворов, отличающиеся процентным содержанием раствора секрета. Основой для всех растворов послужил полимерный раствор 20% ПКЛ (w/v) в ДХМ. Процент содержания рсМСК оценивался по объемной доле – 0, 2, 3, 4 и 5%, соответственно. Полученные значения представлены на Рисунке 5.

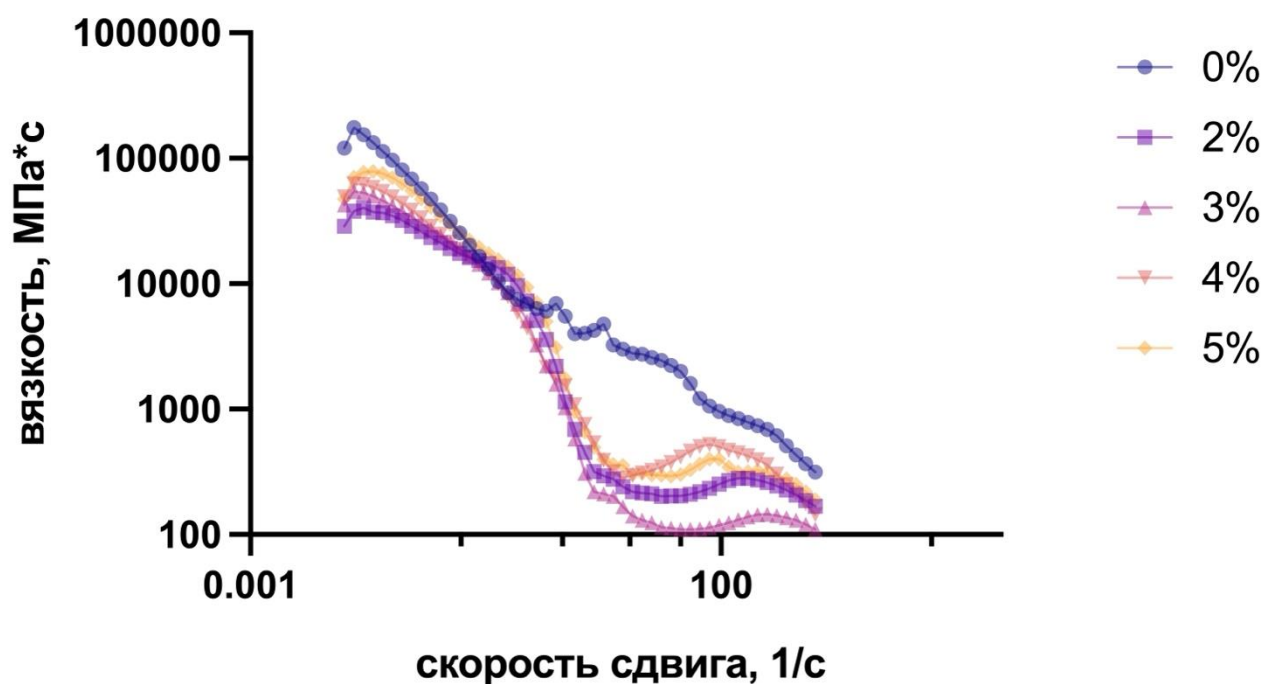


Рисунок 5. Динамическая вязкость растворов с 0, 2, 3, 4 и 5% рсМСК при температуре 23°C.

Отметим, что для всех растворов отмечается снижение динамической вязкости при увеличении скорости сдвига, что означает выравнивание молекулярных цепей. Таким образом, именно эти пики позволяют оценить межмолекулярные взаимодействия в растворах. В диапазоне скоростей 1-5,69 1/с отмечается резкий спад вязкости, что связано с разрывом межмолекулярных связей в растворе. Тогда усредненная вязкость в диапазоне скоростей сдвига 5,7-47,2 1/с является вязкостью ньютоновской жидкости, что эквивалентно полимерному раствору с минимальным числом межмолекулярных взаимодействий. В диапазоне скоростей сдвига 100-200 1/с наблюдается участок плато, соответствующий поведению ньютоновской жидкости. Вязкость растворов при скорости сдвига, рассчитанной с помощью Формулы 1 и близкой к условиям электроспиннинга (~ 170 1/с) лежит в пределах 112,7 – 2230,2 Мпа*с, что в дальнейшем может способствовать разной морфологии волокон ввиду разного давления, приложенного к раствору при электроспиннинге. При достижении плато наименьшая вязкость у раствора с 3% рсМСК, что повлияет на формирование тонких волокон за счет

лучшего вытягивания раствора в электрическом поле. Более плотная укладка волокон, полученная для скаффолдов с 3% рсМСК, обусловит меньшую пористость материала и, как следствие, его упругость ввиду равномерного распределения тонких, более упругих волокон.

При оценке пиковой вязкости можно заметить, что увеличение процентного содержания рсМСК в растворе приводит к увеличению вязкости. Данная зависимость может быть вызвана взаимодействием между молекулами, составляющими секретом, и молекулами ПКЛ. Так, возможно взаимодействие ПКЛ с белками путем образования водородных связей между карбонильными группами полимера и амидными и гидроксильными группами белковых молекул, за счет чего менее вязкий рсМСК встраивается в конгломераты ПКЛ. Также, благодаря гидрофобным взаимодействиям, молекулы белка адсорбируются на поверхности ПКЛ. Кроме того, в состав секрета входят внеклеточные везикулы, которые липидной оболочкой могут связываться через матриксные белки с ПКЛ.

3.2 Анализ физико-химических и биологических свойств однослойных скаффолдов с хаотичной укладкой

3.2.1 Анализ поверхностных свойств

На СЭМ-фотографиях образцов с добавлением рсМСК отмечается появление тонких наноразмерных волокон, которых не обнаружено у образца из чистого ПКЛ (Рис.6). Это может указывать на композитную природу волокон, так как в тонкие волокна могут быть включены молекулы из рсМСК, что может менять конформацию волокон вследствие уменьшения энергии связей. Также при увеличении процента добавленного рсМСК уменьшается и средний диаметр волокон, что может быть связано с изменением конформации молекул за счет новых взаимодействий (Таб.2).

Увеличение диаметра волокон из чистого ПКЛ по сравнению с волокнами на основе его смеси с рсМСК обусловлено изменением реологических и электрофизических свойств формируемого раствора:

введение гидрофильных молекул, содержащихся в растворе секрета, выступающих в роли пластификатора, снижает общую вязкость системы за счет нарушения связей между молекулами ПКЛ. Это повышает способность системы к вытягиванию и ориентации макромолекул, так как увеличивает электропроводность раствора, приводя к более интенсивному удлинению и утончению заряженной полимерной струи под влиянием электростатических сил, что, в совокупности, и обеспечивает формирование волокон с меньшим средним диаметром. Кроме того, налипание получившихся тонких волокон с меньшей поверхностной энергией друг на друга обеспечивает снижение толщины скаффолдов за счет более компактного расположения волокон. Добавление рсМСК привело к уменьшению размера пор, среднего диаметра волокон и толщины скаффолдов ввиду образования более тонких волокон.

Тонкие волокна обладают меньшей механической прочностью в первую очередь благодаря своей геометрии и тому, что количество связей между молекулами синтетического полимера, показывающего высокие механические характеристики, уменьшается. За счет этого скаффолды с добавлением рсМСК выдерживают меньшую силу на разрыв и, соответственно, меньше подвержены удлинению.

При увеличении содержания рсМСК в диапазоне 0-3% отмечается тенденция к уменьшению размера пор, но в случае 4 и 5% концентрации тонкие волокна располагаются более плотными отдельными конгломератами. Наибольшую сетчатость тонкие волокна показывают у скаффолда 3%#, что обуславливает меньшую пористость материала и в дальнейшем повлияет на механические свойства. Низкая пористость у скаффолдов 2%# и 3%# обусловлена большим количеством упругих тонких волокон, что, в дальнейшем, повлияет на увеличение упругости и модуля Юнга скаффолдов при механическом растяжении, а также позволит выдерживать большее напряжение по сравнению с образцами 4%# и 5%#.

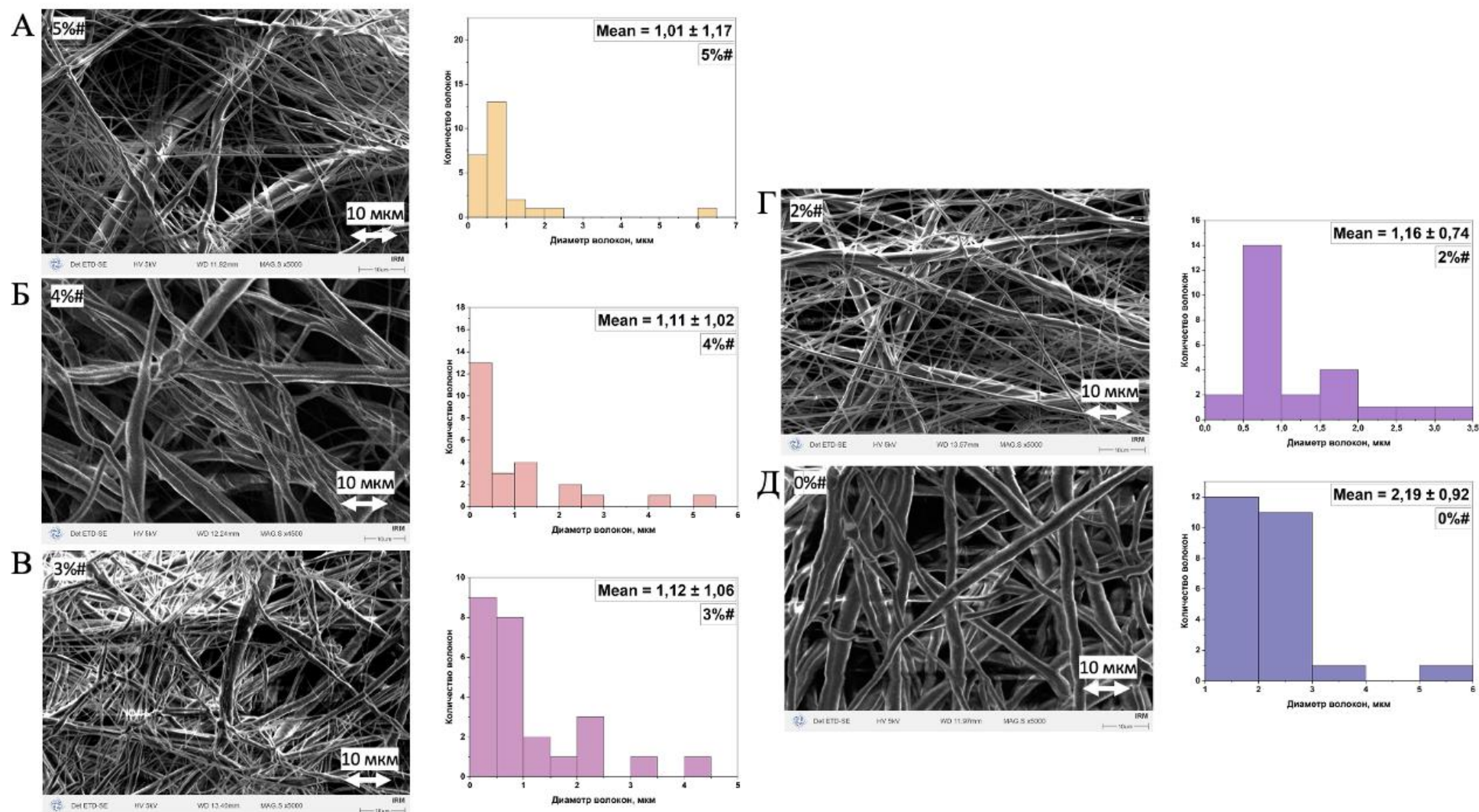


Рисунок 6. СЭМ-фотографии скаффолдов и графики распределения диаметров ($n=25$): А — для скаффолда 5%#, Б — для скаффолда 4%#, В — для скаффолда 3%#, Г — для скаффолда 2%#, Д — для скаффолда 0%#.

Таблица 2. Распределение размера пор, пористости материала, среднего диаметра волокна и толщины скаффолдов в зависимости от процента загрузки скаффолда секретомом (n=3).

Скаффолды	Средний размер пор, нм	Пористость материала, %	Средний диаметр волокон, мкм	Толщина скаффолда, мкм
5%#	433 ± 41	18 ± 3	1,01 ± 1,17	51 ± 3
4%#	290 ± 12	12 ± 1	1,11 ± 1,02	56 ± 5
3%#	251 ± 1	9 ± 1	1,12 ± 1,06	62 ± 2
2%#	416 ± 44	13 ± 2	1,16 ± 0,74	86 ± 10
0%#	1917 ± 54	15 ± 1	2,19 ± 0,92	101 ± 12

Гидрофильные свойства скаффолдов были исследованы путем измерения КУС на образцах. Результаты эксперимента представлены на Рисунке 7 и показывают тенденцию к уменьшению КУС при увеличении концентрации рсМСК.

Данная зависимость может быть обусловлена рядом причин: раствор рсМСК является гидрофильным вследствие большого количества гидрофильных (белки, пептиды, микроРНК) и амфифильных (липидные компоненты) молекул; уменьшение межмолекулярных связей между молекулами ПКЛ вследствие возможного взаимодействия с молекулами в составе секретома приводит к увеличению полярных сложноэфирных групп, которые взаимодействуют с водой. Все скаффолды демонстрируют гидрофобное поведение.

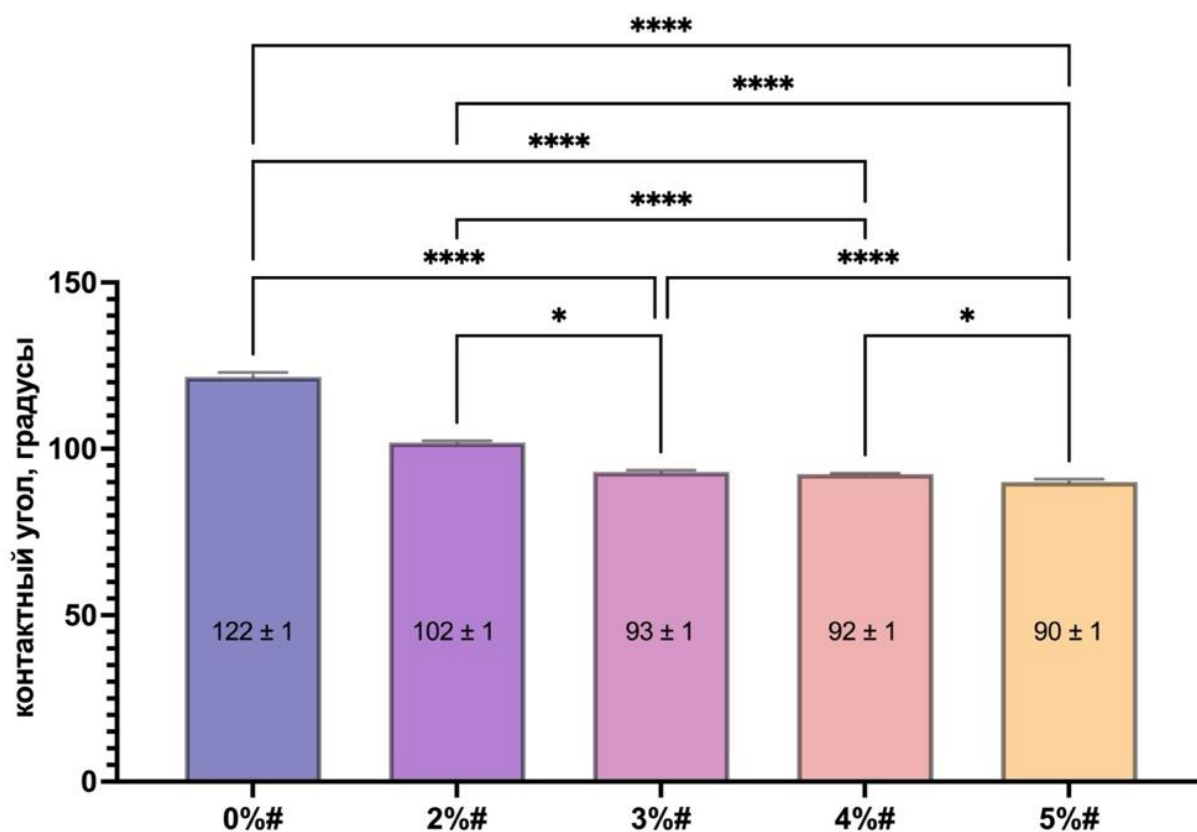


Рисунок 7. График КУС скаффолдов. * - $p \leq 0,0332$, ** - $p \leq 0,0021$, *** - $p \leq 0,0002$, **** - $p \leq 0,0001$.

Скаффолды на основе чистого ПКЛ характеризуются наибольшим контактным углом смачивания ($122 \pm 2^\circ$), то есть большей гидрофобности, за счет наличия длинных алкильных цепей, которые не образуют водородные связи с молекулами воды. Добавление рМСК снижает гидрофобность каркасов — на 20° для 2%# и на $28-31^\circ$ для 3%#, 4%# и 5%# загрузки в сравнении с чистым ПКЛ — вследствие наличия большого количества гидрофильных соединений. С увеличением процента рМСК увеличивается и количество тонких волокон, что способствует уменьшению КУС вследствие геометрического расположения. Однако в случае 4 и 5% рМСК тонкие волокна располагаются более плотно ввиду налипания друг на друга, поэтому предполагается, что при дальнейшем повышении концентрации КУС выйдет на плато.

Уменьшение КУС благоприятно повлияет и на заселение скаффолдов клетками, так как гидрофильность каркаса способствует лучшей адгезии клеток на волокна [67].

3.2.2 Анализ механических характеристик

При исследовании механических характеристик скаффолдов видно, что прочность на разрыв, характеризующая способность материала сопротивляться разрушению под воздействием внешней нагрузки, уменьшается при увеличении концентрации рсМСК (Рис.8). Это может происходить из-за ряда факторов. В первую очередь на механические свойства могут влиять физико-химические особенности секрета, так как энергия связи между молекулами секрета в 3-6 раз меньше энергии связи между молекулами ПКЛ. Модуль Юнга, характеризующий упругие свойства материала, наибольший у скаффолда 3%# ($2,3 \pm 0,3$ МПа), что означает наилучшее соотношение диаметра волокон, их пористости и толщины скаффолда (Таб.3). Благодаря низкой пористости и малому размеру пор и, следовательно, частой укладке волокон, сила, приложенная к скаффолду распределяется более равномерно, чем при другом проценте загрузки, поэтому именно у скаффолда 3%# модуль Юнга наиболее высок.

Таким образом на основе полученных данных можно предположить, что разобщение связей ПКЛ-ПКЛ и предполагаемое наличие молекул секрета в волокнах влияют на механические характеристики в сравнении с чистым ПКЛ, однако четкой корреляции между увеличением процента загрузки и изменением характеристик нет.

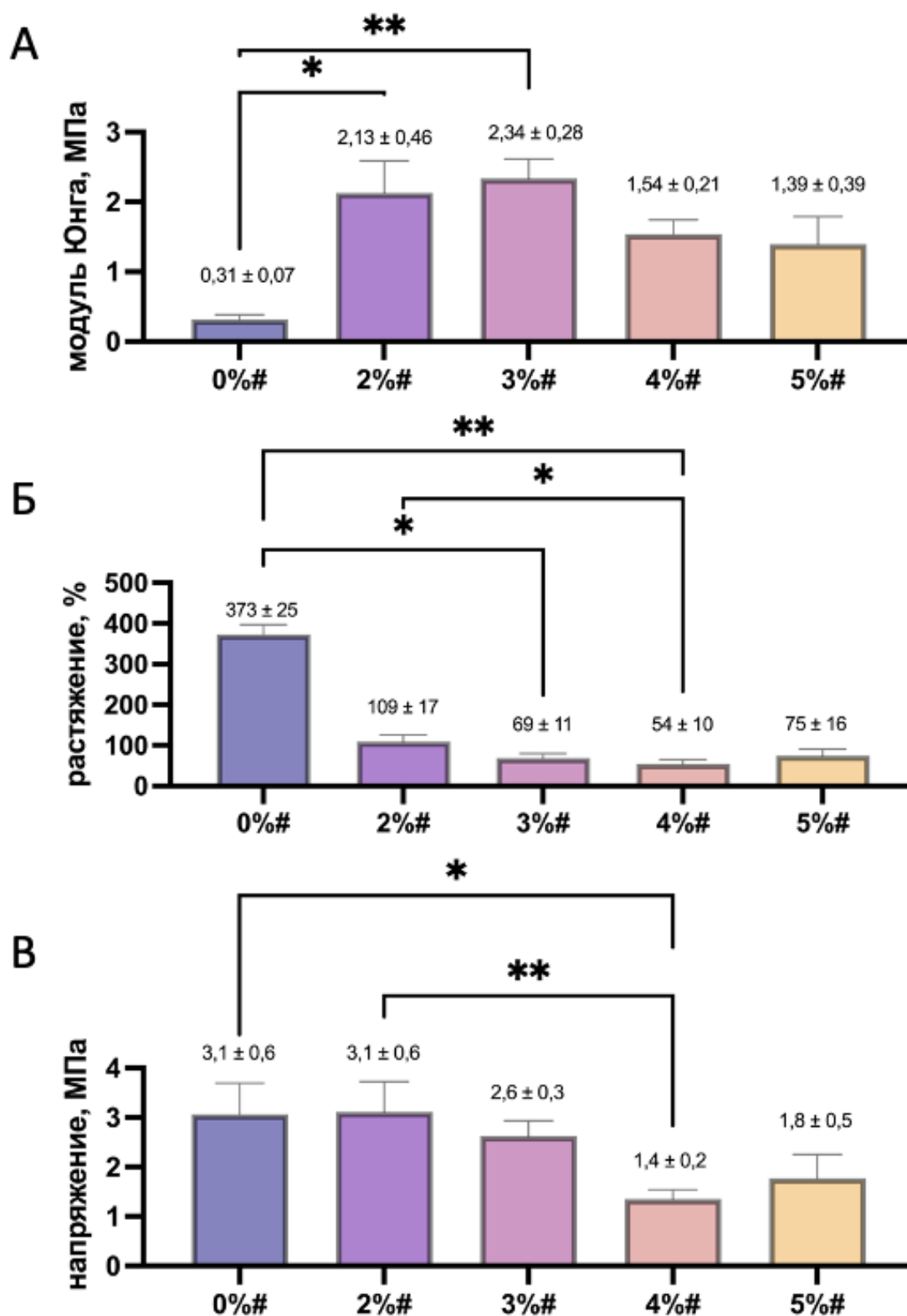


Рисунок 8. Графики механических свойств: А — модуля Юнга; Б — максимального удлинения; В — максимального напряжения. * - $p \leq 0,0332$, ** - $p \leq 0,0021$.

Таблица 3. Механические свойства скаффолдов (объем рабочего раствора 2 мл, n=4).

Скаффолды	Толщина скаффолда, мкм	Модуль Юнга, МПа	Максимальное напряжение, МПа	Максимальное удлинение, %
0%#	101 ± 12	0,31 ± 0,07	3,1 ± 0,6	373 ± 25
2%#	86 ± 10	2,13 ± 0,46	3,1 ± 0,6	109 ± 17
3%#	62 ± 2	2,34 ± 0,28	2,6 ± 0,3	69 ± 11
4%#	56 ± 5	1,54 ± 0,21	1,4 ± 0,2	54 ± 10
5%#	51 ± 3	1,39 ± 0,39	1,8 ± 0,5	75 ± 16

Также ввиду увеличения количества тонких волокон секретома уменьшается и необходимая для разрыва скаффолда сила. Это может быть обосновано тем, что энергия связи молекул из рсМСК и ПКЛ меньше, чем связи ПКЛ-ПКЛ, что, вероятно, связано с уменьшением силы, необходимой для разрыва, с увеличением концентрации раствора секретома. Вследствие уменьшения силы разрыва уменьшается и максимальное удлинение.

3.2.3 Оценка цитотоксичности материалов

Цитотоксическое действие не наблюдалось ни для одной из матриц. Все концентрации экстрактов не оказывали отрицательного влияния на жизнеспособность фибробластов по сравнению с ростовой средой, использованной в качестве отрицательного контроля (Рис. 9). Более того, экстракты из 3%# способствовал повышению метаболической активности фибробластов. Воздействие додецилсульфата натрия (ДСН), использованного в качестве положительного контроля, приводило к значительному снижению жизнеспособности клеток; летальная концентрация ДСН была зафиксирована при разведении 6,25%.

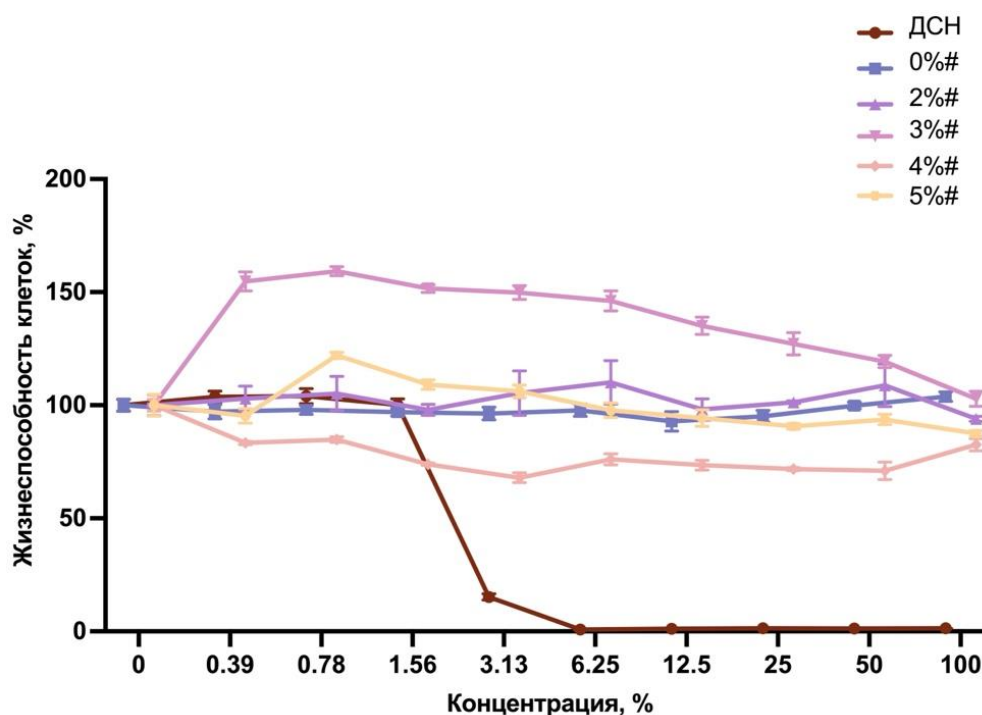


Рисунок 9. Зависимость жизнеспособности клеток, посаженных в растворы полимеров, от концентрации экстракта.

3.2.4 Оценка ангиогенного потенциала

Макроскопическая оценка ангиогенного ответа проводилась по сосудистому индексу, общей протяженности и площади сосудистой сети, так как эти показатели позволяют определить уровень снабжения тканей питательными веществами, что способствует лучшей регенерации. Сосудистый индекс измеряли как разницу между количеством сосудов через 72 часа после имплантации (10 день инкубации) в области вокруг биоматериала и до имплантации (7 день инкубации, 0 часов).

Данные по длине и площади сосудов представлены в процентах, отражающих насколько увеличилась протяженность сосудистой сети через 72 часа после имплантации (10 день инкубации) по сравнению со значениями ПКЛ плохо прикрепляется к хориоаллантаоидной мембране, через 72 часа после имплантации образцы перемещаются к границе эмбриона (Рис. 10).

Оценка ангиогенеза по общей протяженности сосудистой сети показала снижение длины сосудов для матриц из ПКЛ через 72 часа после имплантации (10 день инкубации) по сравнению с контрольным образцом без материала.

Значимые различия в значениях наблюдались между контролем и 0%# и 2%#, что говорит о значительном снижении ангиогенной активности. Оценка по площади сосудистой сети также показала значимые различия между контролем и 0%# (Рис.11).

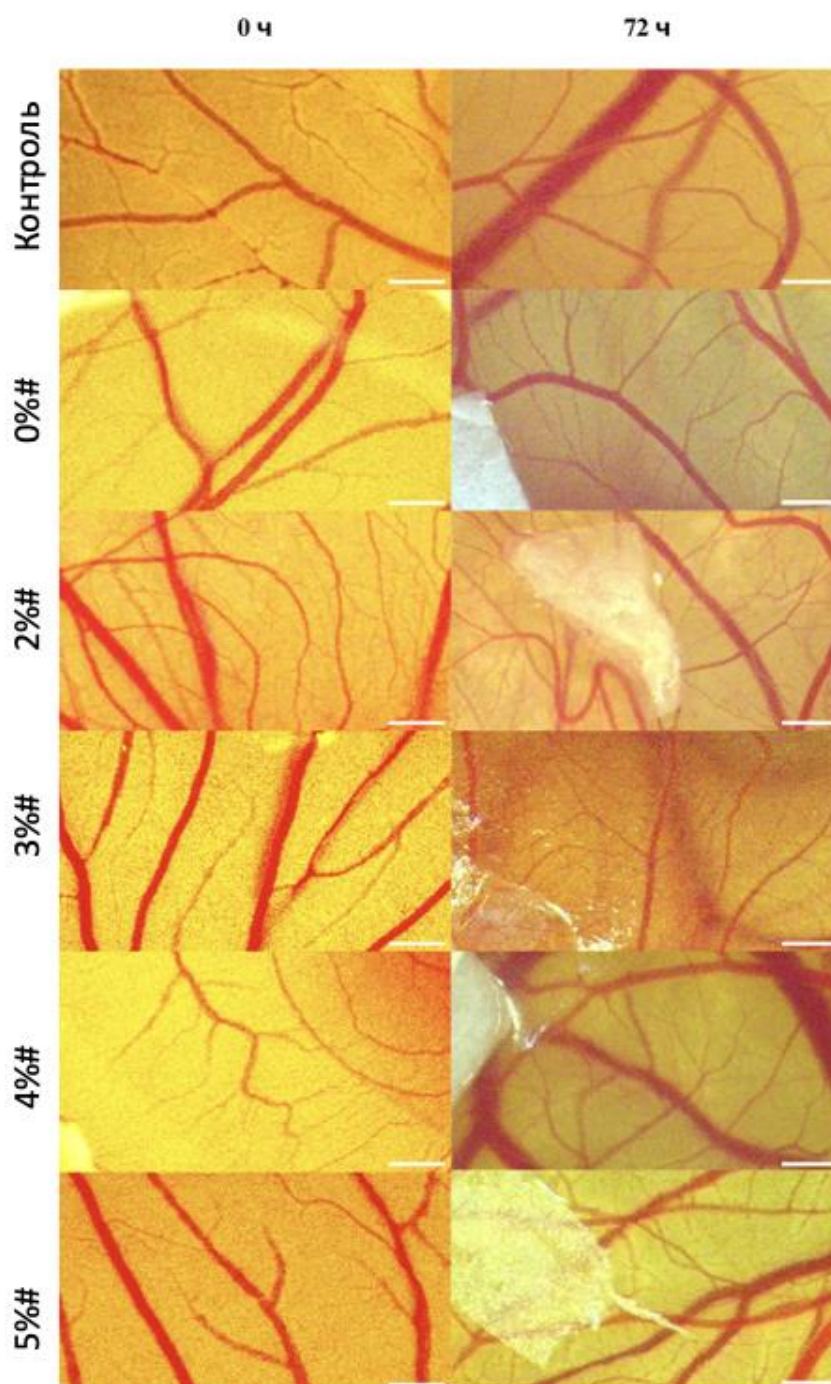


Рисунок 10. Макроскопические фотографии мембран куриных эмбрионов до и после имплантации.

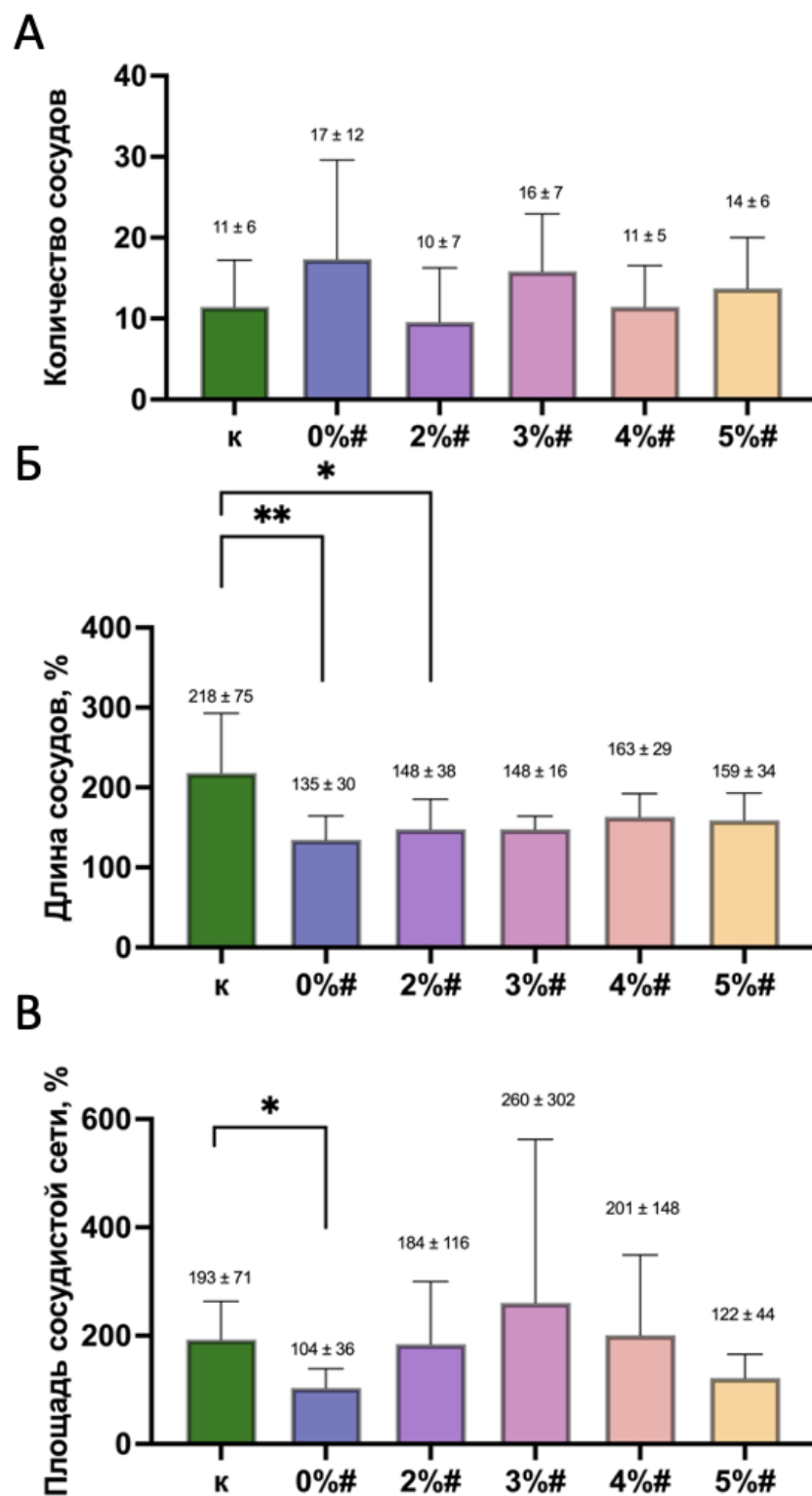


Рисунок 11. Ангиогенные параметры скаффолдов: А — сосудистый индекс; Б — протяженность сосудов; В — площадь сосудистой сети (n=9). * - $p \leq 0,05$, ** - $p \leq 0,001$.

Оценка ангиогенного ответа по количеству новых сосудов продемонстрировала высокую ангиогенную активность ПКЛ-матриц, сопоставимую с контролем.

С увеличением содержания секрета увеличивается и длина сосудов в сравнении с чистым ПКЛ. Такая закономерность может быть обусловлена наличием в составе секрета факторов сосудистого роста.

Сосудистый индекс образцов совпадал с сосудистым индексом положительного контроля, кроме образцов 0%# и 3%#, индекс которых был на 17-21% выше, что свидетельствует о более быстром начале васкуляризации тканей для этих образцов.

Площадь сосудистой сети наиболее высока в образцах 2%#, 3%# и 4%#, причем в образце 3%# она превышает значения положительного контроля, что вкупе со знанием о высокой скорости васкуляризации означает создание более разветвленной и структурированной сети.

3%#, 4%# и 5%# не показали негативных эффектов на сосудистую сеть эмбрионов через 72 часа после имплантации. Матрицы 0%# и 2%# вызвали снижение ангиогенной активности по некоторым параметрам оценки. Такие результаты связаны не только с концентрацией рсМСК, но и с теми изменениями поверхностных и механических свойств, которые эта добавка вызвала.

Ex vivo оценка ангиогенного ответа, основанная на сосудистом индексе, длине сосудов и площади сосудистой сети, показала выраженную ангиогенную активность 3%#, 4%# и 5%#, сопоставимую с показателями отрицательного контроля. Макроскопическая оценка выявила неплотное приращение ПКЛ-матриц к хорио-аллантаисной мембране, что сопровождалось их незначительным смещением относительно исходного положения. Все ПКЛ-матрицы не оказывали статистически значимого влияния на развитие эмбрионов *Gallus gallus*. Через 72 часа после имплантации неблагоприятных эффектов при использовании 3%#, 4%# и 5%# не

наблюдалось. В то же время, при применении 0%# отмечалось снижение общей длины и площади сосудистой сети, а для 2%# — уменьшение общей длины сосудов по сравнению с контрольной группой, что может свидетельствовать о снижении ангиогенной активности в присутствии этих матриц.

По результатам исследования было выявлено, что образец 3%# обладает наибольшим ангиогенным потенциалом за счет высоких значений площади сосудистой сети, общей длины сосудов и сосудистого индекса. Такой эффект был достигнут ввиду упругости и гидрофильных свойств скаффолда, так как это способствовало лучшей адгезии делящихся клеток.

3.3 Анализ физико-химических и биологических свойств двухслойных скаффолдов с различными типами укладки

На основании всех данных, полученных при исследовании однослойных скаффолдов с хаотичной укладкой, было принято решение усилить механические стимулы за счет добавления слоя с параллельной укладкой. Согласно этой гипотезе, были изготовлены скаффолды состоящие из нижнего хаотичного слоя, сохраняющего основные механические свойства, такие как растяжение и прочность, и верхнего параллельно ориентированного слоя, призванного направлять процессы жизнедеятельности клетки по пути активной пролиферации.

3.3.1 Анализ поверхностных свойств

При увеличении объема рабочего раствора также, как и в случае однослойных скаффолдов с хаотичной укладкой отмечено появление тонких наноразмерных волокон (Рис.12). Отмечается, что при параллельной укладке возникают толстые волокна, возможно, ввиду слипания тонких волокон между собой в процессе образования параллельных тяжей.

Однако увеличение концентрации рсМСК в растворах также показывает тенденцию к уменьшению среднего диаметра за счет возникновения тонких волокон. Также заметно изменение толщины скаффолдов при изменении

архитектуры слоев: 99,71 нм для простой однослойной архитектуры против 126,10 нм для двухслойной архитектуры.

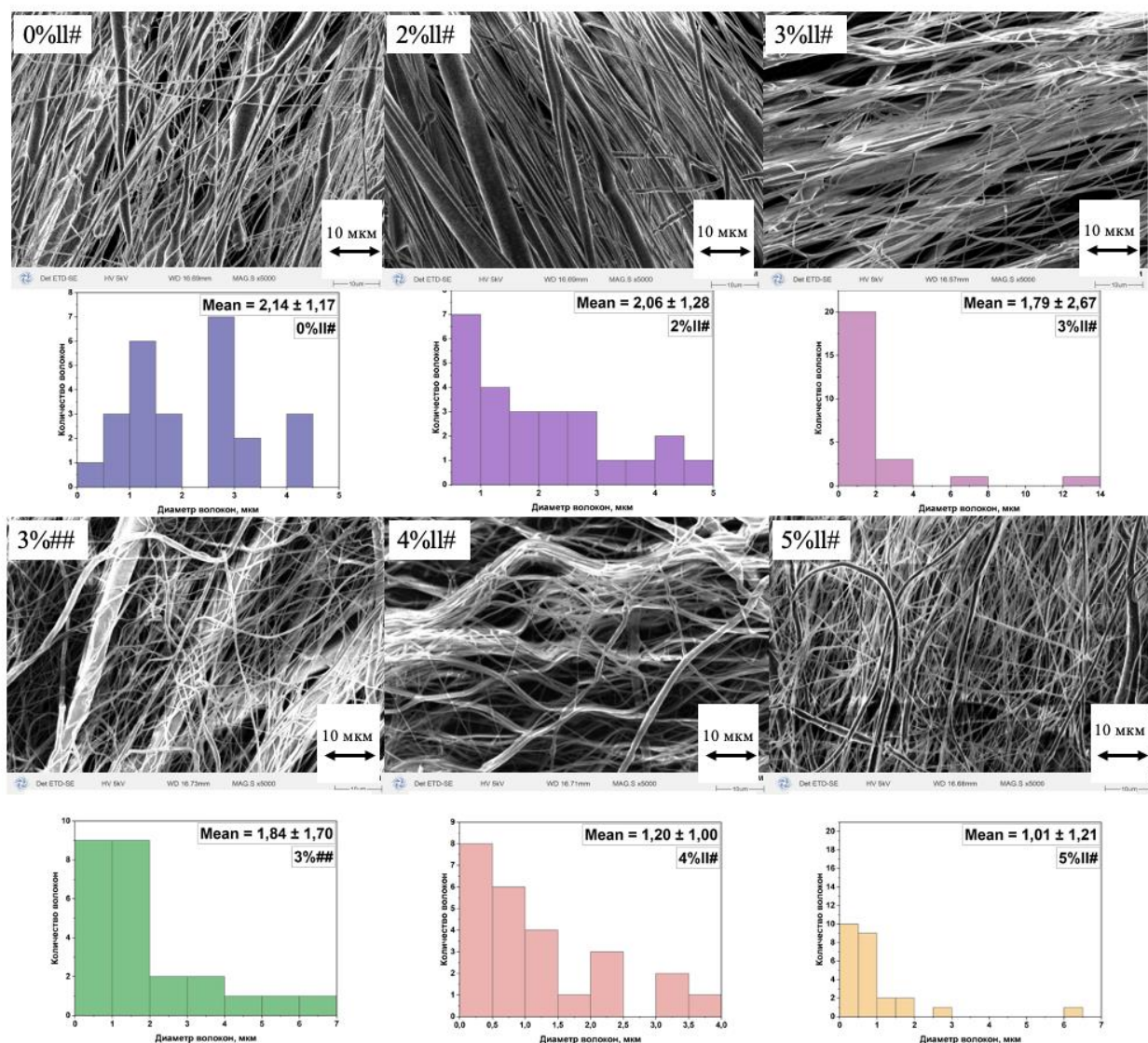


Рисунок 12. СЭМ-фотографии скаффолдов и графики распределения диаметров волокон (n=25).

Увеличение объема рабочего раствора ожидаемо привело к увеличению толщины скаффолдов, что отражено в Таблице 4.

Таблица 4. Распределение размера пор, пористости материала, среднего диаметра волокна и толщины скаффолдов в зависимости от процента загрузки скаффолда секретомом (объем рабочего раствора 4 мл).

Скаффолды	Средний размер пор, нм	Пористость материала, %	Средний диаметр волокон, мкм	Толщина скаффолда, мкм
5%II#	33 ± 4	4,18 ± 4,06	1,01 ± 0,97	94,67 ± 2,74
4%II#	161 ± 12	17,19 ± 1,04	1,20 ± 0,99	135,32 ± 6,39
3%II#	131 ± 11	2,12 ± 0,59	1,79 ± 1,67	126,10 ± 2,76
3%##	100 ± 11	10,97 ± 1,42	1,86 ± 1,96	99,71 ± 5,63
2%II#	230 ± 46	6,93 ± 2,01	2,06 ± 1,28	176,91 ± 8,17
0%II#	62 ± 6	3,48 ± 4,52	2,14 ± 1,17	187,03 ± 12,42

Гидрофильные свойства скаффолдов были исследованы путем измерения КУС на образцах. Результаты эксперимента представлены на Рисунке 13 и показывают тенденцию к уменьшению КУС при увеличении содержания рсМСК. В случае 4%II# и 5%II# капля впитывалась в течение минуты, что показывает гидрофильный потенциал данных скаффолдов. Такой результат может быть связан с разобщением связей между молекулами синтетического полимера и включением в эти пространства более гидрофильных участков, содержащихся в рсМСК.

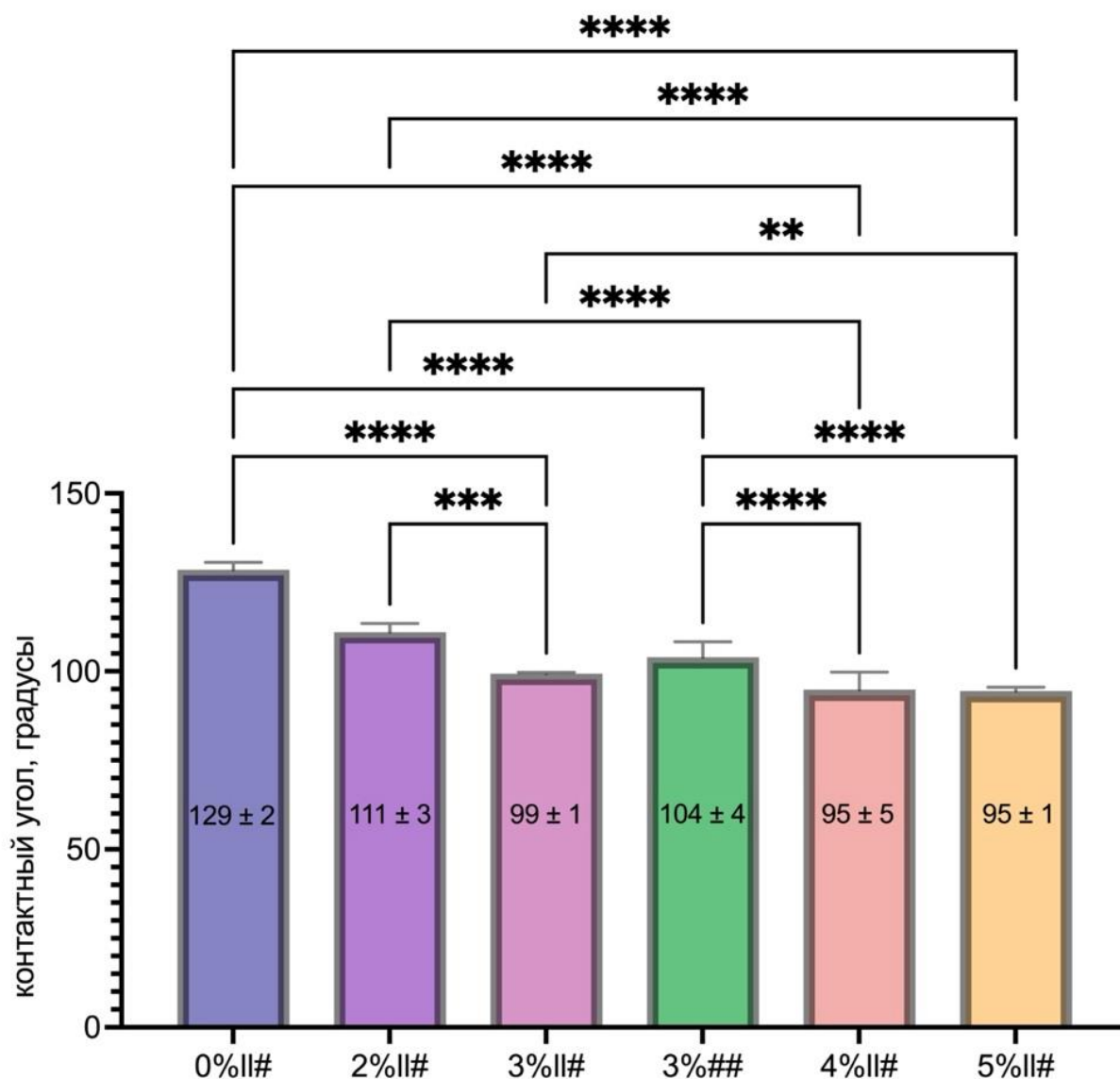


Рисунок 13. График КУС скаффолдов. * - $p \leq 0,0332$, ** - $p \leq 0,0021$, *** - $p \leq 0,0002$, **** - $p \leq 0,0001$.

Также при сравнении разных архитектур отмечается то, что сложная двухслойная архитектура обладает большей гидрофильностью, чем хаотичная однослойная укладка — $99 \pm 2^\circ$ против $104 \pm 5^\circ$. Такое изменение возможно из-за увеличения размера пор и толщины скаффолдов при изменении архитектуры. Скорее всего это связано с тем, что слой параллельной укладки при сложной архитектуре дает большую распушенность волокон, образуя параллельные тяжи с промежутками между ними.

Даже при увеличении объема рабочего раствора сохраняется тенденция увеличения гидрофильности, что опять же может быть связано со снижением

количества связей ПКЛ-ПКЛ и возможным включением гидрофильных молекул в волокна. Кроме того, сохраняется «плато», достигаемое у скаффолдов 4%ll# и 5%ll# за счет того, что тонкие волокна располагаются более плотно ввиду налипания друг на друга.

Согласно результатам, полученным в ходе эксперимента, ввиду высокой гидрофильности скаффолдов 4%ll# и 5%ll#, они имеют лучший биопотенциал, так как гидрофильность способствует лучшей адгезии клеток на поверхность каркасов.

Для исследования поверхности скаффолдов был проведен анализ методом ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье. Данные представлены на Рисунке 14. Полученные спектры показали, что во всех исследуемых образцах сохраняются характерные полосы ПКЛ. Наиболее выраженной является полоса в области около 1725 см^{-1} , соответствующая валентным колебаниям карбонильной группы C=O сложноэфирного фрагмента ПКЛ. Кроме того, в спектрах наблюдаются полосы в области 2945 и 2865 см^{-1} , относящиеся к асимметричным и симметричным валентным колебаниям CH_2 -групп, а также полосы в диапазоне $1230\text{--}1110\text{ см}^{-1}$, связанные с колебаниями C-O-C и C-O связей сложноэфирных групп ПКЛ.

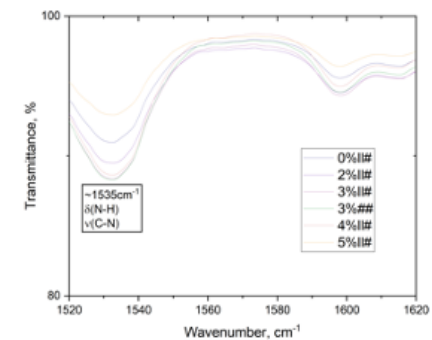
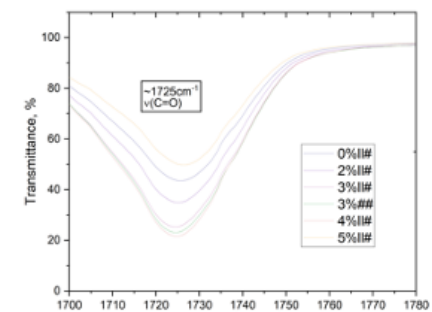
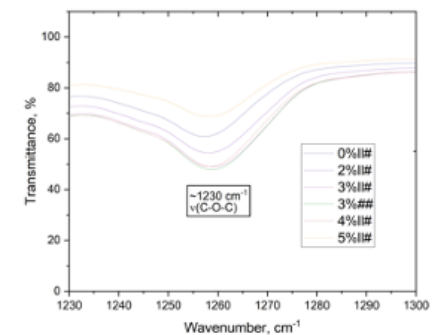
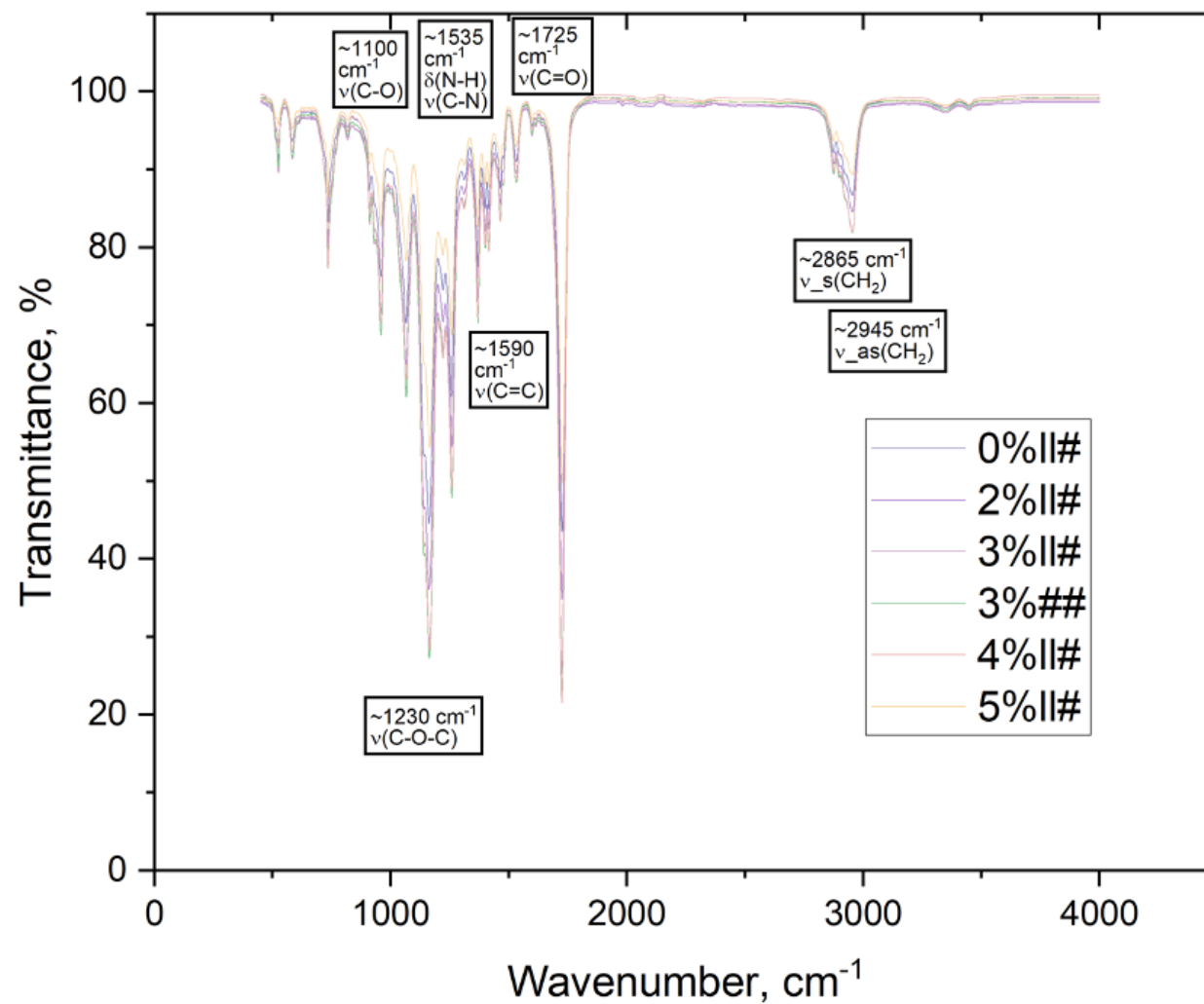


Рисунок 14. ИК-спектры скаффолдов до деградации в ФБС.

При сравнении спектров образцов с различным содержанием рсМСК было установлено, что увеличение его концентрации приводит к изменению формы и интенсивности отдельных полос. Так, в области карбонильной группы наблюдается сдвиг полосы $C=O$. Это может быть следствием того, что между белковыми компонентами секрета и ПКЛ формируются нековалентные взаимодействия (водородные связи), что приводит к изменению локального окружения карбонильных групп ПКЛ. В результате максимум полосы $C=O$ смещается в сторону меньших волновых чисел. Кроме того, изменение формы данной полосы может быть связано с появлением вклада карбонильных групп белковых и пептидных компонентов секрета, что приводит к асимметрии и уширению пика.

Особое значение имеют изменения в амидной области спектра, поскольку именно они могут указывать на наличие белковой составляющей секрета. В диапазоне $1595\text{--}1610\text{ см}^{-1}$ наблюдается повышение интенсивности полосы, соответствующей валентным колебаниям $C=O$ в белковых структурах и относимой к области Амида I. Данная полоса связана преимущественно с пептидными связями белков и является одним из косвенных признаков присутствия белковых компонентов секрета в составе композитных образцов. Кроме того, в области $1520\text{--}1550\text{ см}^{-1}$ появляются дополнительные деформации, соответствующие полосам Амида II, которые могут быть обусловлены, главным образом, деформационными колебаниями $N-H$ и валентными колебаниями $C-N$ пептидной связи. Наличие данных полос косвенно подтверждает присутствие аминокислотных остатков и белково-пептидных компонентов в структуре материала.

Также следует отметить усиление полосы в области $1250\text{--}1270\text{ см}^{-1}$, которое может быть связано с сигналами от аминокислотных остатков и проявлением полосы Амида III. Изменение интенсивности и формы пика при увеличении содержания секрета может указывать на дополнительный вклад белковых компонентов. Таким образом, совокупность изменений в областях

1725 cm^{-1} , 1595–1610 cm^{-1} , 1520–1550 cm^{-1} и 1250–1270 cm^{-1} скорее всего свидетельствует о присутствии секретома МСК в составе ПКЛ-матрицы.

Полученные данные позволяют предположить следующее: введение секретома МСК не приводит к исчезновению характеристических полос ПКЛ, то есть основная химическая структура скаффолда сохраняется; появление и усиление полос, характерных для белковых и пептидных компонентов, а также сдвиг карбонильной полосы ПКЛ указывают на возникновение взаимодействия между секретомом и полимером и возможное депонирование части молекул секретома в волокнах ПКЛ.

Таким образом, результаты ИК-спектроскопии косвенно подтверждают включение секретома МСК в ПКЛ-матрицу.

После недели нахождения образцов в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) для имитации физиологической среды организма основные характеристические полосы ПКЛ сохранялись без существенных смещения и изменения формы: во всех спектрах наблюдается интенсивная полоса валентных колебаний карбонильной группы сложноэфирного фрагмента ПКЛ в области $\sim 1720 \text{ cm}^{-1}$, а также полосы метиленовых групп в области $\sim 2940\text{--}2860 \text{ cm}^{-1}$ и полосы С–О–С-связей в диапазоне $\sim 1300\text{--}1100 \text{ cm}^{-1}$. ИК-спектры после деградации представлены на Рисунке 15. Сохранение данных полос свидетельствует о том, что за исследуемый период не произошло значимых изменений в структуре основного полимера. Таким образом, ПКЛ сохраняет свою химическую структуру и остается стабильным в условиях инкубации в ФСБ в течение одной недели.

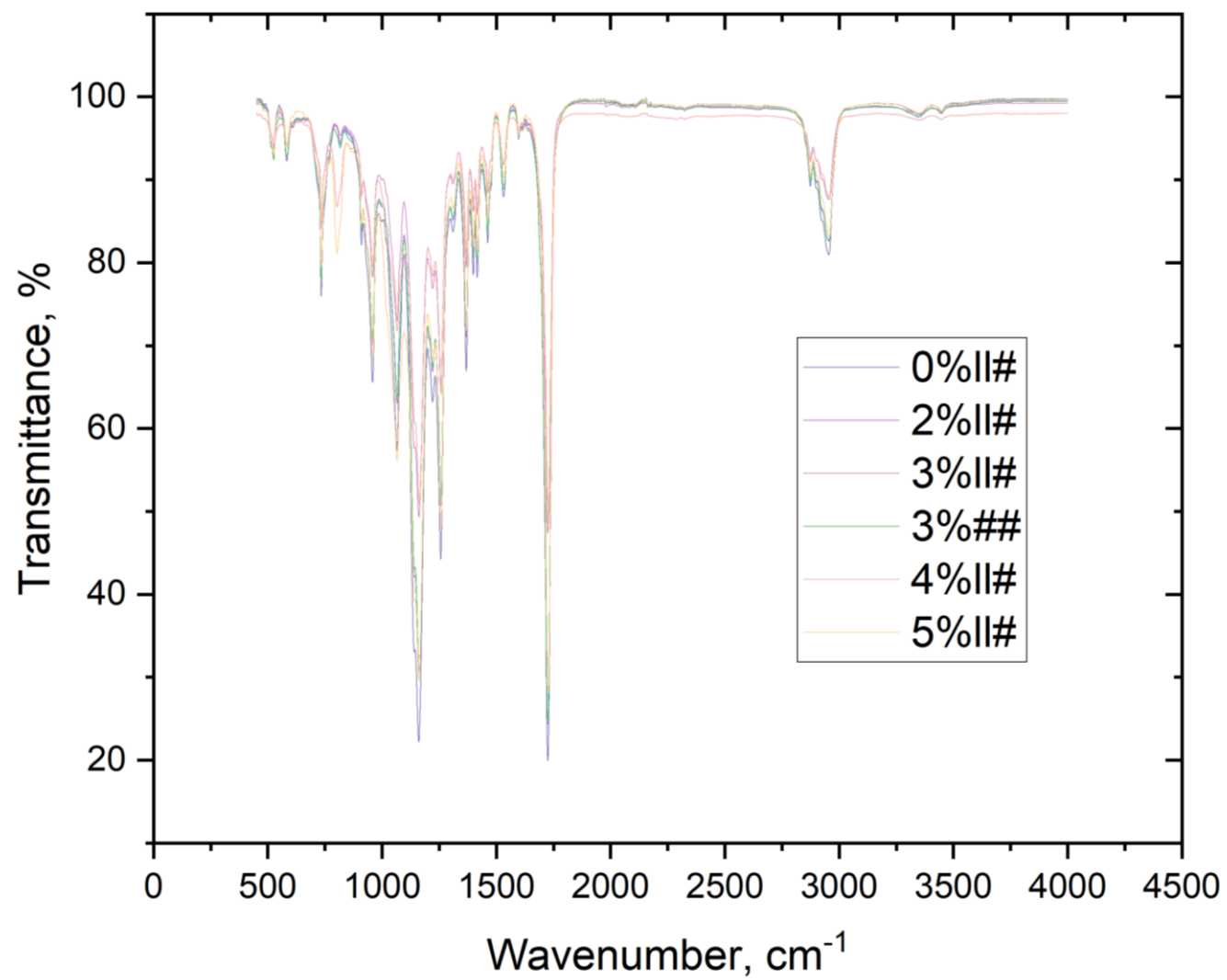


Рисунок 15. ИК-спектры скаффолдов после недели деградации в ФБС.

В то же время после инкубации наблюдалось уменьшение различий между спектрами образцов с различным содержанием рсМСК. Наиболее заметные изменения проявлялись в области 1650–1540 см⁻¹, соответствующей амидным полосам Amide I и Amide II, а также в диапазоне 1300–1000 см⁻¹, где, предположительно, проявляются колебания, связанные с белками, фосфатными группами, углеводными компонентами и другими биомолекулами секрета. После недельной деградации образцов интенсивность и выраженность амидных пиков снизилась, а спектры приближались к спектру чистого ПКЛ. Это может свидетельствовать о том, что происходил процесс релиза компонентов секрета в раствор ФСБ.

Полученные результаты позволяют предположить, что в процессе деградации мог происходить релиз компонентов секрета из скаффолдов в раствор ФСБ, имитирующий внутреннюю среду организма. Отсутствие существенных изменений в полосах, характерных для ПКЛ, указывает на то, что за неделю деградация была, скорее всего, связана с релизом из волокон непосредственно секрета, тогда как плоходеградируемый ПКЛ разрушается в соответствии с гидролитической моделью расщепления. Это свидетельствует о том, что разработанный материал способен сохранять структурную стабильность, что может быть перспективным с точки зрения создания систем контролируемой доставки биологически активных веществ для тканевой инженерии и регенеративной медицины.

3.3.2 Анализ механических характеристик

Увеличение объема рабочего раствора изменило механические свойства скаффолдов (Рис.16). Такое изменение может быть связано с утолщением скаффолда, что позволяет дольше сохранять хотя бы один неповрежденный слой волокон при растяжении, однако увеличение рабочего раствора привело к потере упругости и снижению прочности скаффолдов. Наблюдаемое снижение модуля Юнга и предела прочности при увеличении толщины электроспиннинговых скаффолдов ПКЛ с секретом обусловлено, в первую очередь, статистическим масштабным эффектом, при котором в большем

объеме материала повышается вероятность наличия критического дефекта. Дополнительный вклад вносит технологическая неоднородность, возникающая в процессе длительного электроспиннинга: неравномерное распределение раствора секрета в растворе полимера и ухудшение морфологии волокон в толстых слоях создают градиенты свойств и локальные концентраторы напряжений. При сравнении скаффолдов различной укладки также видны значимые различия (Таб.5). Ключевое отличие в механических характеристиках двухслойного скаффолда по сравнению с полностью изотропным хаотичным образцом, вероятно, обусловлено анизотропией свойств и слабой межслойной границей. Параллельный слой становится крайне слабым при нагрузке на расслоение. При комбинировании с хаотичным слоем именно граница раздела и разница в реакции слоев на общую нагрузку становятся концентратором напряжений, что приводит к преждевременному разрушению, особенно при растяжении в направлении, не совпадающем с ориентацией параллельных волокон.

Стоит отметить, что скаффолд 4%ll# демонстрирует лучшие механические характеристики по сравнению с другими концентрациями двухслойных скаффолдов (Рис. 13). Пик механических свойств свидетельствует об оптимальности такой концентрации, при которой компоненты из раствора секрета, вероятно, модифицируют межволоконные взаимодействия и укрепляют границу раздела слоев. При меньших концентрациях (0, 2, 3%) этого эффекта недостаточно для подавления расслоения, а при большей (5%) избыток компонентов разрушает морфологию волокон, выступая как концентратор напряжений.

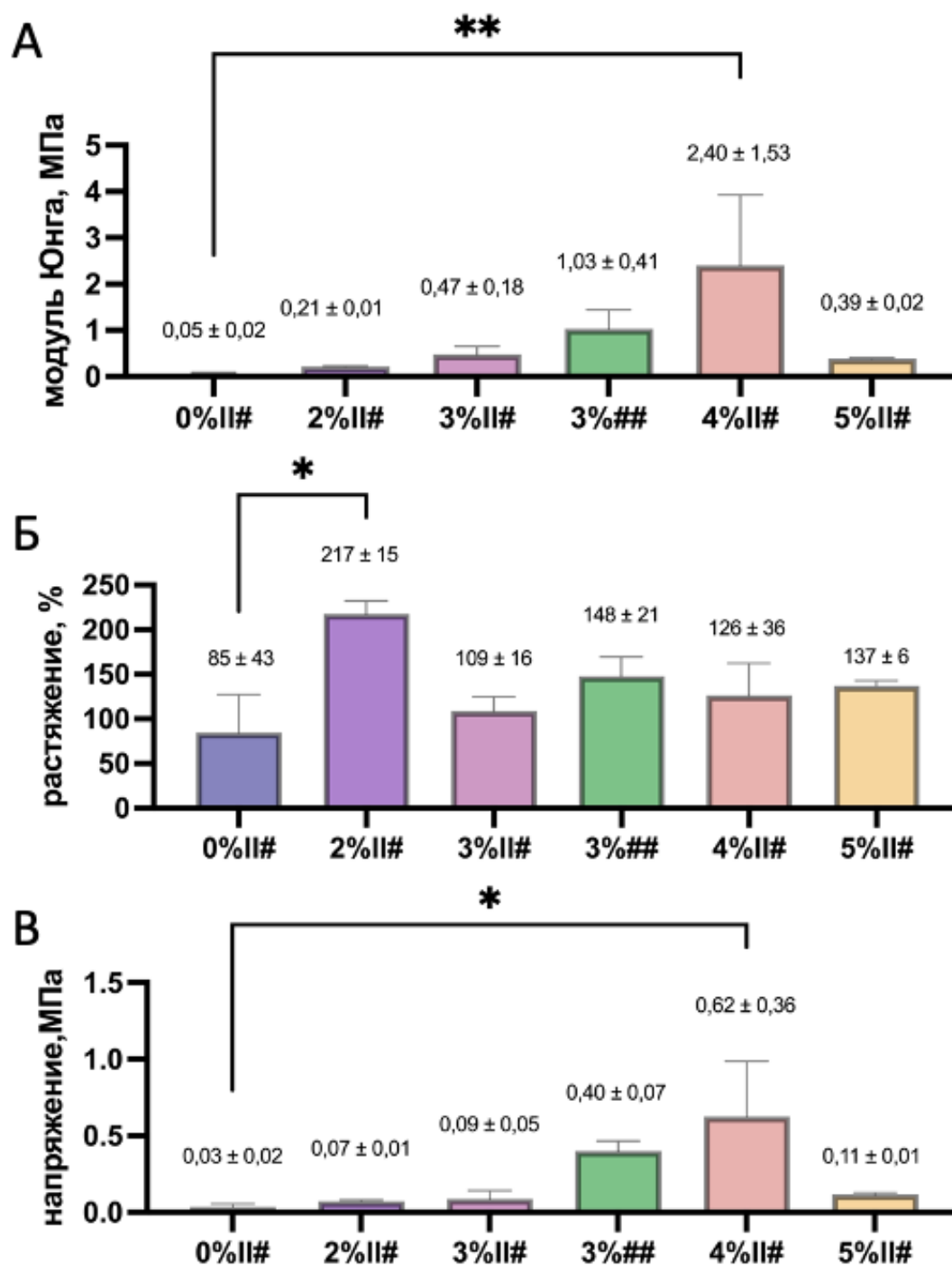


Рисунок 16. Графики механических свойств: А — модуля Юнга; Б — максимального удлинения; В — максимального напряжения. * - $p \leq 0,0332$, ** - $p \leq 0,0021$.

Таблица 5. Механические свойства скаффолдов.

Процент загрузки	Толщина скаффолда, нм	Модуль Юнга, МПа	Максимальное напряжение, МПа	Максимальное удлинение, %
0%II#	187 ± 12	0,06 ± 0,02	0,03 ± 0,02	85 ± 43
2%II#	177 ± 8	0,21 ± 0,01	0,07 ± 0,01	217 ± 15
3%II#	126 ± 3	0,47 ± 0,18	0,09 ± 0,05	109 ± 16
3%##	100 ± 6	1,03 ± 0,41	0,40 ± 0,07	140 ± 4
4%II#	135 ± 6	2,40 ± 1,53	0,62 ± 0,36	126 ± 36
5%II#	95 ± 3	0,39 ± 0,02	0,11 ± 0,01	137 ± 6

3.3.3 Оценка скорости биodeградации

Полученные кинетические профили деградации согласуются с ожидаемым механизмом ускоренного гидролитического расщепления в присутствии гидрофильных компонентов (Рис. 17). Чистый ПКЛ (0%II#) демонстрирует классическую медленную деградацию, характерную для этого полимера. Добавление рсМСК, состоящего в большей степени из гидрофильных молекул, повышает смачиваемость и водопоглощение

материала, что облегчает доступ воды к эфирным связям ПКЛ. Наибольшую скорость деградации за три недели показал скаффолд 5%II#, что может означать быстрый релиз молекул из раствора секретома, которыми одними из первых должны выходить из скаффолдов при деградации за счет более высокой гидрофильности. Также вклад в быструю деградацию может вносить разобщение молекул ПКЛ, что приводит к большей площади доступной для взаимодействия с водой и дальнейшего гидролитического расщепления. Наибольшую же деградацию за последний месяц показал скаффолд 4%II#, что может свидетельствовать о пролонгированном релизе молекул из раствора секретома. Это может быть связано с большим количеством связей белок-ПКЛ, которые сложнее гидролизировать, чем связь белок-белок. Интересно, что скаффолд 4%II#, показавший ранее наилучшие механические характеристики, деградирует с оптимальной для регенерации тканей скоростью: достаточно быстро для обеспечения пространства для роста клеток, но достаточно медленно для временного механического поддержания дефекта. Таким образом, регулирование концентрации раствора секретома позволяет точно настраивать срок службы скаффолда, что является ключевым параметром для успешной тканевой инженерии.

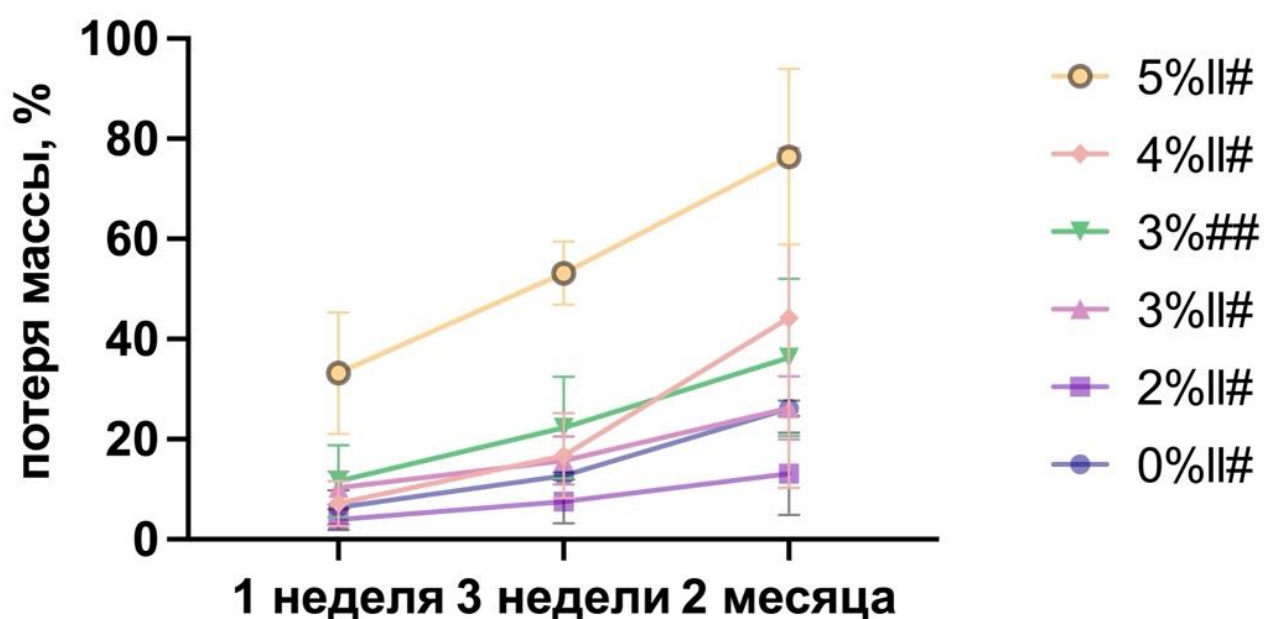


Рисунок 17. Деградация скаффолдов в ФСБ.

3.3.4 Контактная цитотоксичность

Во всех образцах процент живых клеток остается значительно выше, чем процент мертвых клеток, что указывает на общую жизнеспособность клеток. Отмечается тенденция увеличения выживаемости клеток с увеличением секретома, однако у скаффолдов 5%ll# отмечается снижение выживаемости, что коррелирует с изменением архитектуры и толщины этого каркаса за счет большей адгезии волокон друг с другом вследствие увеличения количества тонких волокон. Результаты представлены на Рисунках 18 и 19.

Также, по результатам эксперимента было выявлено, что различная архитектура не оказывает значимого влияния на выживаемость клеток: 84,67% выживших клеток для однослойного скаффолда хаотичной укладки против 84,19% выживших клеток для двухслойного скаффолда со слоем параллельной и слоем хаотичной укладки.

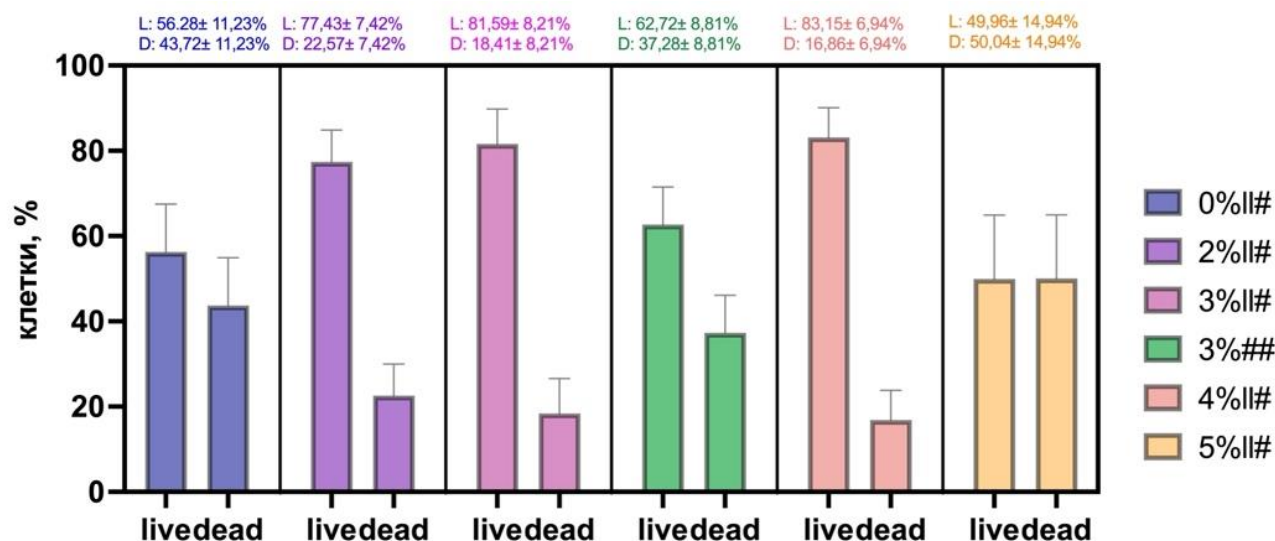


Рисунок 18. Жизнеспособность клеток после засева на матрицы из ПКЛ.

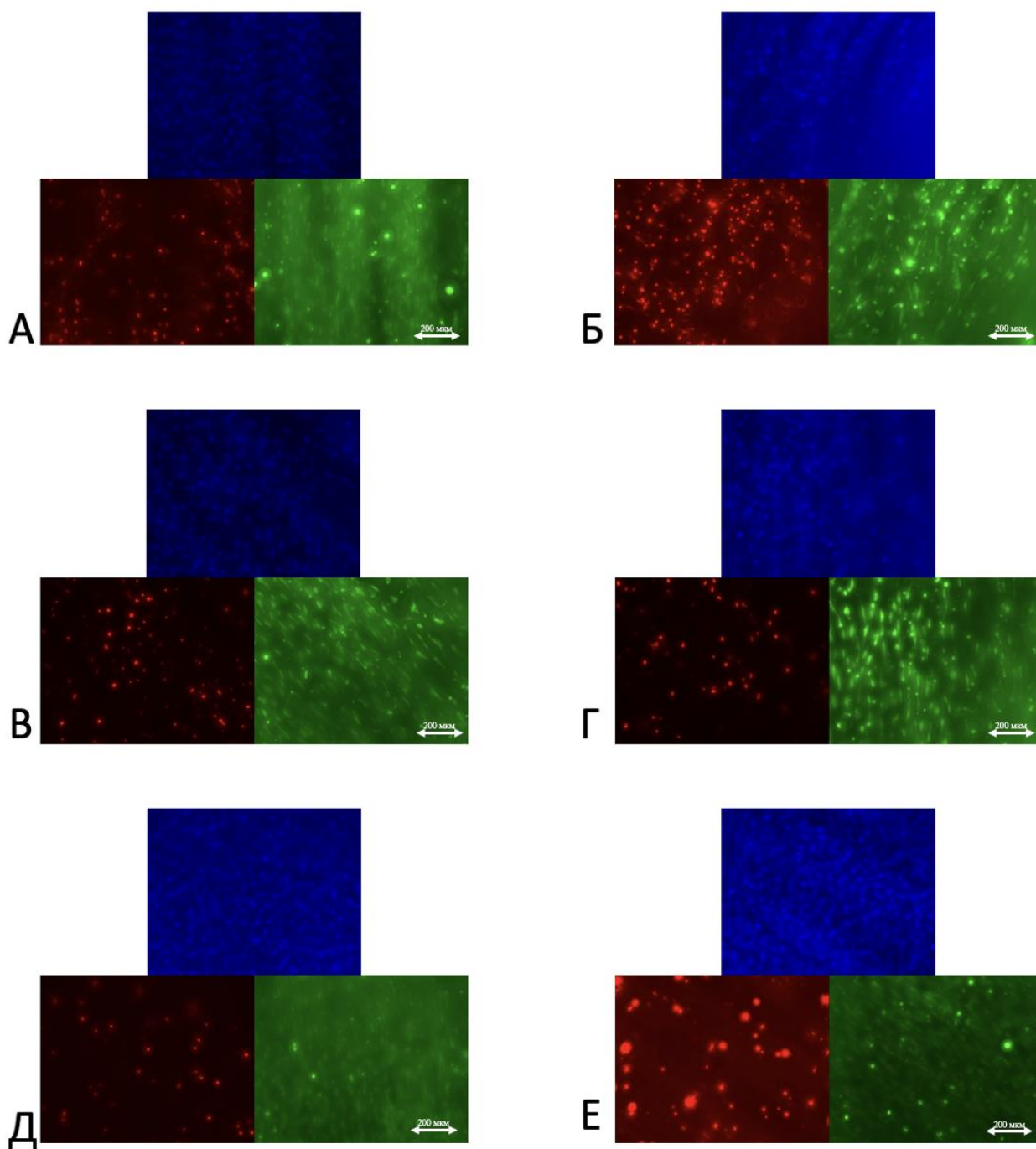


Рисунок 19. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия скаффолдов: А – 0%ll#, Б – 2%ll#, В – 3%ll#, Г – 3%##, Д – 4%ll#, Е – 5%ll# (DAPI — синие ядра клеток, GFP — зеленая цитоплазма живых клеток, RFP — красные ядра мертвых клеток).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что увеличение жизнеспособности клеток на матрицах пропорционально концентрации рсМСК вследствие изменения гидрофильных и механических свойств, но также коррелирует с морфологическими характеристиками скаффолда,

которые могут опосредованно влиять на адгезию и выживание клеток. Тем не менее, несмотря на выявленную зависимость, изменение архитектуры матрицы для однослойного скаффолда хаотичной укладки не привело к существенным отличиям в жизнеспособности по сравнению с более сложными по архитектуре матрицами с аналогичным содержанием рсМСК. Это указывает на то, что ключевым фактором, определяющим клеточный ответ, является изменение поверхностных адгезивных свойств и, предположительно, биологический эффект молекул секретома, тогда как вариации структуры скаффолда в пределах исследованных параметров оказывают минимальное влияние.

3.3.5 Оценка пролиферативной активности

Положительный контроль демонстрирует максимальную метаболическую активность, принимаемую за 100%, отрицательный контроль показывает отсутствие флуоресцентного сигнала. Среди исследуемых групп матриц метаболическая и пролиферативная активность клеток остается высокой во всех группах, однако ее уровень варьирует в зависимости от содержания секретома. Наиболее высокие показатели активности зафиксированы в образцах 2%ll#, 3%ll# и 4%ll#, где значения приближаются к уровню положительного контроля. Скаффолд 3%## демонстрирует заметно сниженный сигнал по сравнению 3%ll# (66% против 96%). Это может косвенно свидетельствовать о разнице в релизе молекул, содержащихся в рсМСК, из матрицы и о влиянии механической стимуляции путем направленной ориентации волокон. У скаффолда с простой однослойной архитектурой релиз компонентов должен происходить быстрее, что снижает пролиферацию на матрице. Результаты представлены на Рисунке 20.

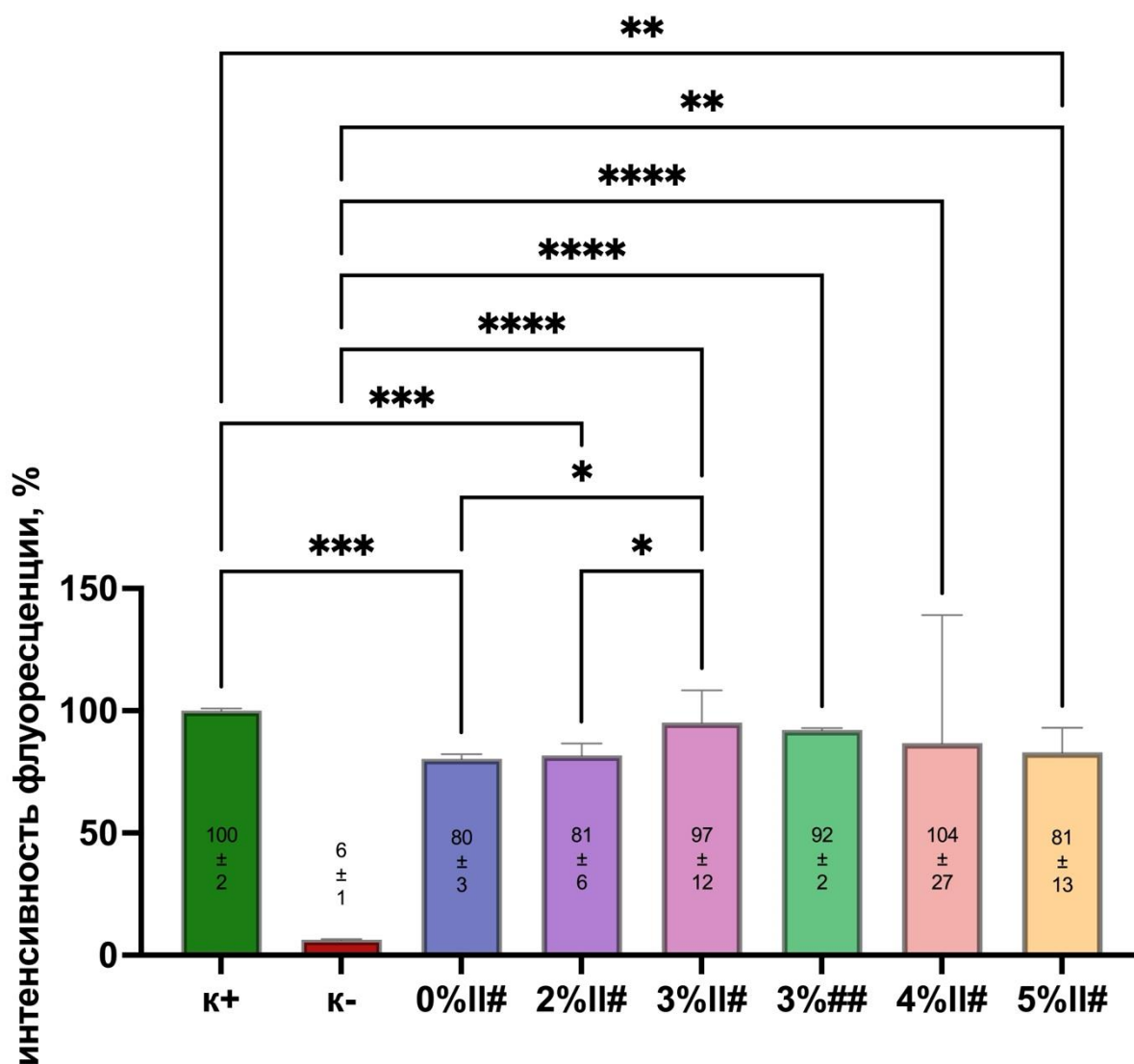


Рисунок 20. Оценка метаболической активности клеток методом окраски Alamar Blue после засева на скаффолды. Включены положительный контроль (k+ - клетки без матрицы) и отрицательный контроль (k- - среда без клеток). * - $p \leq 0,0332$, ** - $p \leq 0,0021$, *** - $p \leq 0,0002$, **** - $p \leq 0,0001$.

Полученные результаты подтверждают, что добавление рсМСК, оказывает влияние на клетки, повышая их жизнеспособность и метаболическую активность на матрицах. Концентрации рсМСК 3% и 4% могут обеспечивать благоприятные условия для клеточной адгезии, пролиферации и поддержания метаболизма путем изменения поверхностных свойств и, возможно, благодаря оптимальной скорости и объему релиза молекул секрета МСК в ходе биодеградации в ростовой среде.

Одновременно результаты указывают на влияние морфологии скаффолда на поведение клеток. На основе анализа этих данных показано, что морфологические особенности матрицы оказывают дополнительное влияние на клеточный отклик, а определяющим фактором остается концентрация рсМСК.

3.3.6 Оценка результатов микроскопии визуализации времени жизни флуоресценции

Метаболическое состояние клеток REF52, культивируемых на ПКЛ-матрицах, было исследовано методом FLIM-микроскопии на основе анализа времени жизни эндогенной флуоресценции НАДН

Выявленные FLIM-изменения отражают адаптационную метаболическую перестройку клеток при взаимодействии с матриксом. Эксперимент продемонстрировал увеличение вклада свободной формы НАДН (α_1) и одновременное снижение среднего времени жизни флуоресценции (τ_m) в клетках, культивируемых на матрицах, по сравнению с контрольными условиями (Таб. 6 и 7). Поскольку свободный НАДН преимущественно связан с гликолитическими процессами, тогда как белок-связанная форма отражает активность митохондриального окислительного фосфорилирования, полученные результаты указывают на относительный сдвиг клеточного метаболизма в сторону усиления гликолиза.

Важно отметить, что подобный метаболический профиль согласуется с наблюдаемым повышением пролиферативной активности клеток на матрицах с рсМСК. Усиление гликолитического метаболизма характерно для активно пролиферирующих фибробластов и рассматривается как адаптивный механизм обеспечения быстрых энергетических и биосинтетических потребностей клетки при колонизации электроспиннингового скаффолда.

Таблица 6. FLIM-изображения REF52 на контроле и матрицах 0%II#, 2%II#, 3%II#, 3%##, 4%II#, 5%II#, цветокодированные по τ_m на длине волны 780 нм. Регистрация флуоресценции в диапазоне 425-470 нм. Размер изображений 330 x 330 мкм.

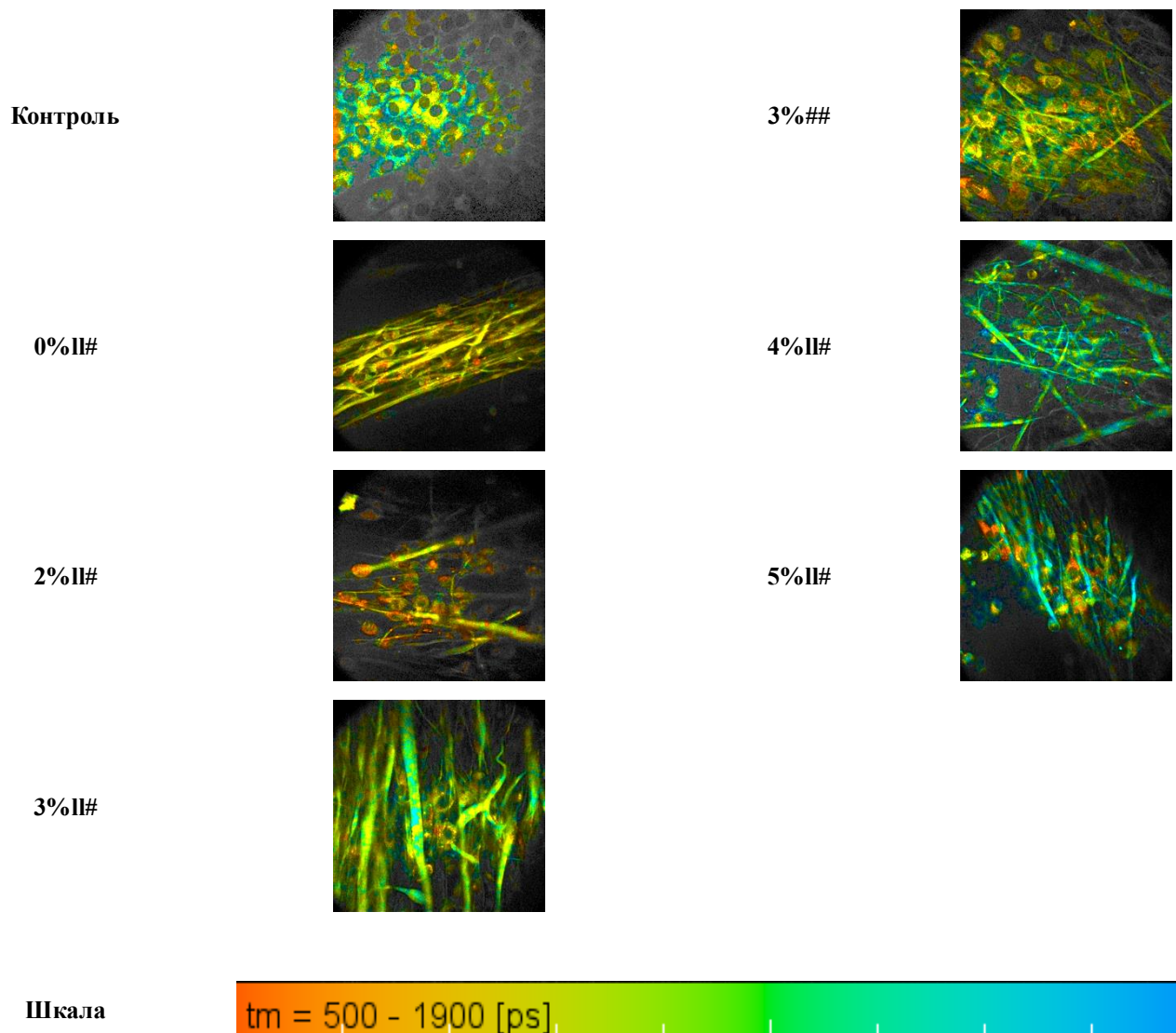


Таблица 7. Характеристики скаффолдов 0%II#, 2%II#, 3%II#, 3%##, 4%II# и 5%II# на основе данных FLIM.

	$\alpha 1$ (%)	$\tau 1$ (ps)	$\tau 2$ (ps)	τm (ps)
Контроль	69.3 $\pm$ 0.7	472.4 $\pm$ 12.7	2624 $\pm$ 20.5	1128.8 $\pm$ 20
0%II#	73.6 $\pm$ 0.5	444.5 $\pm$ 24.1	2593.7 $\pm$ 115.5	1017.2 $\pm$ 34.9
2%II#	74.7 $\pm$ 0.6	359.3 $\pm$ 26.6	2308.3 $\pm$ 81.1	852.56 $\pm$ 47.6
3%II#	73.7 $\pm$ 1.8	409.4 $\pm$ 32.7	2472.2 $\pm$ 146.5	950.8 $\pm$ 74.8
3%##	73.6 $\pm$ 0.6	383.5 $\pm$ 33.1	2348.894.8	901.2 $\pm$ 48.5
4%II#	72.9 $\pm$ 2.1	427.2 $\pm$ 39.1	2550.1 $\pm$ 141.9	999.2 $\pm$ 59.2
5%II#	73.6 $\pm$ 0.9	386.4 $\pm$ 32.6	2465.6 $\pm$ 82.1	934 $\pm$ 59.3

Таким образом, зарегистрированное увеличение $\alpha 1$, вероятно, отражает функциональную активацию клеток, а не снижение митохондриальной эффективности. Наблюдаемое уменьшение времени жизни связанной формы НАДН ($\tau 2$) может быть обусловлено изменением взаимодействия кофермента с митохондриальными ферментными комплексами вследствие ремоделирования цитоскелета и клеточно-матричных контактов. Механические свойства и архитектура скаффолда способны регулировать митохондриальную организацию и энергетический метаболизм через механотрансдукционные сигнальные пути. Полученные ранее данные о различиях метаболической активности между однослойными и более сложными архитектурами матриц косвенно подтверждают влияние кинетики релиза секрета и структуры каркаса на клеточный энергетический статус.

Отсутствие строго монотонной зависимости FLIM-параметров от концентрации рсМСК, вероятно, связано с комбинированным влиянием нескольких факторов, включая архитектуру скаффолдов, локальную плотность клеток и гетерогенность клеточной популяции. При высоком содержании рсМСК изменение архитектуры волокон и увеличение адгезии между ними могут ограничивать диффузию выделяемых клетками факторов, что согласуется с наблюдаемым снижением жизнеспособности при

максимальной концентрации раствора секрета. В совокупности результаты демонстрируют, что рсМСК-модифицированные ПКЛ-матрицы индуцируют метаболическую адаптацию клеток REF52, характеризующуюся переходом к более гликолитическому фенотипу при сохранении высокой жизнеспособности и метаболической активности. Это указывает на формирование благоприятной микросреды, поддерживающей клеточную адгезию, рост и функциональную активность. На основе полученных данных FLIM-метаболический профиль может свидетельствовать о том, что ключевым фактором, определяющим клеточный ответ, является содержание и кинетика высвобождения компонентов секрета, тогда как архитектура матрицы выполняет модулирующую роль.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что введение рсМСК в формовочный раствор влияет на формирование однослойных электроспиннинговых скаффолдов на основе ПКЛ с хаотичной укладкой волокон. При увеличении содержания рсМСК наблюдалось изменение морфологии волокнистой матрицы и тенденция к уменьшению среднего диаметра волокон. Одновременно снижалась гидрофобность поверхности: контактный угол смачивания для чистого ПКЛ составлял около 122° , тогда как у образцов, полученных с добавлением рсМСК, снижался примерно до $102\text{--}90^\circ$.

2. Определены закономерности изменения механических характеристик однослойных скаффолдов в зависимости от состава формовочного раствора и структуры волокнистой матрицы. Наиболее сбалансированные механические свойства среди однослойных образцов продемонстрировал скаффолд с хаотичной укладкой волокон, полученный при добавлении 3% рсМСК в формовочный раствор, для которого модуль Юнга составил $2,34 \pm 0,28$ МПа. Дальнейшее увеличение содержания рсМСК сопровождалось снижением механических показателей, что может быть связано с изменением морфологии волокон, пористости, толщины матрицы и характера межволоконных взаимодействий.

3. Показано, что однослойные скаффолды, полученные с использованием рсМСК в формовочном растворе, не проявляли выраженной цитотоксичности и поддерживали биологический ответ клеток. Экстракты исследованных матриц не снижали жизнеспособность фибробластов, а наиболее выраженное повышение метаболической активности клеток было отмечено для скаффолда с хаотичной укладкой волокон, полученного при добавлении 3% рсМСК. В модели теста однослойные скаффолды, полученные при добавлении 3, 4 и 5% рсМСК, не вызывали выраженных неблагоприятных реакций через 72 часа после имплантации, при этом наиболее выраженный ангиогенный ответ наблюдался для материала с 3% рсМСК.

4. Установлено, что комбинированная архитектура волокон влияет на поверхностные и структурные свойства двухслойных электроспиннинговых скаффолдов. При ориентированной укладке формировались более выраженные волоконные тяжи, что, вероятно, связано со слипанием тонких волокон. Увеличение содержания рсМСК в формовочном растворе сопровождалось тенденцией к уменьшению среднего диаметра волокон. По сравнению с однослойными хаотичными матрицами двухслойные скаффолды характеризовались меньшей гидрофобностью: при добавлении 3% рсМСК контактный угол снижался примерно с $104 \pm 5^\circ$ до $99 \pm 2^\circ$.

5. Выявлена взаимосвязь между составом, архитектурой и механическими свойствами двухслойных скаффолдов. Наиболее сбалансированные механические характеристики были установлены для двухслойного скаффолда с комбинированной архитектурой волокон, полученного при добавлении 4% рсМСК: модуль Юнга составил $2,40 \pm 1,53$ МПа, максимальное напряжение — $0,62 \pm 0,36$ МПа, относительное удлинение — $126 \pm 36\%$.

6. Показано, что двухслойные скаффолды, полученные с использованием рсМСК в формовочном растворе, поддерживают жизнеспособность и метаболическую активность клеток REF52 *in vitro*. Полученные результаты позволяют рассматривать разработанные электроспиннинговые матрицы на основе ПКЛ как экспериментальные платформы для дальнейшей оптимизации материалов тканевой инженерии. Для уточнения механизмов выявленного биологического ответа необходимы дополнительные исследования, направленные на количественную оценку сохранности, высвобождения и функциональной активности компонентов секрета после электроспиннинга.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Hong J. et al. Cell-electrospinning and its application for tissue engineering //International journal of molecular sciences. – 2019. – Т. 20. – №. 24. – С. 6208.
2. Lim D. J. Cross-linking agents for electrospinning-based bone tissue engineering //International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Т. 23. – №. 10. – С. 5444.
3. Liu Y. et al. Application of electrospinning strategy on cartilage tissue engineering //Current Stem Cell Research & Therapy. – 2018. – Т. 13. – №. 7. – С. 526-532.
4. Wang N. et al. Small diameter vascular grafts: progress on electrospinning matrix/stem cell blending approach //Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2024. – Т. 12. – С. 1385032.
5. Kong Y. et al. Electrospinning porcine decellularized nerve matrix scaffold for peripheral nerve regeneration //International Journal of Biological Macromolecules. – 2022. – Т. 209. – С. 1867-1881.
6. Guo S. et al. Electrospinning of botanicals for skin wound healing //Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2022. – Т. 10. – С. 1006129.
7. Thangadurai M. et al. Advances in electrospinning and 3D bioprinting strategies to enhance functional regeneration of skeletal muscle tissue //Biomaterials Advances. – 2022. – Т. 142. – С. 213135.
8. Chow L. W. Electrospinning functionalized polymers for use as tissue engineering scaffolds //Biomaterials for Tissue Engineering: Methods and Protocols. – New York, NY : Springer New York, 2018. – С. 27-39.

9. Chinnappan B. A. et al. Electrospinning of biomedical nanofibers/nanomembranes: effects of process parameters // *Polymers*. – 2022. – T. 14. – №. 18. – C. 3719.
10. Gradov O.V., Gradova M.A., Kochervinskii V.V. Biomimetic biocompatible ferroelectric polymer materials with an active response for implantology and regenerative medicine // *Woodhead Publishing*. – 2022. – P. 571–619.
11. Yao T., et al. Self-assembly of electrospun nanofibers into gradient honeycomb structures // *Materials & Design*. – 2019. – Vol. 168. – P. 107614.
12. Howard D., et al. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds // *Journal of Anatomy*. – 2008. – Vol. 213. – N 1. – P. 66–72.
13. Hutmacher D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage // *Biomaterials*. – 2000. – Vol. 21. – N 24. – P. 2529–2543.
14. Lyons F., Partap S., O'Brien F.J. Part 1: scaffolds and surfaces // *Technology & Health Care*. – 2008. – Vol. 16. – N 4. – P. 305–317.
15. Khang G., Lee S.J., Kim M.S., Lee H.B. Biomaterials: tissue engineering and scaffold // *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*. – 2006. – Vol. 2. – P. 366–383.
16. Nair L.S., Laurencin C.T. Biodegradable polymers as biomaterials // *Progress in Polymer Science*. – 2007. – Vol. 32. – P. 762–798.
17. Pina S., Ferreira J. Bioresorbable Plates and Screws for Clinical Applications: A Review // *Journal of Healthcare Engineering*. – 2012. – Vol. 3. – P. 243–260.
18. Pereira D., Canadas R., Silva-Correia J., et al. Gellan gum-based Hydrogel Bilayered Scaffolds for Osteochondral Tissue Engineering // *Key Engineering Materials*. – 2014. – Vol. 587. – P. 255–260.
19. Gunja N.J., Athanasiou K.A. Biodegradable materials in arthroscopy // *Sports Medicine and Arthroscopy Review*. – 2006. – Vol. 14. – P. 112–119.

20. Zhang S., Gelain F., Zhao X. Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for 3D tissue cell cultures // *Seminars in Cancer Biology*. – 2005. – Vol. 15. – N 5. – P. 423–443.
21. Bredt J.F., Sach E., Brancazio D., et al. Three dimensional printing system // *US Patent 5807437*. – 1998.
22. Ma P.X. Biomimetic materials for tissue engineering // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2008. – Vol. 60. – N 2. – P. 184–198.
23. Gao B., et al. 4D bioprinting for biomedical applications // *Trends in Biotechnology*. – 2016. – Vol. 34. – N 9. – P. 746–756.
24. Sugiaman V.K., Jeffrey, Naliani S., et al. Polymeric Scaffolds Used in Dental Pulp Regeneration by Tissue Engineering Approach // *Polymers*. – 2023. – Vol. 15. – N 5. – P. 1082.
25. Amid R. et al. Structural and chemical features of xenograft bone substitutes: A systematic review of in vitro studies // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. – 2021. – T. 68. – №. 6. – C. 1432-1452.
26. Song W. et al. In vivo biocompatibility and bioactivity of calcium silicate-based bioceramics in endodontics // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2020. – T. 8. – C. 580954.
27. Samuels M., Giamas G. MISEV2023: shaping the future of EV research by enhancing rigour, reproducibility and transparency // *Cancer Gene Therapy*. – 2024. – T. 31. – №. 5. – C. 649-651.
28. Gelinsky M. et al. Porous three-dimensional scaffolds made of mineralised collagen: Preparation and properties of a biomimetic nanocomposite material for tissue engineering of bone // *Chemical Engineering Journal*. – 2008. – T. 137. – №. 1. – C. 84-96.
29. Pant S. et al. 3D bioprinted poly (lactic acid)/mesoporous bioactive glass based biomimetic scaffold with rapid apatite crystallization and in-vitro Cytocompatibility for bone tissue engineering // *International journal of biological macromolecules*. – 2022. – T. 217. – C. 979-997.

30. Abolhassani S. et al. Advances in 4D bioprinting: the next frontier in regenerative medicine and tissue engineering applications //Advanced Healthcare Materials. – 2025. – T. 14. – №. 4. – C. 2403065.
31. Couto M. et al. Neuro-Immunomodulatory Potential of Nanoenabled 4D Bioprinted Microtissue for Cartilage Tissue Engineering //Advanced Healthcare Materials. – 2025. – T. 14. – №. 5. – C. 2400496.
32. Rajzer I. et al. Four-dimensional printing of β -tricalcium phosphate-modified shape memory polymers for bone scaffolds in osteochondral regeneration //Materials. – 2025. – T. 18. – №. 2. – C. 306.
33. Soheli M. H. Extracellular/circulating microRNAs: release mechanisms, functions and challenges //Achievements in the Life Sciences. – 2016. – T. 10. – №. 2. – C. 175-186.
34. Munoz-Perez E. et al. Mesenchymal stromal cell secretome for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases: latest trends in isolation, content optimization and delivery avenues //Pharmaceutics. – 2021. – T. 13. – №. 11. – C. 1802.
35. Múzes G., Sipos F. Mesenchymal stem cell-derived secretome: a potential therapeutic option for autoimmune and immune-mediated inflammatory diseases //Cells. – 2022. – T. 11. – №. 15. – C. 2300.
36. Li J. et al. Regulating type II vessel formation and bone metabolism via bone-targeting oral Micro/Nano-Hydrogel microspheres to prevent bone loss //Advanced Science. – 2023. – T. 10. – №. 15. – C. 2207381.
37. Zhou Y. et al. Microspheric hierarchical controlled-release system and cell growth platform achieves sequential dual-exosomes delivery and promote bone regeneration //Available at SSRN 5896616. – 2025.
38. Mailley D., Hébraud A., Schlatter G. A review on the impact of humidity during electrospinning: From the nanofiber structure engineering to the applications // Macromolecular Materials and Engineering. - 2021. - Vol. 306. - N 7. - P. 2100115.

39. Collins M.N., Birkinshaw C. Morphology of crosslinked hyaluronic acid porous hydrogels // *Journal of Applied Polymer Science*. - 2010. - Vol. 120. - N 2. - P. 1040-1049.
40. Fahimirad S., Ajalloueian F. Naturally-derived electrospun wound dressings for target delivery of bio-active agents // *International Journal of Pharmaceutics*. - 2019. - Vol. 566. - P. 307-328.
41. Hadisi Z., et al. Hyaluronic acid (HA)-based silk fibroin/zinc oxide core-shell electrospun dressing for burn wound management // *Macromolecular Bioscience*. - 2020. - Vol. 20. - N 4. - P. 1900328.
42. Pabjańczyk-Wlaziło E., et al. Fabrication of pure electrospun materials from hyaluronic acid // *Fibres & Textiles in Eastern Europe*. - 2017. - N 3 (123). - P. 45-52.
43. Bjelle A., Andersson T., Granath K. Molecular weight distribution of hyaluronic acid of human synovial fluid in rheumatic diseases // *Scandinavian Journal of Rheumatology*. - 1983. - Vol. 12. - N 2. - P. 133-138.
44. Chao D. T., Korsmeyer S. J. BCL-2 family: regulators of cell death // *Annual review of immunology*. - 1998. - T. 16. - №. 1. - C. 395-419.
45. Labet M., Thielemans W. Synthesis of polycaprolactone: a review // *Chemical society reviews*. - 2009. - T. 38. - №. 12. - C. 3484-3504.
46. Geoghegan N. et al. Controlled degradation of polycaprolactone-based micropillar arrays // *Biomaterials Science*. - 2023. - T. 11. - №. 9. - C. 3077-3091.
47. Schlosser P. M. et al. Human health effects of dichloromethane: key findings and scientific issues // *Environmental health perspectives*. - 2014. - T. 123. - №. 2. - C. 114.

48. Al-Shaibani M. B. H. Three-dimensional cell culture (3DCC) improves secretion of signaling molecules of mesenchymal stem cells (MSCs) //Biotechnology letters. – 2022. – T. 44. – №. 1. – C. 143-155.
49. Lim K. T. et al. Mesenchymal stem cells, the secretome and biomaterials: regenerative medicine application //Biocell. – 2022. – T. 46. – №. 10. – C. 2201.
50. Lai X. et al. The exosomal secretomes of mesenchymal stem cells extracted via 3D-printed lithium-doped calcium silicate scaffolds promote osteochondral regeneration //Materials Today Bio. – 2023. – T. 22. – №. 1. – C. 100728.
51. Lee C. et al. Mesenchymal stem cells influence activation of hepatic stellate cells, and constitute a promising therapy for liver fibrosis //Biomedicines. – 2021. – T. 9. – №. 11. – C. 1598.
52. Wilson E. B., Brooks D. G. The role of IL-10 in regulating immunity to persistent viral infections //Negative Co-Receptors and Ligands. – 2010. – C. 39-65.
53. Peng D. et al. Targeting TGF- β signal transduction for fibrosis and cancer therapy //Molecular cancer. – 2022. – T. 21. – №. 1. – C. 104.
54. Takahashi S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy //Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2011. – T. 34. – №. 12. – C. 1785-1788.
55. Zhang X. et al. Pharmacological mechanism of roflumilast in the treatment of asthma–COPD overlap //Drug design, development and therapy. – 2018. – C. 2371-2379.
56. Nemr W. Biological activity alterations of human amniotic membrane pre and post irradiation tissue banking //Pakistan Journal of Biological Sciences. – 2016.

57. Falcones B. et al. hLMSC secretome affects macrophage activity differentially depending on lung-mimetic environments //Cells. – 2022. – T. 11. – №. 12. – C. 1866.
58. Grue B. H. et al. Alternate soaking enables easy control of mineralized collagen scaffold mechanics from nano-to macro-scale //journal of the mechanical behavior of biomedical materials. – 2020. – T. 110. – C. 103863.
59. Sowmya S. et al. Tri-layered nanocomposite hydrogel scaffold for the concurrent regeneration of cementum, periodontal ligament, and alveolar bone //Advanced healthcare materials. – 2017. – T. 6. – №. 7. – C. 1601251.
60. Slawinski M. et al. Acetic acid enables precise tailoring of the mechanical behavior of protein-based hydrogels //Nano letters. – 2022. – T. 22. – №. 17. – C. 6942-6950.
61. Pieta P. P. et al. A rapid method for protein staining in polyacrylamide gels using water saturated with chloroform //Acta Biochimica Polonica. – 2021. – T. 68. – №. 2. – C. 347-351.
62. Hamidallah K. et al. Sustainable valorization of chicken feather waste: Keratin extraction for advanced UV-protective textile, antioxidant applications, and DFT-guided sodium sulfide dissolution //Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2025. – T. 724. – C. 137397.
63. Bari E. et al. 3D bioprinted scaffolds containing mesenchymal stem/stromal lyosecretome: next generation controlled release device for bone regenerative medicine //Pharmaceutics. – 2021. – T. 13. – №. 4. – C. 515.
64. Whitehead T. J., Sundararaghavan H. G. Electrospinning growth factor releasing microspheres into fibrous scaffolds //Journal of visualized experiments: JoVE. – 2014. – №. 90. – C. 51517.

65. Li X. et al. MBG/PLGA composite microspheres with prolonged drug release //Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials. – 2009. – T. 89. – №. 1. – C. 148-154.
66. Peshkova M. et al. MSCs' conditioned media cytokine and growth factor profiles and their impact on macrophage polarization //Stem cell research & therapy. – 2023. – T. 14. – №. 1. – C. 142.
67. Meng J. et al. Enhancing the bioactivity of melt electrowritten PLLA scaffold by convenient, green, and effective hydrophilic surface modification //Biomaterials Advances. – 2022. – T. 135. – C. 112686.