

РАЗРАБОТКА ДВУХСЛОЙНОГО ПОРИСТОГО СКАФФОЛДА НА ОСНОВЕ ХРЯЦА ПЕРЕГОРОДКИ НОСА СВИНЬИ ДЛЯ ОРТОПЕДИИ

DOI: 10.17691/stm2021.13.4.05

УДК 616.212.3–089.23

Поступила 17.05.2021 г.

**Н.Ю. Игнатъева**, д.х.н., доцент химического факультета¹;**О.Л. Захаркина**, научный сотрудник²;**Е.А. Сергеева**, к.ф.-м.н., старший научный сотрудник³;**Н.Б. Серезникова**, к.б.н., старший научный сотрудник⁴;**А.Л. Файзуллин**, младший научный сотрудник⁴;**А.Б. Шехтер**, д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории экспериментальной морфологии и биобанка Института регенеративной медицины⁴¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, стр. 3, Москва, 119991;²Институт фотонных технологий Федерального научно-исследовательского центра

«Кристаллография и фотоника» РАН, ул. Пионерская, 2, Москва, Троицк, 108840;

³Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики РАН, ул. Ульянова, 46, Н. Новгород, 603950;⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), ул. Малая Трубецкая, 8/2, Москва, 119991

Цель исследования — получение конструкции на основе пластины хряща носовой перегородки, обеспечивающей нужную дифференцировку клеток в разных слоях для замещения глубокого остеохондрального дефекта; разработка алгоритма последовательности химических и физических воздействий для создания неиммуногенной, двухслойной пористой структуры с нужными упруго-механическими свойствами.

Материалы и методы. Пластины из гиалинового хряща носовой перегородки свиньи, покрытые сверху надхрящницей, подвергались многостадийной обработке, включающей заморозку, выдерживание в гипотоническом растворе солей (образцы типа I); трипсинизацию, точечное ИК-лазерное воздействие, повторную трипсинизацию (образцы типа II); стабилизирующее действие сшивающих агентов — глицеринового альдегида/рибозы в кислой среде — отмывку (образцы типа III).

Для всех типов образцов:

1) установлены параметры стабильности (температура денатурации коллагена с помощью термического анализа и модуль Юнга с помощью механического анализа);

2) определены основные морфологические особенности с помощью световой и поляризационной микроскопии с классическими окрасками препаратов и нелинейной оптической микроскопии в режиме генерации второй гармоники.

Результаты. У образцов типа I термические, механические и морфологические свойства практически не отличались от свойств исходной системы носовой перегородки. Значительная часть клеток имела разрушенные мембраны.

В образцах типа II термическая стабильность коллагенового каркаса была существенно снижена; модуль Юнга снизился более чем в 4 раза по сравнению с образцами типа I. Коллагеновая структура гиалинового хряща оказалась дезорганизована, тем не менее сохранились морфологические отличия гиалиновой части и надхрящницы. Произошла почти полная децеллюляризация матрикса конструкции. Последовательное воздействие лазерного излучения и трипсина привело к образованию в матрице неполнослойных отверстий с диаметром ~100 мкм.

В образцах типа III увеличилось как термическая стабильность коллагенового каркаса, так и модуль Юнга (E). Глицериновый альдегид действовал более эффективно, чем рибоза, причем значение E достигло величины, характерной для интактного гиалинового хряща. Волокна коллагена в образцах типа III были более толстые, чем в образцах типов I и II. Сохранились морфологические отличия гиалиновой части и надхрящницы и несквозные отверстия.

Заключение. В результате последовательных обработок солями, трипсином, ИК-лазерным излучением и нетоксичными сшивающими агентами пластины хряща носовой перегородки образует пористую бесклеточную конструкцию, которая состоит из двух слоев, образованных волокнами коллагена типа I (из надхрящницы) и типа II (из гиалиновой части). Для данной конструкции можно задавать стабильность, механические свойства и размеры полостей для заселения клеткам. Это дает возможность использовать конструкцию для замены дефектов суставного хряща.

Ключевые слова: пористый скаффолд; хрящевая ткань; химическая модификация; глицериновый альдегид; рибоза.

Для контактов: Игнатъева Наталия Юрьевна, e-mail: nyu@kge.msu.ru

Как цитировать: Ignatieva N.Yu., Zakharkina O.L., Sergeeva E.A., Serezhnikova N.B., Faizullin A.L., Shekhter A.B. Development of a two-layer porous scaffold based on porcine nasal septal cartilage for orthopedics. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2021; 13(4): 48–56, <https://doi.org/10.17691/stm2021.13.4.05>

English

Development of a Two-Layer Porous Scaffold Based on Porcine Nasal Septal Cartilage for Orthopedics

N.Yu. Ignatieva, DSc, Associate Professor, Chemical Faculty¹;
O.L. Zakharkina, Researcher²;
E.A. Sergeeva, PhD, Senior Researcher³;
N.B. Serezhnikova, PhD, Senior Researcher⁴;
A.L. Faizullin, Junior Researcher⁴;
A.B. Shekhter, MD, DSc, Chief Researcher, Laboratory of Experimental Morphology and Biobank, Institute for Regenerative Medicine⁴

¹Lomonosov Moscow State University, 1, bld. 3 Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russia;

²Institute of Photonic Technologies of Federal Scientific Research Center "Crystallography and Photonics" of the Russian Academy of Sciences, 2 Pionerskaya St., Moscow, Troitsk, 108840, Russia;

³Federal Research Center Institute of Applied Physics of the Russian Academy of Sciences, 46 Ulyanova St., Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

⁴I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Malaya Trubetskaya St., Moscow, 119991, Russia

The aim of the study was to design a construct based on a nasal septal cartilage plate providing required cell differentiation in different layers to replace a deep osteochondral defect and develop an algorithm of chemical and physical effect sequence to create non-immunogenic two-layer porous structure with requisite elasto-mechanical properties.

Materials and Methods. The plates derived from porcine nasal septal hyaline cartilage covered by perichondrium were multi-stage treated including freezing, equilibrating in a hypotonic saline solution (type I specimens); trypsinization, point IR-laser effect, re-trypsinization (type II specimens); a stabilizing effect of crosslinking agents — glycerinaldehyde/ribose in an acidic medium — washing (type III specimens).

For all type specimens:

1) there were established stability parameters (collagen denaturation temperature using a thermal analysis; and Young's modulus using a mechanical analysis);

2) there were determined morphological characteristics (using light and polarization microscopy with classical staining and nonlinear optical microscopy in second-harmonic generation mode).

Results. Thermal, mechanical, and morphological properties in type I specimens slightly differed from those of the initial nasoseptal system. A considerable part of cells had destroyed membranes.

In type II specimens, thermal stability of collagen frame was significantly lower; Young's modulus decreased more than fourfold compared to type I specimens. Collagen structure of hyaline cartilage appeared to be disarranged, although the morphological differences of the hyaline part and perichondrium preserved. The construct matrix was almost completely decellularized. Successive exposure to laser radiation and trypsin resulted in the formation of partial holes in the matrix, ~100 μm in diameter.

In type III specimens, both the thermal stability of the collagen frame and Young's modulus (E) increased. Glycerinaldehyde was more effective than ribose, E having reached the value typical for intact hyaline cartilage. Collagen fibers in type III specimens were thicker than in type I and II specimens. The morphological differences of the hyaline part and perichondrium and partial holes were preserved.

Conclusion. Due to sequential treatment by salts, trypsin, IR-laser radiation, and nontoxic crosslinking agents, nasal septal cartilage plate forms porous acellular construction consisting of two layers formed by type I (from perichondrium) and type II (from hyaline part) collagen fibers. In the present construction, stability, mechanical properties, and size of the partial holes can be assigned for cell colonization. It enables to use the construction to replace articular cartilage defects.

Key words: porous scaffold; cartilage tissue; chemical modification; glycerinaldehyde; ribose.

Введение

Наличие связанных с травмами или остеохондрозом глубоких остеохондральных дефектов в суставах является одной из наиболее распространенных

проблем в лечении патологии опорно-двигательного аппарата. В последние два десятилетия развивается новый подход к восстановлению тканей, обуславливающий имплантацию тканеинженерных конструкций [1].

Для суставного хряща такая конструкция должна

соответствовать определенным требованиям [2–5]: 1) быть неиммуногенной, биodeградируемой и биосовместимой; 2) обладать способностью к объемному заселению клетками; 3) сохранять дифференцировку хондроцитов или дифференцироваться в хондроциты при засевании скаффолда стволовыми клетками; 4) соответствовать остеохондральной структуре по своим упруго-механическим свойствам и гетерогенной многослойности.

По-видимому, идеальной следует признать конструкцию, сделанную из собственной ткани (аутографт), однако у такого подхода есть существенное ограничение: замещение глубокого остеохондрального дефекта приводит к созданию дефектов в других местах. Перспективной основой для создания скаффолдов хрящевой ткани является децеллюляризованный матрикс самой хрящевой ткани животных — ксенографт [3–13], который соответствует требованиям 1 и 3. Децеллюляризация является многостадийным процессом комплексной химико-механической обработки [4], после которой препарат хрящевой ткани перестает соответствовать требованию 4. Следует отметить, что без механического измельчения децеллюляризация — весьма трудозатратный процесс, кроме того, оставшийся коллагеновый матрикс оказывается слишком плотным, чтобы обеспечить выполнение требования 2 [7]. Создание материала с ориентированными волокнами коллагена и порами из порошка хряща, как правило, осуществляется в специальных пресс-формах с программируемым изменением температуры [8, 10, 11]. Другой интересный способ создания каналов в коллагеновой матрице был предложен в работе [9], где использовались иглы диаметром 400 мкм.

Одна из наиболее сложных проблем в создании конструкции, замещающей остеохондральный дефект, связана с многослойностью поврежденной ткани суставного хряща. Его верхняя часть представляет собой гиалиновый хрящ, образованный коллагеном типа II, а нижний слой — субхондральную костную ткань, сформированную на основе коллагена I типа. Предлагаются разные варианты изготовления механически единой и стабильной конструкции, удовлетворяющей требованию 4, однако большинство из них технически очень сложны в исполнении. К таким вариантам относятся пространственно-разделенная иммобилизация трансгенов, кодирующих разные факторы роста для хондрогенной или остеогенной дифференцировки стволовых клеток [14], и механическая комбинация децеллюляризованного размолотого хряща и минеральной (или полимерной) подсистемы [15–18].

Мы предлагаем использовать в качестве исходной заготовки для скаффолда часть перегородки носа, включающую гиалиновый хрящ (коллаген типа II) и элементы надхрящницы (коллаген типа I). После децеллюляризации, создания пор и восстановления механических свойств коллагенового каркаса за счет образования дополнительных поперечных связей воз-

можно получение поддерживающей конструкции для замещения остеохондральных дефектов, удовлетворяющей требованиям 1–4. Отметим, что оптимальными для свободного заселения хондроцитами считаются отверстия с характерным размером ~100 мкм [9].

Цель исследования — получение конструкции на основе пластины хряща носовой перегородки, обеспечивающей нужную дифференцировку клеток в разных слоях, для замещения глубокого остеохондрального дефекта; разработка алгоритма последовательности химических и физических воздействий для создания неиммуногенной двухслойной пористой структуры с нужными упруго-механическими свойствами.

Материалы и методы

В качестве исходной системы использовали пластины размером 7×10 мм и толщиной 2 мм, вырезанные из носовой перегородки свиньи (не позднее 12 ч после забоя). Сверху пластины были покрыты тонким слоем надхрящницы, низ представлял собой гиалиновую часть хряща.

Предварительная обработка состояла в заморозке пластин в течение 6 сут при температуре –18°C и последующем выдерживании в течение 24 ч при 37°C в гипотоническом растворе солей (0,1 М NaCl с добавлением 0,01 М трис-HCl и 0,005 М MgCl₂).

Ферментативная обработка заключалась в выдерживании пластин в течение 24 ч при 37°C в 0,15 М растворе NaCl, содержащем 1 мг/мл трипсина. Такую обработку проводили дважды: до ИК-лазерного воздействия и после него.

Обработка сшивающими агентами состояла в выдерживании пластин в течение заданного времени (24, 48 или 120 ч) при 24°C в 0,15 М растворе NaCl — с добавлением HCl до концентрации 0,32 мМ (pH=3,5), содержащем сшивающий агент. В качестве сшивающего агента выступал глицериновый альдегид, образующийся *in situ* из его прекурсора — дитилацетата глицеринового альдегида в кислой среде. Прекурсор добавляли в раствор так, чтобы его концентрация составляла 0,02 М. Был также протестирован сшивающий агент рибоза с концентрацией 0,02 М. Такие обработки проводили после ИК-лазерного воздействия.

После каждой обработки (ферментативной и сшивающим агентом) образцы промывали в 300 мл 0,15 М раствора NaCl на воронке с фильтрующим дном под вакуумом водоструйного насоса. Время отмывки каждого образца составляло около 1 ч.

Для создания полостей в материале использовали излучение допированного эрбием волоконного лазера с длиной волны 1,56 мкм. Излучение подавали с помощью кварцевого оптического волокна с диаметром сердцевины 400 мкм. Воздействие осуществляли контактно, диаметр облучаемой зоны соответствовал диаметру волокна. Обработку излучением пластины конструкции проводили с двух сторон рядами лазерных

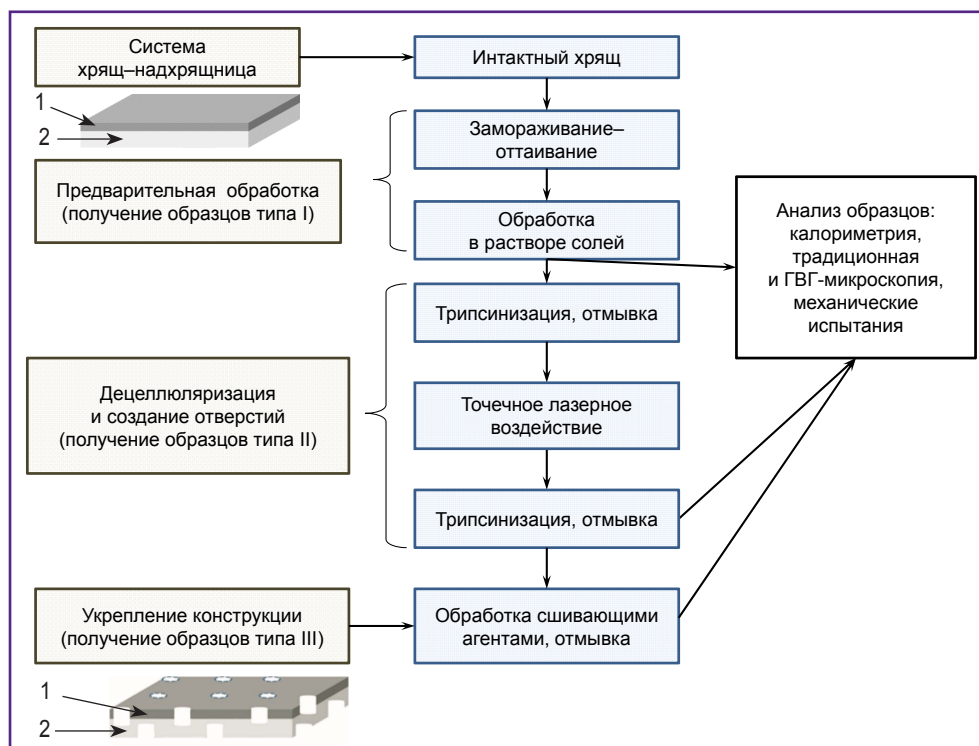


Рис. 1. Блок-схема эксперимента:
1 — надхрящница; 2 — гиалиновый хрящ

пятен, расстояние между рядами и двумя соседними пятнами составляло около 2 мм. При таком расстоянии между точками контакта изменение матрикса в каждой зоне воздействия обусловлено непосредственно действием лазерного излучения в месте контакта волокна с материалом и не зависит от облучения в соседних точках.

Термическую стабильность коллагена в образцах определяли на дифференциальном сканирующем калориметре (модель DSC 204 F1; Netzsch, Германия). Образцы массой 5–8 мг герметично закрывали в стандартных алюминиевых чашках объемом 20 мкл. Начальная, конечная температура составляли 20 и 90°C, скорость нагрева — 10 К/мин соответственно.

Механические испытания проводили на универсальной настольной испытательной машине EZ Test (модель EZ-SX; Shimadzu, Япония) при комнатной температуре в условиях одноосного сжатия в направлении, перпендикулярном поверхности пластины. Вертикальную нагрузку (до 20 Н) определяли при помощи датчиков силы, скорость перемещения сжимающей пластины составляла 0,5 мкм/с. Из зарегистрированных автоматически данных «сила–перемещение» получали зависимости «напряжение (σ)–деформация (ϵ)», которые в дальнейшем аппроксимировали экспоненциальной функцией $\sigma = A \cdot \exp(B\epsilon)$ с двумя подгонными параметрами (A , B). Значение первой производной аппроксимационной функции при $\epsilon = 10\%$ принимали за модуль Юнга (E).

Для морфологических исследований образцы фиксировали в 10% нейтральном формалине и готовили парафиновые среды толщиной 4 и 16 мкм. Более тонкие срезы, окрашенные гематоксилином и эозином и пикросириусом красным по стандартной методике, анализировали на универсальном оптическом микроскопе Leica DM4000 B LED (Leica Microsystems, Швейцария) в режимах световой, фазово-контрастной и поляризационной микроскопии. Микрофотографии получали с помощью цифровой видеокамеры Leica DFC7000 T с программным обеспечением LAS V4.8. На срезах толщиной 16 мкм проводили визуализацию в режиме генерации второй гармоники (ГВГ). Их анализировали с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия). Возбуждение осуществляли импульсным фемтосекундным излучением Ti:Sa-лазера (Mai Tai HP; Spectra-Physics, США) на длине волны 800 нм с длительностью импульсов 100 фс и частотой их повторения 80 МГц. Сигнал ГВГ выделяли с помощью дихроичного фильтра видимого излучения HFT KP 650 (Carl Zeiss) и узкополосного фильтра (400/10 нм).

Общая схема эксперимента, включающая приготовление образцов и методы их анализа, представлена на рис. 1.

Результаты

Морфологический анализ образцов после предварительной подготовки (тип I) показал, что для

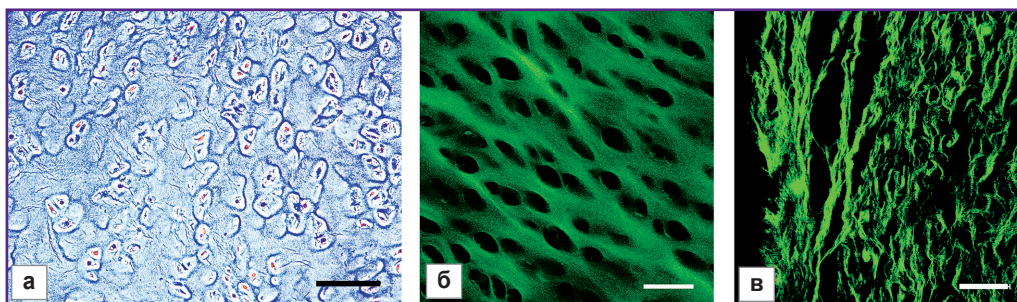


Рис. 2. Микрофотографии срезов образцов типа I:
 а — гиалиновый хрящ, окраска гематоксилином и эозином, фазово-контрастная микроскопия;
 б — гиалиновый хрящ; в — надхрящница; ГВГ-изображения. Бар — 50 мкм

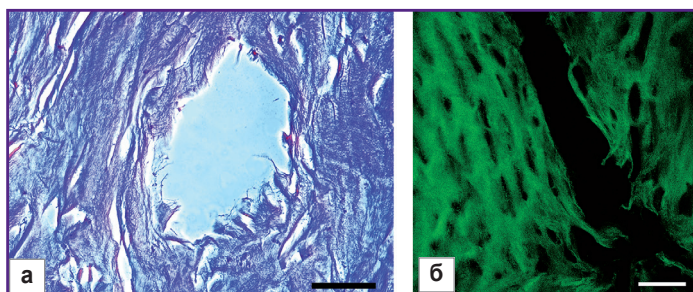


Рис. 3. Лазерные отверстия на поперечном (а) и продольном (б) срезах образцов типа II:
 а — окраска гематоксилином и эозином, фазово-контрастная микроскопия; б — ГВГ-изображение. Бар — 50 мкм

значительной части хондроцитов характерны деформация ядер и кариорексис, при этом структура коллагенового матрикса ткани сохраняется и в гиалиновой части, и в надхрящнице (рис. 2).

Термический анализ подтвердил, что коллаген в обеих частях сохранил термостабильность: в гиалиновой части коллаген не денатурирует вплоть до 95°C, а в надхрящнице денатурация происходит при температуре 63,5±0,5°C.

Механические свойства образцов типа I практически не изменились по сравнению с интактными: модуль Юнга (E) составил 0,65±0,15 МПа, что близко к величине E=0,70±0,10 МПа, характерной для интактных образцов.

Для создания несквозных отверстий образцы типа I на первом этапе подвергали ферментативной обработке с отмыванием продуктов протеолиза, включая цепи гликозаминогликанов. После такой процедуры термическая стабильность коллагена надхрящницы не изменилась, но коллаген в гиалиновой части оказался способным денатурировать полностью при 61,8±0,5°C.

Для локальной денатурации необходимо, чтобы, с одной стороны, время лазерного нагрева было существенно меньше времени тепловой релаксации (~0,1 с в радиальном направлении [19]) и, с другой стороны, температура в облучаемом объеме составляла не ме-

нее 61°C. Соответственно были выбраны время однократного воздействия (50 и 100 мс) и мощность лазерного излучения 2–4 Вт [20]. После точечной лазерной обработки образцы повторно трипсинизировали и отмывали от продуктов протеолиза.

Геометрические характеристики полученных отверстий измеряли на лабораторном микроскопе с точностью около 10 мкм. Оказалось, что при мощности 2 Вт и длительности импульса 100 мс или мощности 3 Вт и длительности импульса 50 с получаются круглые отверстия диаметром от 90 до 120 мкм, что близко к целевому размеру. Так получали образцы типа II.

На микрофотографиях продольных и поперечных срезов образцов типа II видно, что в матрице действительно образуются неполнослойные отверстия с диаметром, близким к целевым значениям ~100 мкм (рис. 3).

В образцах типа II происходили и существенные морфологические изменения по сравнению с образцами типа I. На микрофотографиях видно, что большая часть лакун оказались пустыми, без клеточных ядер (кариолизис), лишь в незначительной части содержатся фрагменты ядер (кариорексис). Коллагеновые волокна сохранялись и в надхрящнице, и в гиалиновой части, но волокнистая структура гиалиновой части была повреждена (рис. 4). В обычно гомогенном матриксе проявляется тонкая волокнистость, а анизотропия коллагена при поляризационной микроскопии наблюдается не везде.

По данным термического анализа, стабильность коллагена надхрящницы образцов типа II мало изменялась в отличие от коллагена гиалиновой части, где его денатурация происходила в интервале 48–61°C с максимумом пика на эндотерме ~55°C. Модуль Юнга уменьшился до 0,15±0,10 МПа.

Укрепление коллагенового каркаса конструкции осуществляли с помощью обработки сшивающими агентами (глицериновым альдегидом и рибозой), в результате чего получали образцы типа III. Эти образцы характеризовались практически полным отсутствием клеточных ядер при сохранности коллагенового кар-

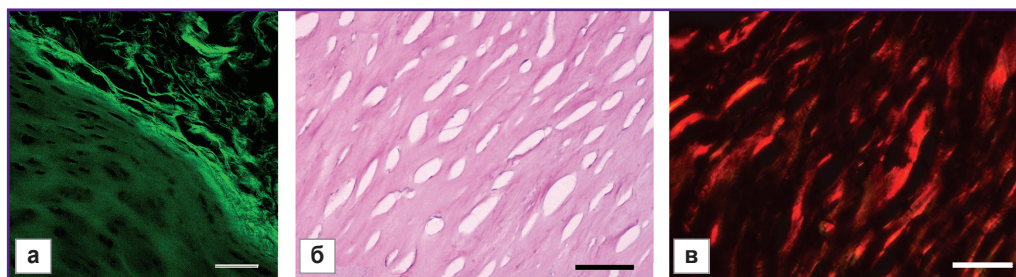


Рис. 4. Микрофотографии срезов образцов типа II:
 а — ГВГ-изображение; б — окраска гематоксилином и эозином; в — окраска пикросириусом красным, поляризационная микроскопия. Бар — 50 мкм

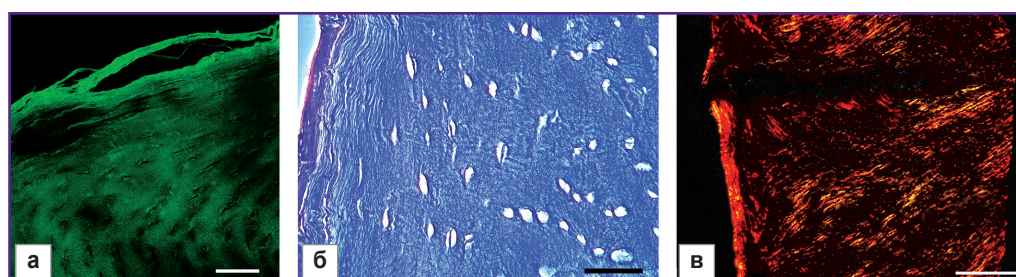


Рис. 5. Микрофотографии срезов образцов типа III после воздействия глицериновым альдегидом в течение 48 ч:
 а — ГВГ-изображение; б — окраска гематоксилином и эозином, фазово-контрастная микроскопия; в — окраска пикросириусом красным, поляризационная микроскопия. Бар — 50 мкм (а, б) и 500 мкм (в)

Термические и механические характеристики образцов в ходе приготовления скаффолда

Тип образца	Температура денатурации гиалиновой части, °С	Модуль Юнга, МПа
I	>95	0,65±0,15
II	55±2	0,15±0,10
III ГА-24	62±1	0,65±0,10
III ГА-48	64±1	0,7±0,1
III Р-48	59±1	0,3±0,1
III Р-120	62±1	0,6±0,2

Здесь: ГА — глицериновый альдегид; Р — рибоза; 24, 48 и 120 — время воздействия сшивающего агента, ч.

каса и лазерных отверстий (рис. 5). Архитектоника коллагенового каркаса гиалиновой части существенно изменилась: структура стала более плотной и волокна собрались в пучки. В надхрящнице волокна сохранили ориентацию, параллельную поверхности.

Термическая стабильность коллагена в образцах типа III возросла. Увеличение времени сшивания образцов приводило к увеличению температуры денатурации. Глицериновый альдегид как сшивающий агент оказался активнее, чем рибоза. Данные термического анализа образцов типа III приведены в таблице.

Механическая устойчивость конструкций в образцах типа III увеличилась, модуль Юнга оказался близок к величине E для интактной хрящевой ткани. Как и в случае с температурой денатурации, обработка глицериновым альдегидом привела к большему увеличению E в отличие от рибозы, даже при меньшем времени воздействия. Увеличение времени сшивания с помощью глицеринового альдегида приводило к росту E. Значения E для образцов типа III также приведены в таблице.

Обсуждение

Подготовительная обработка хрящевой пластины оказала влияние главным образом на состояние клеток. Действительно, замораживание–оттаивание и обработка гипотоническим раствором инициируют разрушение клеточных мембран. Таким образом, в образцах типа I прошел первый этап деструкции клеток. Первая трипсинизация образцов типа I обеспечивает возможность денатурации коллагена гиалиновой части хряща при ИК-лазерном нагреве [21]. В результате после локального воздействия и повторной трипсинизации, запускающей в свою очередь протеолиз денатурированного коллагена, в препаратах образуются полости. Радиус и длина полости зависят от совокупности параметров лазерного воздействия. Так, длина волны излучения λ определяет глубину

проникновения излучения, диаметр волокна — площадь воздействия. Длительность импульса t и мощность P обуславливают максимальную температуру, их вариации позволяют корректировать область изменений в ткани [22]. Для создания полостей радиусом 100 мкм и длиной ~1 мм мы выбрали $\lambda=1,56$ мкм и подходящий диаметр волокна для контактного воздействия. Другие необходимые характеристики (P и t) определяли экспериментально, предварительно оценив их диапазон на основе более ранних работ [20]. Таким образом, меняя параметры ИК-лазерного воздействия, можно варьировать геометрические характеристики полостей в коллагеновом каркасе конструкции в достаточно широких пределах.

Важно отметить, что двойная протеолитическая ферментативная обработка, приводящая к деструкции всех белков (включая внутриклеточные), и двойная отмывка продуктов протеолиза дает практически полную децеллюляризацию матрикса. Видимо, разрушение мембран и освобождение ДНК и РНК от стабилизирующих белковых оболочек способствует удалению клеточного материала. К сожалению, коллагеновый каркас теряет свою устойчивость, в том числе термическую и механическую, в связи с разрушением подсистемы протеогликановых агрегатов [21, 23].

Почти пятикратное падение модуля Юнга в образцах типа II ставит под сомнение возможность их использования в качестве замены части хрящей, подвергающихся сжатию при работе сустава. Для увеличения жесткости и механической прочности материалов на основе коллагена успешно применяют обработку сшивающими агентами [24–26]. Первыми такими агентами были полифункциональные альдегиды, в первичной реакции образующие связь между альдольной группой и свободной аминогруппой остатка лизина, входящего в полипептидную цепь коллагена [24]. Увеличение количества ковалентных связей между молекулами коллагена, очевидно, приводит к увеличению жесткости материала, состоящего из отдельных волокон [27]. Основными требованиями к сшивающим агентам (в частности, альдегидам) являются наличие у них достаточной химической активности в реакции присоединения, с одной стороны, и отсутствие цитотоксичности — с другой. В качестве сшивающих агентов мы выбрали два альдегида: более активный глицериновый альдегид с крайне низкой цитотоксичностью и гораздо менее активную рибозу, но с абсолютным отсутствием цитотоксичности. Оба агента показали свою способность стабилизировать коллагеновый каркас конструкции (образцы типа III глицеринового альдегида и типа III рибозы). При этом с увеличением времени реакции показатели степени образования сшивков (температура денатурации и E) возрастали, но в соответствии с ожидаемой активностью. Так, через 24 ч действия глицеринового альдегида механические характеристики материала сравнялись с таковыми для исходного гиалинового хряща. Коллаген стал существ-

венно более термостабилен. Что касается химически менее активной рибозы, то приблизиться к этому результату удалось за трое суток реакции. Таким образом, использование предлагаемых нами нетоксичных сшивающих агентов позволяет получать скаффолды на основе единой системы волокон коллагена II и I, преимущественно разделенных в пространстве, причем механические характеристики конструкции можно варьировать в широком диапазоне.

Реакции, приводящие к образованию сшивков между макромолекулами, мы проводили при pH=3,5, в отличие от работ [25–28], в которых также применялись эти сшивающие агенты. Использование кислой среды для сшивания *in vivo* невозможно, но для обработки скаффолда это не является препятствием, так как избыток кислоты можно нейтрализовать основанием или отмыть. С другой стороны, образование первой ковалентной связи между альдегидом и остатком лизина включает стадию протонирования и реакция в кислой среде идет существенно быстрее. Действительно, в условиях нейтральной среды добиться значимого изменения характеристик стабильности под действием рибозы удастся через 5–7 сут [25–28]. В нашем случае эффект зафиксирован уже через 3 сут.

Важным результатом является сохранение единого коллагенового каркаса и гиалиновой части, представленной коллагеном II, и надхрящницы, преимущественно состоящей из коллагена I. Такое пространственное разделение разных типов коллагена в единой системе может обеспечить нужную дифференцировку клеток как в остеогенной, так и в хондрогенной части.

Заключение

В результате последовательных обработок солями, трипсином, ИК-лазерным излучением и нетоксичными сшивающими агентами пластина хряща носовой перегородки образует пористую бесклеточную конструкцию. Она состоит из двух слоев, образованных волокнами коллагена типа I (из надхрящницы) и типа II (из гиалиновой части). Данной конструкции можно задавать стабильность, механические свойства и размеры полостей для заселения клеткам. Это дает возможность использовать ее для замены дефектов суставного хряща.

Источники финансирования. Исследование проведено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №19-02-00135а и №19-315-90058), а также Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Государственного задания Федерального научно-исследовательского центра «Кристаллография и фотоника» РАН в части лазерных технологий, Федерального исследовательского центра Институт прикладной физики РАН (проект №#0030-2021-0014) в части морфологического

исследования и Государственного задания по теме №АААА-А21-121011990019-4 в части физико-химической модификации и анализа образцов.

Конфликт интересов отсутствует.

Литература/References

- Cheng A., Schwartz Z., Kahn A., Li X., Shao Z., Sun M., Ao Y., Boyan B.D., Chen H. Advances in porous scaffold design for bone and cartilage tissue engineering and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2019; 25(1): 14–29, <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2018.0119>.
- Wang M., Yuan Z., Ma N., Hao C., Guo W., Zou G., Zhang Y., Chen M., Gao S., Peng J., Wang A., Wang Y., Sui X., Xu W., Lu S., Liu S., Guo Q. Advances and prospects in stem cells for cartilage regeneration. *Stem Cells Int* 2017; 2017: 4130607, <https://doi.org/10.1155/2017/4130607>.
- Izadifar Z., Chen X., Kulyk W. Strategic design and fabrication of engineered scaffolds for articular cartilage repair. *J Funct Biomater* 2012; 3(4): 799–838, <https://doi.org/10.3390/jfb3040799>.
- Cheng C.W., Solorio L.D., Alsborg E. Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffolds for orthopaedic tissue engineering. *Biotechnol Adv* 2014; 32(2): 462–484, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.012>.
- Yang Q., Peng J., Guo Q., Huang J., Zhang L., Yao J., Yang F., Wang S., Xu W., Wang A., Lu S. A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2008; 29(15): 2378–2387, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.01.037>.
- Zhang Y., Liu S., Guo W., Wang M., Hao C., Gao S., Zhang X., Li X., Chen M., Jing X., Wang Z., Peng J., Lu S., Guo Q. Human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells combined with an acellular cartilage extracellular matrix scaffold improve cartilage repair compared with microfracture in a caprine model. *Osteoarthritis Cartilage* 2018; 26(7): 954–965, <https://doi.org/10.1016/j.joca.2018.01.019>.
- Graham M.E., Gratzner P.F., Bezuhly M., Hong P. Development and characterization of decellularized human nasoseptal cartilage matrix for use in tissue engineering. *Laryngoscope* 2016; 126(10): 2226–2231, <https://doi.org/10.1002/lary.25884>.
- Jia S., Zhang T., Xiong Z., Pan W., Lui J., Sun W. In vivo evaluation of a novel oriented scaffold-BMSC construct for enhancing full-thickness articular cartilage repair in a rabbit model. *PLoS One* 2015; 10(12): e0145667, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145667>.
- Luo R., Eswaramoorthy K.J., Mulhall D.J., Kelly D.J. Decellularization of porcine articular cartilage explants and their subsequent repopulation with human chondroprogenitor cells. *J Mech Behav Biomed Mater* 2015; 55: 21–31, <https://doi.org/10.1016/j.jmbm.2015.10.002>.
- Bowland P., Ingham E., Jennings L., Fisher J. Review of the biomechanics and biotribology of osteochondral grafts used for surgical interventions in the knee. *Proc Inst Mech Eng H* 2015; 229(12): 879–888, <https://doi.org/10.1177/0954411915615470>.
- Wang K.H., Wan R., Chiu L.H., Tsai Y.H., Fang C.L., Bowley J.F., Chen K.C., Shih H.N., Lai W.T. Effects of collagen matrix and bioreactor cultivation on cartilage regeneration of a fullthickness critical-size knee joint cartilage defects with subchondral bone damage in a rabbit model. *PLoS One* 2018; 13(5): e0196779, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196779>.
- Rowland R., Colucci L.A., Guilak F. Fabrication of anatomically-shaped cartilage constructs using decellularized cartilage-derived matrix scaffolds. *Biomaterials* 2016; 91: 57–72, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.03.012>.
- Барановский Д.С., Демченко А.Г., Оганесян Р.В., Лебедев Г.В., Берсенева Д.А., Балясин М.В., Паршин В.Д., Люндуп А.В. Получение бесклеточного матрикса хряща трахеи для тканеинженерных конструкций. *Вестник РАМН* 2017; 72(4): 254–260, <https://doi.org/10.15690/vramn723>.
- Baranovsky D.S., Demchenko A.G., Oganessian R.V., Lebedev G.V., Berseneva D.A., Balyasin M.V., Parshin V.D., Lyundup A.V. Acellular tracheal cartilaginous scaffold producing for tissue-engineered constructs. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk* 2017; 72(4): 254–260, <https://doi.org/10.15690/vramn723>.
- Rowland C.R., Glass C.A., Etyreddy A.R., Gloss C.C., Matthews J.R.L., Huynh N.P.T., Guilak F. Regulation of decellularized tissue remodeling via scaffold-mediated lentiviral delivery in anatomically-shaped osteochondral constructs. *Biomaterials* 2018; 177: 161–175, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.04.049>.
- Yang Q., Peng J., Lu S.B., Guo Q.Y., Zhao B., Zhang L., Wang A.Y., Xu W.J., Xia Q., Ma X.L., Hu Y.C., Xu B.S. Evaluation of an extracellular matrix-derived acellular biphasic scaffold/cell construct in the repair of a large articular high-load-bearing osteochondral defect in a canine model. *Chin Med J (Engl)* 2011; 124(23): 3930–3938.
- Hernigou J., Vertongen P., Chahidi E., Kyriakidis T., Dehoux J.P., Crutzen M., Boutry S., Larbanoix L., Houben S., Gaspard N., Koulalis D., Rasschaert J. Effects of press-fit biphasic (collagen and HA/βTCP) scaffold with cell-based therapy on cartilage and subchondral bone repair knee defect in rabbits. *Intern Orthop* 2018; 42(7): 1755–1767, <https://doi.org/10.1007/s00264-018-3999-3>.
- Bernhardt A., Paul B., Gelinsky M. Biphasic scaffolds from marine collagens for regeneration of osteochondral defects. *Mar Drugs* 2018; 16(3): 91–97, <https://doi.org/10.3390/md16030091>.
- Xu Y., Guo X., Yang Sh., Li L., Zhang P., Sun W., Liu C., Mi S. Construction of bionic tissue engineering cartilage scaffold based on three-dimensional printing and oriented frozen technology. *J Biomed Mater Res Part A* 2018; 106(6): 1664–1676, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36368>.
- Zakharkina O.L., Sergeeva E.A., Kirillin M.Yu., Ignatieva N.Y. Analysis of laser-induced modification of collagen structure using nonlinear optical microscopy. *Quantum Electron* 2020; 50(1): 76–80, <https://doi.org/10.1070/qel17214>.
- Sviridov A.P., Zakharkina O.L., Ignatieva N.Y., Vorobieva N.N., Bagratashvili N.V., Plyakin V.A., Kulik I.O., Sarukhanyan O.O., Minaev V.P., Lunin V.V., Bagratashvili V.N. Ex vivo laser thermoplasty of whole costal cartilages. *Lasers Surg Med* 2014; 46(4): 302–309, <https://doi.org/10.1002/lsm.22233>.
- Ignatieva N.Yu., Lunin V.V., Averkiev S.V., Maiorova A.F., Bagratashvili V.N., Sobol E.N. DSC investigation of connective tissues treated by IR-laser radiation. *Thermochim Acta* 2004; 422(1–2): 43–48, <https://doi.org/10.1016/j.tca.2004.04.030>.

22. *Лазерная инженерия хрящей*. Под ред. В.Н. Баграташвили, Э.Н. Соболя, А.Б. Шехтера. М: ФИЗМАТЛИТ; 2006.

Lazernaya inzheneriya khryashchey [Cartilage laser engineering]. Bagratashvili V.N., Sobol E.N., Shekhter A.B. (editors). Moscow: FIZMATLIT; 2006.

23. Schmidt M.B., Mow V.C., Chun L.E., Eyre D.R. Effects of proteoglycan extraction on the tensile behavior of articular cartilage. *J Orthop Res* 1990; 8(3): 353–363, <https://doi.org/10.1002/jor.1100080307>.

24. Bailey A.J., Paul R.G., Knott L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mech Ageing Dev* 1998; 106(1–2): 1–56, [https://doi.org/10.1016/s0047-6374\(98\)00119-5](https://doi.org/10.1016/s0047-6374(98)00119-5).

25. Danilov N.A., Ignatieva N.Yu., Iomdina E.N., Semenova S.A., Rudenskaya G.N., Grokhovskaya T.E., Lunin V.V. Stabilization of scleral collagen by glycerol aldehyde

cross-linking. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1780(5): 764–772, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.01.014>.

26. Sung H.W., Chang Y., Chiu C.T., Chen C.N., Liang H.C. Crosslinking characteristics and mechanical properties of a bovine pericardium fixed with a naturally occurring crosslinking agent. *J Biomed Mater Res* 1999; 47(2): 116–126, [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(199911\)47:2<116::aid-jbm2>3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(199911)47:2<116::aid-jbm2>3.0.co;2-j).

27. Bai P., Phua K., Hardt T., Cernadas M., Brodsky B. Glycation alters collagen fibril organization. *Connect Tissue Res* 1992; 28(1–2): 1–12, <https://doi.org/10.3109/03008209209014224>.

28. Lee K.W., Simpson G., Ortwerth B. A systematic approach to evaluate the modification of lens proteins by glycation-induced crosslinking. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1453(1): 141–151, [https://doi.org/10.1016/s0925-4439\(98\)00097-0](https://doi.org/10.1016/s0925-4439(98)00097-0).