ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧЕРЕЖДЕНИЕ

НОВОСИБИРСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ ИМ. Я.Л. ЦИВЬЯНА

Применение электроспиннинга в нуждах тканевой инженерии

Выполнил клинический ординатор

Терещенко В.П.

Новосибирск, 2014.

Оглавление

Введение

1. Электроспинниг

2. Элеткроспиннинг материалов в нуждах тканевой инженерии

3. Нервная ткань

4. Кожа

5. Сосуды

6. Сердечная ткань

7. Костная и хрящевая ткань

8. Материалы, применяемые в тканевой инженерии

Заключение

# Список используемой литературы

# Введение

Используя клетки, питательную среду и подложку-матрицу тканевая инженерия создает прототипы тканей живых организмов с целью получения продукта пригодного для выполнения функций живого органа.

По мере развития науки все более и более уменьшаются исследуемые и создаваемые ею объекты. Производство вышло на уровень нанотехнологий, современные микроскопы способны визуализировать микро- и нанообъекты.

Данная тенденция не обошла и современную медицину, а в частности и тканевую инженерию. Так, например, производство матриц для культивирования клеток сейчас идет по пути максимального копирования структуры внеклеточного матрикса живых тканей. Это подтверждают ученые из Чехии в своей работе посвященной изучению эффекта нанотопографии матриц на остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток. В заключении они приходят к выводу, что для создания качественной тканеинженерной конструкции лучше всего имитировать живую 3D нишу предшественников остеобластов внутри матрицы, чтобы воздействовать на клетки химическими и физическими стимулами схожими с натуральными[1]. Так же ряд ученых изучая ту же тему провели эксперимент с матрицами имеющими различный диаметр пор от 25 до 150 мкм. Культуры мезенхимальных стволовых клеток на матрицах с различным диаметром пор вели себя по-разному. Так на матрицах с меньшим диаметром пор были более выражены адгезия и остеогенная дифференцирвка, на матрицах с большим диаметром клетки активно инфильтрировали конструкцию и наблюдалась тенденция к ангиогенезу[2]. В дополнение можно отметить группу исследователей во главе с Rebecca L. Dahlin, которые в своей обзорной статье делают вывод о том, что клетки живых организмов активней всего взаимодействуют с рельефом, структуры которого сопоставимы с ними же по размерам[3].

Таким образом ученые натолкнулись на проблему создания матриц с поверхностью структурированной на микро- и наноуровне. Помимо этого к матрицам выдвигается еще ряд требований, обусловленных необходимостью выполнения функций замещаемых ими органов, а так же свойств позволяющих использовать их при имплантации в живой организм. К этим требованиям относятся механическая прочность, что бы, например, выполнять опорную функцию кости, высокая порозность, для обеспечения поступления питательных веществ, биореактивность, для взаимодействия с клетками, биодеградируемость, что бы иметь возможность замещения конструкции натуральными тканями.

Часть этих требований возможно выполнить путем правильного подбора материала для матрицы. На сегодняшний день изучено множество биодеградируемых материалов, используемых для создания матриц. Существует две основные группы полимеров: натуральные и синтетические. Синтетические полимеры, такие как, полилактид(Poly(L-lactic acid)(PLLA)), полигликолиевая кислота(poly(glycolic acid), PGA) и поликапролактон (Polycaprolactone, PCL), по сравнению с другими обеспечивают огромную гибкость синтеза, создания разнообразных конструкций и их модифицирования. Биоактивность этих полимеров очень мала, что позволяет устранить неблагоприятные воздействия на макроорганизм. Натуральные полимеры (коллаген, желатин, шелк, хитин, хитозан), с другой стороны, высоко биоактивны, что положительно влияет на адгезию, пролиферацию и дифференцировку клеток. Коллаген, желатин, шелк и хитозан широко используются в создании полимерных матриц, но возможность их применения ограничена в связи с относительно небольшой механической прочностью[4].

Задачу же структурирования матрицы на микро- и наноуровне можно решить лишь с помощью выбора метода ее создания. На данный момент предложено несколько способов создания матриц способных удовлетворить большинство из поставленных перед ними условий. К ним относятся элеткроспиннинг, стереолитография, 3D принтинг, метод фазовой сепарации, метод самосборки амфифильных белков и некоторые другие. Каждый из них имеет свои достоинства и недостатки. Так, например, стереолитография обеспечивает возможность создания заданной структуры, но требует дорогостоящего оборудования и технически сложен. Набирающему популярность 3D принтингу не достает высокого разрешения производимых изделий. Методы фазовой сепарации и самосборки амфифильных белков относительно просты и не требуют дорогостоящего оборудования, но не всегда способны обеспечить необходимую исследователю микроархитектонику матриц.

В данной работе будет подробнее рассмотрен один из методов создания матриц для тканевой инженерии - электроспинниг. Поскольку, данный метод привлекает все больший интерес исследователей в связи со своей относительной технической простотой, возможностью использования практически любых полимеров при синтезе, возможностью получения достаточно больших пористых конструкций с диаметром фибрилл от нано- до микрометров. Будет освещена техническая сторона метода, а так же сделан упор на материалы, применяемые при данном методе, и эффекте конечного продукта на жизнедеятельность культур клеток.

# 1. Электроспинниг

Электроспиннинг впервые был применен в первом десятилетии ХХ века для нужд текстильной промышленности. И лишь намного позже ряд ученых показали, что многие биополимеры также возможно использовать для создания структур методом электроспиннига, что открыло новые горизонты тканевой инженерии. Устройство для элеткроспиннинга схематично изображено на рисунке 1.



Рис. 1. Схематичное изображение аппарата для элеткроспиннига.

Аппарат электроспиннинга состоит из иглы через которую подается раствор полимера. Из коллектора, куда собирается выпущенная из иглы струя полимера. Все составляющие аппарата - игла, струя, коллектор являются элементами одной электрической цепи. Сутью процесса электроспиннинга является преодоление напряжением электрического тока сил поверхностного натяжения раствора полимера на конце иглы. По мере роста напряжения на конце иглы сначала образуется конус Тейлора - конусообразная капля полимера. Как только напряжения достаточно с верхушки конуса в направлении коллектора устремляется струя полимера, диаметр которой зависит от множества условий. Находясь в воздухе часть растворителя испаряется и на коллекторе собирается более чистый полимер в виде хаотично или направленно уложенных фибрилл.

Одними из первых, кто применили электроспиннинг для создания структур из синтетичесгоко полимера были ученые Doshi J. И Reneker D.H.. В своей работе от 1993 года они изучали техническую сторону процесса электроспиннинга. Исходя из описания метода электроспиннинга, ученые сделали предположение, что следующие параметры влияют на процесс: свойства раствора - вязкость, элеткропроводность, поверхностное натяжение; и контролируемые переменные, такие как скорость подачи полимера, величина электрического напряжения, расстояние между иглой и коллектором, а так же условия окружающей среды - температура и влажность. По завершении эксперимента прогнозы ученых подтвердились. Так, например, оказалось, что при вязкости раствора менее 800 Па\*с струя ломалась, а при более 4000 Па\*с вообще не удавалось сформировать струю из-за большого поверхностного натяжения раствора. При этом при увеличении концентрации полимера в растворе, а следовательно и вязкости требовалось все большее электрическое напряжение для преодоления поверхностного напряжения и создания струи. Чем толще использовалась игла, тем большее расстояние могла преодолеть струя до коллектора. В заключении исследователи предложили области науки и промышленности, где данная технология могла бы использоваться. Среди них создание композитных материалов, полимерных полупроницаемых мембран, использование в нетканом производстве, производстве покрывающих раны покрытий и многое другое[6].

# . Элеткроспиннинг материалов в нуждах тканевой инженерии

На начальных этапах использования элеткроспиннинга исследователи работали с отдельно взятыми синтетическими полимерами. В дальнейшем ученые начали создавать композитные матрицы, состоящие из полимеров и белков натурального внеклеточного матрикса. Такие матрицы, помимо нужных механических свойств, получили так же биореактивные свойства естественного клеточного окружения. По мере накопления знаний и опыта в этой сфере оказалось, что электроспинниг позволяет создавать множество разнообразных конфигураций клеточных матриц, пригодных для культивирования клеток различного происхождения, а следовательно пригодных и для создания множества видов искусственных тканей. Более того ученые выяснили, что изменяя основные параметры структуры матрицы, такие как диаметр фибрилл, порозность, направленность волокон можно влиять и на поведение клеток в культуре - на их адгезию, пролиферацию, дифференцировку и морфологию.

# . Нервная ткань

Ученым, занимающимся инженерией нервной ткани, методом электроспиннинга удалось создать 4 типа матриц из поли-L-лактида(PLLA): матрицы с диаметром фибрилл 150-500 нм с разнонаправленными и параллельными волокнами и матрицы с диаметром фибрилл 800-3000 нм так же с разнонаправленными и параллельными волокнами. Для электроспиннига 5% раствора PLLA использовались иглы 18G, для растворов с увеличенной концентрацией - 22G. Расстояние между иглой и коллектором составляло 10 см. Для создания параллельных волокон использовали мандрел вращающийся со скоростью 1000 об./мин. Для преодоления сил поверхностного натяжения раствора был выбран ток напряжением в 12кВ. При ведении на полученных матрицах нейральных стволовых клеток линии С17.2 выяснилось, что уже ко 2му дню в культуре клетки приобретают вытянутую биполярную морфологию. При этом элонгация клеток на матрицах всегда шла вдоль направления фибрилл, т.е. на матрицах с параллельным расположением волокон клетки вытягивались и выращивали отростки всегда параллельно волокну. На матрицах с хаотичным расположением фибрилл клетки удлинялись разнонаправлено. В дополнение было отмечено, что изменения морфологии клеток, их элонгация и появление отростков, наблюдалось лишь у 40 % при ведении культуры на матрице с диаметром фибрилл 0,8-3 мкм и в 80 % при ведении на матрице с волокнами в 150-500 нм. Поскольку наиважнейшим аспектом в регенерации нервной ткани является возможность роста отростков - аксона и дендритов, ученые сделали вывод, что для воссоздания нервный ткани необходимо использовать параллельные нановолокна, которые очень удобно создавать методом элетроспинннга[7].

На следующем этапе в создании матриц ученые к синтетическому 9% полимеру поли-L-лактиду-ко-поликапролактону(PLCL) добавили белок внеклеточного матрикса - коллаген I типа. Для элеткроспиннига использовали иглы диаметром 27G. Скорость подачи раствора составляла 1 мл/час, вольтаж электрического тока 15 кВ, расстояние от иглы до коллектора 12см. При ведении человеческих мезенхимальных стволовых клеток(hMSC) в нейрогенной среде на данных матрицах, в сравнении с матрицами из чистого PLCL, было отмечено несколько закономерностей. Во-первых, матрицы с добавлением коллагена оказались более гидрофильны - водный контактный угол 57±5о, против матриц из чистого PLCL, где водный контактный угол составил 127±8о, что делает их более комфортной средой для жизнедеятельности клеток, поскольку питательные вещества в организме растворены именно в воде межклеточной жидкости. Вдобавок существенно отличались и механические свойства полученных матриц. Так предел прочности на разрыв для матриц с добавлением коллагена в три раза превосходил таковой матриц из чистого PLCL(4,61±0,69 МРа против 1,42±0,40 МРа), что немало важно для периода нейрогенеза - необходимо обеспечить целостность конструкции во время мобилизации больного. Во-вторых, при использовании колорометрического метода была выявлена значительно большая пролиферация клеток находящихся на матрицах PLCL/ColI относительно культур развивающихся на чистом PLCL (индекс абсорбции 1300 против 900). А так же иммуноцитохимический анализ показал достоверно большее отложение нейрофиламента 200 и нестина - маркеров нервной ткани культурами, растущими на матрицах из PLCL/ColI. Морфология клеток в обоих случаях становилась нейроподобной - клетки увеличивались и принимали мультиполярную многоотростчатую форму[8].

Таким образом, добавление белка натурального внеклеточного матрикса к матрице не только усиливает ее механическую прочность, но и делает матрицу более эффективной для пролиферации и дифференцировки клеток.

# . Кожа

Одним из перспективных направлений применения электроспиннинга является создание покрывающих раны конструкций, для терапии обширных кожных дефектов. Ведь на данный момент кожная аутопластика обрекает больного на множество запрограммированных операций, членовредительство донорских участков кожи и крайне длительное время восстановления.

Занимаясь данной проблемой группа ученых создала из полилактида-ко-гликолида (PLGA, молекулярный вес 70 кDa, лактид/гликолид= 75/25) три типа полимерных матриц различающихся по диаметру пор, порозности и степени гидрофильности. Первый тип матриц нес поры размером 21.0±4.8 мкм, имел порозность 68.2±3.7% и водный контактный угол 131.0±4.6. Второй тип имел следующие параметры (в порядке перечисленном выше) 59.5±16.3 мкм, 79.1±5.2%, 112.4±6.5. И третий 132.7±39.6 мкм, 92.4±4.3%, 76.1±8.5. Различные характеристики матриц получили путем изменения конфигурации приемного коллектора: в 1м случае - плоский неподвижный коллектор, во 2м - цилиндрический мандрел вращающийся со скоростью 28 об./ мин., в 3м - цилиндрический мандрел вращающийся со скоростью 60 об./ мин. Параметры электроспиннинга для создания данных матриц были следующими: игла диаметром 0,6 мм, скорость подачи раствора 0,5 мл/час, напряжение тока 20кВ. Анализ физических свойств матриц показал, что механическая прочность матриц снижается по мере роста их порозности. Для исследования биореактивных свойств матриц ученые использовали культуры человеческих дермальных фибробластов. Клеточное число увеличивалось на всех матрицах весь период наблюдения. Но характер распределения клеток по конструкции существенно различался. Так, для матриц первого типа с меньшим размером пор, меньшей порозностью и гидрофильностью миграция клеток внутрь конструкции не отмечалась вовсе. Клетки распределялись монослоем на поверхности матрицы. Данной явление исследователи объясняют тем, что диаметр пор такой матрицы(21.0±4.8) существенно меньше размера фибробласта(10-100мкм). Для сравнения клетки на матрицах третьего типа, с большим размером пор, большей порозностью и гидрофильностью отмечалась миграция клеток более чем на 100 мкм вглубь конструкций. Вдобавок исследование пролиферации культуры колорометрическим методом (MTS assay) уже после первых суток показало достоверно большую клеточную плотность на матрицах третьего типа по сравнению с конструкциями первого и второго типов. И разрыв в клеточных плотностях продолжал увеличиваться весь период наблюдения. В заключении проведенное иммуноцитохимическое исследование показало визуально большее отложение коллагена в матрицах третьего типа[9].

Команда ученых во главе с Kumbar S.G. занималась схожей темой. Учеными методом электроспиннинга были созданы матрицы из полилактида-ко-гликолида(PLGA, лактид/гликолид 50/50) с диаметром фибрилл от 150-225 нм до 3250-6000 нм и порозностью от 38 до 60%. Параметры электроспиннига для создания данных матриц следующие: скорость подачи раствора 2 мл/час, диаметр иглы 20G, расстояние от иглы до коллектора 20-40 см, вольтаж использовался из расчета 1 кВ на 1 см. Механические свойства всего ряда матриц оказались сопоставимы с механическими свойствами натуральной кожи. Человеческие дермальные фибробласты показали достоверно лучший рост на матрицах с диаметром волокон 350-1100 нм. Экспрессия гена коллагена III типа также оказались достоверно большими на матрицах с этим диаметром фибрилл[10].

На следующем этапе группа исследователей из Сингапура для создания тканеинженерного эквивалента кожи к 10% раствору синтетического полимера поликапролактона (PCL) добавила биореактивный белок - желатин. Из данного композитного раствора методом электроспинннига(с параметрами: вольтаж 10,5 кВ, игла 0,4 мм, расстояние до коллектора 15 см, скорость подачи растовра 0,7 мл/ч), были получены матрицы со средним диаметром фибрилл 470 ± 120 нм и порозностью 62-75%. Пористое строение матриц, по замыслу ученых, должно способствовать не только проникновению клеток вглубь конструкции, но и осуществлять эффективный гемостаз в ране. Для анализа биологических свойств матриц использовались человеческие дермальные фибробласты. Анализ количества клеток находящихся на конструкциях на протяжении эксперимента не выявил достоверных различий при ведении клеток на матрицах из PCL и PCL/ желатин. Но клетки находящиеся на PCL/желатин конструкциях мигрировали глубже внутрь матрицы, что может быть связано с большей гидрофильностью данного материала. Однако ученые подчеркивают, что полученной инфильтрации не достаточно для заключения о равномерном распределении клеток внутри матрицы[11].

Таким образом, на поведение клеток в культуре влияет не только качественный состав подложки, но и ее структура. Учеными предложено множество вариантов строения матриц. Но для дальнейшего развития тканевой инженерии необходимо определение оптимальных для клеточного роста параметров микроархитектоники получаемых конструкций.

# . Сосуды

Проблема стеноза и тромбирования сосудов все еще остается нерешенным вопросом современной медицины. Поскольку применяемые на данный момент методы лечения, в частности аутотрансплантация и протезирование, не дают долгосрочного приемлемого эффекта. Так, при использовании в качестве трансплантата большой подкожной вены бедра ее просвет сужается до 88% к 5 году после операции и до 50 к 10[12]. Наиболее часто используемый для протезирования сосудов полимер - политетрафторэтилен уменьшается в просвете до 60% уже после 5 лет после имплантации[13]. Таким образом, ученые нуждаются в новом подходе лечения патологии сосудов. Один из вариантов - тканевая инженерия.

Группа ученых, чтобы создать тканеинженерный сосуд провела занятный с точки зрения электроспиннинга эксперимент. С диаметром иглы 26G и вращением цилинидрического коллектора со скоростью 300-2000 об/мин, вольтажом в 13 кВ, расстоянием до коллектора в 20см и скоростью подачи раствора 0,6-1,5 мл/час исследователями были созданы двухслойные матрицы-трубки. Внутренний слой состоял из хаотично расположенных фибрилл поликапролактона (PCL, молекулярный вес 80kDa) диаметром 600±400 нанометров и пор со средним размером 15мкм. Наружний - из циркулярных волокон полилактида(PLA, молекулярный вес 76kDa) диаметром от 800нм до 3мкм, с порами меньше 10 мкм. Общая порозность конструкции составила 79 ± 4%. Такой подход ученые объясняют необходимостью имитирования анатомического строения натурального сосуда, где медиа содержит циркулярно расположенные волокна коллагена для сопротивления растяжению, а интима является ложем для эндотелиоцитов. Исследователи делают акцент на том, что за время всего эксперимента не наблюдалось раздвоения конструкции на слои, что можно объяснить наличием крепкой зоны смешивания. Анализ механических свойств показал, что такие матрицы выдерживают на разрыв до 4.3 ± 0.2 MPa, при максимальном растяжении в 47.0 ± 6.3%, что значительно крепче, чем при изолированном использовании PCL. Для исследования биосовместимости матриц использовли мышиные фибробласты 3Т3 и человеческие венозные миофибробласты. Мышиные фибробласты увеличивали собственное число вплоть до 30 дня культивирования. К 14м суткам в культуре было отмечено проникновение клеток вглубь матрицы, а к 30м достигнута почти полная конфлуэнтность. Инфильтрации конструкции человеческими венозными фибробластами отмечено не было. К 30 дню клетки формировали монослой на поверхности матрицы. Иммуноцитохимические исследования показали отложения коллагена и гликозаминогликанов в обоих случаях[14].

В паре исследований при добавлении к синтетическому биоразлагаемому полимеру поликапролактону белка естественного внеклеточного матрикса коллагена I типа наблюдалось уменьшение модуля Юнга с 7.5±0.7 (для чистого PCL) до 2.7±1.2 (для композитного материала), что говорит о снижении ригидности материала и проявлении им более эластичных свойств. Параметры электроспиннига для создания данных матриц были следующие: напряжение электрического тока 5-25кВ, расстояние до коллектора 10-20см, скорость вращения приемного мандрела 1000 об/мин, скорость подачи растовора 1-10 мл/час. В эксперименте наблюдалась достоверно большая адгезия и пролиферация эндотелиальных и гладкомышечных клеток на матрицах с добавлением коллагена по сравнению с конструкциями из чистого PCL. Эндотелиальные клетки самостоятельно распределялись по внутренней стороне цилиндрической матрицы, что может говорить возможности становлении сосуда. Морфология клеток эндотелиальных клеток зависела от диаметра волокон матрицы. Так, при диаметре фибрилл меньше 1 мкм клетки имели многоотросчатую форму, большое количество сайтов фокальной адгезии на множестве волокон находящихся рядом с ними. При диаметре фибрилл от 2,39 до 4,45 мкм клетки контактировали лишь с одним волокном, не продуцировали сайтов фокальной адгезии и имели вытянутую вдоль волокна форму. Иммуноцитохимический анализ экспрессии эндотелиальных маркеров, таких как CD31, фактор фон Виллебранда, VE-кадгерин показал значительно большее их отложение в культурах клеток выращиваемых на матрицах с диаметром волокна до 1 мкм. Наблюдалась характерная для эндотелиальных клеток локализация молекул: CD31, VE-кадгерина - между мембранами отдельных клеток и фактора фон Виллебранда внутри клетки[15-16].

Таким образом электроспиннинг позволяет создавать цилиндрические структуры схожие по строению с натуральной сосудистой стенкой, а правильный подбор материала матрицы может обеспечить необходимую для сосуда эластичность. Структурирование конструкции на микро- и наноуровнях поможет в создании оптимальных условий для того или иного вида клеток.

# . Сердечная ткань

Одной из причин развития хронической сердечной недостаточности является рубцевание и развитие зон гипокинеза миокарда после перенесенного больным острого инфаркта миокарда. Если учесть, что смертность от сердечно-сосудистых заболеваний находится на первом месте среди других причин смертности, то проблема лечения данной патологии становится одной из актуальнейших в современной медицине. На сегодняшний день не существуют эффективного лечения описанной патологии, а тканевая инженерия сердечной ткани является наиболее перспективным направлением, способным решить поставленную задачу.

Чтобы создать тканеинжинерный эквивалент сердечной ткани ученые подвергли электроспинннигу 3 вида синтетических полимеров: поли-L-лактид(PLLA, молекулярный вес 100000 г/моль), полилактид-ко-гликолид(лактид/гликолид=10/90), полилактид-ко-гликолид(лактид/гликолид=75/25). Параметры получившихся матриц следующие: для 1го типа - средний диаметр фибрилл 1мкм, порозность 71, водный контактный угол 107о, для 2го - средний диаметр фибрилл 1мкм, порозность 78, водный контактный угол 85о, для 3го - средний диаметр фибрилл 0,9 мкм, порозность 75, водный контактный угол 65о. Параметры процесса электроспиннига, позволившего создать данные матрицы следующие: расстояние до приемного коллектора 15 см, напряжение тока 2кВ на 1 см, скорость подачи раствора 6мл/час. Каждая матрица имела вариант с хаотично расположенными волокнами и вариант с продольным расположением, что обеспечивалось разной скорость вращения приемного мандрела. Анализ биодеградируемости конструкций показал, что добавление гликолидов в конструкцию ускоряет ее время разложения. Так, после 7 дней в фосфатном буфере матрица из PLLA потеряла меньше 10% массы, матрица из PLGA(75/25) чуть больше 10%, в то время как матрица из PLGA(10/90) потеряла в массе около 22%. Анализ биосовместимости проводился с помощью кардиомиоцитов. В ходе исследования было выявлена, что адгезия и пролиферация клеток убывали в ряду PLLA - PLGA(75/25) - PLGA(10/90). Т.е. кардиомиоциты лучше взаимодействуют с гидрофобными структурами, что не характерно для подавляющего большинства остальных клеток организма. Вдобавок на матрицах из PLLA наблюдалось образование вставочных дисков между кардиомиоцитами, что говорит о формировании необходимой гистологической структуры. Данное явление не было выявлено при использовании других видов матриц. Одной из причин такого поведения клеток может быть ускоренная биодеградация, которая не позволяет клеткам эффективно расположиться на поверхности матриц, содержащих PLGA. При использовании матриц с продольно расположенными фибриллами клетки вытягивались вдоль волокон и образовывали пул однонаправлено расположенных клеток, что в сочетании с формированием вставочных дисков между кардиомиоцитами давало гистологическую картину схожую с естественной сердечной тканью[17].

Группа других ученых решила добавить натуральный белок желатин к 19% растовору синтетического PLGA(лактид/гликолид=75/25). При различных параметрах электроспиннинга(вольтаж 14-16кВ, диаметр иглы 27G, скорость подачи растора 1 мл/час, расстояние до коллектора 12 см) микроархитектоника конечных продуктов оказалась разной. Средний диаметр фибрилл для матриц из PLGA составил 630±51нм, для композитных матриц 64±55 нм, средний диаметр пор 1.072±0.54 мкм и 0.546±0.29 мкм соответственно. К тому же было выявлено значительное снижение эластичности и прочности на разрыв композитных матриц по сравнению с конструкций из чистого PLGA. Для исследования биосовместимости ученые применили кардиомиоциты. Колорометрический анализ показал достоверно большую пролиферацию клеток на композитных матрицах все время культивирования. Исследование механических свойств матриц после заселения их клетками показал снижение и прочности и эластичности конструкций. Расселение клеток по поверхности PLGA матриц имело ограниченный характер, в то время как клетки находящиеся на PLGA/Gel конструкция уже к 4 дню заняли почти всю представленную поверхность. Данное явление можно объяснить тем, что желатин имеет множество интегрин-связываемых сайтов, что положительно влияет на адгезию и дифференцировку клеток. Иммуноцитохимический анализ показал визуально большее отложение специфичных белков сердечной мышцы, таких как альфа-актин и тропонин I, на матрицах из PLGA/Gel[18].

Другая команда исследователей тестировала матрицы состоящие из полигликолида(PGA) и коллагена I типа. В работе был применен электроспинниг с параметрами: диаметр иглы 0,7 мм, напряжение электрического тока 25 кВ, расстояние до приемного коллектора 23 см, скорость подачи раствора 10мл/час. Оказалось, что добавление полигликолида к коллагену существенно увеличивает прочность матрицы. Анализ биосовместимости с помощью сердечных стволовых клеток показал, что ни матрица из чистого PGA ни композитная матрица не являются цитотоксиными - рост клеточного числа отмечался все время культивирования. Однако большая адгезия и пролиферация наблюдались на композитных матрицах[19].

В данных исследованиях еще раз подтверждается большая биореактивность композитных материалов, но обнаруживается и недостаток. Добавления натуральных белков может не только увеличивать но и уменьшать механическую прочность матрицы. Вдобавок становится ясно, что созданные благоприятные условия для одних клеток совсем не обязательно будут приемлемыми для другого их вида. Таким образом, для создания оптимального продукта ученые вынуждены лавировать между механическими и биореактивными свойствами матриц путем выбора материала и структуры конструкций, а так же вида используемых клеток.

# . Костная и хрящевая ткань

Необходимость в восстановлении обширных костных дефектов и протезирования хрящей сделала тканевую инженерию костнохрящевой ткани одним из самых изученных направлений. На сегодняшний день с этой целью исследовано множество синтетических и композитных материалов. Все они обладают своими достоинствами и недостатками и многие из них являются потенциальными предшественниками тканеинженерных конструкций.

С целью создания тканеинженерного хряща ученые подвергли электроспиннингу 2 вида полилактида-ко-гликолида(PLGA, лактид/гликолид= 50/50 и 75/25). Параметры процесса были следующие: расстояние до приемного коллектора 25 см, вольтаж 0,56кВ на 1 см расстояния до коллектора, диаметр иглы 18G, скорость вращения 0,3 м/сек. Получившиеся матрицы имели средний диаметр волокон 550±150 нм, размеры пор от 0.0032 до 409.44 мкм и порозность 80,68%. Выяснилось, что по механическим свойствам такие матрицы сопоставимы с кожей, но для хряща являются слишком эластичными и не выполнят опорную функцию. К тому же время деградации, как и в предыдущих использованиях PLGA, оказалось слишком мало для эффективного хондрогенеза. Так была выявлена необходимость смены материала или добавления веществ, способных усилить механическую составляющую[20].

В другой работе ученые наоборот использовали лишь белок натурального внеклеточного матрикса - коллаген II типа. Матрицы полученные методом электроспиннинга имели волокна со средним диаметром 496 нм м среднюю площадь пор 6,94 мкм2. Анализ механических свойств показал, что матрица хоть и имеет достаточный запас прочности, но является ригидной и почти не подвергается деформации(1-2% растяжения). Что так же не пригодно для хрящевой ткани. Однако при исследовании биосовместимости хондроциты активно инфильтрировали конструкцию, что немало важно для будущего тканеобразования[21].

Чтобы сохранить преимущества и устранить недостатки обоих типов используемых материалов ученые создали композитную матрицу из поликапролактона(PCL) и эластина со средним диаметром пор 540±21 мкм. Механические свойства данной конструкции приближались к механическим свойствам естественной хрящевой ткани. По мере увеличения концентрации эластина в растворе вело к увеличению захвата воды и гидрофильности матрицы, что дополнительно увеличивало эластичность конструкции, что важно для хрящевой ткани. Анализ биосовместимости проводился с помощью хондроцитов. Адгезия и пролиферация клеток более выражена на композитных матрицах по сравнению с конструкциями из чистого PCL. Вдобавок на матрицах из PCL/эластина отмечалась активная инфильрация клеток вглубь конструкции[22].

Интересный подход к созданию композитных матриц для протезирования межпозвоночного диска осуществила группа ученых во главе с Leon J. Nesti. Суть метода заключалось в том, что в центр матрицы созданной методом электроспиннинга из поли-L-лактида(PLLA, молекулярный вес 50000 Da) вводился гель из гиалуроновой кислоты. Сделано это было для повторения макроструктуры межпозвоночного диска. Так, матрица из чистого PLLA на периферии конструкции имитировала фиброзное кольцо, а введенная в центр гиалуроновая кислота за счет своей способности привлекать большое количество воды призвана исполнять эластическую и амортизационную функцию пульпозного ядра. Параметры элеткроспиннига для создания фиброзного кольца были следующие: игла диаметром 18G, вольтаж из расчета 0,8кВ на 1 см расстояния до коллектора, скорость подачи растовора 1,8мл/час. При ведении на полученных конструкциях мезенхимальных стволовых клеток выявилась еще одна особенность, но уже в морфологии клеток. Так, в области фиброзного кольца на поздних срока культивирования клетки удлинились, приобрели отросчатую форму, расположились вдоль волокон матрицы, концентрически относительно пульпозного ядра. Данная хондроподобная морфология была ожидаема. А вот клетки находящиеся в гиалуроновом геле сохранили свою округлую морфологию в течение всего эксперимента, что говорит о особенностях в поведении клеток в гелях. Тем не менее, клетки обоих областей активно увеличивали собственное количество и синтезировали элементы внеклеточного матрикса, такие как протеогликаны и коллаген I, II и IX типов[23].

Одной из особенностей тканевой инженерии костной ткани является применение синтетических полимеров не только в сочетании с натуральными белками но и в сочетании с неорганическим соединениями естественного внеклеточного матрикса кости, такими как гидроксиаппатит, бета-трикальций фосфат и другими кальций-фосфат содержащими веществами.

Так группа ученых методом электроспиннинга создала матрицу сразу из трех составляющих - поликапролактона(PCL, молекулярный вес 80000 Da), гидроксиаппатита(HA, диаметр частиц 30.25±4.43нм), желатина типа A. Параметры процесса составили вольтаж 11-13 кВ, расстояние до коллектора 12 см, скорость подачи раствора 1,5 мл/час. Полученная матрица имела диаметр фибрилл 411±158нм, размер пор 7-35мкм и порозность 93%. Механические свойства полученной матрицы выгодно отличались от свойств матриц из чистого PCL, а так же композитных PCL/HA и PCL/желатин, за счет эффективного сочетания эластичности и прочности (растяжение 142% при 1.2MPa) конструкции. При анализе биосовместимости с помощью человеческих фетальных остеобластов была выявлена достоверно(p<0.001) большая пролиферация(88%), активность щелочной фосфотазы(77%) и минерализация(66%) на композитных матрицах по сравнению с конструкциями из чистого PCL[24]. В другой схожей работе желатин был заменен на коллаген I типа, результаты мало отличались от описанных выше. Вдобавок авторы отмечают возможность васкуляризации конструкции за счет достаточно большого диаметра пор. Интересный материал для создания тканеинженерного эквивалента кости применили ученые Zhang H. И Chen Z.. К синтетическому полимеру полилактиду-ко-гликолиду(PLGA, молекулярный вес 100000 г/моль, лактид/гликолид=75/25) и гидроксиаппатиту(HA, средний диаметр частиц 20-40нм) были добавлены многослойные углеродные нанотрубки (multiwalled carbon nanotubes, MWNT). Были применены следующие параметры электроспиннига: напряжение электрического тока 20 кВ, растояние до приемного коллектора 13 см, диаметр иглы 0,27 мм, скорость подачи раствора 12 мл/час. Оказалось, что по мере роста концентрации HA в растворе увеличивается средний диаметр фибрилл и средний размер пор. Анализ биосовместимости матрицы с помощью человеческих мезенхимальных клеток костного мозга показал, что пролиферация культуры достоверно увеличивается (p<0.05) при использовании композитных конструкций по сравнению с контрольными- из чистого PLGA. Вдобавок было отмечено активная миграция клеток вглубь матриц содержащих HA. При этом, чем больше начальная концентрация HA в растворе, тем активнее клетки инфильтрировали конструкцию, что может быть связано с возрастающим размером пор. В заключении ученые признают матрицы, содержащие углеродные нанотрубки пригодными для использования в тканевой инженерии костной ткани[26].

Так же интересными являются работы с добавлением в матрицы к обычно используемым материалам BMP-2 (bone morphogenetic protein- сигнальная молекула, участвующая в остеогенной дифференцировке клеток). Целью добавления данного вещества в тканеинженерные конструкции является не преследование тех или иных механических свойств матрицы, а постепенное выделение сигнальной молекулы и индуцирование с ее помощью остеогенного развития клеток. Параметры электроспиннига растворов содержащих BMP-2 принципиально не отличались от описанных выше( вольтаж электрического тока 20-30кВ, расстояние до приемного коллектора 15см, скорость подачи растовра 8,4мл/час). В ряде работ уже было доказано, что введение в биоразлагаемую конструкцию BMP-2 существенно увеличивает пролиферацию и дифференцировку клеток, а так же отложение внеклеточного матрикса[27-28].

Кульминацией стремления заключить достоинства всех типов материалов в одной матрице является работа с использованием синтетического полимера - полиэтилен оксида(PEO, молекулярный вес 900000Da), натурального шелка, наногидроксиаппатита(nHAP, средний размер частиц 50-100нм) и BMP-2. Параметри процесса элетктроспиннига использовались следующие: напряжение элеткрического тока 12 кВ, расстояние до приемного коллектора 21.5 см, скорость полдачи раствора 1,2мл/час. Данный подход дал свои результаты. Так полученные матрицы обладали механическими свойствами схожими со свойствами натуральной костной ткани. А исследование биосовместимости показало увеличение пролиферативной активности в ряду шелк/PEO - шелк/PEO/nHAP - шелк/PEO/BMP-2 - шелк/PEO/nHAP/BMP-2. В этом же ряду увеличивалось и отложение кальций-фосфатных депозитов[29].

В результате применения множества методов и использования большого количества различных материалов ученым удалось добиться формирования аналогов костной и хрящевой тканей in vitro. Некоторые матрицы показали способность генерировать на своей основе костную и хрящевую ткани и in vivo[2,30].

Принимая в расчет огромное количество разработанных материалов и методов, пригодных для создания тканеинженерных конструкций, можно заключить, что на данный момент работа каждой исследовательской группы должна сводиться не только к поиску новых вариантов производства клеточных матриц, а прежде всего к мельчайшей проработке уже существующих методов, апробации их in vivo и создания эффективного промышленного производства тканеинженерных конструкций.

# 8. Материалы, применяемые в тканевой инженерии

Материалы, наиболее часто применяемые для создания клеточных матриц, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Материалы и их характеристика[31-36].

|  |  |
| --- | --- |
| Материал | Характеристика |
| Синтетические полимеры |
| Poly-L-lactic acid(PLLA), поли-L-лактид | (C3H4O2)n, Молекулярная масса 5,000-160,000 Da, срок биодеградации 2-3 года. |
| Polycaprolactone(PCL), поликапролактон | (C6H10O2)n, Молекулярная масса 10,000-80,000 Da, срок биодеградации 6-18 месяцев. |
| Poly-L-lactide-co-glycolide(PLGA), полилактид-ко-гликолид | (C3H4O2)x(C2H2O2)y, лактид/гликолид=75/25, 50/50, молекулярная масса 24,000-240,000 Da, срок биодеградации 6-24 месяца.  |
| Белки |
| Chitosan хитозан | Молекулярный масса 50,000-310,000 Da |
| Gelatin желатин | Молекулярный масса 10,000-100,000 Da |
| Collagen I type, Коллаген I типа | Молекулярная масса 300,000 Da |
| Bone morphogenetic protein- 2 | Молекулярная масса 26,000 Da |
| Неорганические соединения |
| Hydroxyapatite гидроксиаппатит | Ca5(OH)(PO4)3 , диаметр частиц < 200 нм |
| β-tricalcium phosphate β-трикальцияфосфат | Ca3(PO4)2 |

# Заключение

В данной работе было рассмотрено множество вариантов применения электроспиннига для создания клеточных матриц в целях тканевой инженерии.

Анализируя техническую сторону процесса электроспиннинга можно сделать вывод, что на конечную структуру продукта влияют такие показатели как: свойства раствора - вязкость, элеткропроводность, поверхностное натяжение; и контролируемые переменные, такие как скорость подачи полимера, величина электрического напряжения, расстояние между иглой и коллектором, а так же условия окружающей среды - температура и влажность. Вдобавок можно отметить, что данные параметры влияют не только на структуру продукта но и друг на друга. Так, при увеличении вязкости раствора приходится увеличивать напряжение электрического тока для преодоления увеличившихся сил поверхностного натяжения и уменьшать дистанцию до приемного коллектора из-за меньшей податливости струи. При снижении скорости подачи раствора придется уменьшить скорость вращения приемного коллектора, иначе струя будет обрываться. При увеличении и скорости подачи раствора и скорости вращения коллектора возможно создание параллельных волокон. Иглы с большим диаметром лучше подходят для элеткроспиннига растворов с большей концентрацией полимера, т.е. с большей вязкостью и большим поверхностным натяжением. Обычно параметры процесса электроспиннига варьируют от 10 до 30 кВ для напряжения электрического тока, от 10 до 30 см для расстояния от иглы до приемного коллектора (или 0,5-2,0 кВ на 1 см расстояния), 18-27G для диаметра иглы, от 30-3000 об/мин для скорости вращения приемного коллектора и 0,5-10 мл/час для скорости подачи раствора. Изменяя данные параметры возможно создание трехмерных матриц с желаемой архитектоникой. Диаметр волокна и размер пор конструкций можно варьировать от нано- до микрометров. Так же в существенном диапазоне возможно изменение общей порозности матрицы. Вдобавок немало важно для инженерии определенных видов тканей возможность создания параллельных волокон внутри конструкции.

Одним из достоинств электроспиннига является возможность применения большого количества материалов для создания клеточных матриц. Синтетические полимеры(поли-L-лактид, поликапролактон, полилактид-ко-гликолид, полиэтиленоксид) на выходе дают гидрофобную конструкцию механически прочную и часто излишне эластичную. Время биодеградации таких матриц может варьировать от нескольких месяцев до нескольких лет, что так же удобно при производстве различных типов тканей. Добавление в раствор белков естественного внеклеточного матрикса(коллаген, желатин, шелк, хитин, хитозан) изменяет эластичность конструкций и их механическую прочность на разрыв. Использование сигнальных молекул для создания биодеградирующих матриц не влияет на ее механические свойства, но оказывает существенное воздей ствие на поведение клеток в культуре.

Изучение роста культур различных клеток на полученных матрицах дало возможность заключить, что все перечисленные выше параметры существенно влияют на адгезию, пролиферацию, дифференцировку и морфологию клеточных элементов. Так, клетки лучше всего взаимодействуют с фибриллами диаметр которых, сопоставим с ними по размерам. Увеличение размеров пор способствует инфильтрации клеток вглубь конструкции и ангиогенезу. Однонаправленное расположение волокон задает направление элонгации клеток и роста их отростков. Добавление в матрицы белков естественного внеклеточного матрикса положительно влияет на адгезию, пролиферацию и дифференцировку клеток, а также делает конструкции более гидрофильными, что важно для многих видов тканей.

Таким образом, электроспиннинг позволяет создавать конструкции пригодные для клеточного роста, а следовательно и создания на их основе тканеинженерных эквивалентов тканей. Ввиду большого количества наработанных материалов и методов возможных к применению на данный момент, дальнейшее производство должно двигаться по пути тщательной отработки протоколов создания готовой продукции, содержание которых будет зависеть от конкретного создаваемого вида ткани.

# Список используемой литературы

электроспиннинг матрикс тканевый инженерия

1. Faghihi, F., Eslaminejad, M.B., The effect of nano-scale topography on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells.// Biomedical papers. - 2014. - Vol. 158(1). - pp. 005-016. ИФ= 0.99

. Effect of scaffold microarchitecture on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells/ Phadke, A., Hwang, Y., Kim. S.H., and oth. / European Cells and Materials-2013.- Vol. 25. - рр.114-129. ИФ=3,028

. Polymeric Nanofibers in tussie engineering./ Dahlin, R.L., Kasper, F.K., Mikos, A.G./ Tissue Engineering. - 2011.- Vol. 17. ИФ= 4,022

. Holzwarth, J.M., Ma, P.X., Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering.// Biomaterials. - 2011. - N. 32. - pp. 9622-9629. ИФ=8.312

. Electrospinning of PLGA/gelatin randomly- oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering/ Meng, Z.X., Wang, Y.S., Ma, C., Zheng, W., Li, L., Zheng, Y.F.// Materials Science and Engineering. - 2010. - Vol. 30. - pp. 1204-1210. ИФ=5,868

. Doshi J., Reneker D.H., Electrospinning Process and Applications of Electrospun Fibers.// Journal of Electrostatics. - 1995. - Vol. 35. - pp. 151-160. ИФ= 1.265

. Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering/ F. Yang, R. Murugan, S. Wang, S. Ramakrishna/ Biomaterials. - 2005. - Vol. 26. - pp. 2603-2610. ИФ=8.312

. Mesenchymal stem cell differentiation to neuronal cells on electrospun nanofibrous substrates for nerve tissue engineering/ Prabhakaran M.P., Jayarama R.V., Ramakrishna S./ Biomaterials. - 2009. - Vol. 30. - pp. 4996-5003. ИФ=8.312

. Electrospun Fibrous Mats with High Porosity as Potential Scaffolds for Skin Tissue Engineering/ Zhu X., Cui W., Li X., Jin Y./ Biomacromolecules. - 2008. - Vol. 9. - pp. 1795-1801. ИФ= 5.37

. Electrospun poly(lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds for skin tissue engineering./ Kumbar S.G., Nukavarapu S.P., James R., Nair L.S., Laurencin C.T./ Biomaterials. - 2008. - Vol. 29. - pp. 4100-4107. ИФ=8.312

. Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution./ E.J. Chong, T.T. Phan, I.J. Lim, Y.Z. Zhang, B.H. Bay, S. Ramakrishna, C.T. Lim./ Acta Biomaterialia. - 2007. - Vol.3. - pp. 321-330. ИФ= 2,914

. Analysis of graft healing in a new elastomer-coated vascular prosthesis./ Granke K, Ochsner JL, McClugage SG, Zdrahal P./ Cardiovasc Surg. - 1993. - Vol.1. - pp. 54-61.

. Dynamics of extracellular matrix produc-tion and turnover in tissue engineered cardiovascular structures./ Stock U.A., Wiederschain D.G., Kilroy S.M., Shum-Tim D., Khalil P.N., Vacanti J.P../ Cel Biochem - 2001. -Vol 2. - pp. 22-28.

. Design of scaffolds for blood vessel tissue engineering using a multi-layering electrospinning technique./ Vaz C.M., van Tuijl S., Bouten C.V.C., Baaijens F.P.T./ Acta Biomaterialia. - 2005. - Vol. 1. - pp. 575-582. ИФ= 2,914

. Bilayered scaffold for engineering cellularized blood vessels./ Ju Y.M., Choi J.S., Atala A., Yoo J.J., Lee S.J./ Biomaterials. - 2010. - Vol. 31. - pp. 4313-4321. ИФ=8.312

. Development of a composite vascular scaffolding system that withstands physiological vascular conditions./ Biomaterials. - 2008. - Vol. 29. - pp. 2891-2898. ИФ=8.312

. Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs./ Zong X., Bien H., Chung C-Y., Yin L., Fang D., Hsiao B.S., Chu B., Entcheva E./ Biomaterials. - 2005. - Vol. 26. - pp. 5330-5338. ИФ=8.312

. Electrospun biocomposite nanofibrous patch for cardiac tissue engineering./ Prabhakaran M. P., Kai D., Ghasemi-Mobarakeh L., Seeram Ramakrishna S./ Biomedical Materials. - 2011. - Vol. 6. - pp. 1748-1760. . ИФ= 2.922

. Micro and nano-scalein vitro 3D culture system for cardiac stem cells./ Hosseinkhani H., Hosseinkhani M., Hattori S., Matsuoka R., Kawaguchi N./ Journal of Biomedical Materials Research. - 2011. -Vol. 94. - pp. 1-8. ИФ= 2.328

. Electrospun PLGA nanofiber scaffolds for articular cartilage reconstruction: mechanical stability, degradation and cellular responses under mechanical stimulation in vitro./ Shin H.J., Lee C.H., Cho I.H., Kim Y.J., Lee Y.J., Kim I.A., Park K.D./ Journal of Biomaterials Science. - 2006. - Vol. 17. - pp 113-119. ИФ= 1.70

. Electrospun PLGA nanofiber scaffolds for articular cartilage reconstruction: mechanical stability, degradation and cellular responses under mechanical stimulation in vitro./ Shield M.S., Beckman M.T., Bowlin G.L., Wayne J.S./ Tissue Engineering. - 2004. - Vol.10. - pp.1510-1517. ИФ= 4,022

. The effect of elastin on chondrocyte adhesion and proliferation on poly (3-caprolactone)elastin composites./ Annabi N., Fathi A., Mithieux S.M., Martens P., Weiss A.S., Dehghani F./ Biomaterials. - 2011. -Vol. 32. - pp.1517-1525. ИФ=8.312

. Intervertebral Disc Tissue Engineering Using a Novel Hyaluronic Acid-Nanofibrous Scaffold (HANFS) Amalgam./ Nesti L.J., Li W.J., Shanti R.M., and oth./ Tissue Engineering. - 2008. - Vol.14. - pp. 1527-1535. ИФ= 4,022

. Nanobioengineered Electrospun Composite Nanofibers and Osteoblasts for Bone Regeneration./ Venugopal V.R., Low S., Choon A.T., Kumar B., Ramakrishna S./ Artificial Organs. - 2008. - Vol. 35. - pp. 388-397. ИФ= 1.87

. Increasing the pore sizes of bone-mimetic electrospun scaffolds comprised of polycaprolactone, collagen I and hydroxyapatite to enhance cell infiltration/ Phipps M.C., Clem W.C., Grunda J.M., Clines G.A., Bellis S.L./ Biomaterials. - 2012. - Vol. 33. - pp. 524-534. ИФ=8.312

. Fabrication and Characterization of Electrospun PLGA/MWNTs/Hydroxyapatite Biocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering./ Zhang H., Chen Z./ Journal of Bioactive and Compatible Polymers. - 2010. -Vol.25. - pp. 241-255. ИФ= 2.5

. Optimized Bone Regeneration Based on Sustained Release From Three-Dimensional Fibrous PLGA/Hap Composite Scaffolds Loaded with BMP-2/ Fu Y.C., Hemin Nie H., Ho M.L, Wang C.K., Wang C.H./ Biotechnology and Bioenginering. - 2007. - Vol. 99. - pp. 996-1006. ИФ= 4.164

. Electrospun PLLA Nanofiber Scaffolds and Their Use in Combination with BMP-2 for Reconstruction of Bone Defects./ Schofer1 M.D., Roessler1 P,P.,Schaefer J. and oth./ PLoS ONE. - 2011. - Vol. 6. - pp. 1-9. ИФ=3,53

. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering./ Lia C., Veparia C., H.J., Kim H,J,,, Kaplan D.L./ Biomaterials. - 2006. - Vol. 27. - pp. 3115- 3124. ИФ=8.312

. In Vivo Response of Polylactic Acid-Alginate Scaffolds and Bone Marrow-Derived Cells for Cartilage Tissue Engineering./ Wayne J.S., McDowell C.L. Shields K.J., Tuan R.S./Tissue Engineering. - 2005. - Vol. 11. - pp. 953-963. ИФ= 4,022

. Preparation of chitosan/PLA blend micro/nanofibers by electrospinning./ Xu J., Zhang J., Gao W., Liang H., Wang H., Li W./ Materials Letters. - 2009. - Vol. 63. - pp. 658-660. ИФ=2.269

. Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method./ Gautam S., Dinda A.K., Mishra N.C./ Materials Science and Engineering C. - 2013. - Vol. 33. - pp. 1228-1235. ИФ=5,868

33. Increasing the pore sizes of bone-mimetic electrospun scaffolds comprised of polycaprolactone, collagen I and hydroxyapatite to enhance cell infiltration./ Phipps M.C., Clem W.C., Grunda J.M., Clines G.A., Bellis S.L./ Biomaterials. - 2012. - Vol. 33. - pp. 524-534. ИФ=8.312

. The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering./Ngiam M., Liao S., Patil A.J., Cheng Z., Chan C.K., Ramakrishna S./ Bone. - 2009. - Vol. 45. - pp. 4-16.

. Electrospun composite poly(L-lactic acid)/tricalcium phosphate scaffolds induce proliferation and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells./ McCullen S.D., Zhu Y.Z., Bernacki S.H., Narayan1 R.J., Pourdeyhimi B., Gorga R.E., Loboa E.G./ Biomedical Materials. - 2009. - Vol. 4. - 9 pp. ИФ= 2.922

. Fabrication, characterization and in vitro drug release behavior of electrospun PLGA/chitosan nanofibrous scaffold./ Menga Z.X., Zhenga W., Li L., Zheng Y.F./ Materials Chemistry and Physics. - 2011. - Vol. 125. - pp. 606-611. ИФ=2,129