

ВЛИЯНИЕ КОЛЛАГЕНА И GeIMA В СОСТАВЕ СКАФФОЛДОВ НА СОХРАНЕНИЕ ФЕНОТИПА РЕБЕРНЫХ ХОНДРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ *in vivo*

DOI: 10.17691/stm2023.15.2.01

УДК 612.751.2:615.5–003.93–089.843

Поступила 24.01.2023 г.



Е.В. Исаева, к.в.н., старший научный сотрудник лаборатории тканевой инженерии¹;
А.А. Кисель, научный сотрудник лаборатории тканевой инженерии¹;
Е.Е. Бекетов, к.б.н., научный сотрудник лаборатории медико-экологической дозиметрии и радиационной безопасности¹; доцент Инженерно-физического института биомедицины²;
Г.А. Демяшкин, д.м.н., зав. отделом патоморфологии¹; зав. лабораторией гистологии и иммуногистохимии Института трансляционной медицины и биотехнологии³;
Н.Д. Яковлева, к.б.н., преподаватель⁴;
Т.С. Лагода, к.б.н., лаборант-исследователь лаборатории тканевой инженерии¹;
Н.В. Аргучинская, младший научный сотрудник лаборатории тканевой инженерии¹;
Д.С. Барановский, к.м.н., зав. лабораторией тканевой инженерии¹; научный сотрудник Научно-образовательного ресурсного центра клеточных технологий⁵;
С.А. Иванов, д.м.н., член-корреспондент РАН, директор¹; профессор кафедры онкологии и рентгенодиагностики имени В.П. Харченко Медицинского института⁵;
П.В. Шегай, к.м.н., зав. Центром инновационных радиологических и регенеративных технологий⁶;
А.Д. Каприн, д.м.н., профессор, академик РАН, генеральный директор⁶; зав. кафедрой урологии и оперативной нефрологии с курсом онкоурологии Медицинского института⁵

¹Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава России, ул. Жукова, 10, Обнинск, 249036;

²Обнинский институт атомной энергетики — филиал Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ», тер. Студгородок, 1, Обнинск, 249034;

³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), ул. Трубецкая, 8/2, Москва, 119991;

⁴Медицинский техникум, пр. Ленина, 75а, Обнинск, 249037;

⁵Российский университет дружбы народов, ул. Миклухо-Маклая, 6, Москва, 117198;

⁶Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Минздрава России, ул. Королева, 4, Обнинск, 249036

Цель исследования — сравнение гидрогелей на основе коллагена I типа и желатина метакрилоила (GelMA) по их способности поддерживать формирование гиалинового хряща в организме животных после подкожной имплантации скаффолдов.

Материалы и методы. Хондроциты выделяли из реберных хрящей новорожденных крысят 0,15% раствором коллагеназы в DMEM. Принадлежность клеток к хрящевой ткани определяли окрашиванием гликозаминогликанов альциановым синим. Скаффолды с хондроцитами получали из 4% ателоколлагена свиньи I типа и из 10% GelMA методом микромолдинга и имплантировали подкожно в область холки двум группам крыс линии Wistar. Гистологические и иммуногистохимические исследования выполняли на 12-й и 26-й дни после имплантации. Образцы тканей окрашивали гематоксилином и эозином, альциановым синим, коллагены I и II типов выявляли с помощью соответствующих антител.

Результаты. При имплантации животным скаффолды вызвали умеренную воспалительную реакцию в обеих группах. К 26-му дню после имплантации как коллаген, так и GelMA подвергались почти полному рассасыванию. Образование хрящевой ткани наблюдали у животных обеих групп. Вновь образованная ткань интенсивно окрашивалась альциановым синим, клетки давали положительную реакцию на оба типа коллагена. Хрящевая ткань формировалась среди мышечных волокон.

Для контактов: Исаева Елена Васильевна, e-mail: kusimona@yandex.ru

Заключение. Исследована способность гидрогелей на основе коллагена I типа и GelMA поддерживать развитие гиалинового хряща в организме животных после подкожной имплантации скаффолдов. Как коллаген, так и GelMA способствуют формированию хрящевой ткани гиалиноподобного типа в организме животных, но фенотип хондроцитов характеризуется как смешанный. Необходимо более детальные исследования возможных механизмов хондрогенеза под влиянием каждого из гидрогелей.

Ключевые слова: скаффолд; фенотип хондроцитов; микромолдинг; ателоколлаген I типа; GelMA; хрящевая ткань.

Как цитировать: Isaeva E.V., Kisel A.A., Beketov E.E., Demyashkin G.A., Yakovleva N.D., Lagoda T.S., Arguchinskaya N.V., Baranovsky D.S., Ivanov S.A., Shegay P.V., Kaprin A.D. Effect of collagen and GelMA on preservation of the costal chondrocytes' phenotype in a scaffold *in vivo*. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2023; 15(2): 5, <https://doi.org/10.17691/stm2023.15.2.01>

English

Effect of Collagen and GelMA on Preservation of the Costal Chondrocytes' Phenotype in a Scaffold *in vivo*

E.V. Isaeva, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Tissue Engineering¹;

A.A. Kisel, Researcher, Laboratory of Tissue Engineering¹;

E.E. Beketov, PhD, Researcher, Laboratory of Medical and Environmental Dosimetry and Radiation Safety¹; Associate Professor, Engineering Physics Institute of Biomedicine²;

G.A. Demyashkin, MD, DSc, Head of the Department of Pathomorphology¹; Head of Department of Histology and Immunohistochemistry, Institute of Translational Medicine and Biotechnology³;

N.D. Yakovleva, PhD, Lecturer⁴;

T.S. Lagoda, PhD, Research Laboratory Assistant, Laboratory of Tissue Engineering¹;

N.V. Arguchinskaya, Junior Researcher, Laboratory of Tissue Engineering¹;

D.S. Baranovsky, MD, PhD, Head of Laboratory of Tissue Engineering¹; Researcher, Research and Educational Resource Center for Cellular Technologies⁵;

S.A. Ivanov, MD, DSc, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director¹; Professor, Department of Oncology and X-ray Radiology named after V.P. Kharchenko, Medical Institute⁵;

P.V. Shegay, MD, PhD, Head of the Center for Innovative Radiological and Regenerative Technologies⁶;

A.D. Kaprin, MD, DSc, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, General Director⁶; Head of the Department of Urology and Operative Nephrology with a Course of Oncourology, Medical Institute⁵

¹A. Tsyb Medical Radiological Research Centre — Branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, 10 Zhukova St., Obninsk, 249036, Russia;

²Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering — Branch of the National Research Nuclear University MEPhI, 1 Studgorodok, Obninsk, 249034, Russia;

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Malaya Trubetskaya St., Moscow, 119991, Russia;

⁴Medical Technical School, 75 A Lenina St., Obninsk, 249037, Russia;

⁵Peoples' Friendship University of Russia, 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow, 117198, Russia;

⁶National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, 4 Koroleva St., Obninsk, 249036, Russia

The aim of the study was to compare type I collagen-based and methacryloyl gelatin-based (GelMA) hydrogels by their ability to form hyaline cartilage in animals after subcutaneous implantation of scaffolds.

Materials and Methods. Chondrocytes were isolated from the costal cartilage of newborn rats using 0.15% collagenase solution in DMEM. The cells were characterized by glycosaminoglycan staining with alcian blue. Chondrocyte scaffolds were obtained from 4% type I porcine atelocollagen and 10% GelMA by micromolding and then implanted subcutaneously into the withers of two groups of Wistar rats. Histological and immunohistochemical studies were performed on days 12 and 26 after implantation. Tissue samples were stained with hematoxylin and eosin, alcian blue; type I and type II collagens were identified by the corresponding antibodies.

Results. The implanted scaffolds induced a moderate inflammatory response in both groups when implanted in animals. By day 26 after implantation, both collagen and GelMA had almost completely resorbed. Cartilage tissue formation was observed in both animal groups. The newly formed tissue was stained intensively with alcian blue, and the cells were positive for both types of collagen. Cartilage tissue was formed among muscle fibers.

Conclusion. The ability of collagen type I and GelMA hydrogels to form hyaline cartilage in animals after subcutaneous implantation of scaffolds was studied. Both collagen and GelMA contributed to formation of hyaline-like cartilage tissue type in animals, but the chondrocyte phenotype is characterized as mixed. Additional detailed studies of possible mechanisms of chondrogenesis under the influence of each of the hydrogels are needed.

Key words: scaffold; chondrocyte phenotype; micromolding; type I atelocollagen; GelMA; cartilage tissue.

Введение

Хрящ — плотная соединительная ткань с ограниченными возможностями самовосстановления [1]. Высокоорганизованный внеклеточный матрикс (ВКМ) хрящевой ткани состоит преимущественно из протеогликанов и коллагенов [2]. Регенерация различных типов хряща является сложной задачей и требует разработки микросреды, способствующей развитию хрящевой ткани гиалинового, эластического или волокнистого типов [3]. Одним из способов восстановления локальных дефектов хряща в регенеративной медицине служит имплантация аутологичных хондроцитов [4]. Процедура включает в себя использование клеток, полученных из здоровых участков хрящевой ткани и размноженных в условиях *in vitro* [4–6]. Недостатками этого метода являются ограниченное количество хондроцитов и их склонность к дедифференцировке в ходе 2D-культивирования, а также возможные повреждения донорской зоны [7–9].

Технология тканевой инженерии с использованием скаффолдов на основе гидрогелей природного происхождения открывает новые возможности восстановления дефектов хряща. Гидрогели представляют собой сеть сшитых гидрофильных полимеров. При набухании в воде масса гидрогеля увеличивается, во много раз превышая его собственную. Физические и биохимические свойства гидрогелей во многом зависят от их состава, методов полимеризации и плотности сшивания. Гидрогели могут служить универсальной платформой с желаемым сочетанием свойств для использования в регенеративной медицине и других смежных областях [10]. В частности, гидрогели для биомедицинского применения разрабатываются так, чтобы воспроизводить характеристики нативного ВКМ и обеспечивать трехмерную поддержку делящимся клеткам при формировании тканей [11]. Преимущества природных гидрогелей — лучшая биосовместимость и минимальная воспалительная реакция в организме [12–14]. Недостатком их являются плохие механические свойства, что требует добавления компонентов (материалов), увеличивающих жесткость, или использования различных способов полимеризации основного материала.

Важным является и вопрос, насколько гидрогели могут сами регулировать фенотип клеток в тканеинженерных конструкциях. В идеале гидрогель должен способствовать хондрогенезу и регенерации сложной зональной организации нативного хряща, при этом вновь образованный матрикс должен напоминать исходный гиалиновый хрящ, богатый коллагеном II типа и агреканами [15]. С этой точки зрения представляет интерес изучение возможности различных гидрогелей поддерживать хондрогенез в условиях *in vitro* и после имплантации скаффолдов, содержащих хондроциты, животным. В составе скаффолдов для хрящевой ткани применяют коллаген I типа [16–21] и желатин мета-

крилоил (GelMA) [9, 22–25]. При этом получаемые результаты часто довольно противоречивы.

Коллаген является основным компонентом ВКМ. Это фибриллярный белок, входящий в состав различных форм соединительной ткани, таких как кости, хрящи, сухожилия и собственно кожа [26–29]. Коллаген I типа в природе существует в виде тройной спирали ($\alpha 1$) $2\beta 2$ [30, 31]. Как наиболее распространенный белок ВКМ коллаген содержит сайты клеточной адгезии на основе трипептида аргинин–глицин–аспарагиновая кислота (RGD), а также обладает низкой иммуногенностью [32]. Коллаген и его производные наиболее часто используются в качестве биочернил в биопечати и основы для скаффолдов в целом, особенно если речь идет о работе с клетками [33, 34].

Желатин представляет собой белковое вещество, содержащее денатурированный и частично гидролизованный нативный коллаген, в основном типа I [35]. Тепловая денатурация снижает антигенность желатина по сравнению с коллагеном [36]. Биоактивные последовательности коллагена (например, RGD) для прикрепления клеток и чувствительные к матричной металлопротеиназе участки, ответственные за клеточно-опосредованную деградацию, сохраняются [37]. Желатин, модифицированный метакрилоильными (метакриламидными или метакрилатными) боковыми группами (GelMA), получает все большее распространение в тканевой инженерии, поскольку при сохранении хорошей биосовместимости он обладает лучшими и настраиваемыми в широких пределах механическими свойствами, особенно по сравнению с другими доступными гелеобразующими биоматериалами [38, 39]. Введение фотосшиваемых метакрилоильных замещающих групп обеспечивает удобное и быстрое гелеобразование при облучении ультрафиолетом в присутствии фотоинициаторов [40]. Использование этого материала для трехмерного культивирования клеток не только позволяет имитировать естественную внеклеточную среду, но и дает возможность создавать четко определенные тканевые конструкции [9, 23].

Цель исследования состояла в том, чтобы сравнить гидрогели на основе коллагена I типа и GelMA по их способности поддерживать формирование гиалинового хряща в организме животных после подкожной имплантации скаффолдов.

Материалы и методы

Клеточная культура. Получение первичной культуры хондроцитов осуществляли по протоколу, описанному ранее [20]. Для выделения клеток из реберных хрящей использовали девять 5-дневных крысят. Мягкие ткани удаляли инкубацией в растворах 0,25% трипсина («ПанЭко», Россия) и 0,2% коллагеназы 1-го типа (Gibco, США) с умеренным перемешиванием на магнитной мешалке (Biosan, Латвия) при +37°C. Реберные хрящи в растворе 0,15% коллагеназы оставляли на ночь при +37°C в CO₂-инкубаторе

(Sanyo, Япония). Нерасщепленные фрагменты ткани удаляли фильтрованием (100 нм, нейлон; SPL Lifesciences, Южная Корея). Фермент инактивировали добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Бразилия) и отмывали центрифугированием (Elmi, Латвия). После последнего центрифугирования клеточный осадок ресуспендировали в питательной среде DMEM (содержание глюкозы — 4,5 г/л), затем отбирали 200 мкл суспензии, окрашивали 0,4% раствором трипанового синего в фосфатно-солевом буфере (рН — 7,4; «ЭКО-Сервис», Россия) и подсчитывали количество живых клеток.

Клетки помещали во флаконы с площадью поверхности 225 см² (Corning, США) в питательную среду DMEM (содержание глюкозы — 4,5 г/л) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Бразилия), пенициллина-стрептомицина (по 50 ЕД/мл и мкг/мл соответственно), глутамина (649 мкг/мл). Культивировали в течение 7 дней до образования монослоя (~90%), после чего снимали с пластика и использовали для смешивания с гидрогелями. Принадлежность клеток к хрящевой ткани определяли по образованию гликозаминогликанов (ГАГ) в соответствии с ранее описанной методикой [19].

Гидрогель на основе коллагена. Гидрогель готовили на основе стерильного раствора ателоколлагена свиньи I типа (80 мг/мл; «Имтек», Россия) по ранее описанной методике [41]. В день эксперимента хондроциты снимали с пластика раствором трипсин:ЭДТА (1:1), после окрашивания трипановым синим подсчитывали количество живых клеток, центрифугировали (400 g, 5 мин) и ресуспендировали в 0,25 мл среды DMEM (содержание глюкозы — 4,5 г/л) без сыворотки. В клеточную суспензию добавляли 0,25 мл буферного раствора для коллагена (Трис-HCl; 0,3 М; рН — 8,0) и охлаждали при 4°C в течение 10 мин. Этот раствор смешивали с 0,5 мл раствора коллагена, получив таким образом гидрогель с концентрацией коллагена 4%. Конечная концентрация клеток составляла ~20·10⁶ мл⁻¹. До использования гидрогель держали при 4°C.

Гидрогель на основе GelMA. Для его приготовления использовали GelMA (Bloom 300) (Sigma-Aldrich, США; 900496). Сначала взвешивали 6 мг фотоинициатора Irgacure 2959 (Sigma-Aldrich; 410896) и помещали его в 600 мкл стерильной дистиллированной воды. Растворяли при 70°C в течение 10–15 мин в твердотельном термостате «Термит» («ДНК-технология», Россия), после чего охлаждали в темноте при комнатной температуре. Остывший раствор добавляли к 80 мг предварительно взвешенного GelMA и оставляли на ночь при 4°C для набухания. На следующий день раствор выдерживали в термостате «Термит» 3–4 ч при 40°C, периодически встряхивая, до полного растворения GelMA. Хондроциты снимали с пластика, после окрашивания трипановым синим подсчитывали количество живых клеток, центрифугировали и ресуспендировали в 200 мкл среды DMEM без сыво-

ротки. Смешивали этот объем с 600 мкл GelMA, получив таким образом гидрогель с концентрацией желатина 10%. Конечная концентрация клеток составляла ~30·10⁶ мл⁻¹. До использования гидрогель держали при 37°C.

FDM-печать. За день до эксперимента из ПВА (поливинилацетат, диаметр филамента — 1,75 мм) методом FDM (fused deposition modelling) были напечатаны каркасы в форме куба размером 5×5×5 мм с внутренней решеткой (рис.1). Размеры ячеек составляли 1×1×1 мм. Печать осуществляли на 3D-биопринтере Rokit INVIVO (Rokit, Южная Корея) с ПО версии 1.68. Слайсинг модели проводили в программе NewCreatorK версии 1.57.63. Печать осуществляли на плоский печатный столик без нагрева, температура работы экструдера — 200°C. Толщина одного слоя составляла 0,2 мм при диаметре сопла 0,2 мм. Перед печатью объекта выполнялась программа Skirt для более точного нанесения первого слоя. До печати проводили стерилизацию внутреннего пространства принтера с помощью встроенной УФ-лампы с длиной волны 254 нм. Готовые каркасы стерилизовали ультрафиолетом с той же длиной волны в течение 2 ч.

Изготовление тканеинженерных конструкций (скаффолдов). Скаффолды получали методом микромолдинга. В день эксперимента 12 каркасов из ПВА помещали в стерильные чашки Петри (Corning, США) диаметром 35 мм по 3 штуки. Потом 6 каркасов заливали охлажденным гидрогелем на основе коллагена, добавляли теплую питательную среду и помещали в CO₂-инкубатор (Sanyo, Япония) (37°C, 5% CO₂) для полимеризации. Другие 6 каркасов расплагали на хладоэлементе, заливали теплым гидрогелем на основе GelMA, выдерживали 30 мин, заливали холодной питательной средой и 10 мин облучали ультрафиолетом (365 нм) во внутреннем пространстве принтера при температуре печатно-

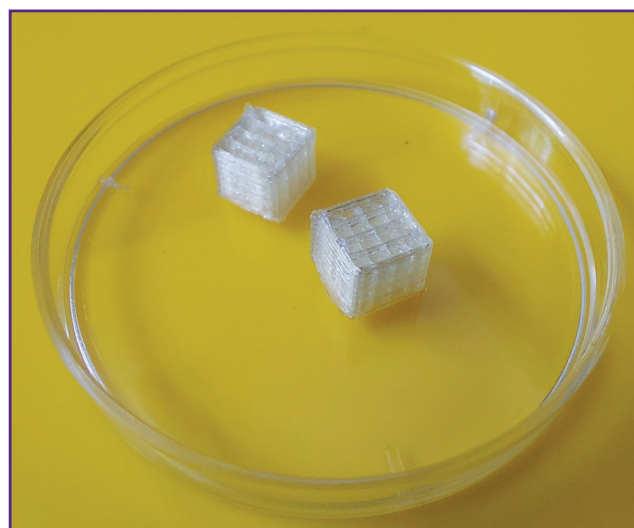


Рис. 1. Внешний вид ПВА-формы

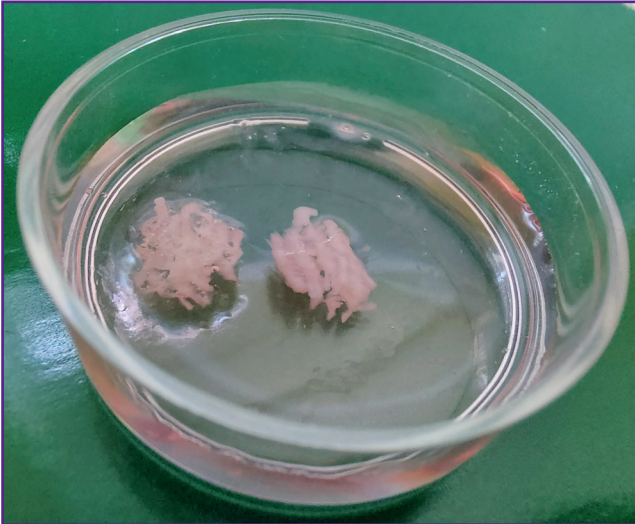


Рис. 2. Внешний вид полученных скаффолдов после растворения ПВА-формы

го столика 0...+4°C. После облучения выдерживали еще 30 мин на холоде, после чего помещали в CO₂-инкубатор (Sanyo, Япония). Через несколько часов, когда каркасы из ПВА подверглись растворению, полученные скаффолды отмывали фосфатно-солевым буфером от остатков ПВА, помещали в новые стерильные чашки Петри, добавляли среду DMEM (содержание глюкозы — 4,5 г/л) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки и оставляли в инкубаторе до следующего дня. После полимеризации гидрогелей и растворения ПВА готовые конструкции имели форму решетки (рис. 2).

Имплантация скаффолдов животным. После примерно 18-часовой инкубации скаффолды имплантировали подкожно в область холки восьми 2-месячным крысам-самцам линии Wistar с массой тела ~200 г. Животные были разделены на две группы по 4 особи. Крысам 1-й группы имплантировали скаффолды на основе коллагена, животным 2-й группы — на основе GelMA. Все операции осуществляли с применением ингаляционного эфирного («Химмед», Россия) наркоза. Животным выстригали шерсть в месте имплантации, операционное поле обрабатывали 70% раствором этанола (РФК, Россия), делали разрез ножницами и с помощью скальпеля формировали под кожей карман, в который помещали имплантат. При зашивании раны края кармана стягивали, место вживления имплантата помечали цветной нитью шовного материала (Monocryl Poliglecaprone 25; Ethicon, США). Шов обрабатывали 3% раствором перекиси водорода. Для лучшей фиксации сверху наносили медицинский клей БФ-6 («Вертекс», Россия). Область вокруг операционного поля дополнительно обезболивали 0,5% раствором новокаина («Дальхимфарм», Россия). В течение эксперимента крысы находились изолированно друг от друга в одиночных клетках со свободным доступом к воде и пище. Место операции осматривали ежеднев-

но. По два животных из каждой группы подвергали эвтаназии с интервалом ~2 нед — на 12-й и 26-й дни после имплантации — и отбирали материал для гистологического и иммуногистохимического исследований. Все работы с лабораторными животными проведены в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, и согласованы с локальной комиссией по биоэтическому контролю.

Гистологические и иммуногистохимические исследования. Скаффолды с фрагментами окружающих тканей фиксировали 24 ч в кислой жидкости Буэна: 1,3% тринитрофенол (Sigma-Aldrich, США), 40% формалин («БиоВитрум», Россия). После отмывки в 70% этаноле выполняли стандартную гистологическую проводку образцов с их последующим заключением в парафиновую среду «Гистомикс» («Эргопродакшн», Россия). Парафиновые срезы толщиной 5 мкм, полученные на микротоме (Leica RM 2235; Leica Microsystems, Германия), помещали на силанизированные стекла (S3003; Dako, Дания). Для гистологических исследований депарафинированные срезы окрашивали гематоксилином и эозином и альциановым синим (8GX; Sigma-Aldrich). После обезвоживания в спиртах и просветления в ортоксилоле препараты заключали в канадский бальзам (Merck, Германия).

Имуногистохимические исследования проводили с использованием моноклональных кроличьих антител к коллагену II типа (SAB4500366, 1:50; Sigma-Aldrich) и поликлональных кроличьих антител к коллагену I типа (FNab01836, 1:100; Fine Test, China). Для иммуновизуализации кроличьих антител применяли вторичные козы антитела к кроличьим IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (ab205718, 1:1000; Abcam, США). Растворы для иммуногистохимии готовили на фосфатно-солевом буфере. Согласно протоколу иммуногистохимических исследований, до нанесения первичных антител к коллагенам I и II типов депарафинированные срезы, погруженные в цитратный буфер (pH — 6,0), кипятили 5 мин. Эндogenous пероксидазу блокировали в 3% растворе перекиси водорода. В блокирующий буфер добавляли 2% нормальной сыворотки животных-доноров вторичных антител, 1% бычьего сывороточного альбумина и 0,1% Тритона X-100. В растворе первичных антител препараты инкубировали в течение ночи во влажной камере при +4°C. После отмывки препаратов в фосфатном буфере на срезы наносили вторичные козы антикроличьи антитела на 1 ч при комнатной температуре. Субстратную пероксидазу выявляли с использованием диаминобензидина (Liquid DAB+, K3468; Dako North America, Inc., США). После обезвоживания в спиртах и просветления в ксилоле препараты заключали в канадский бальзам. Гистологические срезы изучали под микроскопом Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) с микрофотосъемкой на цифровую камеру Canon Power Shot A640 (Canon, Япония).

Результаты

Изоляция клеток из реберных хрящей. При первичной изоляции из реберных хрящей новорожденных крысят количество клеток составляло ~16,5 млн, содержание живых клеток — 93,9%. Клетки нулевого пассажа имели характерную для хондроцитов кубическую форму и зернистую цитоплазму, образовывали плотный монослой на 7-е сутки культивирования. Окрашивание альциановым синим выявляло в межклеточном пространстве специфические метаболиты хондроцитов — ГАГ (рис. 3), на основании чего выде-

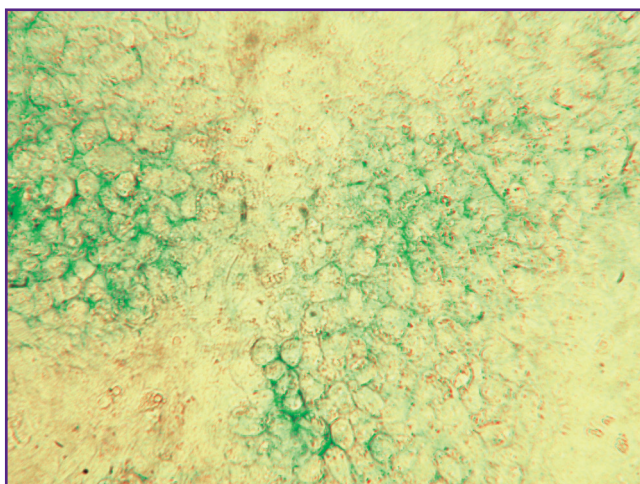


Рис. 3. Хондроциты 0-го пассажа через 7 дней культивирования в чашке Петри
Окрашивание альциановым синим, гликозаминогликаны; об. ×25

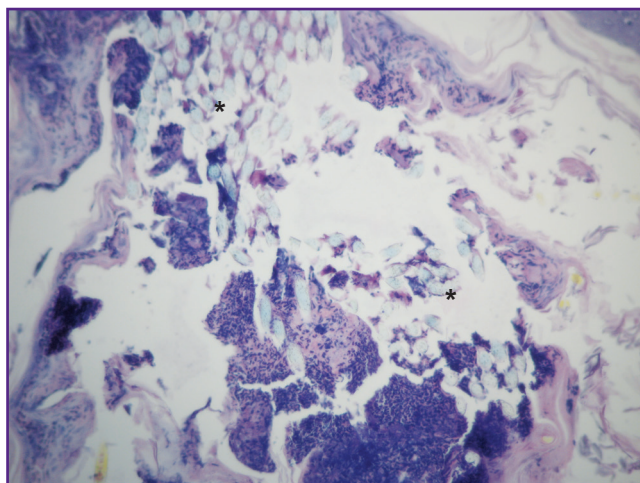


Рис. 4. 1-я группа (скаффолды на основе ателоколлагена); 12-й день после имплантации
Некротизированные ткани в области расположения имплантата; окрашивание гематоксилином и эозином; об. ×20. Звездочками отмечены остатки нити шовного материала, обозначавшего место имплантации

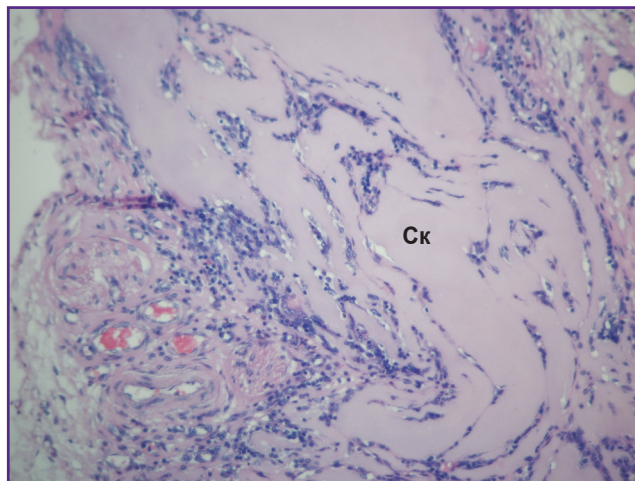


Рис. 5. 1-я группа (скаффолды на основе ателоколлагена); 12-й день после имплантации

Скаффолд, окруженный соединительнотканной капсулой (обозначен буквами Ск); окрашивание гематоксилином и эозином; об. ×20

ленные клетки были идентифицированы как хрящевые. Жизнеспособность клеток 0-го пассажа, снятых с пластика в день эксперимента, до смешивания с гидрогелями составляла ~95%.

Исследование на животных

1-я группа (ателоколлаген I типа), 12-й день после имплантации. На гистологических препаратах кожи с подкожной жировой клетчаткой и мышцами, взятыми у животных на этом сроке, место имплантации скаффолда определяется по присутствию остатков нити шовного материала и некротизированным тканям (рис. 4). Имплантат представлен пучками коллагеновых волокон, разделенных прорастающими в него соединительнотканными клетками (рис. 5). К этому сроку уже сформирована умеренно разросшаяся соединительнотканная капсула, в которой видны многоядерные макрофаги и клетки рассасывания инородных тел (рис. 6). Вдоль кровеносных сосудов в подкожной клетчатке наряду с элементами волокнистой соединительной ткани располагаются крупные клетки, цитоплазма которых дает интенсивную реакцию с альциановым синим, что позволяет отнести эти клеточные элементы к категории тучных клеток, учитывая их расположение и интенсивное окрашивание цитоплазмы в кислой среде (рис. 7). Окрашивания на коллагены на этом сроке не проводили. Признаков формирования хрящевой ткани не выявлено.

1-я группа (ателоколлаген I типа), 26-й день после имплантации. На этом сроке в зоне имплантации обнаруживаются остатки скаффолда, разделенные на небольшие фрагменты круглоклеточным инфильтратом (рис. 8). В соединительнотканной капсуле выявляются многоядерные макрофаги. У одного из животных среди поперечнополосатых мышц, расположенных в

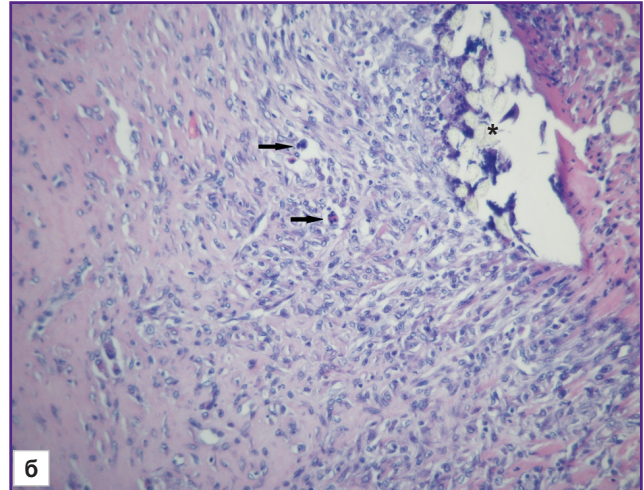
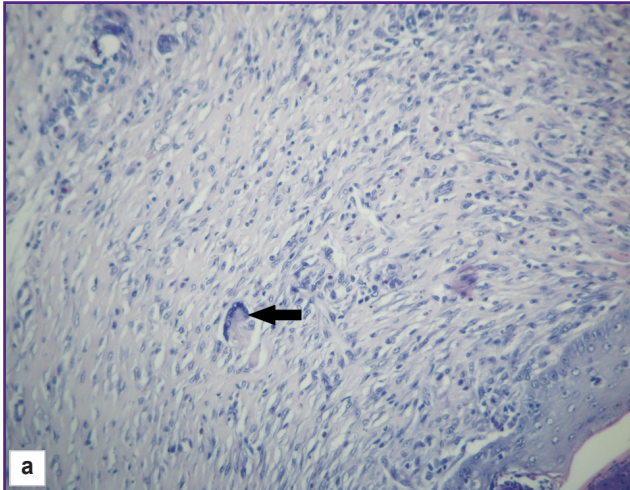


Рис. 6. 1-я группа (скаффолды на основе ателоколлагена); 12-й день после имплантации

Соединительнотканная капсула вокруг скаффолда: а, б — соединительная ткань с многоядерными клетками рассасывания инородных тел (отмечены стрелками на рис. 6, а, б, в); звездочкой обозначены остатки нити шовного материала в месте имплантации. Окрашивание гематоксилином и эозином; об. $\times 20$; в — фрагмент рис. 6, б; об. $\times 40$

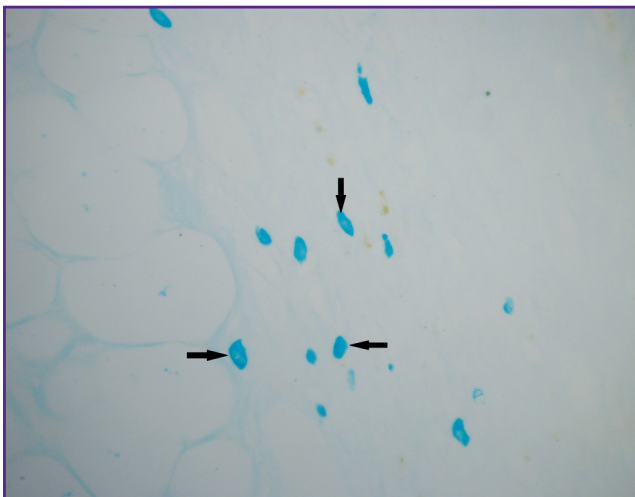
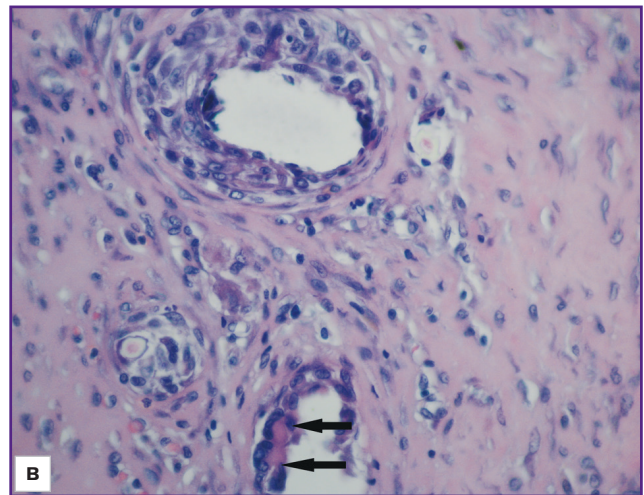


Рис. 7. 1-я группа (скаффолды на основе ателоколлагена); 12-й день после имплантации

Тучные клетки в соединительнотканной капсуле вокруг имплантата (показаны стрелками). Окрашивание альциановым синим; об. $\times 40$

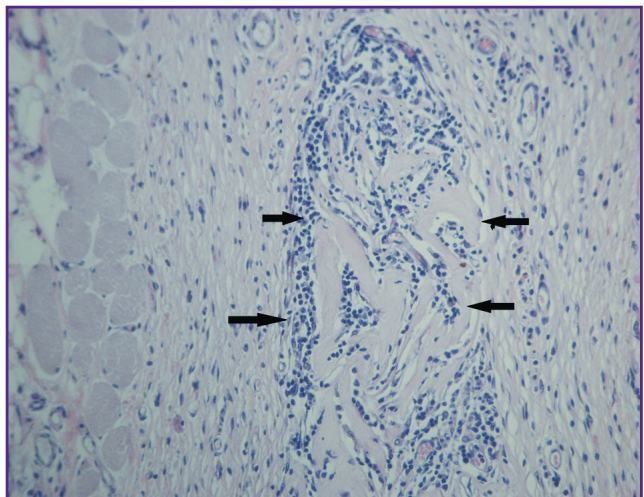


Рис. 8. 1-я группа (скаффолды на основе ателоколлагена); 26-й день после имплантации

Фрагменты решетки имплантата (показаны стрелками). Окрашивание гематоксилином и эозином; об. $\times 20$

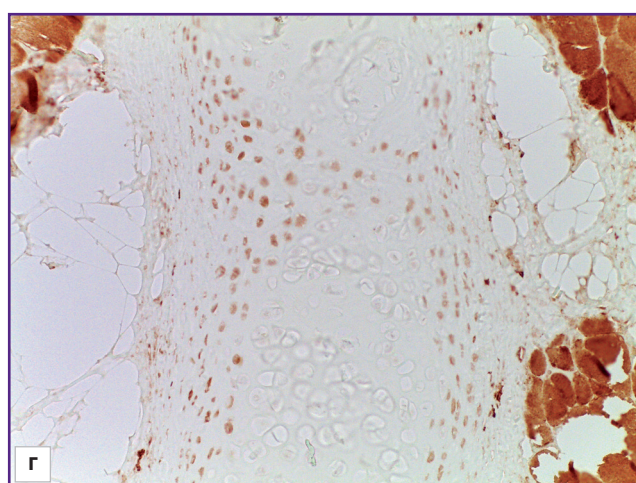
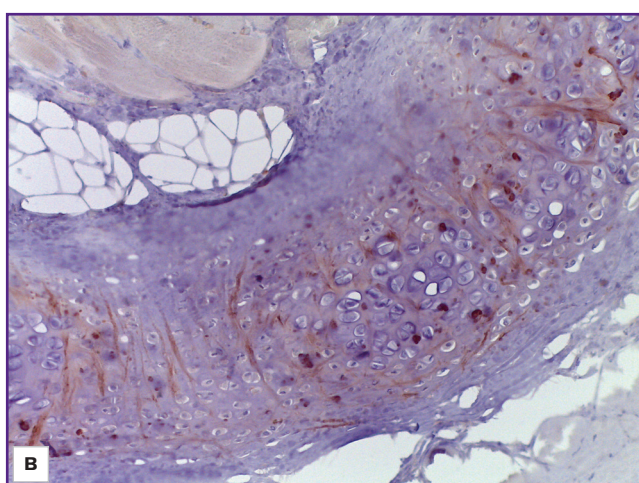
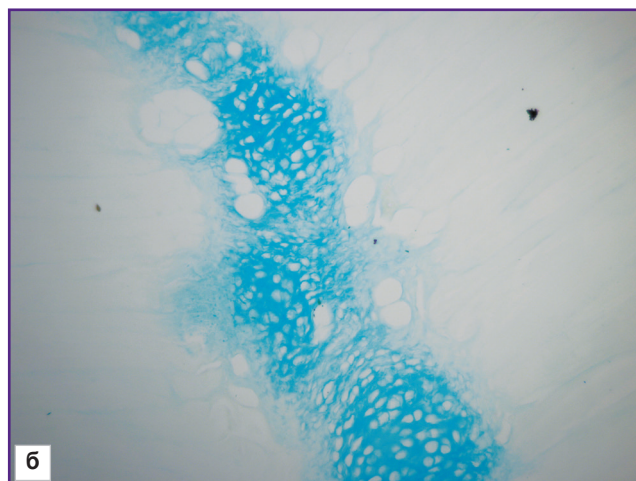
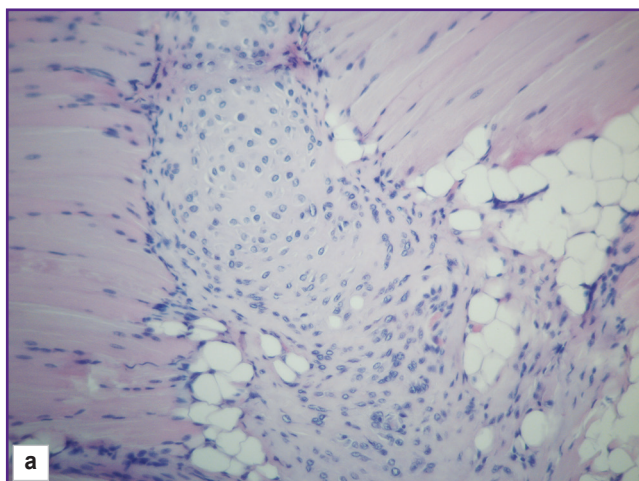


Рис. 9. 1-я группа (скаффолды на основе ателоколлагена); 26-й день после имплантации
 Островок хрящевой ткани на месте скаффолда: а — окрашивание гематоксилином и эозином; б — окрашивание альциановым синим; в — иммуногистохимическая реакция на коллаген II типа; г — иммуногистохимическая реакция на коллаген I типа; об. $\times 20$

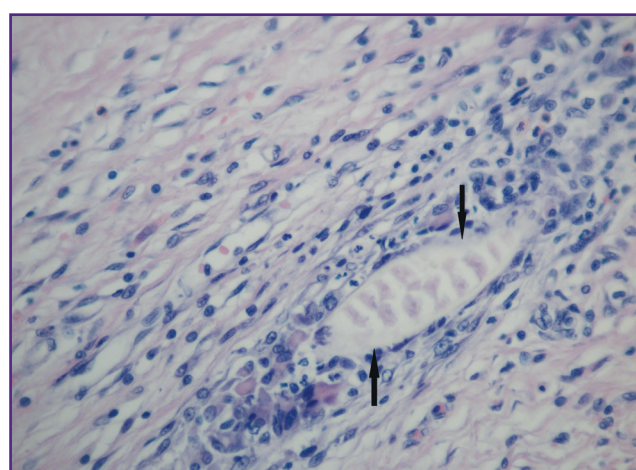
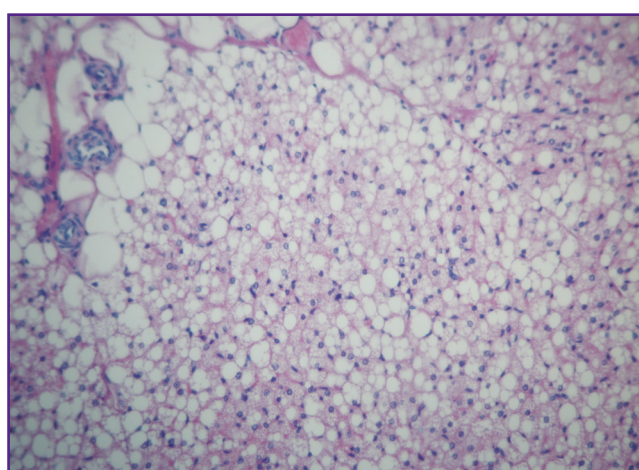


Рис. 10. 1-я группа (скаффолды на основе ателоколлагена); 26-й день после имплантации
 Бурый жир (многокапельные липоциты) в подкожной клетчатке крыс. Окрашивание гематоксилином и эозином; об. $\times 20$

Рис. 11. 2-я группа (скаффолды на основе GeIMA); 12-й день после имплантации
 Фрагменты решетки имплантата в подкожной клетчатке крыс (показаны стрелками). Окрашивание гематоксилином и эозином; об. $\times 40$

зоне имплантации, обнаружались очаги разрастания хрящевой ткани (рис. 9, а), которая окрашивалась альциановым синим (рис. 9, б) и хондроциты которой давали положительную иммуногистохимическую реакцию на коллаген II типа (рис. 9, в). В клетках, расположенных ближе к перихондру, выявляется также коллаген I типа (рис. 9, г). Обращает на себя внимание выраженное разрастание в зоне имплантации бурого жира (рис. 10).

2-я группа (GelMA), 12-й день после имплантации. У животных, подвергнутых эвтаназии, на этом сроке в зоне нахождения имплантата отмечается присутствие фрагментов хаотично расположенных волокон (рис. 11). В близлежащей соединительной ткани располагаются немногочисленные многоядерные клетки рассасывания инородных тел (рис. 12). По ходу кровеносных сосудов в подкожной соединительной ткани, как и у животных 1-й группы, обнаруживают-

ся крупные клетки, цитоплазма которых интенсивно окрашивается альциановым синим. У одного из животных среди мышечных волокон в зоне имплантации обнаружен островок хрящевой ткани (рис. 13, а), интенсивно окрашивающийся альциановым синим (рис. 13, б). Окрашивания на коллагены на этом сроке не проводили.

2-я группа (GelMA), 26-й день после имплантации. У одного из животных, подвергнутых эвтаназии на этом сроке, среди поперечнополосатых мышц обнаружен островок хрящевой ткани со слабо развитым перихондром (рис. 14, а). Хрящ состоит из редко расположенных хондробластов, как правило, одиночных, не образующих изогенных групп. Интенсивную реакцию при окрашивании альциановым синим показывают цитоплазма хрящевых клеток и небольшие зоны территориального матрикса (рис. 14, б). В цитоплазме хондроцитов, расположенных ближе

Рис. 12. 2-я группа (скаффолды на основе GelMA); 12-й день после имплантации

Многоядерные клетки рассасывания инородных тел в соединительнотканной капсуле (показаны стрелками). Окрашивание гематоксилином и эозином; об. $\times 40$

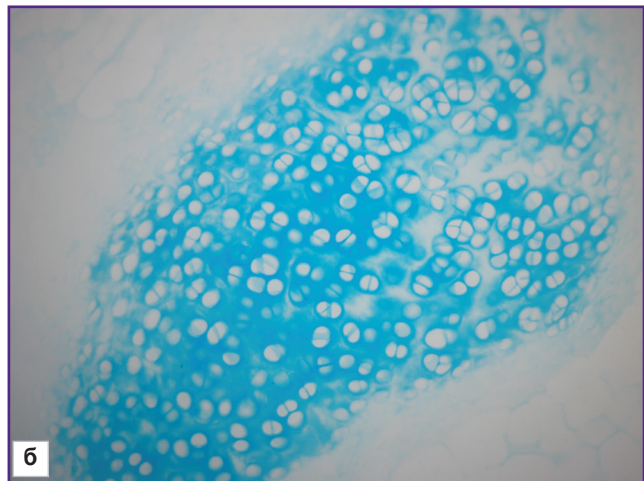
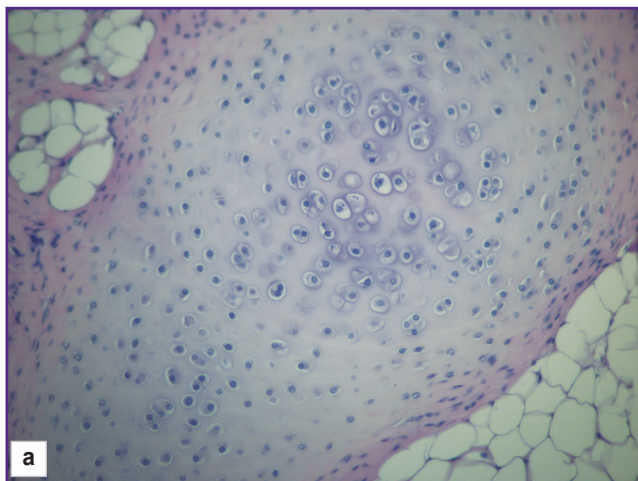
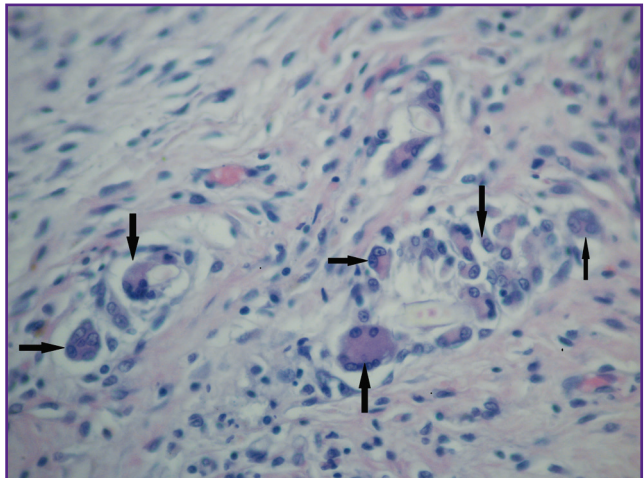


Рис. 13. 2-я группа (скаффолды на основе GelMA); 12-й день после имплантации

Хрящевая ткань на месте имплантата: а — окрашивание гематоксилином и эозином; б — окрашивание альциановым синим; об. $\times 20$

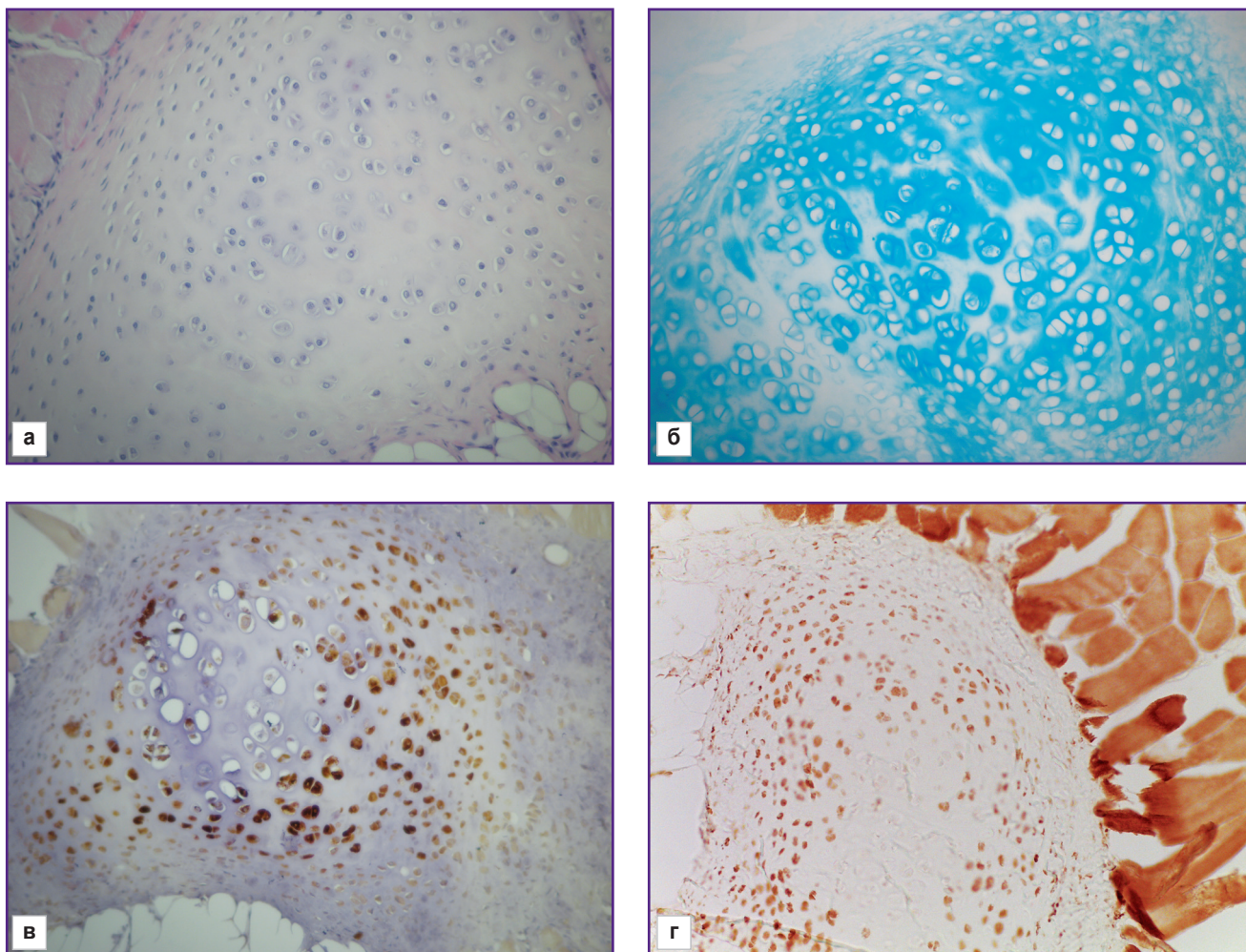


Рис. 14. 2-я группа (скаффолды на основе GelMA); 26-й день после имплантации

Хрящевая ткань на месте имплантата: а — окрашивание гематоксилином и эозином; б — окрашивание альциановым синим; в — иммуногистохимическая реакция на коллаген II типа; г — иммуногистохимическая реакция на коллаген I типа; об. $\times 20$

к перихондру, при иммуногистохимическом окрашивании выявляется высокое содержание коллагена II типа (рис. 14, в), в этих же клетках выявлен и коллаген I типа (рис. 14, г).

Обсуждение

В этом исследовании была изучена способность гидрогелей на основе природных полимеров — коллагена I типа и GelMA — сохранять фенотип реберных хондроцитов и стимулировать хондрогенез в условиях *in vivo*.

Известно, что трехмерные каркасы не только служат субстратом для прикрепления клеток, синтеза ВКМ и накопления биоактивных молекул, но также способны направлять клеточную дифференцировку, влияя на взаимодействия между клетками и между клетками и ВКМ [42]. Такие каркасы могут поддерживать редиф-

ференцировку дедифференцированных хондроцитов в условиях как *in vitro* [43], так и *in vivo* [38].

Для сохранения формы полученных скаффолдов и приближения механических свойств конструкций к свойствам нативного хряща мы взяли гидрогели с высокой концентрацией коллагена (4%) и GelMA (10%). Гидрогель с такой концентрацией коллагена мы уже использовали в своих предыдущих исследованиях по тканевой инженерии [20, 21, 44] и продемонстрировали его пригодность для этих целей. Увеличение концентрации полимера — самый простой подход к непосредственному повышению жесткости и прочности гидрогеля. Однако в плотных гидрогелях без дополнительных каналов диффузия метаболитов может быть затруднена [38, 44], поэтому для уменьшения диффузионного расстояния тканеинженерные конструкции были изготовлены в виде решетки. Микромолдинг — это быстрый и эко-

номичный подход к изготовлению скаффолдов на основе гидрогелей [40].

ПВА — водорастворимый полимер с высокой степенью набухания — нетоксичный, биосовместимый [45], биоразлагаемый, обладающий хорошими адгезивными свойствами [46], что позволяет использовать его в экспериментах с клетками. Примененный способ получения скаффолдов дал удовлетворительные результаты: после растворения ПВА решетка каркаса сохранялась, доступ питательных веществ к клеткам, заключенным внутри гидрогелей, мог осуществляться с нескольких сторон.

При имплантации животным каркасы вызвали умеренную воспалительную реакцию в обеих группах, о чем говорит присутствие макрофагов и тучных клеток в окружающей соединительнотканной капсуле. Известно, что воздействие провоспалительных цитокинов способно стимулировать миграцию хондроцитов [47, 48]. К 26-му дню после имплантации как коллаген, так и GelMA подверглись почти полному рассасыванию. Хрящевая ткань, как и в наших предыдущих исследованиях [20, 21], формировалась среди мышечных волокон, что можно объяснить хорошим кровоснабжением мышечной ткани.

Специфическими маркерами гиалинового хряща считаются коллаген II типа и ГАГ, выявляемые окрашиванием альциановым синим в кислой среде [15]. Качественное обнаружение этих продуктов в гистологических и иммуногистохимических исследованиях позволило заключить, что у одного из животных 1-й группы с имплантированными скаффолдами на основе ателоколлагена наблюдалось формирование хрящевой ткани гиалиноподобного типа на 26-й день после имплантации. У животных 2-й группы, которым были имплантированы скаффолды на основе GelMA, хрящевая ткань гиалинового типа формировалась как на 12-й, так и на 26-й день после имплантации. Мы не считаем, что этот результат обязательно обусловлен материалом каркаса, так как в нашем предыдущем исследовании [20] хрящевая ткань формировалась в скаффолдах из ателоколлагена с крысиными реберными хондроцитами у всех экспериментальных животных с 5-го по 40-й день наблюдения. Количественную оценку содержания ГАГ не проводили, так как, по некоторым данным, инфильтрация клеток хозяина в имплантированный каркас может искажать результаты исследований *in vivo* [38]. Выявление коллагена I типа в цитоплазме хондроцитов может быть связано в первую очередь с незрелостью вновь образованной хрящевой ткани на 26-й день после имплантации скаффолдов. В работе A.J. Sophia Fox с соавт. [2] отмечено, что в гиалиновом хряще кроме коллагена II типа, на долю которого в ВКМ приходится от 90 до 95%, присутствуют коллагены I, IV, V, VI, IX и XI типов [2]. Возможно, в более поздние сроки исследования экспрессия коллагена I типа хондроцитами была бы незначительной.

Во многих работах отмечено, что гидрогели на основе чистого или модифицированного коллагена I

типа поддерживали хондрогенез в условиях как *in vitro* [43, 49], так и *in vivo* [50]. В то же время опубликованы и другие результаты. Так, в работе G.Z. Jin и H.W. Kim [51] крысиные суставные хондроциты при культивировании в хондрогенной среде в геле на основе коллагена I типа (концентрация — 3,87 мг/мл) подверглись процессу дедифференцировки, в отличие от тех же хондроцитов в гелях на основе альгината и альгината с коллагеном, которые сохранили специфический фенотип. В исследовании W. Schlegel с соавт. [52] также показано, что хондроциты могут принимать фибробластоподобную (распластанную) форму в гидрогелях коллагена I типа.

Желатин, являясь продуктом денатурации коллагена, в биохимическом отношении мало от него отличается. Но желатин метакрилоил содержит метакриламидные или метакрилатные функциональные группы, подвергающиеся фотосшиванию под действием ультрафиолета в присутствии фотоинициатора. В тканеинженерных конструкциях на основе желатина метакрилоила как источник желатина, так и тип фотоинициатора могут оказывать влияние на редифференцировку хондроцитов [53], а облучение клеток снижает их жизнеспособность [54]. Результаты, полученные для этого гидрогеля, также противоречивы. В работе A.C. Daly с соавт. [3] сообщается, что гидрогели на основе GelMA и коллагена I типа в условиях *in vitro* в хондрогенной среде способствовали синтезу компонентов матрикса, соответствующего волокнистому хрящу, в то время как агароза и альгинат стимулировали развитие гиалиноподобной хрящевой ткани мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга. В работе W. Schuurman с соавт. [23] гидрогели на основе GelMA поддерживали жизнеспособность и дифференцированное состояние инкапсулированных суставных лошадиных хондроцитов при культивировании в условиях *in vitro* в течение 4 нед. A K.W. Voere с соавт. [38] исследовали способность человеческих суставных хондроцитов синтезировать в каркасах из GelMA, усиленных смесью полимеров поли(гидроксиметилгликолид-со-ε-капролактон)/поли(ε-капролактон), специфические продукты хрящевой ткани. Показано, что инкапсулированные хондроциты демонстрировали значительную продукцию хрящевого матрикса в этих конструкциях как *in vitro*, так и *in vivo*. P.A. Levett с соавт. [15] сообщают, что гидрогели на основе GelMA низкой упругости (1,5 кПа) поддерживали пролиферацию клеток и накопление матрикса, богатого ГАГ. Однако хондроциты имели смешанный фенотип с высокой экспрессией коллагена I типа. На основании этого авторы делают вывод о необходимости применения сразу нескольких индикаторов формирования хрящевой ткани, поскольку широко используемые показатели, такие как продукция ГАГ и окрашивание альциановым синим, не обязательно коррелируют с хондрогенезом в условиях *in vitro*.

В нашем исследовании анализ гистологической картины показал, что как коллаген, так и GelMA после

имплантации каркасов способствовали формированию в организме животных хрящевой ткани гиалиноподобного типа. Однако хондроциты вновь образованной ткани экспрессировали как коллаген II типа, так и коллаген I типа. Следует отметить, что среда *in vivo* очень сложна и, как следствие, может по-разному влиять на продукцию компонентов ВКМ и деградацию каркаса, что затрудняет прямое сравнение результатов с исследованиями *in vitro*. На основании полученных данных мы можем сделать вывод, что хондроциты вновь образованной хрящевой ткани на 26-й день после имплантации скаффолдов животным имели смешанный фенотип.

Заключение

Опубликованные данные о способности гидрогелей на основе коллагена I типа и GelMA поддерживать формирование гиалинового хряща часто противоречивы. В нашем исследовании как коллаген, так и GelMA способствовали формированию хрящевой ткани гиалиноподобного типа в организме животных на 26-й день после имплантации скаффолдов, но хондроциты имели смешанный фенотип. Поскольку каждый материал обладает определенными преимуществами и недостатками, необходимы более детальные исследования возможных механизмов хондрогенеза под влиянием каждого из гидрогелей.

Источники финансирования. Данная работа проводилась в рамках выполнения тем государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации за 2020–2022 гг.

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

- Schneider M.C., Chu S., Randolph M.A., Bryant S.J. An *in vitro* and *in vivo* comparison of cartilage growth in chondrocyte-laden matrix metalloproteinase-sensitive poly (ethylene glycol) hydrogels with localized transforming growth factor β 3. *Acta Biomater* 2019; 93: 97–110, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.03.046>.
- Sophia Fox A.J., Bedi A., Rodeo S.A. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health* 2009; 1(6): 461–468, <https://doi.org/10.1177/1941738109350438>.
- Daly A.C., Critchley S.E., Rencsok E.M., Kelly D.J. A comparison of different bioinks for 3D bioprinting of fibrocartilage and hyaline cartilage. *Biofabrication* 2016; 8(4): 045002, <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/4/045002>.
- Davies R.L., Kuiper N.J. Regenerative medicine: a review of the evolution of autologous chondrocyte implantation (ACI) therapy. *Bioengineering (Basel)* 2019; 6(1): 22, <https://doi.org/10.3390/bioengineering6010022>.
- Kalson N.S., Gikas P.D., Briggs T.W.R. Current strategies for knee cartilage repair. *Int J Clin Pract* 2010; 64(10): 1444–1452, <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2010.02420.x>.
- Brittberg M., Recker D., Ilgenfritz J., Saris D.B.F.; SUMMIT Extension Study Group. Matrix-applied characterized autologous cultured chondrocytes versus microfracture: five-year follow-up of a prospective randomized trial. *Am J Sports Med* 2018; 46(6): 1343–1351, <https://doi.org/10.1177/0363546518756976>.
- Marlovits S., Hombauer M., Truppe M., Vécsei V., Schlegel W. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br* 2004; 86(2): 286–295, <https://doi.org/10.1302/0301-620x.86b2.14918>.
- Schlegel W., Nürnberger S., Hombauer M., Albrecht C., Vécsei V., Marlovits S. Scaffold-dependent differentiation of human articular chondrocytes. *Int J Mol Med* 2008; 22(5): 691–699, <https://doi.org/10.3892/ijmm.00000074>.
- Mu L., Zeng J., Huang Y., Lin Y., Jiang H., Teng L. Experimental study on tissue engineered cartilage constructed by three-dimensional bioprinted human adipose-derived stem cells combined with gelatin methacryloyl. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2021; 35(7): 896–903, <https://doi.org/10.7507/1002-1892.202101049>.
- Annabi N., Tamayol A., Uquillas J.A., Akbari M., Bertassoni L.E., Cha C., Camci-Unal G., Dokmeci M.R., Peppas N.A., Khademhosseini A. 25th anniversary article: rational design and applications of hydrogels in regenerative medicine. *Adv Mater* 2014; 26(1): 85–123, <https://doi.org/10.1002/adma.201303233>.
- Dzobo K., Motaung K.S.C.M., Adesida A. Recent trends in decellularized extracellular matrix bioinks for 3D printing: an updated review. *Int J Mol Sci* 2019; 20(18): 4628, <https://doi.org/10.3390/ijms20184628>.
- Perrier-Groult E., Pérès E., Padeloup M., Gazzolo L., Duc Dodon M., Mallein-Gerin F. Evaluation of the biocompatibility and stability of allogeneic tissue-engineered cartilage in humanized mice. *PLoS One* 2019; 14(5): e0217183, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217183>.
- Benayahu D., Pomeranec L., Shemesh S., Heller S., Rosenthal Y., Rath-Wolfson L., Benayahu Y. Biocompatibility of a marine collagen-based scaffold *in vitro* and *in vivo*. *Mar Drugs* 2020; 18(8): 420, <https://doi.org/10.3390/md18080420>.
- Campos F., Bonhome-Espinosa A.B., Chato-Astrain J., Sánchez-Porras D., García-García Ó.D., Carmona R., López-López M.T., Alaminos M., Carriel V., Rodríguez I.A. Evaluation of fibrin-agarose tissue-like hydrogels biocompatibility for tissue engineering applications. *Front Bioeng Biotechnol* 2020; 8: 596, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00596>.
- Levett P.A., Melchels F.P., Schrobback K., Huttmacher D.W., Malda J., Klein T.J. Chondrocyte redifferentiation and construct mechanical property development in single-component photocrosslinkable hydrogels. *J Biomed Mater Res A* 2014; 102(8): 2544–2553, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34924>.
- Thitiset T., Damrongsakkul S., Bunaprasert T., Leeanansaksiri W., Honsawek S. Development of collagen/demineralized bone powder scaffolds and periosteum-derived cells for bone tissue engineering application. *Int J Mol Sci* 2013; 14(1): 2056–2071, <https://doi.org/10.3390/ijms14012056>.
- Chang C.H., Chen C.C., Liao C.H., Lin F.H., Hsu Y.M., Fang H.W. Human acellular cartilage matrix powders as a biological scaffold for cartilage tissue engineering with synovium-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A* 2014; 102(7): 2248–2257, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34897>.

18. Lee H.J., Kim Y.B., Ahn S.H., Lee J.S., Jang C.H., Yoon H., Chun W., Kim G.H. A new approach for fabricating collagen/ECM-based bioinks using preosteoblasts and human adipose stem cells. *Adv Healthc Mater* 2015; 4(9): 1359–1368, <https://doi.org/10.1002/adhm.201500193>.
19. Yang X., Lu Z., Wu H., Li W., Zheng L., Zhao J. Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2018; 83: 195–201, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.09.002>.
20. Beketov E.E., Isaeva E.V., Yakovleva N.D., Demyashkin G.A., Arguchinskaya N.V., Kisel A.A., Lagoda T.S., Malakhov E.P., Kharlov V.I., Osidak E.O., Domogatsky S.P., Ivanov S.A., Shegay P.V., Kaprin A.D. Bioprinting of cartilage with bioink based on high-concentration collagen and chondrocytes. *Int J Mol Sci* 2021 22(21): 11351, <https://doi.org/10.3390/ijms222111351>.
21. Isaeva E.V., Beketov E.E., Demyashkin G.A., Yakovleva N.D., Arguchinskaya N.V., Kisel A.A., Lagoda T.S., Malakhov E.P., Smirnova A.N., Petriev V.M., Eremin P.S., Osidak E.O., Domogatsky S.P., Ivanov S.A., Shegay P.V., Kaprin A.D. Cartilage formation in vivo using high concentration collagen-based bioink with MSC and decellularized ECM granules. *Int J Mol Sci* 2022; 23(5): 2703, <https://doi.org/10.3390/ijms23052703>.
22. Grogan S.P., Chung P.H., Soman P., Chen P., Lotz M.K., Chen S., D'Lima D.D. Digital micromirror device projection printing system for meniscus tissue engineering. *Acta Biomater* 2013; 9(7): 7218–7226, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.03.020>.
23. Schuurman W., Levett P.A., Pot M.W., van Weeren P.R., Dhert W.J.A., Hutmacher D.W., Melchels F.P., Klein T.J., Malda J. Gelatin-methacrylamide hydrogels as potential biomaterials for fabrication of tissue-engineered cartilage constructs. *Macromol Biosci* 2013; 13(5): 551–561, <https://doi.org/10.1002/mabi.201200471>.
24. Rothrauff B.B., Shimomura K., Gottardi R., Alexander P.G., Tuan R.S. Anatomical region-dependent enhancement of 3-dimensional chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by soluble meniscus extracellular matrix. *Acta Biomater* 2017; 49: 140–151, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.046>.
25. Levato R., Webb W.R., Otto I.A., Mensinga A., Zhang Y., van Rijen M., van Weeren R., Khan I.M., Malda J. The bio in the ink: cartilage regeneration with bioprintable hydrogels and articular cartilage-derived progenitor cells. *Acta Biomater* 2017; 61: 41–53, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.08.005>.
26. Narayanan N., Calve S. Extracellular matrix at the muscle-tendon interface: functional roles, techniques to explore and implications for regenerative medicine. *Connect Tissue Res* 2021; 62(1): 53–71, <https://doi.org/10.1080/03008207.2020.1814263>.
27. Neff L.S., Bradshaw A.D. Cross your heart? Collagen cross-links in cardiac health and disease. *Cell Signal* 2021; 79: 109889, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109889>.
28. Ruiz Martínez M.A., Peralta Galisteo S., Castán H., Morales Hernández M.E. Role of proteoglycans on skin ageing: a review. *Int J Cosmet Sci* 2020; 42(6): 529–535, <https://doi.org/10.1111/ics.12660>.
29. Tiplea M.G., Lemnaru G.M., Truşcă R.D., Holban A., Kaya M.G.A., Dragu L.D., Ficaï D., Ficaï A., Bleotu C. Antimicrobial films based on chitosan, collagen, and ZnO for skin tissue regeneration. *Biointerface Res Appl Chem* 2021; 11(4): 11985–11995, <https://doi.org/10.33263/briac114.1198511995>.
30. Krane S.M. The importance of proline residues in the structure, stability and susceptibility to proteolytic degradation of collagens. *Amino Acids* 2008; 35(4): 703–710, <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0073-2>.
31. Bliidi O.E., Omari N.E., Balahbib A., Ghchime R., Menyiy N.E., Ibrahim A., Kaddour K.B., Bouyahya A., Chokairi O., Barkiyou M. Extraction methods, characterization and biomedical applications of collagen: a review. *Biointerface Res Appl Chem* 2021; 11(5): 13587–13613, <https://doi.org/10.33263/briac115.1358713613>.
32. Bellis S.L. Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. *Biomaterials* 2011; 32(18): 4205–4210, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.02.029>.
33. Marques C.F., Diogo G.S., Pina S., Oliveira J.M., Silva T.H., Reis R.L. Collagen-based bioinks for hard tissue engineering applications: a comprehensive review. *J Mater Sci Mater Med* 2019; 30(3): 32, <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6234-x>.
34. Kulakov A., Kogan E., Brailovskaya T., Vedyayeva A., Zharkov N., Krasilnikova O., Krashennikov M., Baranovskii D., Rasulov T., Klubukov I. Mesenchymal stromal cells enhance vascularization and epithelialization within 7 days after gingival augmentation with collagen matrices in rabbits. *Dent J (Basel)* 2021; 9(9): 101, <https://doi.org/10.3390/dj9090101>.
35. Young S., Wong M., Tabata Y., Mikos A.G. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *J Control Release* 2005; 109(1–3): 256–274, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.09.023>.
36. Gorgieva S., Kokol V. Collagen- vs. gelatine-based biomaterials and their biocompatibility: review and perspectives. In: *Biomaterials applications for nanomedicine*. Pignatello R. (editor). London: InTechOpen; 2011; p. 17–52, <https://doi.org/10.5772/24118>.
37. Van den Steen P.E., Dubois B., Nelissen I., Rudd P.M., Dwek R.A., Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2002; 37(6): 375–536, <https://doi.org/10.1080/10409230290771546>.
38. Boere K.W., Visser J., Seyednejad H., Rahimian S., Gawlitta D., van Steenbergen M.J., Dhert W.J., Hennink W.E., Vermonden T., Malda J. Covalent attachment of a three-dimensionally printed thermoplast to a gelatin hydrogel for mechanically enhanced cartilage constructs. *Acta Biomater* 2014; 10(6): 2602–2611, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.041>.
39. Levato R., Visser J., Planell J.A., Engel E., Malda J., Mateos-Timoneda M.A. Biofabrication of tissue constructs by 3D bioprinting of cell-laden microcarriers. *Biofabrication* 2014; 6(3): 035020, <https://doi.org/10.1088/1758-5082/6/3/035020>.
40. Yue K., Trujillo-de Santiago G., Alvarez M.M., Tamayol A., Annabi N., Khademhosseini A. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials* 2015; 73: 254–271, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.08.045>.
41. Osidak E.O., Karalkin P.A., Osidak M.S., Parfenov V.A., Sivogriov D.E., Pereira F.D.A.S., Gryadunova A.A., Koudan E.V., Khesuani Y.D., Kasyanov V.A., Belousov S.I., Krashennikov S.V., Grigoriev T.E., Chvalun S.N., Bulanova E.A., Mironov V.A., Domogatsky S.P. Viscoll collagen solution as a novel bioink for direct 3D bioprinting. *J Mater Sci*

Mater Med 2019; 30(3): 31, <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6233-y>.

42. Levorson E.J., Hu O., Mountziaris P.M., Kasper F.K., Mikos A.G. Cell-derived polymer/extracellular matrix composite scaffolds for cartilage regeneration, part 2: construct devitalization and determination of chondroinductive capacity. *Tissue Eng Part C Methods* 2014; 20(4): 358–372, <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2013.0288>.

43. Jiang X., Zhong Y., Zheng L., Zhao J. Nano-hydroxyapatite/collagen film as a favorable substrate to maintain the phenotype and promote the growth of chondrocytes cultured in vitro. *Int J Mol Med* 2018; 41(4): 2150–2158, <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3431>.

44. Isaeva E.V., Beketov E.E., Yuzhakov V.V., Arguchinskaya N.V., Kisel A.A., Malakhov E.P., Lagoda T.S., Yakovleva N.D., Shegai P.V., Ivanov S.A., Kaprin A.D. The use of collagen with high concentration in cartilage tissue engineering by means of 3D-bioprinting. *Cell Tissue Biol* 2021; 15(5): 493–502, <https://doi.org/10.1134/s1990519x21050059>.

45. Bialik-Wąs K., Pluta K., Malina D., Barczewski M., Malarz K., Mrozek-Wilczkiewicz A. Advanced SA/PVA-based hydrogel matrices with prolonged release of aloe vera as promising wound dressings. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2021; 120: 111667, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111667>.

46. Mok C.F., Ching Y.C., Muhamad F., Abu Osman N.A., Hai N.D., Che Hassan C.R. Adsorption of dyes using poly (vinyl alcohol) (PVA) and PVA-based polymer composite adsorbents: a review. *J Polym Environ* 2020; 28: 775–793, <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01656-4>.

47. Барановский Д.С., Люндуп А.В., Балясин М.В., Клубуков И.Д., Красильникова О.А., Крашенинников М.Е., Паршин В.Д. Интерлейкин IL-1 β стимулирует ревитализацию хрящевого матрикса назальными хондроцитами человека in vitro. *Вестник трансплантологии и искусственных органов* 2019; 21(4): 88–95, <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2019-4-88-95>.

Baranovsky D.S., Lyundup A.V., Balyasin M.V., Klabukov I.D., Krasilnikova O.A., Krashennnikov M.E., Parshin V.D. Interleukin IL-1 β stimulates revitalization of cartilage matrix in vitro with human nasal chondrocytes. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov* 2019; 21(4): 88–95, <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2019-4-88-95>.

48. Балясин М.В., Барановский Д.С., Демченко А.Г.,

Файзуллин А.Л., Красильникова О.А., Клубуков И.Д., Крашенинников М.Е., Люндуп А.В., Паршин В.Д. Экспериментальная ортотопическая имплантация тканеинженерной конструкции трахеи, созданной на основе заселенного мезенхимальными и эпителиальными клетками девитализированного матрикса. *Вестник трансплантологии и искусственных органов* 2019; 21(4): 96–107, <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2019-4-96-107>.

Balyasin M.V., Baranovsky D.S., Demchenko A.G., Fayzullin A.L., Krasilnikova O.A., Klabukov I.D., Krashennnikov M.E., Lyundup A.V., Parshin V.D. Experimental orthotopic implantation of tissue-engineered tracheal graft created based on devitalized scaffold seeded with mesenchymal and epithelial cells. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov* 2019; 21(4): 96–107, <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2019-4-96-107>.

49. Rigogliuso S., Salamone M., Barbarino E., Barbarino M., Nicosia A., Ghersi G. Production of injectable marine collagen-based hydrogel for the maintenance of differentiated chondrocytes in tissue engineering applications. *Int J Mol Sci* 2020; 21(16): 5798, <https://doi.org/10.3390/ijms21165798>.

50. Okubo R., Asawa Y., Watanabe M., Nagata S., Nio M., Takato T., Hikita A., Hoshi K. Proliferation medium in three-dimensional culture of auricular chondrocytes promotes effective cartilage regeneration in vivo. *Regen Ther* 2019; 11: 306–315, <https://doi.org/10.1016/j.reth.2019.10.002>.

51. Jin G.Z., Kim H.W. Efficacy of collagen and alginate hydrogels for the prevention of rat chondrocyte dedifferentiation. *J Tissue Eng* 2018; 9: 2041731418802438, <https://doi.org/10.1177/2041731418802438>.

52. Schlegel W., Nürnberger S., Hombauer M., Albrecht C., Vécsei V., Marlovits S. Scaffold-dependent differentiation of human articular chondrocytes. *Int J Mol Med* 2008; 22(5): 691–699.

53. Pahoff S., Meinert C., Bas O., Nguyen L., Klein T.J., Huttmacher D.W. Effect of gelatin source and photoinitiator type on chondrocyte redifferentiation in gelatin methacryloyl-based tissue-engineered cartilage constructs. *J Mater Chem B* 2019; 7(10): 1761–1772, <https://doi.org/10.1039/c8tb02607f>.

54. Fedorovich N.E., Oudshoorn M.H., van Geemen D., Hennink W.E., Alblas J., Dhert W.J. The effect of photopolymerization on stem cells embedded in hydrogels. *Biomaterials* 2009; 30(3): 344–353, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.09.037>.