

БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ СКАФФОЛДЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИДА, СФОРМИРОВАННЫЕ МЕТОДОМ ДВУХФОТОННОЙ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ, В НЕЙРОТРАНСПЛАНТАЦИИ

DOI: 10.17691/stm2016.8.4.03

УДК 539.2:577.3:616.8.001.6–089.844

Поступила 02.03.2016 г.

© **А.В. Королева**, к.ф.-м.н., научный сотрудник отдела нанотехнологий¹;
Д.С. Гусева, к.б.н., научный сотрудник кафедры клеточной нейрофизиологии²;
Н.А. Коновалов, д.м.н., профессор, зав. отделением спинальной нейрохирургии³;
Т.М. Жарикова, научный сотрудник отдела современных биоматериалов⁴;
Е.Г. Понимаскин, д.б.н., профессор, зав. кафедрой клеточной нейрофизиологии²;
Б.Н. Чичков, д.ф.-м.н., профессор, руководитель отдела нанотехнологий¹;
В.Н. Баграташвили, д.ф.-м.н., профессор, руководитель отдела лазерной атомно-молекулярной технологии⁵;
П.С. Тимашев, д.х.н., руководитель отдела современных биоматериалов⁴; старший научный сотрудник
лаборатории лазерной химии⁵

¹Laser Zentrum Hannover, 8 Hollerithallee, 30419, Hannover, Germany;²Hannover Medical School, 1 Carl-Neuberg St., 30625, Hannover, Germany;³НИИ нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко, Москва, 125047, ул. 4-я Тверская-Ямская, 16;⁴Институт регенеративной медицины, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, 119991, ул. Трубецкая, 8/2;⁵Институт фотонных технологий, Федеральный научно-исследовательский центр
«Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Троицк, 142190, ул. Пионерская, 2

Цель исследования — формирование биodeградируемых микроструктур методом двухфотонной полимеризации, совместимых с прогениторными нейрональными клетками, для использования в нейротрансплантации.

Материалы и методы. Фотополимеризуемые композиции получали на основе разветвленных полилактоидов с использованием фотоинициатора — кетона Михлера. Структуры были сформированы методом двухфотонной полимеризации на установке микростереолитографии.

Результаты. С использованием реакционноспособных полилактоидов методом двухфотонной полимеризации сформированы трехмерные структуры с высоким пространственным разрешением. Поверхность сформированных матриц-носителей представляет собой структуру с высокой степенью шероховатости (средняя шероховатость — 1 мкм). Установлено, что разработанные структуры обладают высокой биосовместимостью с первичными культурами гиппокампа, что предполагает их применение в качестве матриц-носителей для клеток нервной системы. Диссоциированные клетки гиппокампа хорошо адгезируют с материалом матрицы, происходит активный рост аксонов и дендритов, к 10-му дню культивирования *in vitro* на трехмерном конструкте визуализируется хорошо разветвленная нейрон-глиальная сеть.

Ключевые слова: двухфотонная полимеризация; полилактоиды; трехмерные скаффолды; биосовместимые материалы; нейрональные клетки.

Как цитировать: Koroleva A.V., Guseva D.S., Konovalov N.A., Zharikova T.M., Ponimaskin E.G., Chichkov B.N., Bagratashvili V.N., Timashev P.S. Polylactide-based biodegradable scaffolds fabricated by two-photon polymerization for neurotransplantation. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2016; 8(4): 23–29, <https://doi.org/10.17691/stm2016.8.4.03>

English

Polylactide-Based Biodegradable Scaffolds Fabricated by Two-Photon Polymerization for Neurotransplantation

A.V. Koroleva, PhD, Researcher, Nanotechnology Unit¹;D.S. Guseva, DSc, Researcher, Department of Neurophysiology²;

Для контактов: Тимашев Петр Сергеевич, e-mail: timashev.peter@gmail.com

N.A. Konovalov, MD, DSc, Professor, Head of the Spinal Neurosurgery Unit³;
T.M. Zharikova, Researcher, Modern Biomaterial Unit⁴;
E.G. Ponomaskin, DSc, Professor, Head of the Department of Cellular Neurophysiology²;
B.N. Chichkov, DSc, Professor, Head of the Nanotechnology Unit¹;
V.N. Bagratashvili, DSc, Professor, Head of the Unit of Laser Atomic and Molecular Nanotechnologies⁵;
P.S. Timashev, DSc, Head of the Novel Biomaterial Unit⁴; Senior Researcher, Laboratory of Laser Chemistry⁵

¹Laser Zentrum Hannover, 8 Hollerithallee, 30419, Hannover, Germany;

²Hannover Medical School, 1 Carl-Neuberg St., 30625, Hannover, Germany;

³N.N. Burdenko Research Institute of Neurosurgery, 16, 4th Tverskaya-Yamskaya St., Moscow, 125047, Russian Federation;

⁴Institute of Regenerative Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8/2 Trubetskaya St., Moscow, 119991, Russian Federation;

⁵Institute of Photon Technologies, Federal Research Center "Crystallography and Photonics" of the Russian Academy of Sciences, 2 Pionerskaya St., Moscow, Troitsk, 142190, Russian Federation

The aim of the investigation was to form biodegradable 3D microstructured scaffolds compatible with progenitor neuronal cells as a perspective approach to neurotransplantation.

Materials and Methods. Photosensitive compositions were obtained from branched polylactides using Michler's ketone photoinitiator. The 3D microstructured scaffolds were fabricated by two-photon polymerization method.

Results. 3D microstructured scaffolds with a high spatial resolution have been fabricated from reactive polylactides by two-photon polymerization. The surface of scaffolds represents a structure with a high degree of roughness (1 μm average roughness). Dissociated hippocampal cells (from embryonic mice) adhere well to the matrix material, and active growth of axons and dendrites takes place. By day 10 of *in vitro* cultivation a well-branched neuron-glia network is visualized on a 3D construct. The developed structures have been found to possess a high biocompatibility with the primary hippocampal cultures, which suggests their application as matrix-carriers for the cells of the nervous system.

Key words: two-photon polymerization; polylactides; three-dimensional scaffolds; biocompatible materials; neuronal cells.

Одним из стратегических направлений современного биомедицинского материаловедения является создание материалов и структур на основе биостабильных и биорезорбируемых полимеров с заданной архитектурой [1, 2]. Круг применений таких структур очень широк, начиная от эндопротезирования (имплантологии), где на основе высокомолекулярных биостабильных полимеров создаются вкладыши для искусственных суставов, до регенеративной медицины и тканевой инженерии, когда для восстановления твердых тканей используются трехмерные матрицы на основе биорезорбируемых полимеров [3]. К этим структурам предъявляются особые требования как по составу, биологической активности, присутствию следов токсичных соединений, так и по архитектонике, которая должна имитировать заменяемые ткани или органы, т.е. иметь определенную пористость структуры, механическую прочность и т.д. [4].

Метод двухфотонной полимеризации дает возможность получать объекты с высоким пространственным разрешением, эффективно управлять пористостью создаваемых структур, что делает этот метод одним из наиболее перспективных при решении проблемы формирования полимерных матриц заданной формы для нужд регенеративной медицины [5, 6]. Возможности метода особенно важны для обеспечения культивирования клеток и транспорта питательных веществ в создаваемых матрицах [7].

Не менее важным аспектом формирования трехмерных матриц для регенеративной медицины является создание структур на основе материалов, подвергающихся деградации в культуральных средах, и регулирование отношения скоростей формирования живых тканей и скорости биорезорбции синтетических имплантатов [8]. Возможность постепенной деградации материала в процессе использования скаффолда *in vitro* обеспечивает протекание процесса роста (регенерации) ткани [9], тогда как в случае использования биологически стабильного материала он будет оставаться в организме и может стать причиной инициации воспалительных процессов [10, 11]. Ранее нами было показано, что методом двухфотонной полимеризации могут быть сформированы гибридные [12] и гидрогелевые [13] структуры, на которых растут диссоциированные нейрональные клетки, полученные из гиппокампуса мышей. Более того, данные клетки были способны формировать трехмерную нейронную сеть.

Цель исследования — разработать подходы к формированию на основе разветвленных полилактидов биосовместимых трехмерных конструктов, а также оценить возможность их использования для адгезии прогениторных нейрональных клеток и дальнейшей разработки нейротрансплантатов на их основе.

Материалы и методы

Синтез реакционноспособных производных полилактида. Двухстадийная синтетическая стратегия

формирования тетрафункциональных полилактидов была представлена в работе [9]. Для формирования трехмерных структур была выбрана производная с молекулярной массой одного луча 760 Да (или 10,5 звеньев лактида). Химическое строение и молекулярно-массовое распределение полимера подтверждено методами ядерного магнитного резонанса (ЯМР), инфракрасной спектроскопии, гельпроникающей хроматографии.

Приготовление фоточувствительной композиции для двухфотонной полимеризации. Для получения фоточувствительной композиции готовили 20% раствор полимера в дихлорметане (99%, Sigma-Aldrich, Германия). В полученную смесь вносили фотоинициатор — кетон Михлера, 1% мас. (BASF Kaisten AG, Германия). Перемешивание системы проводили при комнатной температуре в течение 2 ч до получения гомогенного раствора.

Формирование трехмерных структур. Приготовленную композицию наносили на поверхность покровных стекол диаметром 12 мм (площадь поверхности образцов — 1,13 см²). Покровные стекла перед нанесением композиции промывали водой, помещали на 6 ч в 5% водный раствор соляной кислоты, затем в течение 20 мин отмывали в ультразвуковой бане дистиллированной водой. Модель трехмерной структуры, параметры фотоиндуцированной сшивки и рабочие характеристики лазерной системы были выбраны в соответствии с работой [12]. Отмывка сформированных структур от непрореагировавшего материала осуществлялась в 100 мл дихлорметана в течение 3 ч. Отмытые структуры хранились в эксикаторе при температуре +2°C.

Клеточная культура диссоциированных нейронов из гиппокампа мыши. Гиппокампы были выделены из эмбрионов мышей (на 18-й эмбриональный день, E18). Мышей (C57BL6J) выводили из эксперимента путем смещения шейного позвонка в соответствии с протоколами, утвержденными Национальным министерством здравоохранения Германии, по уходу и использованию лабораторных животных и комитетом по биоэтике Hannover Medical School. Иссечение гиппокампа производили в стерильных условиях в буфере HBSS (Invitrogen, Россия, 24020-091). После ферментативного расщепления в течение 25 мин в 0,25% трипсине (Invitrogen, Россия, 25200-056) при температуре 37°C гиппокампы были диссоциированы с помощью пипетки. После центрифугирования суспензии при 1500 g в течение 2 мин клетки ресуспендировали в среде Neurobasal A (Invitrogen, Россия, 21103-049), обогащенной 2% Supplement B-27 (Invitrogen, Россия, 17504-044), 0,5 мМ L-глутамином (Invitrogen, Россия, 25030-024) и 5% фетальной телячьей сывороткой (среда NBA) («ПанЭко», Россия, K055). Диссоциированные клетки были высеяны на структуры в 40 мкл буфера с исходной плотностью 9000 кл./мм². Контрольную группу составили культуры гиппокампа, высеянные на покровные стекла (18 мм), предварительно обрабо-

танные полиэтиленмином (Sigma-Aldrich, Германия, P3143), в соответствии с ранее установленным протоколом [14]. После того как клетки присоединялись к поверхности структур или стеклу (2 ч), культуральные чашки заполняли 1 мл среды NBA.

Среду меняли каждые 2 дня, при этом обновлялась только половина объема — для сохранения в среде трофических факторов, синтезированных культивируемыми нейронами. Клетки культивировали в течение 14 дней при постоянных условиях — 37°C увлажненной атмосферы, содержащей 95% воздуха и 5% CO₂.

Культуры контролировали при помощи фазово-контрастных изображений каждый день для записи состояния с использованием инвертированного микроскопа Leica DMIL HC (Leica, Германия).

Иммуноцитохимический анализ нейрональной культуры. Иммуногистохимическое исследование культивированных на скаффолдах клеток проводили с помощью двухступенчатого метода. Структуры с клетками были зафиксированы в 4% параформальдегиде в течение 30 мин при комнатной температуре. После этого клетки были пермеабелизированы предварительно охлажденным до -20°C метанолом в течение 3 мин. Для блокирования неспецифического связывания антител пробы обработали 2% бычьим сывороточным альбумином (разведенным в PBS) при температуре 37°C в течение 30 мин. Инкубацию проб с первичными антителами, разведенными в 2% бычьим сывороточном альбумине в PBS, проводили в течение ночи при температуре 4°C. В качестве маркеров были выбраны βIII-тубулин 1:1000; мышинные моноклональные антитела IgG2a, клон 2G10 (Sigma-Aldrich, Германия), или синаптофизин 1:50; кроличьи поликлональные антитела H-93 (Santa Cruz, Германия). После нескольких стадий промывки пробы инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена козьих антител против кроличьего и против мышинного IgG (H + L) (1:100, Dianova GmbH, Германия) в течение 1 ч при комнатной температуре. Антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, визуализировали путем инкубации с 3-амино-9-этил-карбазол субстратом в буфере ацетата натрия (0,1 моль/л, pH=5,2), содержащего пероксид водорода. Структуры с клетками анализировали при помощи микроскопа AxioImager (Carl Zeiss, Германия), оснащенного камерой AxioCam ICC1 и программным обеспечением AxioVision 4.8.

Сканирующая электронная микроскопия. Тканеинженерные конструкторы на 12-й день культивирования нейрональных клеток были дважды промыты в растворе PBS и зафиксированы 2,5% глутаровым альдегидом в течение 30 мин, после чего дополнительно зафиксированы в 2% оксиде осмия (VIII) в течение 30 мин. После дальнейшей интенсивной промывки пробы были обезвожены в серии этанола с возрастающими концентрациями (от 30 до 100%) и высушены с помощью гексаметилдисилазана (HMDS). Для анализа подготовленные структуры покрывали золотом с

толщиной слоя 5 нм. Пробы изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа Quanta 400F (FEI Company, США), оснащенного EDX-спектрометрией (система EDAX и Genesis Software, EDAX Inc., США).

Атомно-силовая микроскопия. Для визуализации поверхности образца матрицы-носителя использовали сканирующий зондовый микроскоп Multimode 8 (Bruker, США), оснащенный программным обеспечением PeakForce QNM (Bruker, США), позволяющим строить карты распределения механических характеристик и адгезионных сил. Для получения изображений поверхности исследуемых объектов использованы кремниевые кантилеверы RTESP (длина балки 105–135 мкм с коэффициентом жесткости 20–80 Н/м, резонансная частота — в пределах 300–360 кГц, радиус кривизны острия кантилеверов — менее 5 нм) без отражающего покрытия (Veeco, США). Сканировали участки поверхности с размерами 5×5 и 10×10 мкм (512×512 точек).

Обработка данных. Статистическую обработку результатов клеточных испытаний и набухания проводили с помощью программы Origin. За ошибку принимали среднеквадратичное отклонение от среднего значения, за достоверные данные — различия по U-критерию Манна–Уитни при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Синтез реакционноспособных полимеров и их структурирование методом двухфотонной полимеризации. Разработанная стратегия синтеза четырехфункциональных полилактидов [9] позволила проводить реакцию в две стадии и добиться высокого процента выхода целевого продукта (>90%) и узкого молекулярно-массового распределения ($M_w/M_n < 1,2$), а структура и чистота синтезированного полимера были подтверждены ЯМР-спектроскопией. Ранее аналогичные синтетические стратегии уже были предложены [15], однако мы оптимизировали процедуру синтеза путем полной конверсии мономера, проходящей за 15 мин, и дальнейшей полимеризации и модификации субпродукта, выполненной по методике «single pot», без дополнительных стадий разделения субпродуктов и их очистки. Для создания структур выбрали метод двухфотонной полимеризации, с помощью которого были получены трехмерные пористые структуры в форме шестиугольника.

Преимущество выбранного метода структурирования заключается в создании высокоспецифичных структур с пространственным разрешением не более 1 мкм. Помимо этого, благодаря отсутствию дополнительного нагрева исходного полимера при инициации пространственной сшивки и точности фокусировки фемтосекундного лазера в процессе двухфотонной полимеризации, не наблюдаются эффекты самопроизвольной сшивки вблизи области фокусировки лазера, что позволяет с большой точностью воспроизводить заданную компьютерную модель. Использование реакционноспособного четырехлучевого полилактида обеспечивало высокую однородность пространствен-

ной сшивки и снижало эффекты усадки материала после проведения процесса структурирования.

Методом сканирующей электронной микроскопии получены микрофотографии матриц-носителей, на которых визуализирована структура материала заданной компьютерной модели (рис. 1, а, б). Сформированные и отмытые структуры состояли из двух слоев полых цилиндров (высота 160 мкм, внутренний диаметр 100 мкм, внешний диаметр 160 мкм) и представляли собой трехмерный шестиугольник. Смещение нижнего слоя относительно верхнего составляло 80 мкм и обеспечивало дополнительную поверхность внутри структуры для адгезии клеток. Методом атомно-силовой микроскопии показано, что на субмикронном уровне на поверхности матрицы присутствует большое количество неоднородностей, средняя шероховатость находится в пределах 1 мкм (рис. 1, в). Методом PeakForce QNM получено распределение значений модуля Юнга по поверхности образца (рис. 1, г).

Установлено, что метод двухфотонной полимеризации формирует полимерные структуры с однородными механическими свойствами, среднее значение модуля Юнга поверхности составляет 600 МПа.

Матричные свойства трехмерных структур на основе полилактида. Используя технику трехмерного микроструктурирования двухфотонной полимеризации, мы изготовили скаффолды с 3D-структурой, которые состоят из двух слоев микроцилиндров (высота — 100 мкм, внутренний диаметр — 100 мкм, наружный диаметр — 60 мкм), расположенных в форме шестигранника (см. рис. 1, а). Смещение верхнего слоя на 80 мкм относительно нижнего позволяет сформировать пористую структуру, которая обеспечивает эффективный перенос питательных веществ среды для культивируемых клеток. Кроме того, сформированные внутренние уступы служат дополнительной поддержкой для развития клеток и формирования клеточных выростов.

Тканеинженерные конструкторы на основе полилактида, совместимые с диссоциированными клетками гиппокампа. Морфологический анализ диссоциированных клеток гиппокампа на 14-й день культивирования показал, что развитие культур на полилактидных структурах соответствует основным признакам развития, характерным для нормального формирования нейронных сетей в первичной культуре. На 1-й день после высадки жизнеспособные клетки были прикреплены к полилактидным структурам. Формирование нейронных сетей подтверждено визуализацией нейрональных клеток с антителами против βIII-тубулина (нейронный маркер) и синаптофизина (пресинаптический маркер), что указывает на развитие дифференцированных нейронов, способных к образованию синаптических контактов. Клетки, культивируемые на полилактидных структурах в течение 14 дней (рис. 2), имеют оба специфических маркера. Данный результат сравним с поведением клеток в контрольной 2D-культуре на стекле.

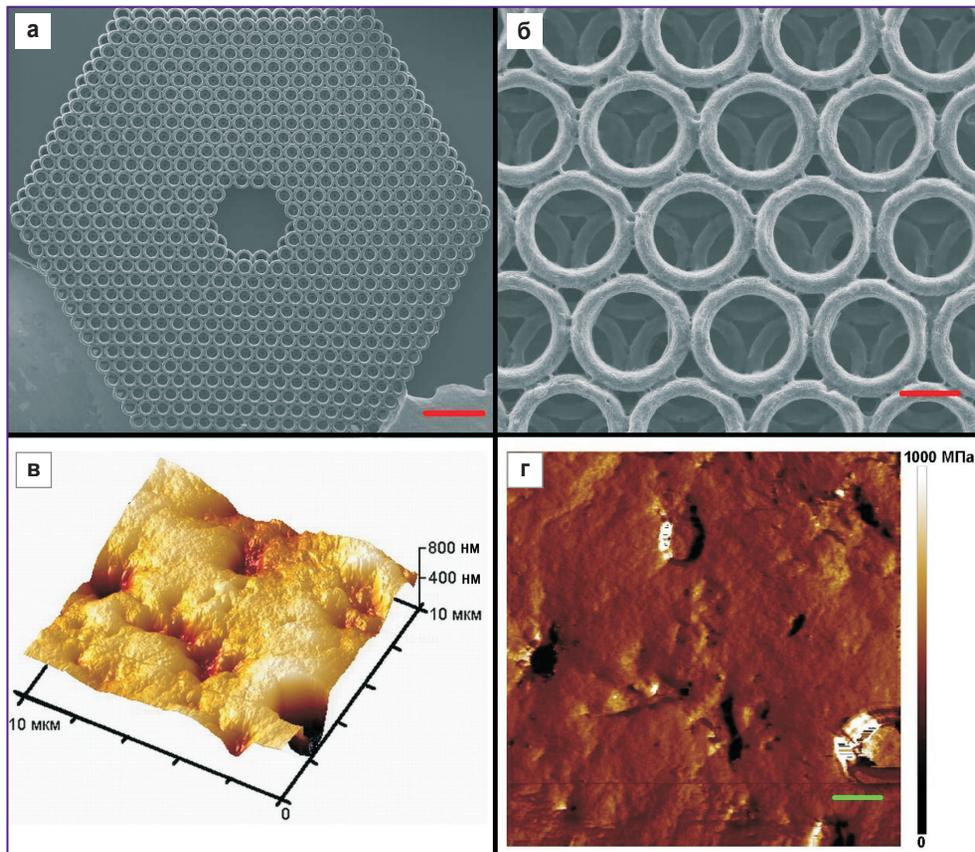


Рис. 1. Сканирующая электронная микроскопия. Микрофотографии сформированных структур; бар — 1 мм (а) и 100 мкм (б). Атомно-силовая микроскопия. Изображение (поле — 10 мкм), полученное в режиме измерения высоты (v) и модуля Юнга (g); бар — 1 мкм

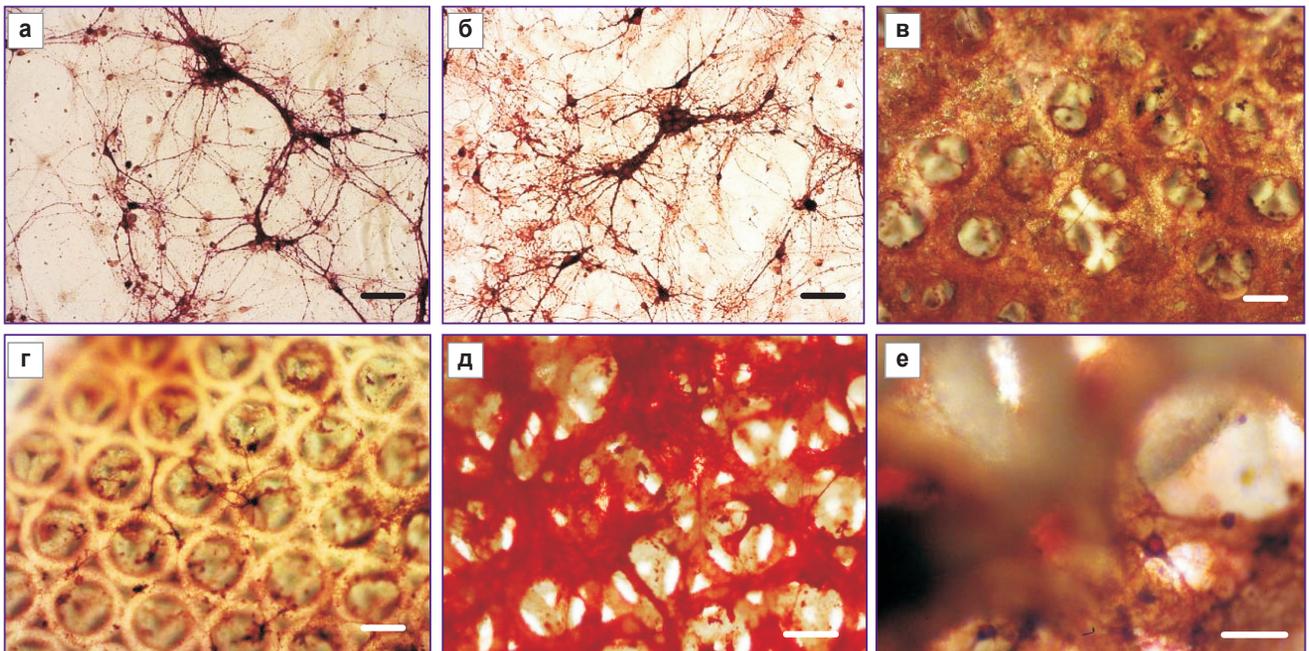


Рис. 2. Оптические микрофотографии иммуногистохимического анализа диссоциированной культуры гиппокампа с использованием нейронального и пресинаптического маркеров на 10-й день развития на стекле и матрице-носителе: нейрональный маркер β III-тубулин (а, в, д); пресинаптический маркер синаптофизин (б, г, е); измерительная линейка — 20 мкм

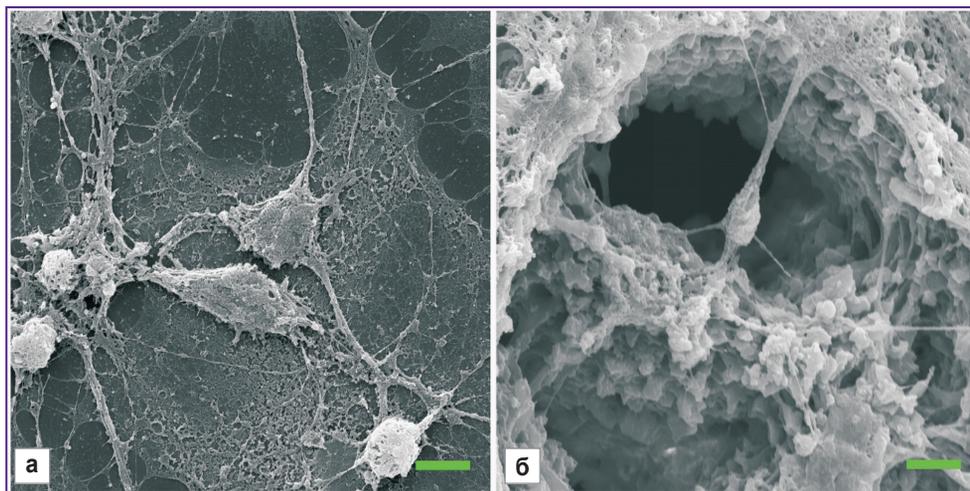


Рис. 3. Сканирующая электронная микроскопия. Микрофотографии диссоциированной культуры гиппокампа на 12-й день развития: контрольная культура на стекле (а) и разветвленная нейронная сеть, сформированная на матрице-носителе (б); бар — 10 кмк

Электронно-микроскопический анализ диссоциированной культуры гиппокампа, выращенной на полилактидных структурах, также показал, что морфологическое строение нервных клеток соответствует нейронам, выращенным на контрольных, покрытых полиэтиленгликолем покровных стеклах. Хорошо развитое дендритное дерево с типичной морфологией дендритных шипиков наблюдалось на поверхностях колец скаффолда, а также в промежутках между одиночными сегментами структуры. Это подтверждает, что данная архитектура тканеинженерного конструкта способствует нейронному росту и формированию синапсов в культуре 3D-клеток (рис. 3).

Заключение. Разработана синтетическая стратегия формирования реакционноспособных производных лактида, не проявляющих токсических свойств. На основе полимеров, полученных методом двухфотонной полимеризации, сформированы структуры, обладающие высоким пространственным разрешением. Установлено, что первичные клетки диссоциированной культуры гиппокампа взаимодействуют с поверхностью матрицы-носителя, после чего происходит активный рост аксонов и дендритов. Иммуногистохимический анализ с нейрональным маркером β III-тубулином и постсинаптическим маркером синаптофизинном свидетельствует о формировании функциональной нейронной сети в 3D-скаффолде.

Благодарность. Авторы благодарят С.В. Костюка за предоставленные образцы полимера, А.А. Фролову за подготовку образцов для атомно-силовой микроскопии.

Финансирование исследования. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект №15-13-00140 (в части проведения работ с первичными клеточными культурами, установ-

ление матричных свойств трехмерных структур, иммуногистохимический и СЭМ-анализ культур на трехмерных объектах), Российского фонда фундаментальных исследований, проект 15-29-04908 (в части формирования трехмерных матриц для нейротрансплантатов, их исследование методами АСМ и СЭМ).

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература/References

1. Huling J., Ko I.K., Atala A., Yoo J.J. Fabrication of biomimetic vascular scaffolds for 3D tissue constructs using vascular corrosion casts. *Acta Biomater* 2016; 32: 190–197, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.01.005>.
2. Kuznetsova D.S., Timashev P.S., Bagratashvili V.N., Zagaynova E.V. Scaffold- and cell system-based bone grafts in tissue engineering (review). *Sovremennyye tehnologii v medicine* 2014; 6(4): 201–212.
3. Kuznetsova D.S., Timashev P.S., Dudenkova V.V., Meleshina A.V., Antonov E.A., Krotova L.I., Popov V.K., Bagratashvili V.N., Zagaynova E.V. Comparative analysis of proliferation and viability of multipotent mesenchymal stromal cells in 3D scaffolds with different architectonics. *Bull Exp Biol Med* 2016; 160(4): 535–541, <https://doi.org/10.1007/s10517-016-3214-8>.
4. Tripathi G., Basu B. A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: physico-mechanical and biological evaluations. *Ceramics International* 2012; 38(1): 341–349.
5. Gittard S.D., Nguyen A., Obata K., Koroleva A., Narayan R.J., Chichkov B.N. Fabrication of microscale medical devices by two-photon polymerization with multiple foci via a spatial light modulator. *Biomed Opt Express* 2011; 2(11): 3167–3178, <https://doi.org/10.1364/BOE.2.003167>.
6. Ovsianikov A., Malinauskas M., Schlie S., Chichkov B., Gittard S., Narayan R., Löbner M., Sternberg K., Schmitz K.-P., Haverich A. Three-dimensional laser micro- and nano-structuring of acrylated poly(ethylene glycol) materials

and evaluation of their cytotoxicity for tissue engineering applications. *Acta Biomater* 2011; 7(3): 967–974, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.10.023>.

7. Gittard S.D., Koroleva A., Nguyen A., Fadeeva E., Gaidukeviciute A., Schlie S., Narayan R.J., Chichkov B. Two-photon polymerization microstructuring in regenerative medicine. *Front Biosci (Elite Ed)* 2013; 5: 602–609, <https://doi.org/10.2741/E642>.

8. Sabir M.I., Xu X., Li L. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *J Mater Sci* 2009; 44(21): 5713–5724, <https://doi.org/10.1007/s10853-009-3770-7>.

9. Timashev P., Kuznetsova D., Koroleva A., Prodanets N., Deiwick A., Piskun Y., Bardakova K., Dzhoiyashvili N., Kostjuk S., Zagaynova E., Rochev Y., Chichkov B., Bagratashvili V. Novel biodegradable star-shaped polylactide scaffolds for bone regeneration fabricated by two-photon polymerization. *Nanomedicine* 2016; 11(9): 1041–1053, <https://doi.org/10.2217/nnm-2015-0022>.

10. Biran R., Martin D.C., Tresco P.A. Neuronal cell loss accompanies the brain tissue response to chronically implanted silicon microelectrode arrays. *Exp Neurol* 2005; 195(1): 115–126, <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.04.020>.

11. Williams J.C., Hippensteel J.A., Dilgen J., Shain W., Kipke D.R. Complex impedance spectroscopy for monitoring tissue responses to inserted neural implants. *J Neural Eng* 2007; 4(4): 410–423, <https://doi.org/10.1088/1741-2560/4/4/007>.

12. Timashev P.S., Vedunova M.V., Guseva D., Ponimaskin E., Deiwick A., Mishchenko T.A., Mitroshina E.V., Koroleva A.V., Pimashkin A.S., Mukhina I.V., Panchenko V.Ya., Chichkov B.N., Bagratashvili V.N. 3D in vitro platform produced by two-photon polymerization for the analysis of neural network formation and function. *Biomed Phys Eng Express* 2016; 2(3), <https://doi.org/10.1088/2057-1976/2/3/035001>.

13. Timashev P.S., Bardakova K.N., Minaev N.V., Demina T.S., Mishchenko T.A., Mitroshina E.V., Akovantseva A.A., Koroleva A.V., Asyutin D.S., Pimenova L.F., Konovalov N.A., Akopova T.A., Solov'eva A.B., Mukhina I.V., Vedunova M.V., Chichkov B.N., Bagratashvili V.N. Compatibility of cells of the nervous system with structured biodegradable chitosan-based hydrogel matrices. *Applied Biochemistry and Microbiology* 2016; 52(5): 508–514, <https://doi.org/10.1134/s0003683816050161>.

14. Kobe F., Guseva D., Jensen T.P., Wirth A., Renner U., Hess D., Müller M., Medrihan L., Zhang W., Zhang M., Braun K., Westerholz S., Herzog A., Radyushkin K., El-Kordi A., Ehrenreich H., Richter D.W., Rusakov D.A., Ponimaskin E. 5-HT7R/G12 signaling regulates neuronal morphology and function in an age-dependent manner. *J Neurosci* 2012; 32(9): 2915–2930, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2765-11.2012>.

15. Theiler S., Diamantouros S.E., Jockenhoevel S., Keul H., Moeller M. Synthesis and characterization of biodegradable polyester/polyether resins via Michael-type addition. *Polymer Chemistry* 2011; 2(10): 2273, <https://doi.org/10.1039/c1py00262g>.