

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(Н И У « Б е л Г У »)

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

КАФЕДРА БИОЛОГИИ

**ИССЛЕДОВАНИЕ IN VITRO АДГЕЗИИ, ПРОЛИФЕРАЦИИ,
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СТРОМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК С
ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИНДИКАТОРА КАЛЬЦИЯ НА
КОМПОЗИТНОЙ МАТРИЦЕ ИЗ
БИОРАЗЛАГАЕМОГО СОПОЛИМЕРА**

Выпускная квалификационная работа
обучающегося по направлению подготовки 06.03.01 Биология
очной формы обучения, группы 07001418
Мовчан Евгении Александровны

Научный руководитель
к.б.н., доцент
Наеждин С.В.

БЕЛГОРОД 2018

Оглавление

Введение.....	3
Глава 1. Обзор литературы по теме исследования	5
1.1. Стромальные стволовые клетки и внеклеточный матрикс.....	5
1.2. Клеточная адгезия и взаимодействие между клетками и поверхностью..	12
1.3. Дифференцировка и пролиферация стволовых клеток.....	20
1.4. Сополимер поли-(лактид-ко-гликолид). Изготовление матрицы и капсул на основе поли-(лактид-ко-гликолида).....	29
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	35
Глава 3. Полученные результаты и их обсуждение.....	41
Выводы.....	46
Список использованных источников.....	47

Введение

В настоящее время тканевая инженерия пытается использовать научные знания и достижения в разработке новых продуктов и методов лечения в различных сферах медицины, для ускорения регенерации или замены тканей, например, таких как кости, хрящи, сухожилия и связки. Сегодня стандартный подход тканевой инженерии для решения проблем восстановления и регенерации тканей, предусматривает совместное использование композитных материалов в виде трехмерных матриц, факторов роста и мультипотентных стволовых клеток (МСК). Стволовые клетки – это неспециализированные клетки со способностями к дифференцировке (становиться клетками другого типа) и самообновлению (самовоспроизводиться без дифференцировки).

Сегодня перспективным материалом для изготовления композитных матриц принято считать биоразлагаемые полимеры. Полимеры, такие как полигликолевая кислота (PGA), полимолочная кислота (PLA), полиэтиленгликоль (PAG) и поли-(лактид-ко-гликолид) идеально подходят в качестве основного компонента композитных матриц, поскольку они биологически совместимы, биоразлагаемы и позволяют включать в свой состав различные биологически активные вещества и лекарственные препараты.

Традиционно для оценки взаимодействия и адгезии клеток к различным носителям используют методику, основанную на снятии прикрепившихся клеток к поверхности матриц и их подсчете. В процессе отработки данной методики мы столкнулись с рядом сложностей, не позволяющей применять её в нашем случае. Оказалось, что сложная топография поверхности и не прозрачность полимерного покрытия в сочетании с высокой адгезивной способностью культуры мезенхимальных стромальных стволовых клеток (ССК) не позволяет снять все клетки и перевести их в суспензию. Из-за этого в последующем, не представляется возможным оценить пролиферацию и дифференцировку клеток.

Целью настоящей работы явилось – исследование *in vitro* прилипания, деления и дифференцировки стромальных стволовых клеток при помощи

флуоресцентного индикатора кальция на композитной матрице из биоразлагаемого сополимера.

В соответствии с целью исследования были сформулированы следующие задачи:

- 1) провести оценку адгезии стромальных стволовых клеток на композитной матрице из биоразлагаемого сополимера;
- 2) осуществить оценку пролиферации стромальных стволовых клеток на композитной матрице из биоразлагаемого сополимера;
- 3) выполнить оценку дифференцировки стромальных стволовых клеток на композитной матрице из биоразлагаемого сополимера.

Выпускная квалификационная работа изложена на 54 страницах. Она состоит из оглавления, введения, трех основных глав и выводов. Список использованных источников насчитывает 85 наименований. В работе используются также 20 рисунков.

1. Обзор литературы по теме исследования

1.1. Стромальные стволовые клетки и внеклеточный матрикс

Определение стволовых клеток основано на таких их врождённых свойствах как самообновление и дифференциация [Weissman, 2000]. Они обитают в определённой среде, необходимой для их выживания. Такая среда называется микросредой или «нишей» стволовых клеток. Ниша динамична и имеет сложную структуру. Поэтому неудивительно, что клетки теряют контроль над самообновлением и дифференцируют самопроизвольно, если их разместить на пластиковой пластине для тканевых культур [Visse, Nagase, 2003].

При изучении ниши стволовых клеток основное внимание, как правило, уделялось межклеточному взаимодействию, т.к. оно считалось основным регулятором судьбы стволовых клеток. Сейчас внимание также уделяется молекулярному составу ниши [Scadden, 2006]. Вдобавок к этому, проявляется растущий интерес к идее о том, что ниша имеет «динамичную» природу, способную при определённых условиях изменять свойства [Adams, Scadden, 2008].

В случае повреждения тканей входящие в их состав стволовые клетки заменяют омертвевшие клетки, и тем самым образуют первую линию защиты. Когда пул эндогенных стволовых клеток истощается, циркулирующие стволовые клетки (ЦСК) его наполняют и принимают участие в восстановлении тканей. ЦСК, представляющие собой основную систему репарации, подвергаются бесчисленному делению для восстановления износившихся или повреждённых клеток в организме [Li et al., 2005]. Сигналы, исходящие от этих примитивных клеток, зависят от типа естественных тканей. Это помогает клеткам верно обозначить границы ниш с целью последующей репарации (рис. 1).

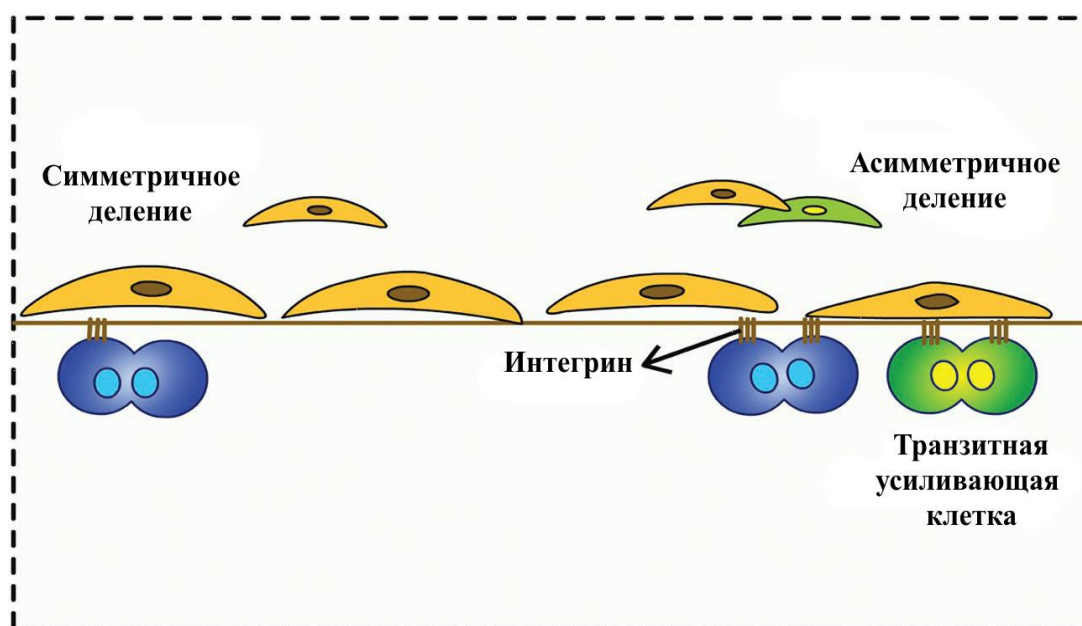


Рис. 1. Контроль ниши стволовых клеток различными факторами

Основными факторами являются ход митотического деления (симметричное/асимметричное) и ход митоза. На эффекторный механизм влияют как внешние, так и внутренние факторы. Эти факторы оказывают влияние и на поддержание связи с ВКМ при помощи интегрин.

Результаты исследований показали, что примитивные по происхождению клетки имеют выраженный дифференцировочный потенциал и могут принимать тип клеток всех трёх зародышевых пластов (энтодерма, мезодерма и эктодерма). Эти примитивные клетки можно обнаружить во всех тканях организма. Как правило, они делятся на взрослые, эмбриональные и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. При дальнейшей классификации их можно также разделить на тотипотентные, плюрипотентные и мультипотентные (рис. 2).

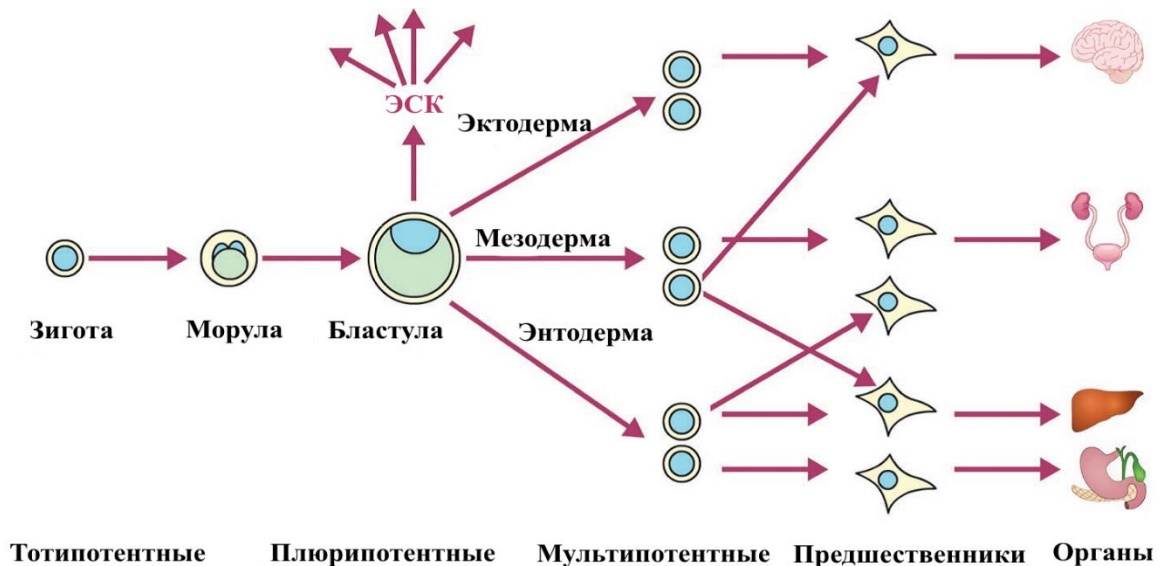


Рис. 2. Разные типы стволовых клеток

Они способны формировать три зародышевых пласта – эктодерму, мезодерму и энтодерму. Клетки-предшественники мезодермы способны формировать клетки по типу эктодермы и энтодермы.

Тотипотентные клетки способны дифференцироваться во все типы клеток. Плюрипотентные могут принимать клеток всех трёх зародышевых пластов. Мультипотентные клетки могут принимать тип многих клеток организма, таких как скелетные, мышечные, сердечные и клетки печени.

Все клеточные элементы крови классифицируются как гемопоэтические клетки. Мезенхимальные клетки-предшественники являются мультипотентными и способны дифференцироваться в хондроциты (хрящевые клетки), адипоциты (жировые клетки), остеобласты (клетки костной ткани) и стромальные клетки. Было выдвинуто предположение, что система стволовых клеток мозга неспособна к регенерации, а существующие нейроны – это окончательно дифференцированные клетки. С развитием технологий удалось выяснить, что некоторые участки мозга взрослого человека на самом деле способны к нейрогенезу. Это наблюдение основано на определении клеток-предшественников, ответственных как за эмбриональное, так и за постнатальное развитие нервной системы [Alvarez-Buylla, Lois, 1995; Gage et al., 1996; Weiss et al., 1996].

Стволовые клетки обладают повышенной способностью к самообновлению благодаря высокой активности теломеразы, в то время как терминально-дифференцированные клетки являются объектом старения. Более того, взрослые стволовые клетки часто используют состояние покоя как средство, позволяющее избежать нарушения ДНК при отсутствии активности [Watt, Hogan, 2000].

Пока взрослые стволовые клетки способны к самообновлению, у них имеется определённый потенциал дифференциации. Они принимают типы клеток только линейного порядка – как правило, для пополнения популяции клеток на участке возле ниши, контролирующей стволовые клетки [Recruitment of stem and progenitor..., 2002]. К примеру, мезенхимальные стволовые клетки развиваются из мезенхимы, включающей в себя клетки и жир. Учёным удалось установить, что среда обитания стволовых клеток, ниша, является важным фактором в регулировании их поведения. Ниша представляет собой трёхмерную микроструктуру, объединяющую многочисленные типы клеток при поддержке ВКМ, который состоит из белков, включая коллаген и фибронектин [Ehninger, Trumpp, 2011]. На клетки оказывает влияние не только микросреда ниши, но и секреты клеток других типов [Hartmann, 2006].

ВКМ также представляет собой среду обитания клеток. Это сеть белков и углеводов, связывающих клетки. Матрикс поддерживает и окружает клетки, при этом регулируя их деятельность, а также обеспечивает решётчатую структуру их передвижение. Существует 5 основных классов макромолекул, формирующих структуру клеток: коллаген, эластические волокна, протеогликаны, гиалуронан и адгезивные гликопротеины. Разные функции требуют разных пропорций данных элементов. ВКМ влияет на развитие клеток, их передвижение и дифференциацию [Tanentzapf et al., 2007; Hayashi et al., 2007]. Это резервуар внеклеточных сигнальных молекул, координирующий функции клеток путём передачи сигналов специальным адгезивным рецепторам клеток – белкам интегрин. Адгезивные рецепторы клеток передают механические стимулы от ВКМ цитоскелету. Избыточный ВКМ наблюдается,

когда примитивные клетки приступают к дифференциации и миграции по направлению к окончательно дифференцированным клеткам, при этом белки ВКМ начинают сокращаться в процессе дифференциации [Letourneau et al., 1994; Lathia et al., 2007].

Естественная среда обитания клеток включает 4 компонента ниши, определяющих конечный фенотип и функции стволовых клеток: (a) растворимые факторы; (b) прямой межклеточный контакт; (c) ВКМ и (d) силы.

Эластичность ВКМ влияет на дифференцировочный потенциал перехода мезенхимальных клеток в хондрогенные, адипогенные, миогенные и остеогенные. Мезенхимальные стволовые клетки, размещённые на поверхности шёлковой ткани, демонстрируют жёсткость, характерную для костей. Судя по результатам предыдущих исследований, система культур стволовых клеток вне организма реагирует на значительное воздействие сил в направлении дифференциации. Как у эмбриональных стволовых клеток, так и у стволовых клеток взрослого человека свойства белков ВКМ, включающие: (1) структурные; (2) биохимические и (3) механические сигналы, развиваются сообща. Стволовые клетки на удивление прекрасно реагируют на данные стимулы в естественных условиях, особенно это касается того, как эти сигналы влияют на силы, генерируемые клетками, или как сила влияет на представление данных свойств [Dalby et al., 2007; McBeath, 2004].

Стволовые клетки особо чувствительны к внутренним свойствам ВКМ. Механобиологические связи и клеточные сигнальные пути модулируются и изучаются для контроля над дифференциацией клеток в естественных и искусственно созданных условиях. Для того чтобы чётко разделить эти переменные и понять их вклад в предопределение судьбы клетки, а также контроль над дифференциацией, разрабатываемые подложки должны обладать саморегулирующейся жёсткостью, адгезивными связями и соответствующей пористостью/пропускающей способностью. Пока данные аспекты находятся на стадии разработки, но последние достижения в области разработки и синтеза подложек окажут существенную помощь в будущем.

Внутренняя гибкость и мультилинейный потенциал, обеспечиваемые стволовыми клетками, регулируют дифференциацию клеток, рост и экспрессию фенотипа. Обычно контроль над предопределением судьбы клетки, как в естественных, так и в искусственных условиях, относится к генетическим и молекулярным факторам (факторы роста, транскрипционные факторы). Однако результаты последних исследований показали, что разнотипный массив дополнительных факторов окружающей среды играет не последнюю роль в общем контроле над деятельностью стволовых клеток. В частности, поступает всё больше данных о значительном влиянии «полупроводниковой» среды, т.е. ВКМ, на предопределение судьбы клеток. Особенно стоит подчеркнуть взаимодействие между лигандами и поверхностными рецепторами клетки [Daley et al., 2008]. Клетки, прикреплённые к субстрату, демонстрировали сократительные способности приводили к напряжению при растяжении в цитоскелете [Ingber, 2004].

Взаимоотношения между данными способностями и механической жёсткостью, или эластичностью, ВКМ может оказывать значительное влияние на поведение клеток: миграцию [Guo et al., 2006; Pelham, Wang, 1997], апоптоз [Wang et al., 2000] и пролиферацию [Hadjiranayı et al., 2009]. Жёсткость ВКМ также способна оказывать влияние и на дифференциацию. Ранние свидетельства данного явления наблюдались при изучении эпителиальных клеток молочной железы у мышей, они демонстрировали повышенную степень дифференциации при росте на мягких коллагеновых гелевых субстратах в противоположность пластинам для культивирования тканей [Emerman et al., 1979].

Результаты последних исследований показали, что предопределение судьбы клетки регулируется механическими свойствами ВКМ. Более того, жёсткость субстрата определяет направление дифференциации мезенхимальных стволовых клеток: мягкие субстраты, имитирующие механические свойства ткани головного мозга, способствуют нейрогенному развитию; субстраты со средней жёсткостью, имитирующие мышцы – миогенному; а относи-

тельно жёсткие субстраты со свойствами, схожими с костями, способствуют остеогенному развитию [Engler et al., 2006]. Кроме того, жесткость субстрата оказывает схожее влияние и на регуляцию дифференциации нейрональных стволовых клеток.

Мезенхимальные стволовые клетки, неплотно размещённые в геле, прекращают движение клеточного цикла при взаимодействии с таким жёстким субстратом. Механические сигналы, связанные с эластичностью ВКМ могут являться определяющими факторами ниши костного мозга, что даёт возможность долгое время поддерживать мезенхимальные стволовые клетки в качестве резервуара. Умение воспроизводить данные свойства в искусственном ВКМ может привести к развитию новых способов контроля над судьбой стволовых клеток вне организма [Dellatore et al., 2008; Ghosh, Ingber, 2007].

Единственным недостатком является тот факт, что у разных тканей может быть одинаковая эластичность, что сделает невозможным определение дифференциации стволовых клеток лишь при помощи механических свойств. Этот факт подчёркивает потенциальные трудности, которые могут возникнуть при взаимодействии между внутренними и внешними свойствами стволовых клеток и их окружающей средой для определения их судьбы.

ВКМ также нужен не только для структурной поддержки. Он обеспечивает специфичные лиганды субстрата, необходимые для миграции, адгезии, быстрого размножения, а также функционирует совместно с химическими и физическими сигналами, регулирующие многие аспекты физиологии тела.

1.2. Клеточная адгезия и взаимодействие между клетками и поверхностью

Биохимическая регуляция судьбы стволовых клеток не ограничивается растворимыми лигандами. Структура матрикса может регулировать поведение клеток при помощи связывания дифференцированного интегрина с участками адгезии совместно со структурой ВКМ.

К примеру, эксплантаты бесклеточной ткани, имеющие чёткую структуру матрикса, могут взаимодействовать с особой разновидностью интегрина на поверхности мезенхимальных стволовых клеток, а также направлять часть популяции клеток при становлении кардиомиоцитами, без участия факторов роста [Ott et al., 2008]. Наличие или отсутствие особых доменов ВКМ может значительно повлиять не только на силу клеточной адгезии [Friedland et al., 2009], но также на процесс дифференциации [Martino et al., 2009; Rowlands et al., 2008] путём конформационных изменений, которые повышают передачу усилий, так как интегрин связывается с лигандами [Integrin activation and matrix..., 2005].

Адгезивные гликопротеины являются высокомолекулярными белками, которые содержатся на поверхности клеток, в матриксе соединительной ткани и межклеточной жидкости. Они играют важную роль в клеточной адгезии, злокачественной трансформации, функционировании ретикуло-эндотелиальной системы и эмбриональной дифференциации. Адгезивные гликопротеины делают возможной адгезию клеток с ВКМ.

Наиболее эффективный способ контроля над взаимодействием между клеткой и поверхностью включает в себя биосоединение с биоактивными элементами, такими как короткие пептиды или клеточные адгезивные белки (как правило, фибронектин), он является одним из самых распространённых адгезивных гликопротеинов.

Как результат, фибронектин обеспечивает связь между ВКМ и адгезивными клетками. Существует два основных типа фибронектина – тканевой и

фибронектин плазмы. Они кодируются одним и тем же геном. Тканевой фибронектин содержится в ВКМ соединительной ткани, а растворимый фибронектин плазмы в крови. Фибронектин плазмы содействует свёртыванию крови. Другой адгезивный гликопротеин ламинин – содержится в специализированном ВКМ, а также связан с клетками эпителия.

Контроль между клетками и поверхностью может происходить путём мягкой литографии. Она же включает в себя следующие составляющие: печать, формовку и тиснение. Эта техника имеет свои преимущества [Qin et al., 2010], поскольку в результате получается установленная и контролируемая химическая структура в диапазоне субстрата при небольших затратах [Kane et al., 1999].

Микроконтактная печать частично связана с биологической системой [Gates et al., 2005], где возможно создать адгезивные и неадгезивные участки в пределах субстрата с целью изучения взаимодействия между клеткой и поверхностью. Использование данной техники делает возможным пространственно-временной контроль, что позволяет создавать определённые узоры полимеров, к примеру, синтетических полимеров или природных белков, таких как фибронектин. Также при помощи этой техники можно изучать не только механизмы выживания клеток, но и их дифференциацию [Chen et al., 1997].

Белки интегрин присутствуют на поверхности многих клеток и сцепляются с ВКМ. Они представляют собой класс трансмембранных рецепторных белков, связывающих фибронектин и ламинин с ВКМ. Плюс ко всему, белки интегрин способны связывать белки клеточной поверхности. Внеклеточный домен интегрина рецептора связывается с адгезивными гликопротеинами ВКМ, при этом внутриклеточный домен связывается с цитоскелетом, гарантируя безопасное закрепление клетки в ВКМ. Более того, белки интегрин играют важную роль в сигнальной системе клеток внутриклеточные каскады сигнальной трансдукции. Таким образом, они способствуют адгезии с ВКМ с сопутствующими изменениями в росте и судьбе клеток.

Химический состав матрикса также может меняться в зависимости от изменений его адгезионных свойств либо путём сплайсинга в естественных условиях, либо путём использования рекомбинантных белков в искусственно созданных условиях при недостатке адгезивных молекул, к примеру, RGD.

Влияние адгезивных лигандов не ограничивается стволовыми клетками, т.к. при концентрации лигандов наблюдаются изменения и в других типах клеток [Williams et al., 2008]. ВКМ также способен связывать факторы роста, что даёт возможность регулировать дифференциацию стволовых клеток. Факторы роста могут связываться с ВКМ напрямую, изолироваться в матриксе, а далее освобождаться либо в процессе протеолитического расщепления, либо под воздействием сил, генерируемых клетками [Wells, Discher, 2008; Wipff et al., 2007].

Взаимодействие между клетками и поверхностью ВКМ играет важную роль в определении поведения клеток в тканях и биоматериалах.

В более общем смысле клеточная адгезия зависит от гидрофобности химической структуры поверхности. Гидрофобность поверхности контролирует и направляет адгезию сывороточных протеинов на поверхности и, следовательно, представление данных химических групп белков может влиять на поведение клеток. Простая функциональность поверхности (к примеру, включение спиртов, аминов и кислот) влияет на предопределение судьбы стволовых клеток [Curran et al., 2006]. Поскольку на сегодняшний день остаётся невозможным рациональное проектирование полимеров с химической функциональностью, контролирующей поведение стволовых клеток, крупные массивы полимеров, расположенные на стеклянных подложках, используются для определения полимеров с потенциалом к дифференциации [Tourniaire et al., 2006; Combinatorial development of biomaterials..., 2010].

При создании биоматериалов и тканей изучение взаимодействия поверхности клеток является важным для разработки новых методов, которые обеспечивают точный контроль при контакте между клетками и биоматериалами. Усиление адгезии тканевых клеток с имплантированными биоматериалами.

лами поспособствует тканевой адгезии/интеграции при взаимодействии между тканью и биоматериалом.

В то же время ослабление клеточной адгезии с имплантированными биоматериалами благотворно скажется на ограничении процессов, регулируемых клетками, такими как активация тромбоцитов и макрофагов на поверхности биоматериалов, что часто приводит к отторжению имплантата. Также тканевые имплантаты способны содействовать особому типу взаимодействия между клетками и биоматериалами, что способствует регенерации тканей.

Тканевые имплантаты в виде предварительных биологически гибридных тканей требуют соответствующего взаимодействия между трансплантированными клетками и подложкой из биоматериалов. Все это необходимо для дальнейшего синтеза ВКМ и его смещения наряду с другими процессами, которые способствуют формированию биологически гибридной ткани в искусственно созданных условиях перед имплантацией в естественных условиях (рис. 3).

Он играет ключевую роль в поведении клеток в составе тканей и при взаимодействии с биоматериалами.

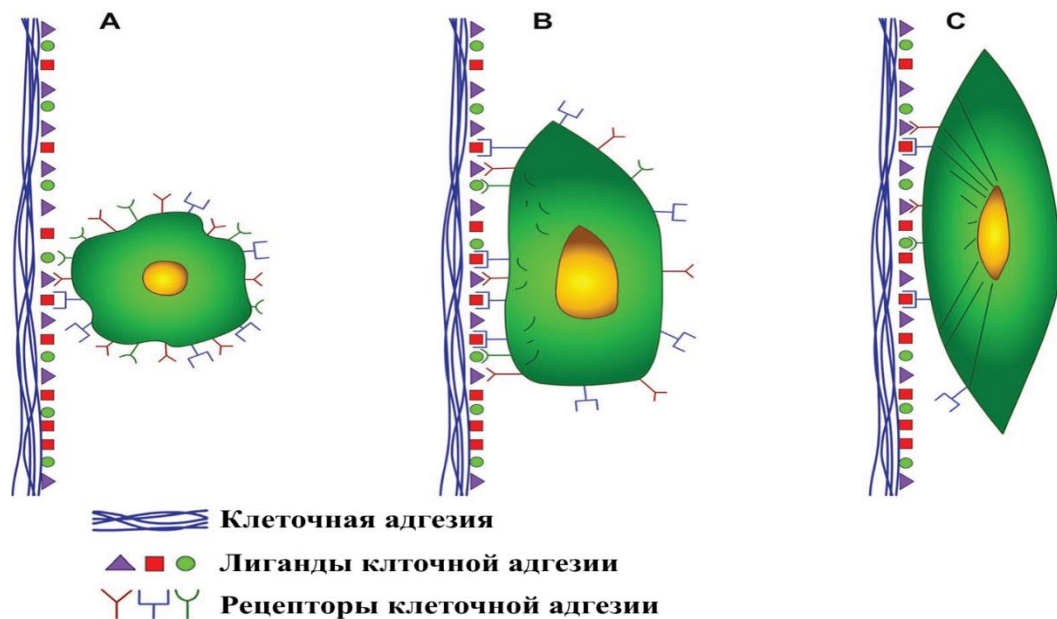


Рис. 3. Межклеточное взаимодействие с внеклеточной поверхностью

Такой тип взаимодействия оказывает влияние на многие аспекты поведения клеток, включая адгезию, миграцию, пролиферацию, дифференциацию и метаболизм.

Интегрины являются главным семейством рецепторов, способствующих клеточной адгезии. Они состоят из α - и β -элементов и формируют димер для взаимодействия с динамичным представлением белков ВКМ. Различные комбинации α - и β -элементов делают возможной специфику лигандов, соответствующую определённому мотиву. Например, лиганд RGD связан с интегрином $\alpha_5\beta_1$. Другой интегриновый мотив [Hersel et al., 2003], связанный с RGD (но не ограниченный им), включает комбинации α_v , $\alpha_8\beta_1$ и $\alpha_{IIb}\beta_3$ [Humphries et al., 2006].

Разнообразие мотивов ВКМ и возможность взаимодействия интегриновых структур оказывает прямое влияние на тип взаимодействия между клетками и ВКМ и, следовательно, на поведение клеток. Без сомнений, наиболее характерной особенностью ВКМ является последовательность аргинина, глицина и аспарагиновой кислоты (RGD) (иногда удлиняется за счёт серинового остатка RGD). Данная последовательность часто описывается как адгезивный пептид [Ruoslahti, Pierschbacher, 1987]. Она не ограничена фибронектином и взаимодействует с различными белками ВКМ, такими как коллаген, витронектин и остеопонтин. Интегрины, связанные с лигандами, стимулируют формирование контактов фокальной адгезии (ФА), в результате чего интегриновые рецепторы группируются и присоединяют другие белки, включая элементы цитоскелета, что позволяет установить соединение между клеткой и ВКМ.

Формирование контактов ФА (фокальная адгезия) определяется и ограничивается пространством между интегринными, которое определяется наличием лигандов ВКМ. В структурном плане контакты ФА играют роль внутренней подложки, а их размер зависит от числа актиновых волокон, способных к группировке (непосредственный результат связи с ВКМ) (рис. 4).

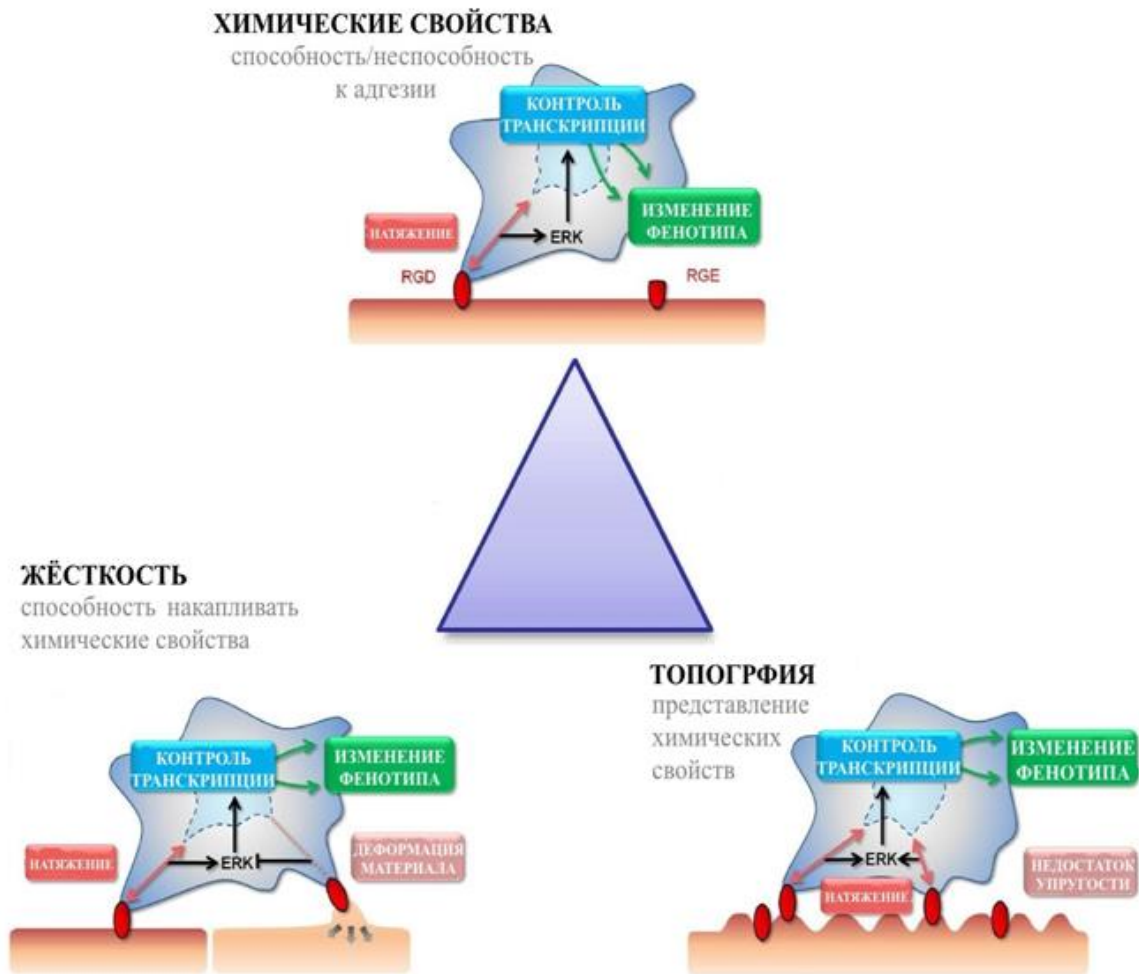


Рис. 4. «Треугольник» контакта материалов и поверхности

Данный треугольник демонстрирует разнообразие химических свойств, жёсткости и нанотопографии, с помощью которых осуществляется контроль над взаимодействием с фокальной адгезией МСК. Три схематических рисунка отображают адгезию МСК с химическими, жёсткими и топографически модифицированными поверхностями, а также её влияние на натяжение стволовых клеток и сигнальную систему. Клетки расширяют филоподии с целью «отыскать» адгезивные лиганды (обозначенные красным цветом). Связь клеток с лигандами при помощи фокальной адгезии создаёт натяжение и активирует сигнальную систему. Химическая функциональность позволяет создавать участки высокой (обозначены красным цветом) или низкой адгезии (обозначены зелёным цветом), от чего зависит реакция клеток (клетка изоб-

ражена на трёхмерной подложке). Жёсткость влияет на способность клеток к натяжению при фокальной адгезии (клетка изображена на плоской подложке). Топография представляет собой адгезию лигандов и клеток при благоприятных или неблагоприятных условиях, что влияет на последующее натяжение и сигнальную систему (клетка изображена на двухмерной подложке).

Прямая механотрансдукция – это процесс, в ходе которого клетки превращают адгерентные стимулы в клеточную реакцию (формирование контактов ФА и поддержание стресс-волокон) при помощи хроматина, который влияет на экспрессию генов и, следовательно, на поведение клеток [Tsimbouri et al., 2013].

Непрямая механотрансдукция описывает биохимические каскады, являющиеся результатом клеточной адгезии путём активация киназы фокальной адгезии (ФАК) и митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК), которые определяются G-белками, такими как Ras, Cdc42 и Rho.

Rho принадлежит к суперсемейству Ras, и отвечает за регулирование ФА и стресс-волокон. Другими G-белками, принимающими участие в регулировании строения цитоскелета и распространении, является Ras, который контролирует ламелллиподию, и Cdc42, контролирующей филоподию [Burridge, Chrzanowska-Wodnicka, 1996].

Непрямая механотрансдукция также способна влиять на предопределение судьбы клеток. Внеклеточный сигнальный путь ERK/МАРК, возможно, является ключевым модулятором остеогенных и адипогенных фенотипов. Остеогенная топография влияет на экспрессию ERK как на геномном, так и на протеомном [Xiao et al., 2002] уровнях мезенхимальных стволовых клеток. Сигнальный путь ERK контролирует нуклеарный фактор транскрипции. Одним из таких транскрипционных факторов, связанных с ERK, является RUNX2 [Prusty et al., 2002], основной остеогенный ген, являющийся неотъемлемой частью остеобластической дифференциации (рис. 5). Сигнальный путь ERK также связан с PPAR γ , играющим важную роль в адипогенезе

[Yang et al., 2014], stat1 и 3, принимающие участие в индукции/редукции остеогенеза [Petersenet al., 2008].

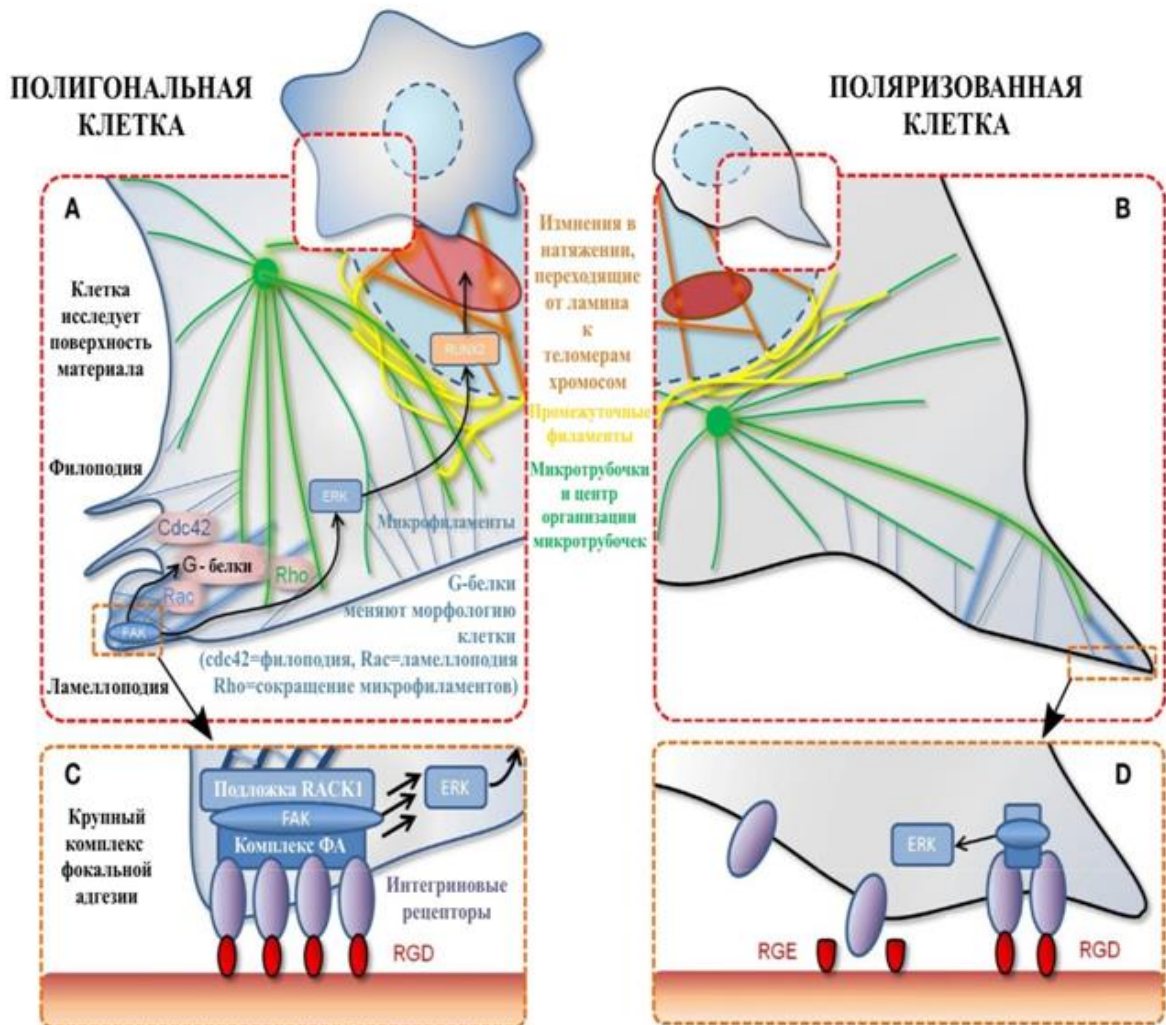


Рис. 5. Схема адгезии мезенхимальных стволовых клеток

Связь с поверхностью материала при помощи ламеллоподии стимулирует сигнальный каскад. Результатом этого является экспрессия транскрипционного фактора (RUNX2), стимулирующего дифференциацию при помощи других G-белков и эффекторов. Полигональные клетки сцепляются с материалом в различных позициях, стимулируя при этом распространение клеток и ослабляя моторику (см. рис. 5 A). Поляризованные клетки проводят адгезию через одну точку при помощи механизмов, описанных в (A) (см. рис. 5 B). Адгезия, описанная в (A) в увеличенном масштабе. При этом благоприятный

мотив адгезии (RGD) обнаруживается в высокой плотности (см. рис. 5 С). Адгезия, описанная в (В) в увеличенном масштабе. При этом мотив адгезии обнаружен в изоляции. Это также демонстрирует отсутствие адгезионных способностей у тесно связанного RGE (аспарагиновая кислота заменяется на глутаминовую кислоту) пептида (см. рис. 5 D).

Для того чтобы клетки могли сцепляться с синтетической поверхностью, материал должен повторять мотив ВКМ либо поглощать белки ВКМ для поддержания соединения клеток и, следовательно, их выживания и последующего функционирования.

1.3. Дифференцировка и пролиферация стволовых клеток

Неспециализированные стволовые клетки, стимулирующие развитие специализированных клеток, подвергаются процессу под названием дифференциация. Дифференциация проходит в несколько этапов. Данный процесс контролируется как внутренними, так и внешними факторами. Внутренние сигналы исходят от собственно клеточных генов, а внешние обеспечиваются другими клетками, во время их физического контакта с соседними клетками, а также определёнными молекулами, составляющими нишу стволовых клеток [Knoblich, 2008]. Ниша представляет собой трёхмерную микроструктуру, объединяющую многочисленные типы клеток при поддержке ВКМ, который состоит из белков, включая коллаген и фибронектин.

На клетки оказывает влияние не только микросреда ниши, но и секреты клеток других типов. Ниша динамична и имеет сложную структуру [Lutolf, Blau, 2009]. Поэтому неудивительно, что клетки теряют контроль над самообновлением и дифференцируют самопроизвольно, если их разместить на пластиковой пластине для тканевых культур.

Сложные взаимодействия внутренних и внешних сигналов во время дифференциации приводят к тому, что в структуре природной ДНК клеток происходят изменения, связанные с принятием нового фенотипа. Такой ме-

ханизм называется эпигенетическим механизмом изменений. Он ограничивает экспрессию клеточной ДНК, которая передаётся через деление клеток потомству.

Структурные белки «ниши», включая компоненты цитоскелета ВКМ, способствуют неравному разделению определителей судьбы клеток [Broadus, Doe, 1997]. Транскрипционные факторы, составляющие нишу стволовых клеток, контролируют судьбу дочерних клеток, образованных при делении стволовых клеток.

В процессе дифференциации стволовые клетки утрачивают пролиферативный потенциал, поскольку приобретают дифференцированные признаки. Для объяснения дифференцировочного потенциала стволовых клеток приводятся две масштабные модели: иерархическая и континуальная [Chomarat et al., 2003].

Согласно иерархической модели, стволовые клетки генерируют дифференцированные клетки путём однонаправленного перехода судьбы клетки от стволовой до клетки предшественника. Самые примитивные клетки обладают высоким пролиферативным потенциалом, но ограниченными способностями к дифференциации, в то время как у клеток-предшественников всё в точности наоборот. На каждом этапе перехода от стволовой клетки к клетке-предшественнице пролиферативный потенциал слабеет, а способность дифференцировать, наоборот, увеличивается. Согласно данной модели, стволовые клетки находятся в состоянии покоя и остаются в фазе клеточного цикла G0 до перехода к фазе G1 – произвольно или под влиянием факторов окружающей среды, таких как цитокины, адгезивные молекулы или межклеточные контакты в клеточной нише. Получив стимул к пролиферации, стволовые клетки могут либо становиться клетками-предшественниками, либо возвращаться в состояние покоя до появления нового стимула. Однако сформированные клетки-предшественники уже не могут вновь стать стволовыми клетками [Koeffler et al., 1981] (рис. 6).

Согласно континуальной модели, стволовые клетки постоянно меняют свой фенотип и переходят из одного состояния в другое. Они также способны вернуться в исходное состояние, т.е. к своему исходному фенотипу. Этот процесс называется дедифференциация. Предполагается, что такое изменение состояния происходит из-за реконструкции хроматина, связанного с изменениями в клеточном цикле. По этой причине меняется поверхностный фенотип клетки – таким образом, клетка реагирует на стимулы окружающей среды. Неподвижные стволовые клетки могут вступить в фазу G1, а далее либо перейти к дифференцированию, либо вернуться в состояние покоя.

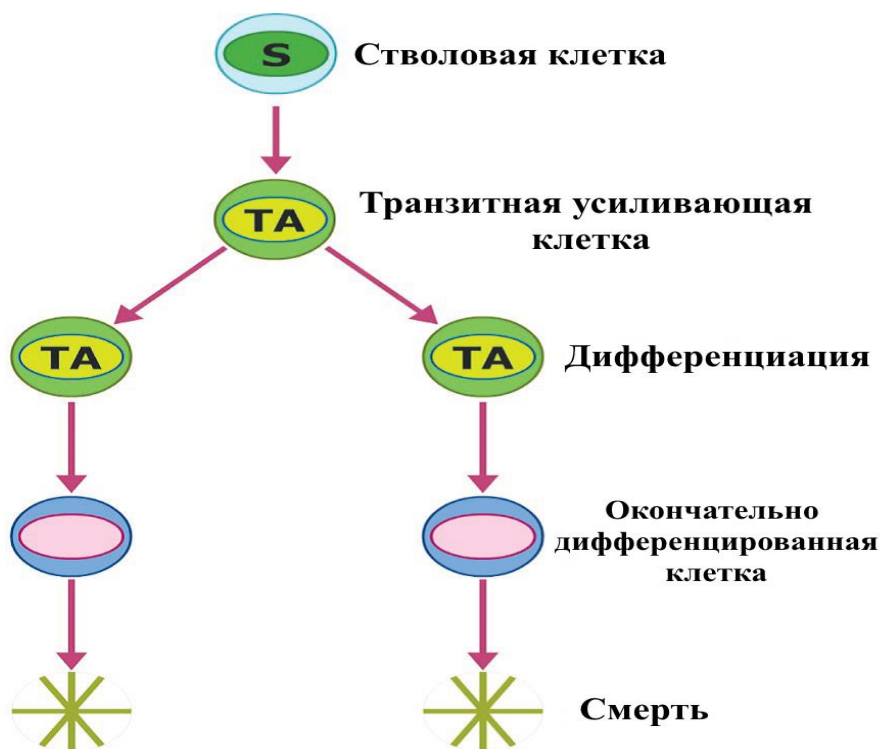


Рис. 6. Иерархическая модель деления клеток

Стволовые клетки могут делиться ассиметрично для поддержки своего количества, в тоже время создавая транзитные усиливающие клетки (ТА). Такие ТА-клетки достигают окончательной дифференциации (TD) и запрограммированы на смерть в определённый период времени.

Клетки, которые уже переходят в состояние клеток-предшественников, всё ещё могут вернуться в состояние стволовых клеток, и таким образом,

стволовые клетки получают возможность генерировать клетки разных типов, в зависимости от стимулов микросреды (рис.7). Стволовые клетки вынуждены дифференцировать при их извлечении их из фибропластов мышиноного эмбриона, а также получившие стимул в виде биоактивных сигналов. Это происходит либо напрямую, либо путём формирования эмбрионидных телец. Такие тельца представляют собой небольшие колонии стволовых клеток, которые развиваются в виде суспензий, формирующих трёхмерные сферические тельца. Эти тельца, в свою очередь, представляют модель дифференциации с самым широким спектром типов клеток, который может быть, достигнут в условиях *in vitro*.

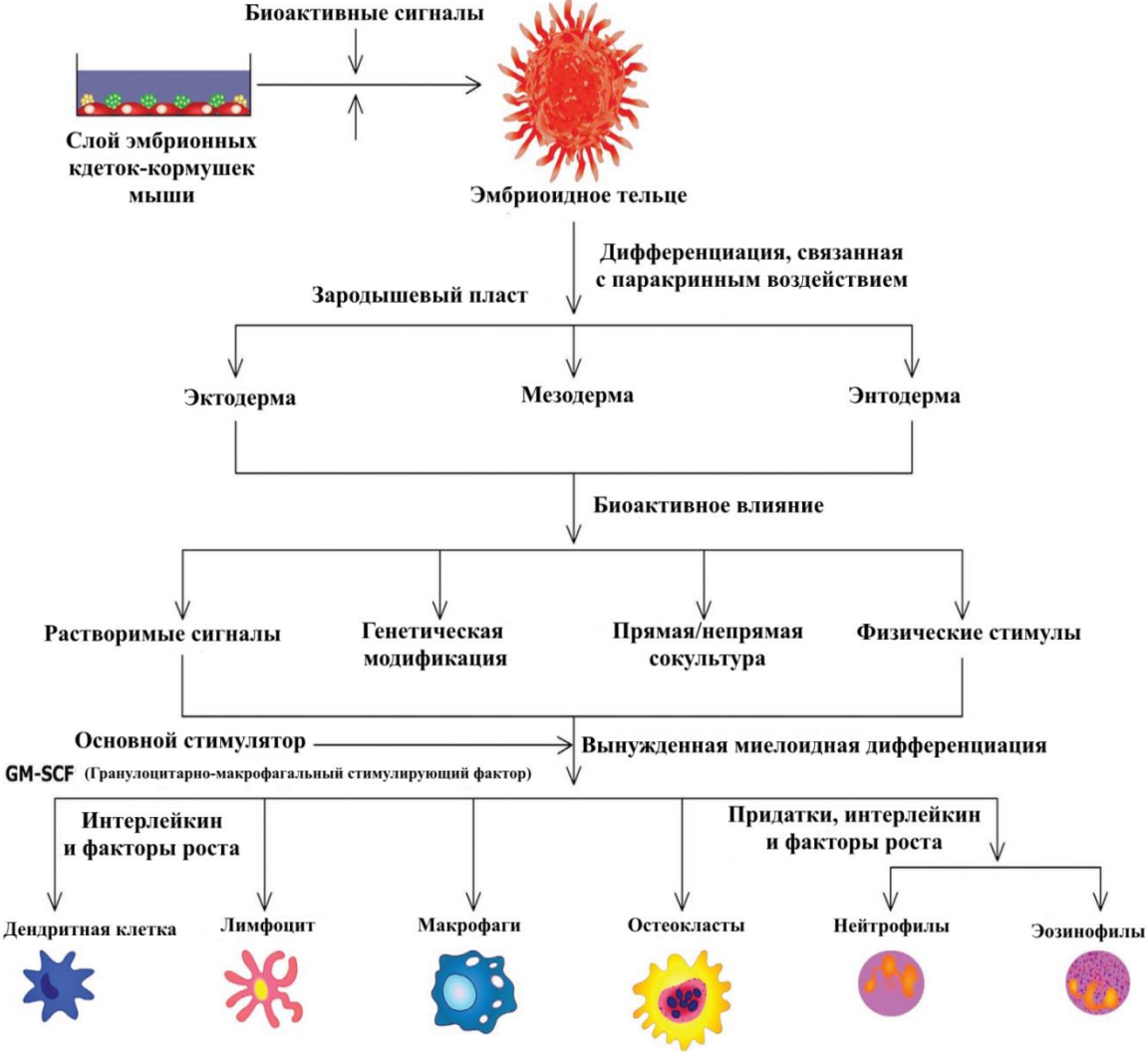


Рис. 7. Схематическое изображение вынужденной дифференциации клеток для создания миелоидного поколения клеток

Клетки, подвергающиеся дифференциации в эмбрионидных тельцах, осуществляют межклеточное взаимодействие и подвергаются паракринному воздействию трёх зародышевых пластов в развивающейся трёхмерной среде, которая имитирует временные и пространственные процессы, имеющие место в развивающемся эмбрионе. Хотя дифференциация возможна, большинство дифференцировочных систем зависит от формирования эмбрионидных телец [Catelas et al., 2006]. Когда клетки приступают к дифференциации, контроль и направление дифференциации принадлежит различным биоактивным манипуляциям. Они включают в себя:

- растворимые сигналы, такие как факторы роста, гормоны и кондиционированная клетками среда;
- генетические модификации, такие как повышенная экспрессия транскрипционных факторов, при помощи которых клетки приобретают необходимый фенотип;
- прямое или косвенное культивирование с другими, развивающимися или зрелыми поколениями соматических клеток;
- физические стимулы, такие как механическая сила, температура и оксигенация. Независимо от того, проходит дифференциация произвольно или направленно, в большинстве известных случаев итоговое поколение клеток остаётся гетерогенным.

ВКМ клетки способен самостоятельно регулировать дифференциацию мезенхимальных стволовых клеток, что имеет потенциал для дальнейшего применения при культивировании тканей. К примеру, ВКМ, лишённый остеобластов на покрытой титаном подложке после обесклетчивания, усилил маркеры остеогенеза, такие как щелочная фосфатаза и смещение кальция. Искусственные матриксы способствуют имитированию микросреды в естественных условиях и регуляции необходимой линии дифференциации стволовых клеток.

Поверхности, в состав которых входят $-\text{NH}_2$ и $-\text{SH}$, способствуют остеогенной линии дифференциации, в то время как поверхности с $-\text{COOH}$ – OH в составе способствуют хондрогенной линии дифференциации. Механические сигналы, такие как местные напряжения (растяжение, сжатие, сдвиг), геометрия, топография и межклеточные контакты оказывают непосредственное влияние на линию дифференциации мезенхимальных стволовых клеток [Estes et al., 2004]. В результате исследований также было выявлено, что на дифференциацию влияние оказывает и форма клетки за счёт механики цитоскелета, трансдуцируемой сигнальным путём RhoA.

Раннее развитие клеток характеризуется быстрой пролиферацией эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), которые затем дифференцируются для получения многих специализированных типов клеток, которые в свою очередь составляют ткани и органы многоклеточных животных. Когда клетки дифференцируются, их скорость пролиферации обычно снижается, и большинство клеток у взрослых животных задерживают свое развитие на стадии G_0 клеточного цикла. Несколько типов дифференцированных клеток никогда не делятся снова, но большинство клеток могут возобновить пролиферацию по мере необходимости, чтобы заменить клетки, которые были потеряны в результате травмы или гибели клеток. Кроме того, некоторые клетки непрерывно делятся на протяжении всей жизни, чтобы заменить клетки, которые имеют высокий уровень оборота у взрослых животных. Таким образом, клеточная пролиферация тщательно сбалансирована с гибелью клеток для поддержания постоянного количества клеток во взрослых тканях и органах.

Клетки взрослых животных могут быть сгруппированы в три общие категории в отношении пролиферации клеток. Несколько типов дифференцированных клеток, таких как клетки сердечной мышцы у людей, уже не способны к делению клеток. Эти клетки продуцируются во время эмбрионального развития, дифференцируются и затем сохраняются на протяжении всей жизни организма. Если они погибли из-за травмы (например, смерти сердеч-

ных мышечных клеток во время сердечного приступа), они никогда не могут быть заменены.

Напротив, большинство клеток взрослых животных входят в стадию G0 клеточного цикла, но возобновляют пролиферацию по мере необходимости, чтобы заменить клетки, которые были ранены или погибли. Клетки этого типа включают фибробласты кожи, клетки гладкой мускулатуры, эндотелиальные клетки, которые выстраивают кровеносные сосуды, и эпителиальные клетки большинства внутренних органов, такие как печень, поджелудочная железа, почка, легкие, простата и грудь. Одним из примеров контролируемой пролиферации этих клеток, является быстрая пролиферация фибробластов кожи для устранения повреждений, вызванных порезом или раной.

Другим ярким примером являются клетки печени, которые обычно делятся редко. Однако если большое количество клеток печени теряется (например, путем хирургического удаления части печени), оставшиеся клетки стимулируются для размножения, чтобы заменить недостающую ткань. Например, хирургическое удаление двух третей печени крысы сопровождается быстрой пролиферацией клеток, что приводит к регенерации всей печени в течение нескольких дней.

Хорошим примером непрерывной пролиферации стволовых клеток является дифференциация клеток крови. Существует несколько различных типов клеток крови со специализированными функциями: эритроциты (красные кровяные клетки) переносят O_2 и CO_2 ; гранулоциты и макрофаги являются фагоцитарными клетками; тромбоциты (которые являются фрагментами мегакариоцитов) функционируют при свертывании крови; и лимфоциты ответственны за иммунный ответ. Все эти клетки имеют ограниченную продолжительность жизни, начиная от менее чем одного дня до нескольких месяцев и непрерывно производятся путем деления общей стволовой клетки (плюрипотентной стволовой клетки) в костном мозге. Потомки плюрипотентной стволовой клетки становятся приверженцами определенных путей дифференциации. Эти клетки продолжают размножаться и проходят несколько стадий де-

ления по мере их дифференциации. Однако когда они становятся полностью дифференцированными, они прекращают распространение, поэтому поддержание дифференцированных популяций клеток крови зависит от постоянного пролиферации плюрипотентной стволовой клетки [Cooper, 2000].

Существует 3 особых условия для пролиферации и дифференциации мезенхимальных эмбриональных стволовых клеток: формирование эмбрионного тела, наличие клеток-кормушек и культур в матриксах. В настоящее время большой популярностью пользуется создание структур, подобных эмбрионам, в которых клетки формируют колонии, а большинство поколений клеток принимают фенотип самопроизвольно.

Основным ограничением является довольно неоднородная природа эмбрионных тел. Отслеживание поведения клеток и регуляция дифференциации невозможны без применения трудоёмкой сортировки клеток.

М. Нагаока с соавторами продемонстрировали мезенхимальные эмбриональные стволовые клетки, которые культивируются на поверхности, покрытой белком E-Cad-Fc. Они обладают уникальными морфологическими характеристиками, полноценными клеточными свойствами эмбриональных стволовых клеток, повышенной способностью к пролиферации и эффективностью трансфекции по сравнению с клетками, культивируемыми в обычных условиях. Комплексное формирование колоний с тесным межклеточным взаимодействием способно создать неоднородную среду в пределах колоний и способствовать ускоренной пролиферации, а также распределению растворимых факторов. М. Нагаока с соавторами также продемонстрировали, что эмбриональные стволовые клетки можно успешно культивировать на рекомбинантном ВКМ, способствуя при этом активной пролиферации. Такой метод демонстрирует, насколько искусственно созданный ВКМ подходит для дифференциации эмбриональных стволовых клеток, о чём можно судить по росту гепатоцитов. Одна-единственная культура клеток может послужить ключом к дальнейшему исследованию сигнальных путей и реакции клеток на факторы роста, цитокины и лекарственные препараты [Nagaoka, 2008]. Со-

здание эффективной системы культивирования эмбриональных стволовых клеток сделает возможным исследование многих физиологических механизмов, принимающих участие регуляции развития и поведения клеток *in vivo* или *in vitro* (рис. 8).

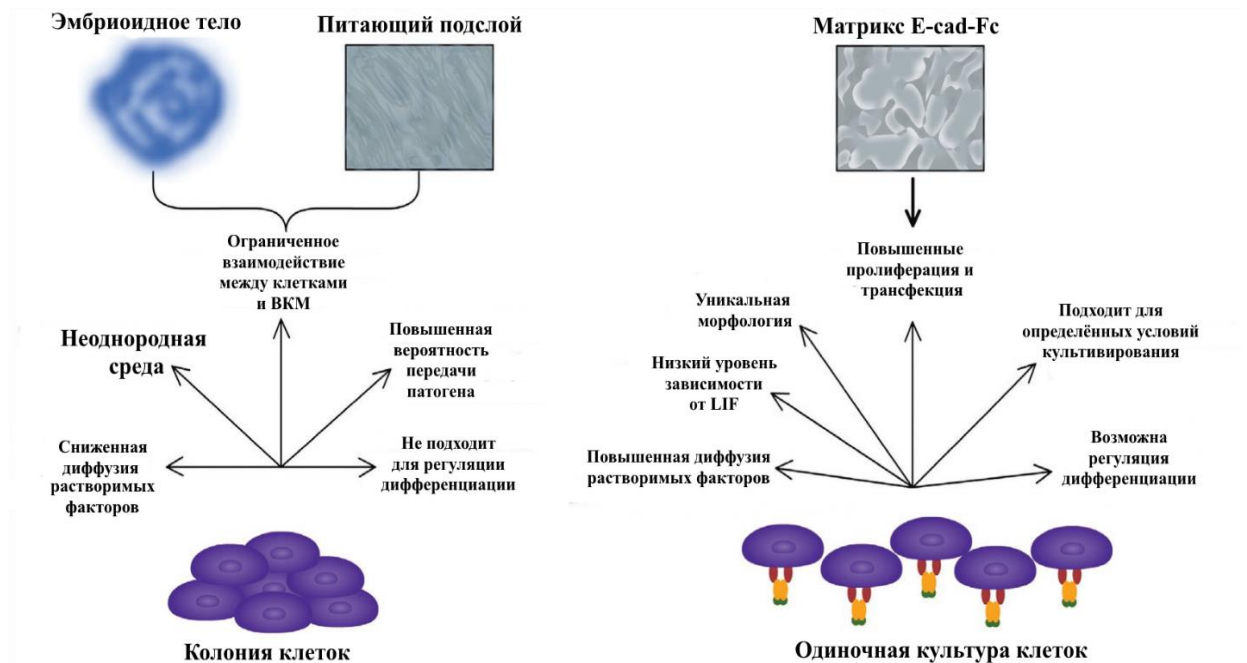


Рис. 8. Компактные и одиночные колонии клеточных культур

Как изображено на рисунке, компактные колонии клеток демонстрируют сниженную диффузию растворимых факторов, что не подходит для регуляции дифференциации и отличается ограниченным взаимодействием между клетками и ВКМ. Единичные культуры клеток, напротив, обладают явными преимуществами для регуляции условий культивирования, трансфекции и пролиферации, а также способствуют повышенной диффузии растворимых факторов. Их с лёгкостью можно применять при создании матриц [Embryonic undifferentiated cells show scattering..., 2008].

Некоторые преимущества использования ВКМ относительно определённых условий культивирования:

1) пролиферация клеток на определённых субстратах для создания однородных условий культивирования;

- 2) имитация процесса клеточной дифференциации;
- 3) производство определённого типа зрелых клеток;
- 4) удаление из культуры экзогенных компонентов.

Предпринимаются попытки регулировать пролиферацию и дифференциацию эмбриональных стволовых клеток при однородных условиях без формирования эмбриоидных тел

1.4. Сополимер поли-(лактид-ко-гликолид). Изготовление матрицы и капсул на основе поли-(лактид-ко-гликолида)

Биоразлагаемые полимеры обладают соответствующими характеристиками с точки зрения физико-химических и биологических свойств, пригодных для изготовления трехмерных матриц/скаффолдов для тканевой инженерии [Salgado, 2004].

Они могут быть классифицированы как натуральные или синтетические. Природные полимеры, такие как белки и полисахариды, обладают несколькими преимуществами, такими как биоразлагаемость и минимальная токсичность. Однако и синтетические полимеры обладают рядом преимуществ по сравнению с природными полимерами, включая высоко контролируемые и стабильные свойства деградации и превосходные воспроизводимые механические и физические свойства, такие как прочность на разрыв, модуль упругости и скорость разложения [Dhandayutharani et al., 2004].

Возможные риски, такие как токсичность, иммуногенность и благоприятствование инфекциям, снижаются при использовании чистых синтетических полимеров с мономерными единицами, в качестве составных частей, имеющими хорошо известную и простую структуру [Gunatillake et al., 2003].

Наиболее часто используемые биоразлагаемые синтетические полимеры для трехмерных (3D) матриц/скаффолдов в тканевой инженерии представляют собой насыщенные поли (α -гидроксиэфиры), включая поли-(молочную кислоту) (PLA) и поли-(гликолевую кислоту) (PGA), а также со-

полимеры поли-(лакто-ко-гликолида) (PLGA) [Mano et al., 2004; Lin et al., 2002].

Химические свойства этих полимеров позволяют им деградировать путем гидролизной деэтерификации. После деградации мономерные компоненты каждого полимера удаляются естественными путями. PGA превращается в метаболиты или устраняется другими механизмами, а PLA может быть разложен в цикле трикарбоновых кислот. Благодаря этим свойствам PLA и PGA используются в биомедицинских изделиях и устройствах, таких как, например биоразлагаемые швы [Jagur-Grodzinski, 1999].

Полимеры и сополимеры на основе молочной и гликолевой кислот являются уникальными материалами, и интерес к ним растет с каждым годом. Это связано с наличием у данных полимеров таких свойств, как биоресорбируемость и биосовместимость. Применение биосовместимых полимеров в медицине обусловлено тем, что при попадании в живые организмы они разлагаются на нетоксичные продукты, которые участвуют в метаболизме. Преимущество таких полимеров заключается в том, что они не вызывают воспалительных или аллергических процессов в организме, а также не требуют повторных операций, как при использовании других материалов. Кроме этого, они обладают достаточно широко регулируемыми сроками биоресорбируемости.

Биоразлагаемые полимеры используются при изготовлении хирургических нитей, пластин, зажимов, винтов, штифтов, а также пленок различного функционального назначения. Такие изделия находят широкое применение в самых различных отраслях медицины: хирургии, травматологии, косметологии, стоматологии и др. Ассортимент данных изделий расширяется с каждым годом. В последнее время большое значение приобретают работы в области микрокапсулирования лекарственных веществ. Микрокапсулы с лекарственным наполнением получают из сополимеров и полимеров, хорошо растворяющихся в различных органических растворителях [Алексеев и др., 2011].

Первичная PLGA матрица, обогащенная нано-гидроксиапатитом, была изготовлена для апробации методов оценки адгезии, пролиферации, направленной дифференцировки и созревания стромальных/мезенхимальных стволовых клеток [Ответная реакция живых систем при взаимодействии..., 2017].

PLGA – синтетический полимер, широко использующийся в тканевой инженерии для устранения костных дефектов в силу своей безвредности, биодegradации и хорошей биосовместимости. Однако его гидрофобность и отсутствие сигналов для распознавания клетками ограничивает его применение [Mouthuy et al., 2016; Zhang et al., 2016; Zhao et al., 2016].

Для решения этих проблем, применяют различные биоактивные минералы на основе фосфатов кальция в качестве наполнителей PLGA матрицы [Miao et al., 2008; Naaparanta et al., 2015].

Основываясь на биомиметической точке зрения, нано-гидроксиапатит был выбран идеальным наполнителем, благодаря своему сходству с минералом костной ткани [Najdanović et al., 2015; Schmid et al., 1997].

PLGA (1,0 г) растворяли в 10 мл $\text{CH}_3\text{—C(O)—CH}_3$, затем добавляли 0,2 г нано-гидроксиапатита, при перемешивании при 3000 об/мин. Полученную смесь постепенно выливали в ультрачистую воду при перемешивании миксером. После выпадения в осадок конгломератов PLGA с нано-гидроксиапатитом формировали пластины, которые высушивали при помощи вакуум эксикатора.

Капсулы из поли-(лактид-ко-гликолида) планируется получать, используя установку распылительной сушки Mini Spray Dryer B-290 с инертным контуром B-295 и осушителем воздуха B-296 (фирмы Buchi).

Сушка распылением применяется для превращения веществ из жидкого растворенного состояния, в высушенную порошкообразную форму, путем распыления жидкости в среду для горячей сушки. Это удобный одностадийный способ превращения различных жидких составов (например, водных и органических растворов, эмульсий и суспензий) в сухие порошки. Получен-

ные порошки имеют высокое качество и низкое содержание влаги, что сохраняет их стабильность при хранении [Anandharamakrishnan, 2015].

Процесс распылительной сушки состоит из трех основных этапов:

- распыление жидкости;
- сушка распыленных капелек в сушильном газе с образованием сухих частиц;
- разделение и сбор сухого вещества из сушильного газа.

Сопло распыляет подаваемую жидкость на капли. Уменьшение размера частиц приводит к значительному увеличению площади поверхности. В сушильной камере растворитель, который может быть водой, органическими растворителями или их смесями, быстро удаляется непрерывным потоком горячего сушильного газа (обычно воздуха или инертного газа). Высушенные твердые частицы отделяют из потока газа циклоном и собирают в емкости для сбора.

Инкапсулирование осуществляют путем эмульгирования основного вещества в растворе материала носителя, а затем распылением смеси в камеру горячей сушки. При помощи распылительной сушки в данной модификации планируется получать капсулы размером более 25 мкм до 200 мкм.

Важно отметить, что PLGA-сополимеры подходят для формирования капсул различного размера, так как обеспечивают гомогенную дисперсию биоактивных веществ в полимерной матрице [Nabraken et al., 2006].

Биодеградация микрочастиц PLGA может быть скорректирована от нескольких недель до нескольких месяцев путем варьирования соотношения поли-молочной кислоты к поли-гликолевой кислоте; это соотношение влияет на деградацию полимера и на скорость высвобождения включенных молекул биологически активных веществ (рис. 9).

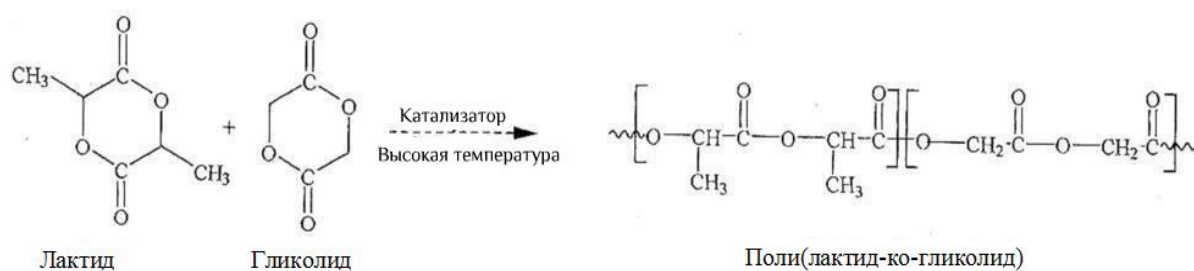


Рис. 9. Схема синтеза поли-(полилактид-ко-гликолида)

Микросферы PLGA могут быть изготовлены способом эмульсии типа «масло в воде»; также были предложены различные способы получения биомиметических инъеклируемых микросфер путем добавления НА (гидроксиапатитных) нано частиц. В недавних исследованиях отрицательно заряженные неорганические НА наночастицы были соединены с положительно заряженными микросферами PLGA, диспергированными в деионизированной воде, для создания когезионного коллоидного геля. Этот материал удерживался вместе электростатическими силами, которые могут быть разрушены сдвигом для облегчения экструзии, формования или инъекции. Микрофотографии высушенных коллоидных гелей, сделанные с помощью сканирующего электронного микроскопа, показали хорошо организованную трехмерную пористую структуру. Реологические тесты показали, что некоторые коллоидные гели могут восстанавливаться после сдвига [Wang et al., 2013].

Другой подход нашел S.W Kang с коллегами, которые изготовили PLGA-микросферы с НА-покрытием методом эмульсии «вода в масле в воде» с последующим погружением в смоделированную биологическую жидкость (SBF) в течение 5 дней при 37°C. Было установлено, что формирование новой костной ткани значительно ускорилось при использовании группы микросфер PLGA с апатитным покрытием по сравнению с группой микросфер PLGA без покрытия [Kang et al., 2008].

В другом исследовании композиты на основе микросфер PLGA-гидроксиапатита были загружены алендронатом (AL) (второе поколение бисфосфонатов – лекарства, предупреждающего остеопороз). Эти микросфе-

ры были изготовлены с использованием метода эмульсии типа «твердые частицы в масле в воде» или типа «вода в масле в воде».

Система PLGA / HA-AL показала тенденцию к устойчивому продолжительному равномерному высвобождению алендроната (AL) в течение 30-дневного периода, за исключением минимального всплеска скорости высвобождения в самом начале. Результаты показали, что система PLGA / HA-AL способна улучшить пролиферацию остеобластов и, кроме того, активизировать экспрессирование ALP (щелочной фосфатазы) [Shi et al., 2009].

Таким образом, перспективным направлением для устранения дефектов костных тканей является применение гибридных композитных конструкций на основе PLGA и гидроксиапатита. Как сообщалось, добавление HA усиливает остеокондуктивность и механические свойства матричных PLGA-каркасов при их использования в качестве несущих конструкций, а также как носителей биологически активных веществ. Кроме того сочетание обеих стратегий (добавление HA и функционализация матрицы) при изготовлении трехмерных PLGA-матриц/скаффолдов, создаст остеокондуктивный и остеоиндуктивный градиент, что позволит увеличить эффективность процессов репаративной регенерации костной ткани.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Исследование выполнялось с использованием стромальных стволовых клеток (ССК) крысы (линии Wistar) 3 пассажа выделенных из красного костного мозга [Шишацкая и др., 2013], которые хранились в банке клеток ОПУ «Клеточные и вспомогательные репродуктивные технологии» технопарка «Высокие технологии БелГУ» НИУ «БелГУ» (рис. 10).



Рис. 10. Криохранилище клеток

Суспензию ССК размораживали в термостате при температуре 37°C в течении 30 минут. Далее суспензию ССК в количестве 1 мл переливали в пробирки объемом 15 мл и приливали питательной среды DMEM/ F12 (фирмы ПанЭко, РФ). Затем проводили центрифугирование в течение 5 мин. при 1000 об. / мин. После центрифугирования полностью сливали питательную среду и приливали 5 мл свежей питательной среды DMEM/ F12 (фирмы ПанЭко, РФ) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), ресуспендировали. Полученную суспензию выливали во флакон 25 см² (фирмы SPL Lifesciences, Корея) и приливали 15 мл питательной среды DMEM/ F12 с 10% ЭТС. Флакон с ССК помещали в CO₂-инкубатор, клетки культивировали в

течении 7 дней при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ и 100% влажности. После получения 80% конfluence ССК снимали при помощи смеси трипсина (0,25%) и ЭДТА (0,02%) (рис. 11).

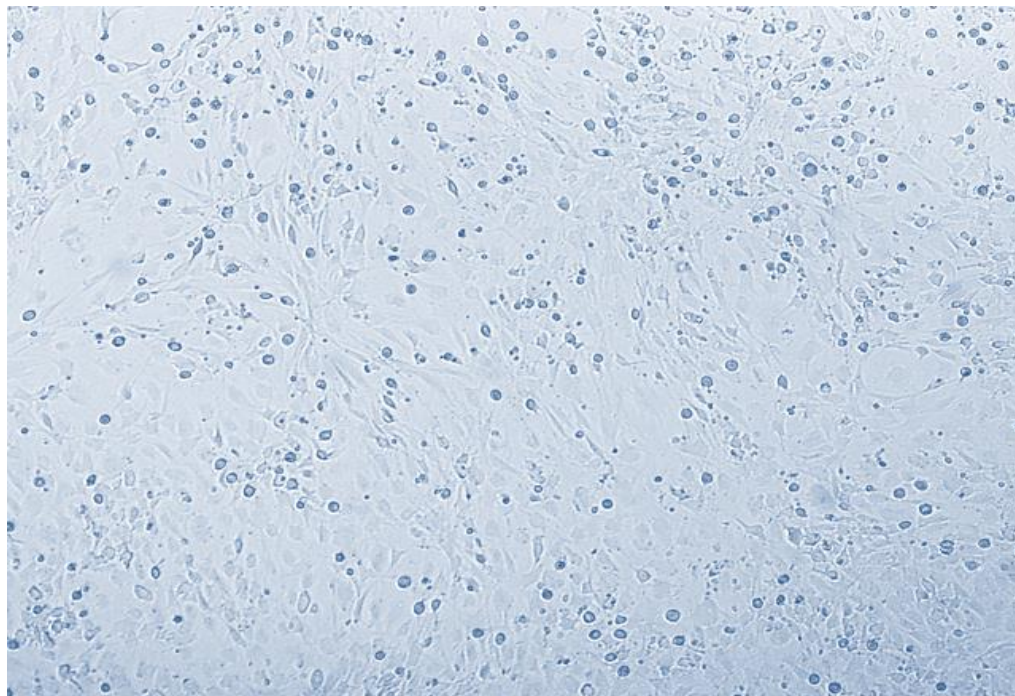


Рис. 11. Стромальные стволовые клетки в культуре, ув. 40х. Eclipse Ti- U, фирмы Nikon, Япония)

В культуральные пластиковые флаконы с площадью 25 см² (фирмы SPL Lifesciences, Корея), содержащие 10 мл питательной среды DMEM/ F12 с 10% ЭТС, добавляли суспензию ССК посевная концентрация 1×10^6 клеток/флакон. В исследовании использованы флаконы, у которых дно покрыто биоразлагаемым сополимером поли-(лактид-ко-гликолидом) полученным из НИ ТГУ (Томск) (рис. 12). Флаконы с ССК помещали в CO₂-инкубатор и культивировали при 37°С, 100 % влажности и 5% CO₂.

Для индукции дифференцировки ССК в остеобласты использовали среду DMEM/ F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, 100 нМ дексаметазона и 10 мМ β-глицерофосфата [Культуральные среды, 2018].

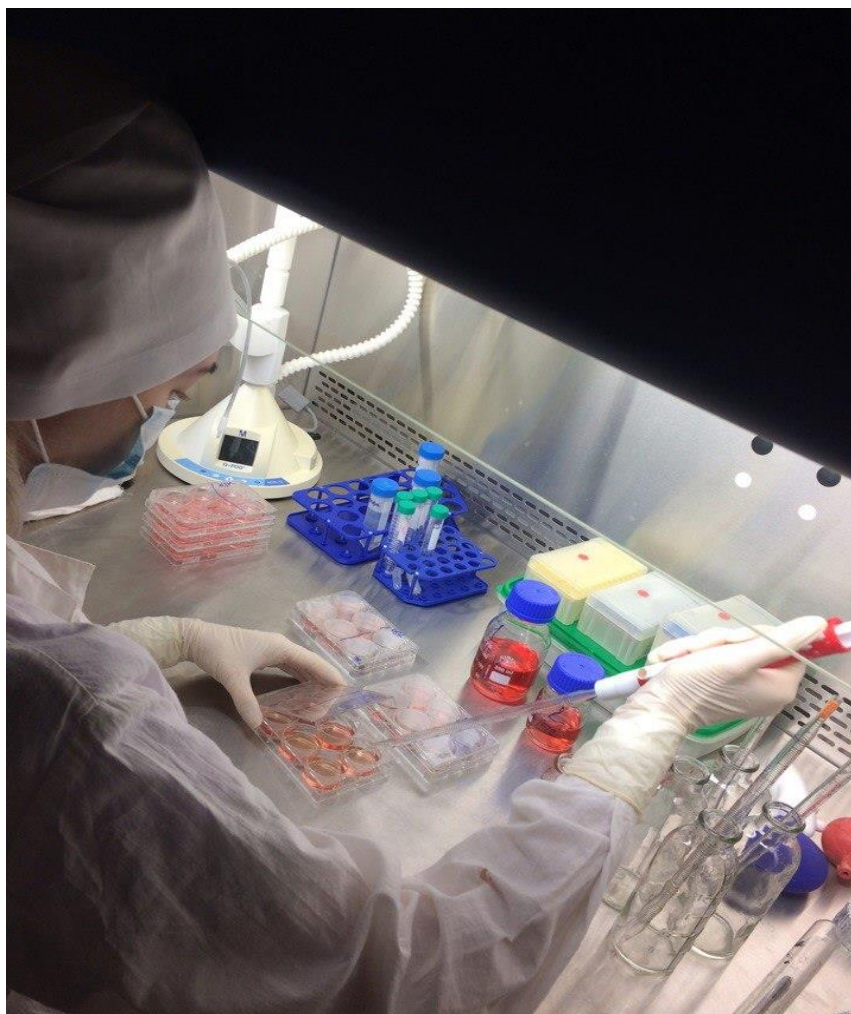


Рис. 12. Работа в ламинарном боксе по расселению ССК в 6 луночные планшеты (фирмы SPL Lifesciences, Корея)

Оценку адгезии проводили через 60 мин после внесения ССК во флаконы.

Приготовление раствора флуоресцентного красителя осуществляли согласно рекомендациям, изложенным в инструкции реагента: готовили стоковый 5 мМ раствор флуоресцентного красителя в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем приготавливали рабочий раствор, содержащий 20 мкМ флуоресцентного красителя в растворе Хенкса с 0,04% Pluronic F-127. Во флакон с клетками добавляли равный объем рабочего раствора красителя. Внутриклеточный краситель Calcium Green-1 AM после разрушения клеточными эстеразами, связывается с ионами кальция и флуоресцирует в зеленой области спектра (рис. 13). Из флаконов полностью удаляли питательную среду и при-

ливали 2 мл раствора Хенкса, интенсивное ресуспендирование не проводили. Затем полностью сливали раствор Хенкса и добавляли 2 мл раствора Хенкса с флуоресцентным красителем ацетоксиметилловый эфир кальцеина (AM Calcium Green-1).

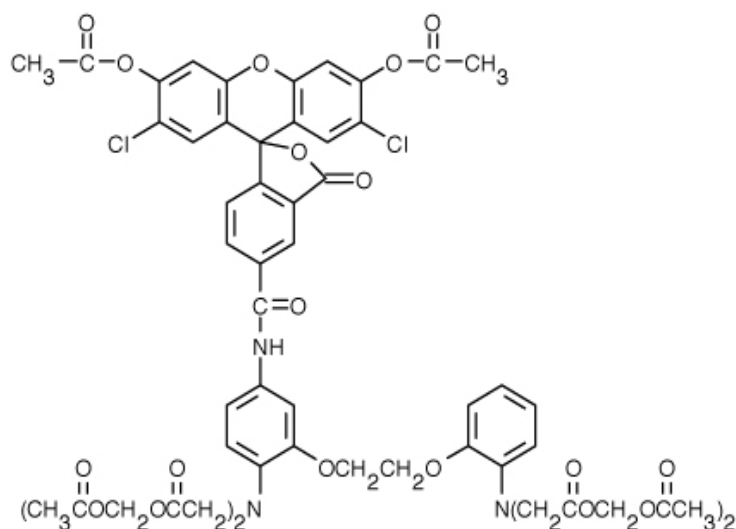


Рис. 13. Структурная формула Calcium Green-1 AM

Флаконы с ССК и красителем помещали в CO_2 -инкубатор, инкубацию проводили в течении 45 мин при 37°C , 100 % влажности и 5% CO_2 . Затем из флаконов полностью удаляли в раствор Хенкса, приливали 20 мл свежего в раствора Хенкса проводили интенсивное ресуспендирование в течение 1 мин. Далее осуществляли регистрацию флуоресценции ССК при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа Eclipse Ti DIGITAL C1+ (фирмы Nikon) при длине волны 488 нм [Конфокальный микроскоп NIKON ECLIPSE C1 Plus, 2018]. При помощи специализированного программного обеспечения Nikon EZ-C1 FreeViewer (фирмы Nikon) подсчитывали количество ССК прикрепившиеся к поверхности в 10 полях зрения.

После 60 минут культивирования проводили первую контрольную точку пролиферации ССК. Для этого из флаконов полностью удаляли питательную среду и приливали 2 мл раствора Хенкса, ресуспендировали. Затем полностью сливали раствора Хенкса и добавляли 2 мл раствора Хенкса с флуо-

ресцентным красителем ацетоксиметилловый эфир кальцеина (AM Calcium Green-1). Флаконы с ССК и красителем помещали в CO₂-инкубатор, инкубацию проводили в течении 45 мин при 37°C, 100 % влажности и 5% CO₂. После истечения этого времени, проводили регистрацию флуоресценции ССК при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа Eclipse Ti DIGITAL C1+ (фирмы Nikon) при длине волны 488 нм. При помощи специализированного программного обеспечения Nikon EZ-C1 FreeViewer (фирмы Nikon) определяли количество ССК прикрепившиеся к поверхности в 10 полях зрения. Вторую контрольную точку для оценки пролиферации ССК проводили на 10 день культивирования. Из флаконов полностью сливали раствор Хенкса, в этот флакон с ССК добавляли 2 мл раствора Хенкса с флуоресцентным красителем ацетоксиметилловый эфир кальцеина (AM Calcium Green-1). Затем флаконы с ССК и красителем помещали в CO₂-инкубатор, инкубацию проводили в течении 45 мин при 37°C, 100 % влажности и 5% CO₂. Флуоресценцию клеток регистрировали при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа Eclipse Ti DIGITAL C1+ (фирмы Nikon) при длине волны 488 нм. При помощи специализированного программного обеспечения Nikon EZ-C1 FreeViewer определяли количество ССК прикрепившиеся к поверхности в 10 полях зрения.

Далее, после 60 минут культивирования проводили первую контрольную точку измерения интенсивности флуоресценции для оценки дифференцировки ССК. Для этого из флаконов полностью удаляли питательную среду и приливали 2 мл раствор Хенкса, ресуспендировали. Затем полностью сливали раствор Хенкса и добавляли 2 мл раствора Хенкса с флуоресцентным красителем ацетоксиметилловый эфир кальцеина (AM Calcium Green-1). Флаконы с ССК и красителем помещали в CO₂-инкубатор, инкубацию проводили в течении 45 мин при 37°C, 100 % влажности и 5% CO₂. После истечения этого времени проводили регистрацию интенсивности флуоресценции ССК при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа Eclipse Ti DIGITAL C1+ (фирмы Nikon) при длине волны 488 нм (рис. 14). При помощи

специализированного программного обеспечения Nikon EZ-C1 FreeViewer (фирмы Nikon) определяли интенсивность флуоресценции отдельных клеток в 10 полях зрения.



Рис. 14. Конфокальный лазерный сканирующий микроскоп Eclipse Ti DIGITAL C1+ (фирмы Nikon, Япония)

На 10 день культивирования проводили измерение интенсивности флуоресценции ССК – вторая контрольная точка для оценки дифференцировки и созревания ССК. Из флаконов полностью сливали раствор Хенкса, в этот флакон с ССК добавляли 2 мл раствора Хенкса с флуоресцентным красителем ацетоксиметилловый эфир кальцеина (AM Calcium Green-1). Затем флаконы с ССК и красителем помещали в CO₂-инкубатор, инкубацию проводили в течении 45 мин при 37°C, 100 % влажности и 5% CO₂. Флуоресценцию клеток регистрировали при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа Eclipse Ti DIGITAL C1+ (фирмы Nikon) при длине волны 488 нм с использованием специализированного программного обеспечения Nikon EZ-C1 FreeViewer определяли интенсивность флуоресценции отдельных клеток в 10 полях зрения.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы STATISTICA 6.0.

Глава 3. Полученные результаты и их обсуждение

В ходе исследования было установлено, что флуоресцентный краситель – Calcium Green-1 AM позволяет провести эффективное окрашивание живых клеток, которые флуоресцируют зеленым цветом (рис. 15).

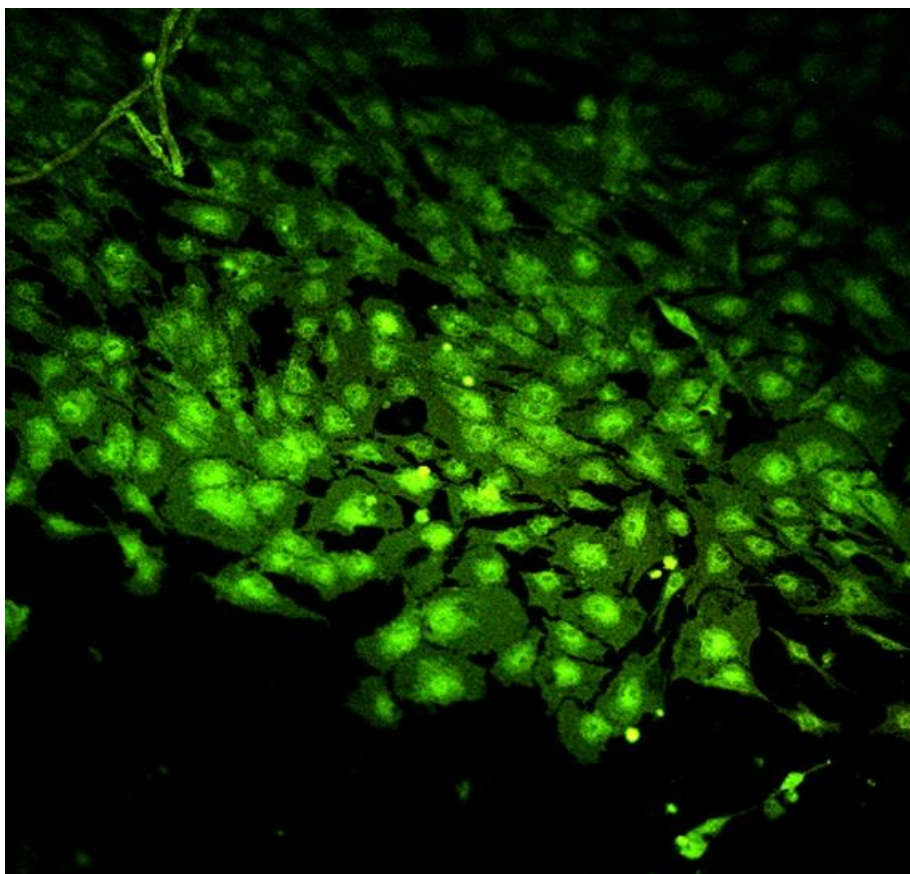


Рис. 15. Флуоресценция ССК при использовании флуоресцентного красителя Calcium Green-1 AM. Ув. 100х

Количество адгезированных ССК до ресуспендирования составило $370,50 \pm 60,70$ штук, после интенсивного ресуспендирования в течении 1 минуты число ССК было равно $368,43 \pm 73,90$ штук, различия не достоверны (рис. 16).

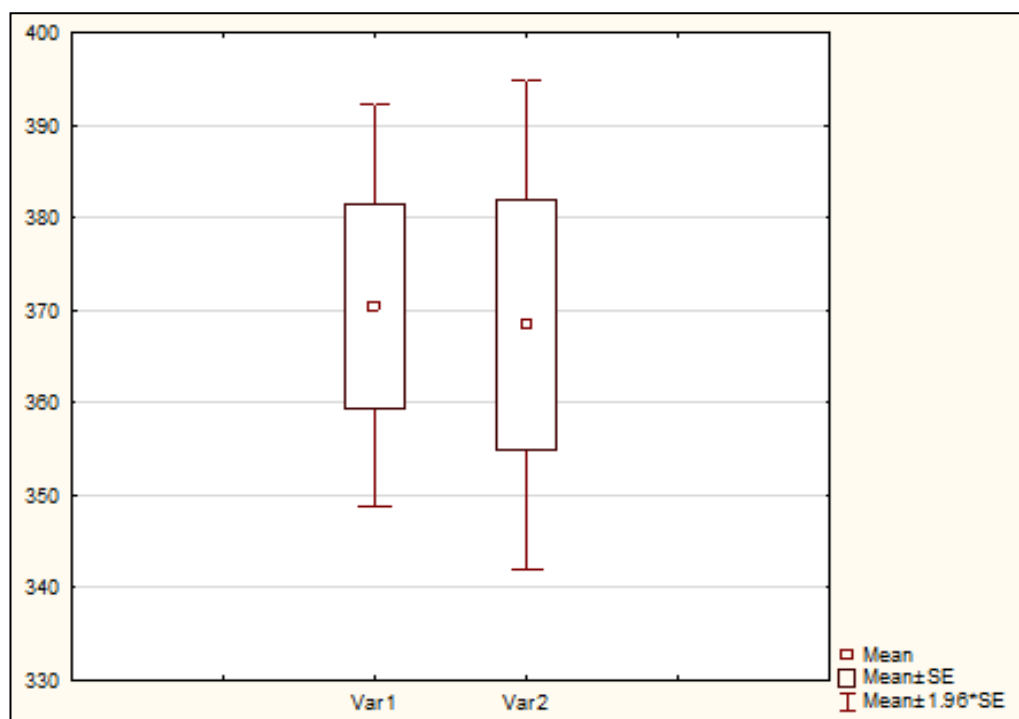


Рис. 16. Количество прикрепившихся ССК до ресуспендирования – Var1 и после 1 минуты ресуспендирования – Var2. StatSoft STATISTICA 6.0

В результате исследования адгезии ССК установлено, что полученная культура ССК прочно прикрепляется к поверхности дна флаконов покрытых биоразлагаемым сополимером поли-(лактид-ко-гликолидом).

В результате оценки пролиферации и подсчета ССК на 10 сутки культивирования было выявлено увеличение клеток – $829,97 \pm 171,11$ штук по сравнению с первой контрольной точкой после 60 минут культивирования – $335,20 \pm 57,25$ штук (рис.17). Различия между данными контрольными точками достоверны при $p < 0,01$ (рис. 18).

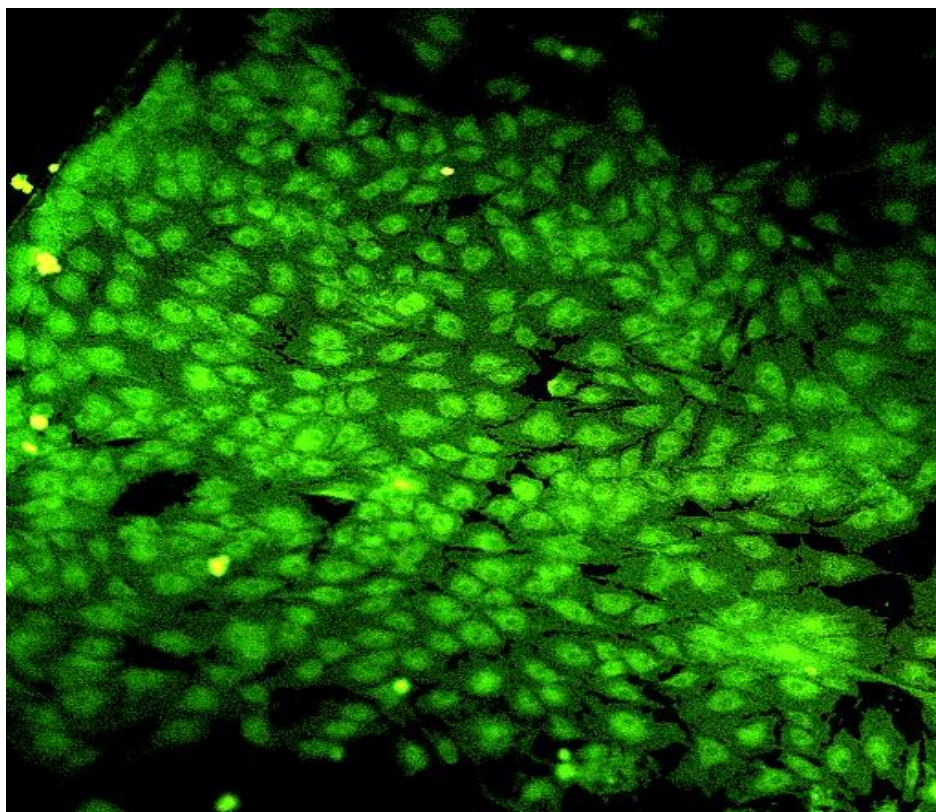


Рис. 17. Флуоресценция ССК на 10 сутки культивирования при использовании флуоресцентного красителя Calcium Green-1 AM. Ув. 100х

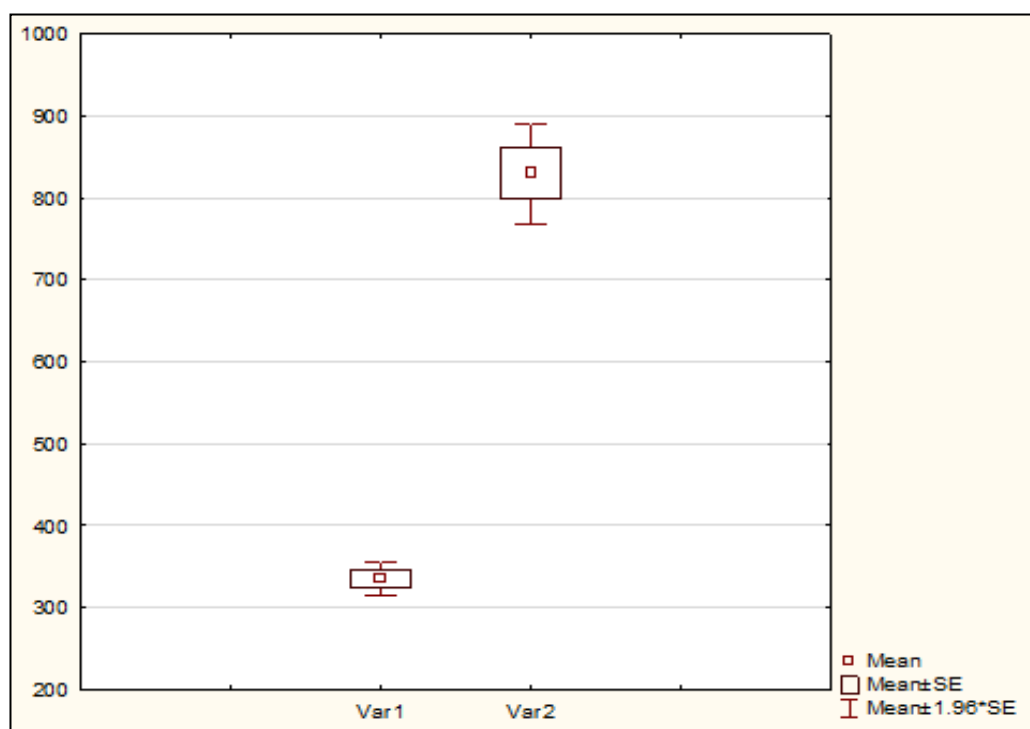


Рис. 18. Количество ССК после 60 минут культивирования – Var1 и после 10 дней культивирования – Var2

Таким образом установлено, что полученная культура ССК активно пролиферирует на поверхности дна флаконов покрытых биоразлагаемым сополимером поли-(лактид-ко-гликолидом).

В ходе оценки дифференцировки ССК и определения интенсивности флуоресценции на 10 сутки культивирования было установлено, увеличение данного параметра – $1138,03 \pm 173,01$ у.е. по сравнению с первой контрольной точкой после 60 минут культивирования – $395,20 \pm 83,36$ у.е. (рис. 19). Различия между данными контрольными точками достоверны при $p < 0,01$ (рис. 20).

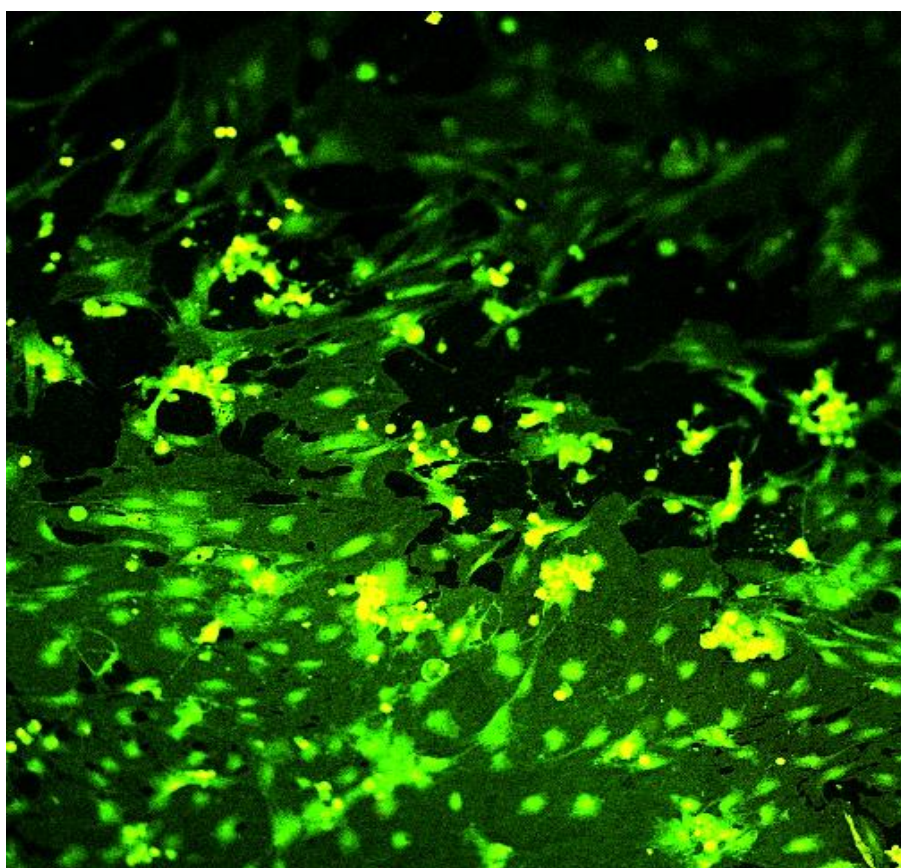


Рис. 19. Флуоресценция ССК на 10 сутки культивирования при использовании флуоресцентного красителя Calcium Green-1 AM для оценки накопления ионов кальция внутри клетки. Ув. 100х

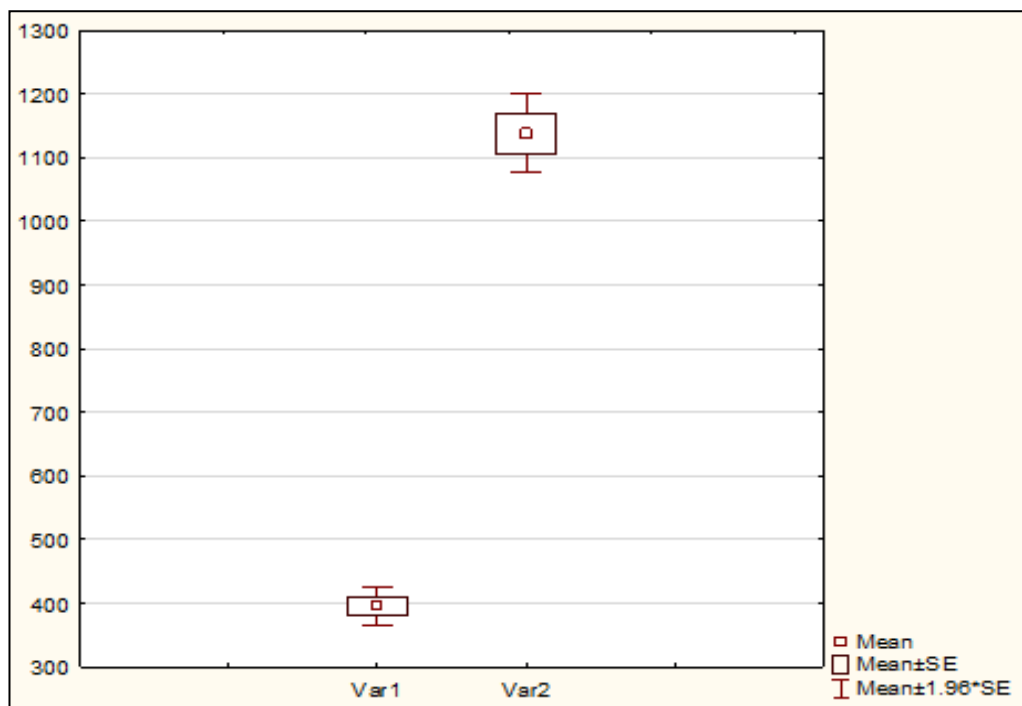


Рис. 20. Интенсивность флуоресценции (y.e.) ССК после 60 минут – Var1 и после 10 дней – Var2 культивирования.

Установлено, что полученная культура ССК успешно дифференцируется в остеогенном направлении на поверхности дна флаконов покрытых биоразлагаемым сополимером поли-(лактид-ко-гликолидом), отмечается увеличение содержания кальция внутри клетки, что свидетельствует о ее созревании и перестройке в остеобласты.

Таким образом, биоразлагаемое покрытие из сополимера поли-(лактид-ко-гликолида) не препятствует адгезии, пролиферации, дифференцировки стромальных стволовых клеток и может в дальнейшем использоваться в качестве материала для изготовления трехмерных матриц – каркасов в тканевой инженерии.

Выводы

1. ССК имеют высокую адгезию к поверхности композитной матрицы из биоразлагаемого сополимера.
2. ССК активно пролиферируют на поверхности биоразлагаемого сополимера.
3. Поверхность композитной матрицы из биоразлагаемого сополимера не препятствует дифференцировки ССК в остеогенном направлении.

Список использованных источников

1. Алексеев К. В., Грицкова И. А., Кедик С. А. Полимеры для фармацевтической технологии / под ред. С. А. Кедика. Москва: Изд-во ИФТ, 2011. 511 с.
2. Конфокальный микроскоп NIKON ECLIPSE C1 Plus. URL: <https://www.8a.ru/print/33381.php> (дата обращения: 20.04.2018).
3. Культуральные среды. URL: <https://www.diam.ru/page.php?pageid=51577> (дата обращения: 15.02.2018).
4. Ответная реакция живых систем при взаимодействии с остеокондуктивным материалом на основе наногидроксиапатита, сополимера лактида и гликолида / С.В. Надеждин [и др.] // Технологии живых систем. 2017. № 6. С. 42–49.
5. Шишацкая Е. И., Николаева А. Д. Культивирование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на носителях из резорбируемого биопластотана // Гены и клетки. 2013. Т. VIII, № 1. С. 57–65.
6. Adams G. B., Scadden D. T. A niche opportunity for stem cell therapeutics // Gene Ther. 2008. Vol. 15, № 2. Pp. 96–99.
7. Alvarez-Buylla A., Lois C. Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates // Stem Cells. 1995. Vol. 13, Pp. 263–272.
8. Anandharamakrishnan C. Spray drying for nanoencapsulation of food components. Spray Drying Techniques for Food Ingredient Encapsulation // John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK. 2015. Vol. 8. Pp. 180–197.
9. Broadus J., Doe Q. C. Extrinsic cues, intrinsic cues and microfilaments regulate asymmetric protein localization in *Drosophila* neuroblasts // Curr Biol. 1997. Vol. 7. Pp. 827–835.
10. Burridge K., Chrzanowska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility, and signaling // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 1996. Vol. 12. Pp. 463–518.

11. Catelas I., Sese N., Tawil B. Human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in fibrin gels in vitro // *Tissue Eng.* 2006. Vol. 12, № 8. Pp. 2385–2396.
12. Chen C. S., Mrksich M., Huang S. Geometric control of cell life and death // *Science.* 1997. Vol. 276, № 5317. Pp. 1425–1428.
13. Chomarat P., Dantin, C., Bennett. TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells // *J Immunol.* 2003. Vol. 171, № 5. Pp. 2262–2269.
14. Combinatorial development of biomaterials for clonal growth of human pluripotent stem cells / Y. Mei [et al.] // *Nat. Mater.* 2010. Vol. 9, № 9. Pp. 768–778.
15. Cooper G. M. *Cell: A Molecular Approach* 2d ed // Amer. Soc. Microbiol., Washington and Sinauer Associates. 2000. Vol. 8, № 3. Pp. 364–372.
16. Curran J. M., Chen R., Hunt J. A. The guidance of human Mesenchymal stem cell differentiation in vitro by controlled modifications to the cell substrate // *Biomaterials.* 2006. Vol. 27, № 27. Pp. 4783–4793.
17. Dalby M. J., Gadegaard N., Wilkinson C. D. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder // *Nat Mater.* 2007. Vol. 6, № 12. Pp. 997–1003.
18. Daley W. P., Peters S. B., Larsen M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine // *J Cell Sci.* 2008. Vol. 121, № 3. Pp. 255–264.
19. Dellatore S. M., Garcia A. S., Miller W. M. Mimicking stem cell niches to increase stem cell expansion // *Curr Opin Biotechnol.* 2008. Vol. 19. Pp. 534–540.
20. Dhandayuthapani B., Yoshida Y., Kumar D. S. Polymeric scaffolds in tissue engineering application // *Int. J. Polym. Sci.* 2004. Vol. 11. Pp.19.
21. Ehninger A., Trumpp A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in // *J. Exp. Med.* 2011. Vol. 208, № 3. Pp. 421–428.

22. Embryonic undifferentiated cells show scattering activity on a surface coated with immobilized Ecadherin / M. Nagaoka [et al.] // *J Cell Biochem.* 2008. Vol. 103, № 1. Pp. 296–310.
23. Emerman J. T., Burwen S. J., Pitelka D. R. Substrate properties influencing ultrastructural differentiation of mammary epithelial cells in culture // *Tissue Cell.* 1979. Vol. 11. Pp. 109–119.
24. Engler A. J., Sen S., Sweeney H. L. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification // *Cell.* 2006. Vol. 126, № 4. Pp. 677–689.
25. Estes B. T., Gimble J. M., Guilak F. Mechanical signals as regulators of stem cell fate // *Curr top Dev Biol.* 2004. Vol. 60. Pp. 91–126.
26. Friedland J. C., Lee M. H., Boettiger D. Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function // *Science.* 2009. Vol. 323, № 5914. Pp. 642–644.
27. Gage F.H., Ray J., Fisher L. J. Isolation, characterization and use of stem cells from the CNS // *Annu Rev neurosci.* 1996. Vol. 18. Pp. 159–192.
28. Gates B. D., Xu Q., Stewart M. New approaches to nanofabrication: molding, printing, and other techniques // *Chem. Rev.* 2005. Vol. 105, № 4. Pp. 1171–1196.
29. Ghosh K., Ingber D. E. Micromechanical control of cell and tissue development: implications for tissue engineering // *Adv Drug Deliv Rev.* 2007. Vol. 59, № 13. Pp. 1306–1318.
30. Gunatillake P. A., Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering // *Eur. Cells Mater.* 2003. Vol. 5. Pp. 1–16.
31. Guo W. H., Frey H. T., Burnham N. A. Substrate rigidity regulates the formation and maintenance of tissues // *Biophys J.* 2006. Vol. 90, № 6. Pp. 2213–2220.
32. Haaparanta A. M., Ella V., Rosling A. Improved Dimensional Stability with Bioactive Glass Fiber Skeleton in Poly (lactide-co-glycolide) Porous Scaffolds for Tissue Engineering // *Mater. Sci. Eng. C.* 2015. Vol. 56, № 15. Pp. 457–466.

33. Habraken W. J., Wolke J. G., Mikos A. G. Injectable plga microsphere/calcium phosphate cements: Physical properties and degradation characteristics. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition // Int. J. Adv. Manufac. Techn.* 2006. Vol. 17, № 31. Pp. 1057 – 1074.
34. Hadjipanayi E., Mudera V., Brown RAJ. Close dependence of fibroblast proliferation on collagen scaffold matrix stiffness // *Tissue Eng Regen Med.* 2009. Vol. 3, № 2. 77–84.
35. Hartmann C. A. Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis // *Trends Cell Biol.* 2006. Vol. 16, № 3. Pp. 151–158.
36. Hayashi Y., Furue M. K., Okamoto T. Integrins regulate mouse embryonic stem cell self-renewal // *Stem Cells.* 2007. Vol. 25. Pp. 3005–3015.
37. Hersel U., Dahmen C., Kessler H. RGD modified polymers : biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond // *Biomaterials.* 2003. Vol. 24, № 24. Pp. 4385–4415.
38. Humphries J. D., Byron A., Humphries M. J. Integrin ligands at a glance // *J. Cell Sci.* 2006. Vol. 119, № 19. Pp. 3901–3903.
39. Ingber D. E. The mechanochemical basis of cell and tissue regulation // *Mech Chem Biosyst.* 2004. Vol. 1, № 1. Pp. 53–68.
40. Integrin activation and matrix binding mediate cellular responses to mechanical stretch / A. Katsumi [et al.] // *J Biol Chem.* 2005. Vol. 280, № 17. Pp. 16546–16549.
41. Jagur-Grodzinski J. Biomedical application of functional polymers // *Reac. Fun. Polym.* 1999. Vol. 39, № 2. Pp. 99–138.
42. Kane R. S., Takayama S., Ostuni E. Patterning proteins and cells using soft lithography // *Biomaterials.* 1999. Vol. 20, № 23–324. Pp. 2363–2376.
43. Kang S. W., Yang H. S., Seo S.W. Apatite-coated poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres as an injectable scaffold for bone tissue engineering // *J. Biomed. Mater. Res.* 2008. Vol. 85A. Pp. 747 –756.
44. Knoblich J. A. Mechanisms of asymmetric stem cell division // *Cell.* 2008. Vol. 132, № 4. Pp. 583–597.

45. Koeffler H. P., Bar-Eli M., Territo M. C. Phorbol ester effect of differentiation of human myeloid leukemia cell lines blocked at different stages of maturation // *Cancer Res.* 1981. Vol. 41, № 3. Pp. 919.
46. Lathia J. D., Patton B., Eckley D. M. Patterns of laminins and integrins in the embryonic ventricular zone of the CNS // *J Comp neurol.* 2007. Vol. 505, № 6. Pp. 630–643.
47. Letourneau P. C., Condic M. L., Snow D. M. Interactions of developing neurons with the extracellular matrix // *J neurosci.* 1994. Vol. 14, № 3. Pp. 915–928.
48. Li W. J., Tuli R., Danielson K. G. A threedimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells // *Biomaterials.* 2005. Vol. 26, № 6. Pp. 599–609.
49. Lin H. R., Yang C.Y., Shaw S.Y. Preparation of macroporous biodegradable PLGA scaffolds for cell attachment with the use of mixed salts as porogen additives // *J. Biomed. Mater. Res.* 2002. Vol. 63, № 3. Pp. 271–279.
50. Lutolf M. P., Blau H. M. Artificial stem cell niches // *Adv. Mater.* 2009. Vol. 21, № 32–33. Pp. 3255–3268.
51. Mano J. F., Sousa R.A., Boesel L. F. Bloinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: State of the art and recent developments // *Comp. Sci. Techn.* 2004. Vol. 64, № 6. Pp. 789–817.
52. Martino M. M., Mochizuki M., Rothenfluh D. A. Controlling integrin specificity and stem cell differentiation in 2D and 3D environments through regulation of fibronectin domain stability // *Biomaterials.* 2009. Vol. 30, № 6. Pp. 1089–1097.
53. McBeath R., Pirone D. M., Nelson C. M. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment // *Dev Cell.* 2004. Vol. 6, № 4. Pp. 483–495.
54. Miao X., Xiao Y., Crawford R. Mechanical and Biological Properties of Hydroxyapatite/Tricalcium Phosphate Scaffolds Coated with Poly (lactic-co-glycolic acid) // *Act. Biomater.* 2008. Vol. 4, № 3. Pp. 638–645.

55. Mouthuy P. A., El-Sherbini Y., Cui Z. Layering PLGA-Based Electrospun Membranes and Cell Sheets for Engineering Cartilage-Bone Transition // *J. Tissue Eng.* 2016. Vol. 10, № 4. Pp. 263–274.
56. Nagaoka M., Ise H., Harada I. Embryonic undifferentiated cells show scattering activity on a surface coated with immobilized Ecadherin // *J Cell Biochem.* 2008. Vol. 103. Pp. 296–310.
57. Najdanović J., Cvetković V., Stojanović S. The influence of adipose-derived stem cells induced into endothelial cells on ectopic vasculogenesis and osteogenesis // *Cell. Molec. Bioeng.* 2015. Vol. 8, № 4. Pp. 577–590.
58. Ott H. C., Matthiesen T. S., Goh S. K. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart // *Nat Med.* 2008. Vol. 14, № 2. Pp. 213–221.
59. Pelham R. J., Wang Y. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility // *Proc natl Acad Sci USA.* 1997. Vol. 94, № 25. Pp. 13661–13665.
60. Petersenet S., Alonso J. M., Goeldner M. Phototriggering of cell adhesion by caged cyclic RGD peptides // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2008. Vol. 47, № 17. Pp. 3192–3195.
61. Prusty D., Davis K. E., Farmer S. R. Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and C/EBPalpha gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 48. Pp. 46226–46232.
62. Qin D., Xia Y., Whitesides G. M. Soft lithography for micro- and nanoscale patterning // *Nat. Protoc.* 2010. Vol. 5, № 3. Pp. 491–502.
63. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand / B. Heissig [et al.] // *Cell.* 2002. Vol. 109, № 5. Pp. 625–637.

64. Rowlands A. S., George P. A., Cooper-White J. J. Directing osteogenic and myogenic differentiation of MSCs: interplay of stiffness and adhesive ligand presentation // *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008. Vol. 295, № 4. Pp. 1037–1044.
65. Ruoslahti E., Pierschbacher M. D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins // *Science*. 1987. Vol. 238, № 4286. Pp. 491–497.
66. Salgado A. J. Bone tissue engineering: State of the art and future trends // *Macromol. Biosci*. 2004. Vol. 4, № 8. Pp. 743–765.
67. Scadden D. T. The stem-cell niche as an entity of action // *Nature*. 2006. Vol. 441, № 7097. Pp. 1075–1079.
68. Schmid J., Wallkamm B., Hammerle C.H. The significance of angiogenesis in guided bone regeneration. A case report of a rabbit experiment // *Clin. Oral Implants Res*. 1997. Vol. 8. Pp. 244–248.
69. Shi X. T., Gong Y.H., Wang D.A. Enhancing alendronate release from a novel PLGA/hydroxyapatite microspheric system for bone repairing applications // *Pharm. Res*. 2009. Vol. 26, № 2. P. 422–430.
70. Tanentzapf G., Devenport D., Godt D. Integrin-dependent anchoring of a stem-cell niche // *Nat Cell Biol*. 2007. Vol. 9, № 12. Pp. 1413–1418.
71. Tourniaire G., Collins J., Campbell S. Polymer microarrays for cellular adhesion // *Chem. Commun*. 2006. № 20. Pp. 2118–2120.
72. Tsimbouri P. M., Murawski K., Hamilton G. A genomics approach in determining nanotopographical effects on MSC phenotype // *Biomaterials*. 2013. Vol. 34, № 9. Pp. 2177–2184.
73. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases – structure, function, and biochemistry // *Circ. Res*. 2003. Vol. 92, № 8. Pp. 827–839.
74. Wang H. B., Dembo M., Wang Y. L. Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells // *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000. Vol. 279, № 5. Pp. 1345–1350.

75. Wang Q., Detamore M. S., Berklund C. Hybrid hydroxyapatite nanoparticle colloidal gels are injectable fillers for bone tissue engineering // *Tissue Eng.* 2013. Vol. 19, № 23–24. Pp. 2586–2593.
76. Watt F. M., Hogan B. L. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*. 2000. Vol. 287, № 5457. Pp. 1427–1430.
77. Weiss S., Reynolds B. A., Vescovi A. L. Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain // *Trends Neurosci.* 1996. Vol. 19, № 9. Pp. 387–393.
78. Weissman I. L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution // *Cell*. 2000. Vol. 100, № 1. Pp. 157–168.
79. Wells R. G., Discher D. E. Matrix elasticity, cytoskeletal tension, and TGF- β : the insoluble and soluble meet // *Sci Signal*. 2008. Vol.1, № 10. Pp. 13.
80. Williams C.M., Engler A.J., Schwarzbauer J.E. Fibronectin expression modulates mammary epithelial cell proliferation during acinar differentiation // *Cancer Res.* 2008. Vol. 68, № 9. Pp. 3185–3192.
81. Wipff P. J., Rifkin D. B., Meister J. J. Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta 1 from the extracellular matrix // *J Cell Biol.* 2007. Vol. 179, № 6. Pp. 1311–1323.
82. Xiao G., Jiang D., Gopalakrishnan R. Fibroblast growth factor 2 induction of the osteocalcin gene requires MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, Cbfa1/Runx2 // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 39. Pp. 36181–36187.
83. Yang C., Tibbitt M. W., Basta L. Mechanical memory and dosing influence stem cell fate // *Nat. Mater.* 2014. Vol. 13. Pp. 645–652.
84. Zhang F. A., Song Q. X., Huang X. Novel High Mechanical Property PLGA Composite Matrix Loaded with Nanodiamond-Phospholipid Compound for Bone Tissue Engineering // *ACS Appl. Mater. Inter.* 2016. Vol. 8. Pp. 1087–1097.
85. Zhao W., Li J. J., Qiu X. F.. Fabrication of Functional PLGA-Based Electrospun Scaffolds and Their Applications in Biomedical // *Mater. Sci. Eng.* 2016. Vol. 59. Pp. 1181–1194.