

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа 133 с., 27 рис., 27 табл., 109 источников, 1 прил.

Ключевые слова: тканеинженерные матриксы, полимолочная кислота, гиалуроновая кислота, моноциты, макрофаги, ангиогенез, HUVEC

Объектом исследования являются тканеинженерные матриксы на основе полимолочной кислоты с высокомолекулярной гиалуроновой кислотой, иммобилизованной на поверхности.

Цель работы – исследование влияния тканеинженерных матриксов на основе полимолочной кислоты, полученных методом электроспиннинга, с иммобилизованной на поверхности гиалуроновой кислотой путем их обработки нетермической плазмой атмосферного давления на первичные макрофаги человека.

В процессе исследования проводились: изучение физико-химических свойств тканеинженерных матриксов методами спектроскопии КР, СЭМ, измерение смачиваемости поверхности матриксов, исследование влияния матриксов на выделение M1- и M2-ассоциированных цитокинов макрофагами методом ELISA, исследование влияния матриксов на экспрессию CHI3L1 методом qRT-PCR, исследование влияния матриксов на ремоделирование экстрацеллюлярного матрикса макрофагами методом ELISA, исследование влияния матриксов на *in vitro* ангиогенез на клетках HUVEC. Проведена оценка ресурсоэффективности проекта, а также разработаны мероприятия по охране труда и защите окружающей среды.

В результате исследования было показано, что реакции макрофагов на тканеинженерные матриксы являются донор-специфичными. Матриксы с наименьшим количеством гиалуроновой кислоты являются наиболее биосовместимыми, так как не стимулируют секрецию провоспалительных цитокинов и не ингибируют секрецию противовоспалительных цитокинов первичными макрофагами человека. Тканеинженерные матриксы с иммобилизованной гиалуроновой кислотой стимулируют ангиогенез. Показано, что предложенный набор маркеров может быть использован для *in vitro* диагностики с целью персонализированного подбора материала медицинского изделия, а полученные результаты могут быть использованы для создания smart-имплантатов.

Степень внедрения: результаты работы опубликованы в 2 журналах, индексируемых SCOPUS и WoS (ИФ=3,088; 0,49), 1 журнале из списка ВАК, 14 тезисах конференций; представлены на 9 российских и 5 международных конференциях (Россия, Испания, США, Чехия, Германия), отмечены золотой медалью на 9-ом Международном биотехнологическом Форуме-выставке "РосБиоТех-2015". Работа поддержана компанией Pfizer, получен грант РФФИ 16-33-00528 мол_а. По результатам работы подано 2 заявки на патенты РФ (№ 2015154342, № 2015154344).

Область применения: трансляционная медицина, регенеративная медицина

Экономическая эффективность/значимость работы: проведенное исследование имеет коммерческий потенциал в сфере диагностических услуг и имплантологии.

В будущем планируется изучение влияния макрофагов на процесс деградации скаффолдов и исследование влияния полученных материалов на внутриклеточные механизмы провоспалительного программирования первичных человеческих макрофагов.

Оглавление

Введение	13
1. Обзор литературы	16
1.1 Тканеинженерные матриксы и вопросы биосовместимости	16
1.2 Материалы, используемые для создания тканеинженерных матриксов	20
1.3 Методы создания тканеинженерных матриксов	23
1.4 Модифицирование поверхности матриксов в плазме атмосферного давления	25
1.5 Гиалуроновая кислота и ее биологическая активность	26
1.6 Выбор метода оценки иммунного ответа	29
2. Объект и методы исследования	32
2.1 Объект исследования	32
2.2 Методы исследования	35
3. Расчеты и аналитика	46
4. Результаты проведенного исследования	47
4.1 Исследование жизнеспособности клеток	47
4.2 Исследование влияния матриксов на выделение M1-ассоциированных цитокинов макрофагами	48
4.3 Исследование влияния матриксов на выделение M2-ассоциированных цитокинов макрофагами	55
4.4 Исследование влияния матриксов на ремоделирование ЭЦМ макрофагами	57
4.5 Предполагаемая гипотеза и обсуждение результатов	60
4.6 In vitro ангиогенез	65
5. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	68
5.1 Оценка коммерческого и инновационного потенциала НТИ	68
5.2 Планирование исследования	76
5.3 Расчет бюджета исследования	82
5.4 Определение ресурсной, финансовой, и экономической эффективности исследования	93
6. Социальная ответственность	97
6.1 Производственная безопасность	98
6.2 Экологическая безопасность	111
6.3 Безопасность в чрезвычайных ситуациях	113
6.4 Правовые и организационные мероприятия обеспечения безопасности	
Выводы	118
Список публикаций студента	119
Список использованных источников	123
Приложение 1	134
CD диск. Магистерская диссертация (файл Станкевич.docx в формате Microsoft Word)	155

Введение

На сегодняшний день в случае тяжелых заболеваний, дефектов и поражений внутренних органов самым распространенным путем спасения жизни пациента является трансплантация донорских органов [1]. Однако, несмотря на достигнутые успехи, данный подход имеет ряд недостатков, которые значительно сокращают сферу и эффективность его применения: ограниченное количество доступного биологического материала, тканевая несовместимость, проблемы консервации и хранения трансплантируемого материала, значительные финансовые затраты, связанные с процедурой трансплантации. Для многих заболеваний и травм, которые приводят к потере органа или функции ткани, до сих пор нет способов решения, которые позволили бы восстановить эти функции и обеспечить для пациентов желательное качество жизни.

Альтернативой классическим материалам для трансплантологии являются биомедицинские клеточные и тканеинженерные продукты для замещения тканей и органов. По данным Стратегии развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 года [2], такой подход является одним из основных направлений развития восстановительной и регенеративной медицины.

Регенеративная медицина подразумевает выращивание тканей и органов в условиях *in vitro* с последующей пересадкой в тело [3]. Данная революционная технология имеет мощный потенциал при лечении прежде неизлечимых болезней – таких, как сахарный диабет, сердечно-сосудистые патологии, хроническая почечная недостаточность, остеопороз, повреждение спинного мозга и др.

Однако для создания тканеинженерных конструкций необходим трехмерный каркас, который будет являться шаблоном для роста ткани, – матрикс или скаффолд (англ. scaffold). Создание подобных каркасов является комплексной задачей, так как должно быть обеспечено эффективное

взаимодействие между тремя компонентами: самим каркасом, который обеспечивает пространственное расположение клеток, клетками, которые образуют новую ткань на каркасе, и сигнальными молекулами, такими как факторы роста, которые направляют процесс дифференцировки клеток [4].

Успешная интеграция скаффолда в организме возможна только при условии отсутствия воспалительных и аллергических реакций иммунной системы человека. Среди клеток, отвечающих за формирование иммунного ответа, главную роль играют макрофаги [5].

Целью данной работы является исследование влияния тканеинженерных матриц на основе полимолочной кислоты, полученных методом электроспиннинга, с иммобилизованной на поверхности гиалуроновой кислотой путем их обработки нетермической плазмой атмосферного давления на первичные макрофаги человека.

Объектом исследования являются тканеинженерные матрицы. Предмет исследования – метод оценки реакции первичных макрофагов человека на тканеинженерные матрицы.

Научная новизна данной работы заключается в том, что впервые исследованы реакции первичных макрофагов человека на тканеинженерные матрицы с использованием следующего набора маркеров: $\text{TNF}\alpha$, IL6, IL8, IL1 β , IL10, IL1ra, CCL18, TGF β , MMP7, MMP9 и YKL40 (CHI3L1), а также влияние тканеинженерных матриц на формирование капиллярных трубок HUVEC (*in vitro* ангиогенез).

Практическая значимость результатов работы состоит в том, что предложенная тест-система может применяться для *in vitro* оценки биосовместимости тканеинженерных матриц и других изделий медицинского назначения в контексте персонализированной медицины. Полученные данные могут быть использованы для создания smart-имплантатов - биоматериалов с программируемыми физико-химическими и иммуномодулирующими свойствами.

Результаты работы опубликованы в 2 журналах, индексируемых SCOPUS и WoS (ИФ=3,088; 0,49), 1 журнале из списка ВАК, 14 тезисах конференций; представлены на 9 российских и 5 международных конференциях (Россия, Испания, США, Чехия, Германия), отмечены золотой медалью на 9-ом Международном биотехнологическом Форуме-выставке "РосБиоТех-2015". Работа поддержана компанией Pfizer, получен грант РФФИ 16-33-00528 мол_а "Разработка фундаментальных подходов к созданию биоразлагаемых материалов, способных влиять на клетки иммунитета человека" (2016-2017). По результатам работы подано 2 заявки на патенты РФ (№ 2015154342, № 2015154344).

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю – Виктору Дмитриевичу Филимонову за ценные советы, идеи и поддержку в течение выполнения работы.

Автор благодарит своего научного руководителя – Сергея Ивановича Твердохлебова за плодотворное сотрудничество и содействие в проведении экспериментов.

Автор благодарит профессора Университета г. Гейдельберг проф. Юлию Кжышковска за возможность проводить собственные исследования, а также Ph.D.-студента г-на Tengfei Liu и постдока, Ph.D. г-на Vladimir Riabov за всестороннюю помощь во время пребывания в Университете г. Гейдельберг.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП № 14.578.21.0031 (уникальный идентификатор RFMEFI57814X0031), РНФ № 16-13-10239, гранта European Union's Seventh Framework Programme for research, technological development and demonstration under grant agreement № 602694.

1. Обзор литературы

1.1 Тканеинженерные матриксы и вопросы биосовместимости

По определению, данному Murugan et al., тканеинженерный матрикс (скаффолд) представляет собой временную конструкцию, служащую каркасом для выращивания тканей *in vitro* [6]. Трехмерная структура матрикса позволяет клеткам пролиферировать, мигрировать и дифференцироваться в трех пространственных направлениях, в результате чего происходит формирование ткани, подобной существующей в живом организме. Тканеинженерный матрикс является основным элементом регенеративной медицины, так как позволяет восстанавливать или замещать утраченные ткани и органы. Существует три базовые стратегии, основанные на применении скаффолда: 1) использование скаффолдов в качестве матрицы, заполняющей свободное пространство, образовавшееся в результате травмы (кондуктивная функция); 2) использование скаффолдов в качестве системы адресной доставки лекарств/биологически активных молекул (индуктивная функция); 3) использование скаффолдов в качестве трехмерной платформы для выращивания тканей *in vitro* из клеток реципиента с последующей имплантацией [7].

В существующих работах Chen et al. и O'Brien сформулировали ряд основных принципов дизайна тканеинженерных матриксов [8-9]:

- поверхность матрикса должна способствовать адгезии клеток, их росту и поддерживать определенное направление дифференцировки;
- скаффолд должен быть биосовместимым; ни сам материал скаффолда, ни продукты его деградации не должны быть токсичными;
- скаффолд должен быть биodeградируемым и, в конечном счете, полностью элиминироваться в организме;
- скаффолд должен обладать механическими свойствами, позволяющими ему выполнять поддерживающие функции до завершения процесса

восстановления; при этом должен быть баланс между достаточной пористостью и механическими свойствами;

- размер пор должен быть достаточным, чтобы позволить клеткам мигрировать внутрь скаффолда;
- технология создания скаффолда должна обеспечивать воспроизводимость результата.

Таким образом, можно выделить три группы свойств тканеинженерных матриксов, которые необходимо проанализировать перед тем, как говорить о потенциальном применении скаффолдов [7]:

- 1) физико-химические свойства (модуль сжатия и упругости, пористость, скорость набухания, химический состав);
- 2) способность к деградации (продукты деградации, скорость деградации, температура деградации, влияние гидролиза и ферментативной деградации);
- 3) биологические свойства.

Так как тканеинженерные матриксы предназначены для применения в медицинских целях, оценка их биологических свойств, в том числе биосовместимости, играет ключевую роль в их дальнейшем использовании.

Несмотря на большой клинический потенциал, тканеинженерный скаффолд, как и любое имплантируемое медицинское изделие, является инородным телом для человеческого организма. В васкуляризированной ткани на присутствие инородного тела отвечают в первую очередь клетки иммунной системы. После имплантации скаффолда на его поверхность из крови адсорбируется слой белков, в том числе альбумин, фибриноген, фрагменты комплемента C3b и неспецифические антитела [10]. Так как в ходе имплантации происходит разрушение тканей и сосудов, резидентные тучные клетки выбрасывают гистамин и провоспалительные цитокины. Это приводит к инфильтрации и адгезии таких клеток, как нейтрофилы, моноциты и макрофаги, в место имплантации. Они, в свою очередь, выделяют еще провоспалительные цитокины, усиливая воспаление. При этом они также

секретируют ряд проангиогенных факторов, а также цитокины и хемокины, которые привлекают к месту воспаления клетки, необходимые для восстановления тканей: фибробласты, мезенхимальные стволовые клетки и т.д. Эти клетки депонируют коллагеновый матрикс и инкапсулируют биоматериал в слое фиброзной ткани [5].

Среди клеток, отвечающих за формирование иммунного ответа, главную роль играют макрофаги. Макрофаги мигрируют в место имплантации, где они активируются и демонстрируют спектр состояний фенотипической поляризации, обусловленных их функциональными особенностями. На одном конце этого спектра M1, или классически активированные макрофаги, а на другом - M2, или альтернативно активированные макрофаги [11-14]. M1 фенотип возникает в результате контакта макрофагов с провоспалительными сигналами, такими как IFN γ или бактериальный LPS [12]. У классически активированных макрофагов активируются такие пути транскрипции, как STAT1 и NF- κ B; они выделяют ряд провоспалительных цитокинов - TNF α , IL1 β , IL6 и IL12 [14], а также соединения, содержащие активный кислород (ROS), такие как NO [15]. Перечисленные цитокины способны индуцировать быстрое развитие воспаления и цитотоксические реакции. Данные процессы характеризуются активацией NK клеток, CD8⁺ цитотоксичных лимфоцитов и привлечением нейтрофилов [14]. Альтернативно активированные, или M2 макрофаги, делятся на несколько подтипов - M2a, M2b, M2c, среди которых M2a (индуцируемые IL4, IL13) и M2b (индуцируемые LPS, IL1 β) выполняют регуляторные функции, а M2c (индуцируемые IL10, TGF β) играют главную роль в процессах восстановления тканей и подавления воспалительных реакций [16-19]. M2 макрофаги характеризуются активацией транскрипционного пути STAT6, а также экспрессией эндоцитотических рецепторов stabilin-1 и маннозного рецептора CD206 [20]. Они выделяют противовоспалительные цитокины, такие как IL10, IL1ra и CCL18 [17-19].

Макрофаги обладают высокой пластичностью и способны изменять фенотип в зависимости от внешних сигналов [21]. Например, выделение TNF α

и IL12 M1 макрофагами, полученными в результате стимуляции LPS, значительно снижается в присутствии IL-4 [22]. Таким образом, присутствие тканеинженерного матрикса потенциально способно изменять соотношение M1:M2 в ту или иную сторону. При этом, продолжительное присутствие M1 макрофагов ведет к обширному воспалению и формированию фиброзной капсулы вокруг материала. В результате в месте имплантации формируется хроническое воспаление, что, в конечном счете, может привести к отторжению имплантата и необходимости его извлечения [5]. Тканеинженерные матриксы в этом случае оказываются бесполезны, поскольку не могут выполнять свои функции замещения утраченных тканей [23]. Длительное присутствие M2 макрофагов также может приводить к отрицательным последствиям, таким как появление гигантских клеток и макрофагов, находящихся в состоянии фрустрированного фагоцитоза, вызванного невозможностью деградировать чужеродное тело [10]. Кроме этого, несмотря на то, что M2 макрофаги все же являются более предпочтительным фенотипом в контексте взаимодействия с матриксами, они участвуют в развитии аллергических реакций и рака, а выделяемый ими цитокин CCL18 способствует поддержанию хронического воспаления [24]. Специфические макрофагальные рецепторы и механизмы распознавания ими биоматериалов практически не описаны. Известно, что макрофаги способны распознавать адсорбировавшиеся на поверхность материала белки (процесс описан выше) за счет интегринов, например, Mac-1 или Arg-Gly-Asp (RGD)-распознающих интегринов $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$ и $\alpha 5 \beta 1$ [25-26]. Интегрины отвечают не только за первичную адгезию макрофагов на поверхность биоматериала, но и за формирование воспалительных реакций и степень фиброзного капсулирования [25]. Также макрофаги способны напрямую взаимодействовать с поверхностью матрикса за счет Толл-подобных рецепторов (TLR) [14]. Известно, что катионные полимеры, такие как полиэтиленмин, полилизин, декстран и желатин способны лигировать TLR4 [26]. Из-за недостатка фактов практически невозможно предсказать реакцию макрофагов на находящиеся в разработке скаффолды и то, как материал

повлияет на их фенотип. В связи с этим, исследуя вопросы биосовместимости, необходимо в первую очередь изучить влияние тканеинженерного матрикса на макрофаги человека с целью выявления как потенциальных проблем, так и оптимальных физико-химических свойств, позволяющих контролировать M1:M2 баланс. Полученные в результате подобного исследования данные могут быть использованы для создания smart-имплантатов - биоматериалов с программируемыми физико-химическими и иммуномодулирующими свойствами.

Так как целью данной работы является исследование влияния тканеинженерных матриксов на основе полимолочной кислоты, полученных методом электроспиннинга, с иммобилизованной на поверхности гиалуроновой кислоты путем их обработки нетермической плазмой атмосферного давления на первичные макрофаги человека, в следующих разделах будет дана характеристика данных материалов и методов и известные факты об их влиянии на макрофаги (или другие клетки иммунной системы).

1.2 Материалы, используемые для создания тканеинженерных матриксов

Материалы, используемые для создания тканеинженерных матриксов можно разделить на четыре большие группы [27]:

- 1) синтетические органические материалы: алифатические полиэфиры, полиэтиленгликоль и др.;
- 2) синтетические неорганические материалы: гидроксиапатит, трикальцийфосфат, стеклокерамика и др.;
- 3) органические материалы природного происхождения: коллаген, желатин, хитозан, шелк, гиалуроновая кислота и др.;
- 4) неорганические материалы природного происхождения: коралловый гидроксиапатит и др.

Среди представленных групп, синтетические органические материалы представляют особый интерес, поскольку они обладают рядом преимуществ:

- 1) доступность (по сравнению с материалами природного происхождения);
- 2) возможность получать материалы с разными, заведомо известными, свойствами [28];
- 3) исключается потенциальная возможность вирусного заражения (по сравнению с материалами природного происхождения);
- 4) широкая область использования (неорганические материалы применяют, как правило, для регенерации костной ткани);
- 5) контролируемая скорость деградации (скаффолды из материалов природного происхождения зачастую деградируют слишком быстро) [29];

Из группы синтетических материалов широкое применение нашли биodeградируемые полимеры, со временем полностью замещающиеся на новые ткани. Наиболее распространенным полимером из этого класса является полимолочная кислота (ПМК) (рис. 1) [30].

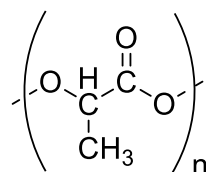


Рисунок 1 - Структурная формула полимолочной кислоты

ПМК в процессе деградации образует мономер, являющийся для организма естественным метаболитом. Молочная кислота входит в цикл трикарбоновых кислот и, в конечном счете, разлагается до углекислого газа, который утилизируется через легкие, и воды. В альтернативном варианте, молочная кислота может метаболизироваться в печени, превращаясь в гликоген. Кроме этого, ПМК легко подвергается переработке; материалы на ее основе могут быть получены методом литья, экструзии, формования, распыления при высоких температурах или под давлением. Варьируя молекулярную массу ПМК и ее степень кристалличности, возможно создавать материалы с большим диапазоном механических характеристик. Производство

ПМК является экологически чистым и ресурсоэффективным. ПМК имеет высокую биосовместимость и одобрена FDA для клинического использования. Несмотря на явные преимущества, медицинские материалы на основе ПМК обладают рядом недостатков, таких как гидрофобность, снижающая эффективность взаимодействия поверхности материала с клетками, относительно низкая скорость биodeградации, хрупкость, недостаток реакционноспособных групп/сигнальных групп, обеспечивающих клеточное распознавание, на поверхности материала [30]. Это ограничивают применение ПМК для создания тканеинженерных матриц.

Ряд работ посвящен изучению реакции клеток иммунитета на ПМК с использованием *in vitro* и *in vivo* моделей. Различными группами на трех клеточных линиях - 2D J774 мышинных макрофагоподобных клетках, 2D крысиных брюшных макрофагах и HL-60 было показано, что наночастицы из сополимера молочной и гликолевой кислот вызывают каскад воспалительных реакций, стимулируя секрецию TNF α и IL1 β в острой фазе воспаления [31-33]. В работе Parks et al. при добавлении сополимера молочной и гликолевой кислот в кокультуру фибробластов и моноцитов наблюдали повышение секреции TNF α , IL1 β , IL6 и GM-CSF [34]. Zhu et al. показали, что сополимер молочной и гликолевой кислот стимулирует созревание дендритных клеток *in vitro* [35]. Однако в процессе хронического воспаления ПМК играет иную роль. На первичных макрофагах человека нами было показано, что ПМК снижает секрецию TNF α (маркера M1 макрофагов), при этом стимулирует экспрессию stabilin-1 (маркера M2 макрофагов) [36]. Vos et al. было показано, что в результате подкожной имплантации ПМК крысам в области спины на 143 недели не было обнаружено стимуляции воспаления. Было отмечено, что финальная стадия деградации ПМК сопровождается усилением воспалительных реакций, однако при этом не происходит формирования гигантских клеток [37].

Таким образом, ПМК обладает всеми необходимыми свойствами, позволяющими использовать этот полимер для создания тканеинженерных

матриков [38]. Однако, указанные ранее недостатки, а также наличие воспалительного клеточного ответа в острой фазе, ограничивают ее применение. Эти недостатки могут быть компенсированы как применением определенного способа формирования скаффолда, так и его последующим модифицированием.

1.3 Методы создания тканеинженерных матриков

Несмотря на достижения в области технологии изготовления скаффолдов, способы их создания постоянно совершенствуются с целью наиболее точного копирования структуры восстанавливаемых тканей. Так, тканеинженерные матриксы можно создать, связывая полимерные волокна в точке их пересечения вторичным полимером [39]. Сублимационная сушка замораживанием позволяет контролировать направление роста пор, обеспечивая пористость свыше 90 %. Метод отливки скаффолдов из раствора эффективен для тонких мембран или для трехмерных образцов с очень узким сечением стенки [40], при этом существует опасность сохранения токсичных растворителей в материале. Для получения матриков с помощью процесса выщелачивания необходимы малые количества полимера, он достаточно легкий, однако невозможно регулировать размер пор и межпоровые отверстия [41]. Обработка высоким давлением сухого полимера приводит к формированию высокопористых матриков без использования органических растворителей. Такой процесс пригоден для термочувствительных полимеров [42], однако наблюдается недостаточная взаимосвязанность пор и образование непористой поверхности. Еще один метод, для которого не требуются органические растворители и высокая температура, – метод вспенивания газа, который позволяет получать макропористые скаффолды с однородным распределением пор, причем, регулируя степень реакции двух солей, генерирующих газ, можно управлять механической прочностью и пористостью [43]. Получение матриков методом разделения фаз под действием изменения

температуры легко объединяется с другими технологиями изготовления, но определяющими параметрами процесса являются температуры фаз и выбор растворителя [44]. Биodeградируемые пористые матриксы также могут изготавливаться посредством процесса трехмерного прототипирования [45].

Однако перечисленные методы недостаточно гибки и не позволяют формировать скаффолды с регулируемыми физико-химическими свойствами. В таких структурах генерация функциональных тканей не происходит на необходимом уровне, поскольку они зачастую неточно имитируют структуру естественного внеклеточного матрикса [46].

Формование скаффолдов из раствора позволяет путем изменения технологических режимов достаточно легко управлять физико-химическими свойствами получаемых материалов: пористостью, диаметром волокон, морфологией; вводимый в полимерный раствор наполнитель также позволяет менять физико-химические и биологические свойства матриксов.

Наиболее подходящим и широко используемым методом для изготовления тканеинженерных полимерных матриксов является электроспиннинг. Метод заключается в формировании нановолокон при приложении высокого постоянного напряжения порядка (10-20) кВ к полимерному раствору, выходящему из тонкого сопла под действием силы тяжести либо давления. Электроспиннинговые нановолокна изготавливают из различных синтетических полимеров, природных полимеров или их смеси, в том числе белков, нуклеиновых кислот и даже полисахаридов. Матриксы из ПМК, полученные методом электроспиннинга, характеризуются однородным (узким) распределением волокон по диаметру, высокими прочностными свойствами, высокой биосовместимостью [47]. Группой Sanders et al. было показано, что волокна матрикса на основе ПМК, полученного методом электроспиннинга, имеющие толщину от 1 до 5 мкм, вызывают минимальный иммунный ответ и формирование наиболее тонкой фиброзной капсулы при подкожной имплантации крысам [48]. Almeida et al. показали, что трехмерные скаффолды на основе ПМК с диагональными пораами вызывают меньший

иммунный ответ, чем с ортогональными [49]. При этом ими и другими группами было показано, что фенотип макрофагов зависит от пространственного расположения клеток по отношению к скаффолду. Кроме того, клетки обладают высокой метаболической активностью, в результате чего активируются как M1, так и M2 маркеры.

1.4 Модифицирование поверхности матриксов в плазме атмосферного давления

За последнее время был разработан ряд физических и химических методов модифицирования поверхности ПМК с целью улучшения биосовместимости и придания биологической активности [30].

Воздействие плазмой является простым и перспективным способом, позволяющим изменить свойства поверхности матриксов на основе ПМК без изменения их объёмных свойств [50]. Использование нетермической плазмы атмосферного давления является привлекательным методом модифицирования, благодаря таким преимуществам, как простое образование стабильной плазмы, низкая стоимость и высокая производительность. В зависимости от того, в каком газе происходит разряд, на поверхности полимера можно генерировать различные функциональные группы (амино-, гидроксильные группы и т.д.), что способствует увеличению гидрофильности поверхности, и, как следствие, клеточной адгезии и биосовместимости [51]. В ряде работ было показано, что обработка плазмой, образующейся в результате разряда между электродами с диэлектрическим барьером (ДБР), может успешно применяться для модифицирования поверхности биodeградируемых полимеров, в том числе ПМК [52-54]. В работе Pankaj et al. было показано, что обработка пленок на основе ПМК ДБР плазмой приводит к увеличению шероховатости поверхности, паропроницаемости и температуры деградации [55]. В работе De Geyter et al. исследовали влияние ДБР плазмы на химический состав поверхностного слоя ПМК в зависимости от того, в каком газе происходит разряд. Было показано,

что использование гелия в качестве среды для генерации ДБР плазмы приводит к высокому содержанию азота на поверхности ПМК, тогда как использование воздуха - к высокому содержанию кислорода. При этом, при добавлении небольшого количества гелия в воздух захват азота на поверхность ПМК становится затруднен за счет наличия кислородсодержащих частиц в плазме [56].

В результате плазменной обработки на поверхности полимера образуются свободные радикалы, изменяется потенциал поверхности. Это приводит к увеличению смачиваемости и дает возможность иммобилизовать биологически активные соединения из водных растворов. В работе Sharma et al. удалось иммобилизовать фосфолипиды на поверхность полиуретана, обработанную ДРБ плазмой в атмосфере азота [57]. Группа Chandy et al. использовала модифицирование матриц на основе ПМК ДРБ плазмой для иммобилизации на их поверхность фибронектина. Было показано, что модифицированные матрицы стимулируют рост человеческих эндотелиальных клеток (обладают ангиогенными свойствами) [58].

Таким образом, использование ДРБ плазмы для модифицирования матриц на основе ПМК позволяет наносить на их поверхность соединения белковой природы из водных растворов, не изменяя при этом объемных свойств материалов. Одним из соединений с высокой биосовместимостью, способных значительно увеличить смачиваемость поверхности матриц на основе ПМК, а также придать им иммуномодулирующие свойства для подавления воспаления в острой фазе, является гиалуроновая кислота.

1.5 Гиалуроновая кислота и ее биологическая активность

Гиалуроновая кислота (ГА) представляет собой линейный анионный полисахарид из группы гликозаминогликанов, мономером которого является дисахарид - β -1,4-D-глюкуроновой кислоты- β -1,3-N-ацетил-D-глюкозамин (рис. 2). [59].

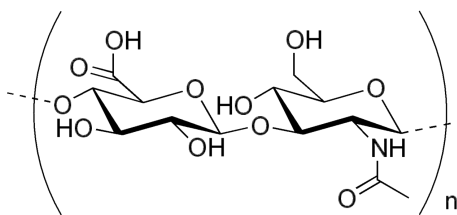


Рисунок 2 - Структурная формула гиалуроновой кислоты

Молекулы ГА очень гидрофильны, кроме того, в растворах они способны самоассоциироваться и образовывать трехмерные структуры, служащие скаффолдом для других белков экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) [60]. ГА является основным компонентом синовиальной жидкости, суставного хряща; входит в состав соединительной, эпителиальной и нервной тканей. За счет своих физико-химических свойств она поддерживает вязкость суставной смазки и эластичность тканей.

Среди трансмембранных рецепторов, способных взаимодействовать с ГА, одним из основных является CD44, экспрессируемый моноцитами, а также другими клетками [61]. Для присоединения ГА необходимо наличие «порогового» количества CD44 на поверхности клетки. Формирование кластера рецепторов обеспечивает более эффективное связывание CD44 с ГА [62]. Образование комплекса ГА-CD44 стимулирует миграцию иммунных клеток в место повреждения тканей, а также облегчает адгезию фибробластов, способствуя заживлению раны и восстановлению ЭЦМ [63]. Кроме CD44, ГА также способна присоединяться к RHAMM и ICAM-1. В результате взаимодействия с ГА активируется экспрессия RHAMM у кератиноцитов, макрофагов и мигрирующих фибробластов, что способствует реэпителизации. Образование комплекса ICAM-1-ГА может способствовать ICAM-1 опосредованной активации воспаления [62]. ГА участвует в каждой стадии процесса восстановления, начиная от ранней фазы и заканчивая формированием грануляционной ткани. В ранней фазе воспаления поврежденная ткань содержит большое количество ГА, которая играет роль

провоспалительного агента. ГА стимулирует выделение таких провоспалительных цитокинов, как $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ и IL8 [64]. С другой стороны, грануляционная ткань также содержит ГА. В этом случае ГА проявляет скавенжинг эффект благодаря своей полианионной природе, защищая клетки от разрушения свободными радикалами. Помимо этого общего механизма ГА способна модерировать воспаление через специфические взаимодействия: ГА связывается с комплексом TSG-6/ $\text{I}\alpha\text{I}$, ингибируя активацию плазмина, который запускает протеолитический каскад, приводящий к разрушению ткани. Таким образом, реализуется отрицательная обратная связь, приводящая к уменьшению воспаления [62].

Биологическая активность ГА зависит от ее молекулярной массы: высокомолекулярная ГА (ВМГА) проявляет противовоспалительные и антиангиогенные свойства, тогда как низкомолекулярная ГА (НМГА) имеет провоспалительную и проангиогенную активность [65]. Например, и ВМГА, и НМГА способны присоединяться к TLR2 и TLR4, экспрессируемые моноцитами и дендритными клетками. Однако, НМГА индуцирует воспаление, а ВМГА ингибирует его [63]. В работе Rayahin et al. на мышинных макрофагах было показано, что ВМГА направляет поляризацию макрофагов в M2 фенотип, даже если ранее они относились к фенотипу M1 [65].

Таким образом, иммобилизация высокомолекулярной ГА на поверхность тканеинженерных матриксов на основе ПМК с использованием нетермической плазмы атмосферного давления имеет следующие преимущества:

- 1) существенно увеличивается гидрофильность поверхности матриксов;
- 2) обработка плазмой позволяет ускорить скорость деградации ПМК;
- 3) матриксы приобретают противовоспалительные свойства.

1.6 Выбор метода оценки иммунного ответа

В табл. 1 кратко обобщены описанные ранее эффекты материалов, из которых состоит исследуемый матрикс, и методов обработки поверхности матрикса на макрофаги.

Таблица 1 - Влияние различных материалов и методов обработки поверхности матрикса на макрофаги

Рецепторы макрофагов, отвечающие за распознавание материала/типа поверхности		Влияние на макрофаги
Материал/соединение		
ПМК	?	В модели хронического воспаления $\text{TNF}\alpha\downarrow$, $\text{stabilin-1}\uparrow$
ВМГА	CD44, RHAMM, ICAM-1, TLR2 (?), TLR4	$\text{TNF}\alpha\downarrow$ $\text{IL1}\beta\downarrow$
НМГА	CD44, RHAMM, ICAM-1, TLR2, TLR4	$\text{TNF}\alpha\uparrow$ $\text{IL1}\beta\uparrow$ $\text{IL8}\uparrow$
Метод		
Электроспиннинг	?	Волокна толщиной 1-5 мкм и диагональные поры уменьшают толщину фиброзной капсулы
Поверхность, обработанная нетермической атмосферной плазмой	?	?

Таким образом, вопрос как о механизмах взаимодействия, так и о влиянии исследуемых матриксов на макрофаги остается открытым. Отдельную проблему представляет выбор метода исследования подобных свойств биоматериалов.

Оценка биосовместимости тканеинженерных матриксов представляет собой комплексную процедуру, включающую как *in vitro*, так и *in vivo* исследования, направленные на выявление цитотоксичности, раздражающего и сенсибилизирующего действия, общей токсичности, способности вызывать аллергические реакции, иммунотоксического действия. Основные принципы оценки биологического действия медицинских изделий описаны в положениях стандартов серии ИСО 10993 [66]. В оценку иммунотоксичности, согласно стандарту, входит определение воспаления, иммуносупрессии, иммуностимуляции, гиперчувствительности и аутоиммунности. В стандарте отдается предпочтение исследованиям *in vivo*, так как *in vitro* тесты считаются более ограниченными, поскольку в подобных моделях отсутствует сложность целостной иммунной системы. Однако результат исследований, проведенных на животных, не может быть напрямую перенесен на человека. К тому же, использование данного стандарта не позволяет учесть такие факторы, как наследственность, место имплантации, микросреда, реакция иммунной системы, присущие каждому конкретному пациенту. Проведение исследований на первичных макрофагах индивидуальных доноров позволяет учесть эти факторы. При этом, с одной стороны, можно дать персонифицированные рекомендации относительно исследуемого материала, а с другой - выявить общие тренды в клеточном ответе. Ранее нами была разработана *in vitro* тест-система, позволяющая моделировать взаимодействие биоматериалов с M0, M1 и M2 макрофагами, полученными в результате стимуляции IFN γ и IL4 для M1 и M2 фенотипа соответственно [36]. Подобная тест-система имеет преимущества по сравнению с использованием только M0, поскольку позволяет исследовать реакции макрофагов на всех этапах от фазы острого воспаления до заживления.

Таким образом, изучение влияния тканеинженерных матриксов на основе ПМК, полученных методом электроспиннинга, с иммобилизованной на поверхности гиалуроновой кислотой путем их обработки нетермической плазмой атмосферного давления на первичные макрофаги человека является актуальной задачей, так как позволит не только дать оценку биосовместимости

разрабатываемых материалов, но и расширить понимание об особенностях взаимодействия между макрофагами и биоматериалами в целом.

2. Объект и методы исследования

2.1 Объект исследования

Объектом исследования являются тканеинженерные матриксы на основе полимолочной кислоты с высокомолекулярной гиалуроновой кислотой ($M_n=2 \cdot 10^6$, Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd., Китай) иммобилизованной на поверхности. Данная часть работы выполнена совместно с Кудрявцевой В.Л. (группа 00м51, кафедра общей физики, ФТИ).

Для формирования нетканых материалов использовали 4% раствор поли-L-молочной кислоты PL38 (PURAC, Нидерланды) в хлороформе (ЭКРОС, Россия). Формирование нетканых материалов осуществляли методом электроспиннинга на установке NANON-01A® (МЕСС, Япония). В качестве сборочного коллектора использовали вращающийся цилиндр диаметром 100 мм и длиной 210 мм при следующих технологических режимах: скорость подачи раствора 6 мл/час, напряжение 20 кВ, расстояние между иглой и коллектором 190 мм, частота вращения сборочного коллектора 50 об/мин.

Для иммобилизации ГА на поверхности матриксов использовали плазму атмосферного давления. Модифицирование полимеров осуществлялось электродной системой с предыонизатором. Режимы облучения были следующими: частота следования импульсов - 500 Гц, напряжения импульса - 20 кВ, длительность импульса - 120 нс, энергия в импульсе - 0,3 Дж. Каждый образец крепился к аноду электродной системы, время облучения задавали 10 минут. ГА наносили из водных растворов 3 различных концентраций: 0,1%, 0,2% и 0,3%.

Смачиваемость поверхности матриксов водой исследовали на установке «EasyDrop» (Krüss, Германия) методом «сидячей» капли (объем 3 мкл) через 1 мин после помещения капли на поверхность. Исследования морфологии поверхности скаффолдов проводили методом сканирующей электронной микроскопии на приборе Quanta 400 FEG (FEI Company, США) с нанесением

проводящего покрытия из золота. Спектры комбинационного рассеяния для исходного и модифицированных матриксов представлены на рис. 3.

Для исследования влияния матриксов на первичные макрофаги человека использовали следующие матриксы размером 1 на 1 см: исходный матрикс на основе ПМК (ПМК_м), матрикс на основе ПМК, обработанный в плазме атмосферного давления (ПМК_п), матрикс на основе ПМК с ГА, нанесенной из 0,1% раствора (ПМК-ГА1), матрикс на основе ПМК с ГА, нанесенной из 0,2% раствора (ПМК-ГА2), матрикс на основе ПМК с ГА, нанесенной из 0,3% раствора (ПМК-ГА3). Изображения СЭМ исследуемых матриксов и гистограммы распределения волокон по их диаметру представлены на рис. 4. Результаты исследования смачиваемости поверхности матриксов и средний диаметр волокон представлены в табл. 2.

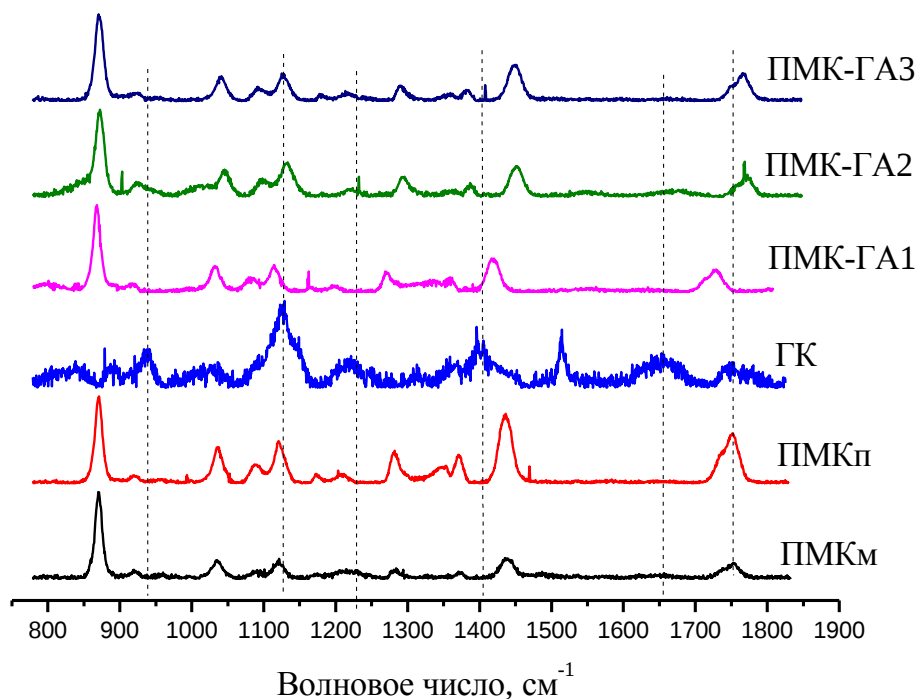
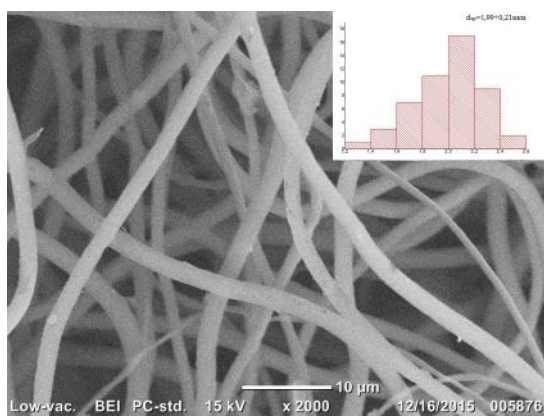
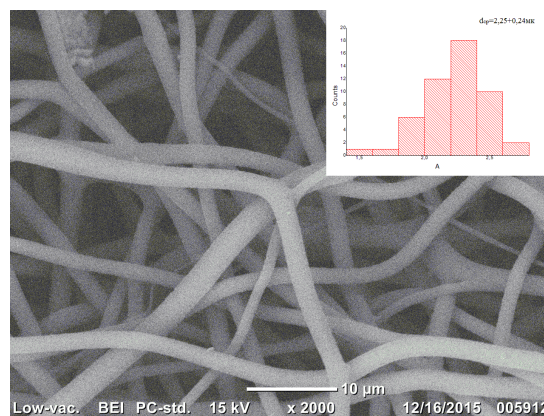


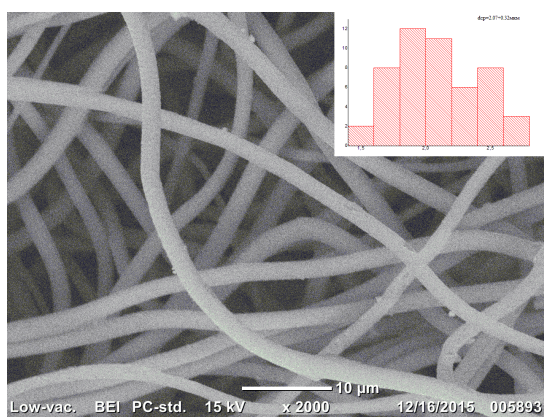
Рисунок 3 – Спектры комбинационного рассеяния исследуемых образцов



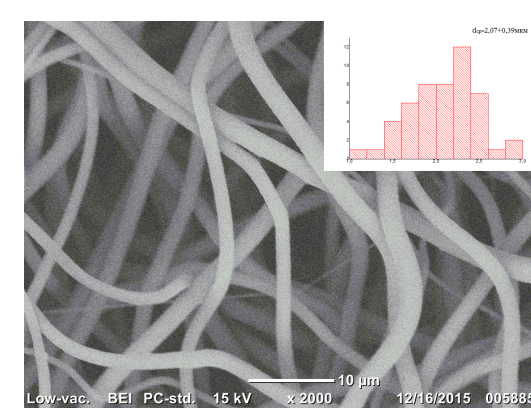
а)



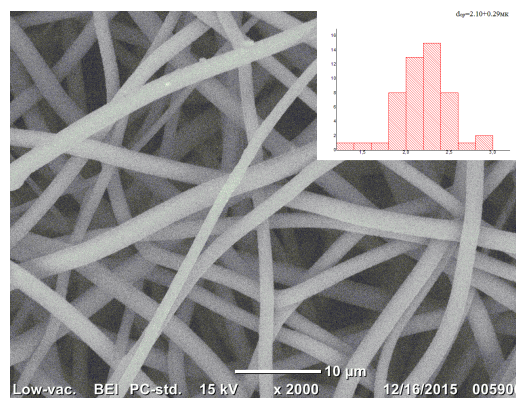
б)



в)



г)



д)

Рисунок 4 - СЭМ изображения матриксов с увеличением $\times 2000$ а) ПМКм, б) ПМКп, в) ПМК-ГА1, г) ПМК-ГА2, д) ПМК-ГА3

Таблица 2 - Значения краевого угла смачивания и средний диаметр волокон исследуемых матриксов

Образец	Угол смачиваемости	Средний диаметр волокон, мкм
	(вода), ° ±5%	
ПМК _м	120,1	1,99±0,21
ПМК _п	0	2,25±0,24
ПМК-ГА1	123,2	2,10±0,27
ПМК-ГА2	0	2,05±0,22
ПМК-ГА3	27,3	2,12±0,29

Для достижения цели исследования были поставлены следующие задачи:

- 1) Исследовать влияние тканеинженерных матриксов на выделение M1-ассоциированных цитокинов макрофагами;
- 2) Исследовать влияние тканеинженерных матриксов на выделение M2-ассоциированных цитокинов макрофагами;
- 3) Исследовать влияние тканеинженерных матриксов на ремоделирование ЭЦМ макрофагами.

2.2 Методы исследования

Для решения поставленных задач использовали следующие методы.

2.2.1 Выделение и культивирование CD14⁺ моноцитов

Первичные моноциты человека были выделены из лейкоцитарно-тромбоцитарной массы индивидуальных здоровых доноров [36]. Каждому

донору был присвоен уникальный идентификационный номер. Концентрат разводили в соотношении 1:1 PBS (Biochrom, Германия), не содержащим ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} . Полученную суспензию в объеме 30 мл аккуратно наносили на 15 мл Биокола (Biochrom, Германия), предварительно добавленного в 50 мл коническую пробирку. Образцы центрифугировали 30 мин (Hettich, Германия) при 420g без перерыва. После этого собирали лейкоцитарную фракцию с интерфазы Биокोल/сыворотка и 2 раза отмывали PBS. Во время центрифугирования готовили непрерывный градиент на основе Перкола, имеющий следующий состав: 13,5 мл Перкола (Pharmacia, Германия), 1,5 мл 10× сбалансированного солевого раствора Эрла (Sigma-Aldrich, Германия) и 15 мл минимально необходимой среды Игла (Sigma-Aldrich, Германия). Отмытые клетки ($5 \cdot 10^8$ – $8 \cdot 10^8$ /мл) ресуспендировали в 5 мл PBS и наслаивали на приготовленный градиент, после чего центрифугировали в течение 30 мин при 420g без перерыва. После центрифугирования собирали 2 верхних фазы и 3 раза отмывали клетки с помощью PBS. Для выделения CD14⁺ моноцитов проводили магнитную сортировку клеток. Для этого использовали стандартный набор CD14 микросфер и колонок (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Германия). Количество выделенных моноцитов определяли на счетчике клеток CASY® Model TT (Roche Innovatis AG, Германия). Выделенные моноциты ресуспендировали в X-VIVO 10 (Lonza, Бельгия) до концентрации $1 \cdot 10^6$ клеток/мл. К полученной суспензии добавляли дексаметазон (Sigma-Aldrich, Германия) до концентрации 10^{-8} М и m-CSF (Peprotech, Германия) до концентрации 5 нг/мл. Моноциты кокультивировали в 12-луночной планшете с исследуемыми материалами. В каждую лунку добавляли 2 мл суспензии, содержащей $2 \cdot 10^6$ клеток. В качестве контроля культивировали моноциты без исследуемых материалов. Протокол постановки эксперимента представлен на рис. 5. Выделенные моноциты были сразу же простимулированы цитокинами: IL4 – 10 нг/мл (Peprotech, Германия), IFN γ – 100 нг/мл (Peprotech, Германия) и культивировались в течение 6 дней в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °C.

Планшет 1

	1	2	3	4
A	Контроль, НС	ПМК _м , НС	ПМК _п , НС	
B	Контроль, IL4	ПМК _м , IL4	ПМК _п , IL4	
C	Контроль, IFN γ	ПМК _м , IFN γ	ПМК _п , IFN γ	

Планшет 2

	1	2	3	4
A	ПМК-ГА1, НС	ПМК-ГА2, НС	ПМК-ГА3, НС	
B	ПМК-ГА1, IL4	ПМК-ГА2, IL4	ПМК-ГА3, IL4	
C	ПМК-ГА1, IFN γ	ПМК-ГА2, IFN γ	ПМК-ГА3, IFN γ	

Рисунок 5 - Протокол постановки эксперимента

2.2.2 Исследование жизнеспособности моноцитов

Жизнеспособность не стимулированных цитокинами моноцитов на 6 день кокультивирования с материалами исследовали с использованием флуоресцирующего красителя Alamar blue (Sigma, США). Для этого в каждой лунке 12-луночного планшета оставляли 1 мл культуральной среды и добавляли по 100 мкл Alamar blue. Клетки инкубировали с красителем в течение 3 ч при 37°C. Далее, супернатанты переносили в 96-луночный планшет и измеряли интенсивность флуоресценции, используя планшетный спектрофотометр Tecan Infinite 200 (Tecan, Швейцария) (длина волны возбуждения - 570 нм, длина волны эмиссии - 600 нм). Все измерения проводили в трипликатах. В качестве контроля использовали моноциты, культивируемые без исследуемых материалов. Согласно литературным данным, количество восстановленной формы красителя Alamar blue пропорционально жизнеспособности клеток [67]. Жизнеспособность клеток рассчитывали согласно следующей формуле:

$$CV (\%) = \frac{f_i}{f_c} \cdot 100\% \quad (1)$$

где CV(%) - жизнеспособность моноцитов (%), f_i - интенсивность флуоресценции культуральной среды, отобранной из лунок, где моноциты культивировали с материалами, и f_c - интенсивность флуоресценции культуральной среды, отобранной из лунок, где моноциты культивировали без материалов.

Эксперимент проводили, используя клетки пяти различных доноров. Исследуемый материал считали цитотоксичным, если рассчитанная жизнеспособность была менее 30%, довольно цитотоксичным, если рассчитанная жизнеспособность лежала в интервале 30-59%, относительно цитотоксичным, если рассчитанная жизнеспособность лежала в интервале 60-90%, и нецитотоксичным, если рассчитанная жизнеспособность была более 90%.

2.2.3 Отбор супернатантов

После 6 ч культивирования отбирали супернатанты (200 мкл из каждой лунки) для определения концентрации TNF α . Для определения концентрации TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-10, IL-1ra, CCL18, TGF β , MMP7 и MMP9 (R&D Systems, США) отбирали супернатанты (1,5 мл из каждой лунки) по окончании культивирования моноцитов на 6 день эксперимента.

2.2.4 Определение концентрации цитокинов методом иммуноферментного анализа (ELISA)

Определение концентрации TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-10, IL-1ra, CCL18, TGF β , MMP7 и MMP9 (R&D Systems, США), проводилось с помощью сэндвич-ELISA согласно инструкции производителя.

За сутки до постановки эксперимента раствор антител рабочей концентрации наносили в лунки 96-луночного планшета из расчета 100 мкл на

лунку. Готовый планшет оставляли на 12 ч при температуре 20 °С. После этого 4 раза промывали лунки 0.05% Tween® 20 (Sigma-Aldrich, Германия) в PBS, 200 мкл на лунку. Оставшиеся места для связывания блокировали 1% (масс.) раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) в PBS в течение часа. В лунки плашки наносили последовательные разведения стандарта антигена для построения калибровочной кривой и образцы супернатанта (разведения супернатанта индивидуальны для различных цитокинов и типов образцов). В качестве стандарта использовали соответствующий рекомбинантный белок. Все образцы анализировали в дубликатах. Образцы, нанесенные в лунки планшета, инкубировали в течение двух часов при комнатной температуре. После инкубации планшет отмывали 4 раза 0,05% Tween® 20 в PBS, наносили раствор меченых антител для определения антигена, 100 мкл в лунку, и инкубировали 2 часа. Далее планшет отмывали 4 раза 0.05% Tween® 20 в PBS и добавляли раствор стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена, 100 мкл в лунку. Планшет инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре в темном месте, после чего отмывали 4 раза 0,05% Tween® 20 в PBS. Ферментативную активность определяли при помощи готового субстрата для пероксидазы хрена на основе тетраметилбензидина. Реакцию останавливали добавлением 2н H₂SO₄. Далее при помощи планшетного спектрофотометра Tecan Infinite 200 (Tecan, Швейцария) определяли оптическую плотность растворов в лунках на длинах волн 450 нм/570 нм. На основании оптических плотностей растворов в лунках, содержащих контрольный белок, строили калибровочную кривую.

Представлены результаты анализа для 8 индивидуальных доноров. Концентрация TNFα после 6 ч культивирования измерена для 4 индивидуальных доноров

2.2.5 Лизирование клеток

На 6 день по окончании культивирования клеток 12-луночный планшет помещали на лед на 10-15 мин. В это время готовили лизирующий буфер: 20 мкл β -меркаптоэтанола на 1 мл Lysis Buffer из набора E.Z.N.A.® Total RNA Kit I (Omega Bio-tek, США). Оставшиеся в лунках супернатанты отбирали в 1,5 мл пробирки «Eppendorf» и центрифугировали 10 мин при 4 °C, 6000 rpm. После этого аккуратно переносили супернатанты в новые пробирки «Eppendorf» для анализа, стараясь не затронуть клеточную массу. В каждую лунку планшета добавляли по 200 мкл Трипсин/ЭДТА и инкубировали 5 мин, после чего переносили Трипсин/ЭДТА из лунки планшета в соответствующую пробирку «Eppendorf» с клеточной массой. Планшет дважды промывали PBS. Для этого переносили PBS из лунки в соответствующую пробирку «Eppendorf» и центрифугировали в течение 10 мин при 4 °C, 6000 rpm. В каждую лунку планшета добавляли по 350 мкл лизирующего буфера, перемешивали. Лизаты переносили из лунки в соответствующую пробирку Eppendorf, перемешивали с помощью вортекса и хранили при -80 °C до использования по назначению.

2.2.6 Выделение матричной РНК (мРНК)

Для выделения мРНК из лизатов использовали набор E.Z.N.A.® Total RNA Kit I (Omega Bio-tek, США). К гомогенизированным клеточным лизатам добавляли 350 мкл 70% этанола и перемешивали с помощью вортекса. Смесь аккуратно переносили на колонки для сорбции РНК «HiBind RNA column», помещенные в пробирки объемом 2 мл, центрифугировали 60 секунд при 10000 rpm. Прошедшую через колонку жидкость отбрасывали, на мембрану колонки наносили 500 мкл «Wash Buffer I», центрифугировали 60 секунд при 10000 rpm. Прошедшую через колонку жидкость отбрасывали, на мембрану колонки дважды наносили 500 мкл «Wash Buffer II», центрифугировали 60 секунд при 10000 rpm каждый раз. Прошедшую через колонку жидкость отбрасывали, колонки помещали в сухие пробирки на 2 мл и высушивали центрифугированием в течение 2 мин при 14000 rpm. Затем колонку «HiBind

RNA column» перемещали в 1,5 мл пробирку «Eppendorf», очищенную от РНКаз (RNase-free «Eppendorf») и дважды элюировали содержимое с мембраны колонки добавлением 40 мкл очищенной от РНКаз воды (DEPC water). Центрифугировали 1 минуту при 14000 rpm, саму колонку откидывали. Хранение образцов осуществляли в пробирках при -80°C до использования по назначению. Конечную концентрацию мРНК измеряли на спектрофотометре Tecan Infinite 200 (Tecan, Швейцария) при длинах волн 260 нм и 280 нм. Для проверки качества полученной мРНК проводили электрофорез в агарозном геле.

2.2.7 Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в режиме реального времени (qRT-PCR)

Экспрессию исследуемого гена оценивали с помощью qRT-PCR (Quantitative reverse transcriptase PCR – количественной обратной транскриптазной ПЦР) по методу ΔC_q (пороговый метод сравнения графиков накопления ДНК). Для нормализации уровней экспрессии использовали GAPDH в качестве референсного гена.

Для обратной транскрипции анализируемых образцов мРНК был использован набор реагентов RevertAid H Minus First Strand Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Обратную транскрипцию проводили на термомиксере Eppendorf ThermoMixer C. Для расщепления остаточной ДНК к 5 мкл полученной тотальной мРНК добавляли 1 мкл ДНКазы «DNAse I», 1 мкл 10-кратного реакционного буфера (10X Reaction Buffer), содержащего $MgCl_2$ и 3 мкл очищенной от РНКаз воды (DEPC water). Образцы инкубировали 40 мин при 37°C в термомиксере, после чего инактивировали ДНКазу при 70°C в течение 10 мин. Образцы помещали на лед. К смеси добавляли 1 мкл праймеров «Oligo(dT)₁₈ Primer» и 1 мкл очищенной от РНКаз воды (DEPC water). Образцы инкубировали 5 мин при 70°C в термомиксере. Затем в смесь добавляли 4 мкл 5-кратного реакционного буфера («5X Reaction Buffer»), 1 мкл ингибитора

РНКаза «RiboLock RNase Inhibitor», 2 мкл 10 мМ смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTP Mix) и 1 мкл обратной транскриптазы «RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase». Общий объем смеси составлял 20 мкл. Смесь аккуратно перемешивали и инкубировали 1 ч при 42°C, затем 10 минут при 70°C. Образцы хранили в пробирках при -80°C.

ПЦР в реальном времени с кДНК после обратной транскрипции проводили в режиме: нагрев до 95 °C - 10 мин, 50 циклов 95 °C - 30 сек, 60°C – 90 сек на амплификаторе LightCycler® 480 (Roshe, Швейцария). qRT-PCR ставили в конечном объеме 10 мкл, содержащем: 5 мкл SensiMix II Probe Kit (Bioline, США), 3 мкл очищенной от РНКаза воды (DEPC water), 1 мкл гена-мишени CHI3L1 (TaqMan CHI3L1 assay, Hs00609691_m1, Life technologies, США) и 1 мкл референсного гена GAPDH (Eurofins Genomics).

Для каждого гена-мишени ПЦР проводили в трипликатах. В каждом исследовании в обязательном порядке ставился негативный контроль, содержащий ПЦР-смесь без матрицы. В работе использовались следующие праймеры и зонды (табл. 1):

Таблица 3 - Последовательность праймеров (прямой F и обратный R) и зондов (FAM-BHQ) для оценки генной экспрессии CHI3L1

Наименование гена	Последовательность	
<i>GAPDH</i>	848F	5'- CATCCATGACAACCTTTGGTATCGT -3'
	848R	5'- CAGTCTTCTGGGTGGCAGTGA -3'
	849Probe	FAM 5'- AAGGACTCATGACCACAGTCCATGCC BHQ1 -3'
<i>CHI3L1</i>	F	Разработано Life technologies, TaqMan CHI3L1 assay, Hs00609691_m1
	R	
	Probe	

2.2.8 Культивирование эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC)

Первичные эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC), объединенные от нескольких доноров, были любезно предоставлены проф. Karen Bieback. Клетки размораживали в течение 5 мин при 37 °С, после этого ресуспендировали в 5 мл PBS (Biochrom, Германия) и центрифугировали 8 мин при 1200 rpm. Супернатант удаляли и ресуспендировали клеточную массу в среде EGM-2 (Lonza, Бельгия). Клетки культивировали во 25 мл флаконе в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С. Когда клетки становились конфлюэнтны, делали пассаж. Для этого из флакона убирали среду и промывали PBS. Добавляли 2 мл Трипсин/ЭДТА и оставляли на 2 мин в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С. Блокировали трипсин добавлением 2 мл инактивированной FCS. Клеточную суспензию переносили в 15 мл коническую пробирку, центрифугировали 8 мин при 1200 rpm. Супернатант удаляли и ресуспендировали клеточную массу в предварительно нагретой до 37 °С среде EGM-2 (Lonza, Бельгия). Клетки культивировали во 25 мл флаконе в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С. Для эксперимента использовали культуру 3 пассажа.

2.2.9 Формирование капиллярных трубок клетками HUVEC (In Vitro ангиогенез)

Во флаконе с клетками за 3 ч до эксперимента заменяли среду EGM-2 на не содержащую ростовых факторов среду EBM (Lonza, Бельгия). В это время в 96-луночный планшет добавляли 50 мкм геля Corning® Matrigel® Growth Factor Reduced (CORNING, Великобритания) на лунку и оставляли 1 ч в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С. После 3 ч из флакона убирали среду и промывали PBS (Biochrom, Германия). Добавляли 2 мл Трипсин/ЭДТА и оставляли на 2 мин в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С. Блокировали трипсин добавлением 2 мл инактивированной FCS. Клеточную суспензию переносили в 15 мл коническую пробирку, центрифугировали 8 мин при 1200

грт. После этого удаляли супернатант и ресуспендировали клеточную массу в 500 мкл PBS (Biochrom, Германия). Количество и жизнеспособность клеток определяли с помощью камеры Горяева: к 10 мкм клеточной суспензии добавляли 10 мкм трипанового синего и считали неокрашенные клетки. В 96-луночный планшет добавляли образцы в трипликатах согласно рис. 6 по 100 мкл в лунку. В каждую лунку добавляли по 10 000 клеток. Среду X-VIVO 10, содержащую 100 нг/мл YKL40 использовали в качестве положительного контроля. Супернатанты культуры макрофагов, стимулированных IFN γ , от трех доноров (ID-6, ID-7, ID-8) использовали в качестве негативного контроля. *In vitro* ангиогенез проводили используя супернатанты, собранные из кокультуры ПМК-ГА1 и нестимулированных макрофагов (M0) и кокультуры PLA-HA1 и макрофагов, стимулированных IFN γ , от трех доноров (ID-6, ID-7, ID-8). Клетки инкубировали в течение 18 ч в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °C. Количество сформированных клетками HUVEC капиллярных трубок подсчитывали в 9 различных полях микроскопа Axiovert 100 (Carl Zeiss, Германия) при 5-кратном увеличении. Результаты представлены в виде «количество клеток/поле микроскопа».

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	X-VIVO		Контроль	Контроль	Контроль	Контроль	Контроль	Контроль
B	+100	EGM-2	НС	НС	НС	IFN γ	IFN γ	IFN γ
C	нг/мл		ID-6	ID-7	ID-8	ID-6	ID-7	ID-8
D	YKL40							
E	ПМК-ГА1	ПМК-ГА1	ПМК-ГА1 НС	ПМК-ГА1	ПМК-ГА1	ПМК-ГА1		
F	НС ID-6	НС ID-7	ID-8	IFN γ ID-6	IFN γ ID-7	IFN γ ID-8		

Рисунок 6 - Протокол постановки эксперимента

2.2.10 Статистическая обработка

Статистическая обработка результатов была проведена с использованием программы Prism (GraphPad Software, США). Для оценки

статистической значимости полученных результатов использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми результаты считались при $p < 0,05$.

2.2.11 Программное обеспечение

Для графического представления результатов qRT-PCR и ELISA использовали программу GENE-E (<http://www.broadinstitute.org/cancer/software/GENE-E/index.html>). Для графического представления результатов экспериментов с HUVEC использовали программу AxioVision (Carl Zeiss, Германия), для построения диаграмм распределения использовали OriginPro 8.1. Общая графическая часть выполнена в CorelDRAW X5.

3. Расчеты и аналитика

Выбор и обоснование направления исследования, включающие методы решения задач и их сравнительную оценку, описание выбранной общей методики проведения научно-исследовательской работы, методы исследований, методы расчета, обоснование необходимости проведения экспериментальных работ приведены в разделах 1. Обзор литературы и 2. Объект и методы исследования (см. выше).

4. Результаты проведенного исследования

4.1 Исследование жизнеспособности клеток

Результаты исследования жизнеспособности клеток показаны на рис. 7.

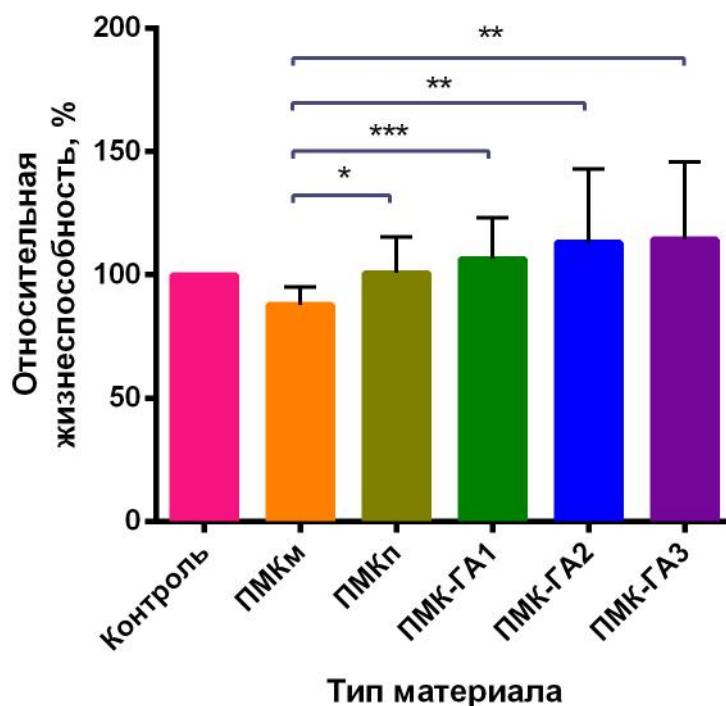


Рисунок 7 - Результаты исследования жизнеспособности клеток, Alamar Blue (не стимулированные цитокинами моноциты кокультивировали с материалами в течение 6 дней в X-VIVO 10). *- $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; $n=5$; тест Манна-Уитни

Рассчитанное по формуле (1) значение жизнеспособности М0 макрофагов, кокультивированных с матриксами, составило более 90% для всех типов материалов. Таким образом, исследуемые матриксы не цитотоксичны. При этом жизнеспособность М0 макрофагов, кокультивированных с модифицированными матриксами (ПМКп, ПМК-ГА1, ПМК-ГА2, ПМК-ГА3), больше, чем жизнеспособность М0 макрофагов, кокультивированных с немодифицированными матриксами (ПМКм), что говорит о том, что

модифицирование плазмой атмосферного давления и иммобилизация гиалуроновой кислоты увеличивают биосовместимость скаффолдов.

4.2 Исследование влияния матриксов на выделение M1-ассоциированных цитокинов макрофагами

Как уже было отмечено ранее, реакция клеток иммунитета, а именно макрофагов, на тканеинженерный матрикс определяет успешность его использования для регенерации тканей. Можно выделить два основных фенотипа макрофагов: M1 фенотип, появляющийся в результате стимуляции IFN γ или LPS (в данной работе под M1 будут подразумеваться макрофаги, поляризованные под действием IFN γ), и M2 фенотип, появляющийся в результате стимуляции IL4, IL13, IL10 (в данной работе под M2 будут подразумеваться макрофаги, поляризованные под действием IL4). M1 макрофаги отвечают за развитие воспалительных реакций, тогда как M2 – за заживление тканей [11-14]. Оба фенотипа присутствуют в месте имплантации тканеинженерных матриксов, однако его физико-химические свойства могут повлиять на M1:M2 баланс, стимулируя развитие патологических процессов [5]. Для того, чтобы исследовать влияние модифицированных ГА тканеинженерных матриксов на основе ПМК на макрофаги, мы выделили CD14⁺ моноциты из лейкоцитарной массы, полученной из крови здоровых доноров, и кокультивировали их с исследуемыми материалами в течение 6 дней с добавлением IFN γ или IL-4 как основных цитокинов, стимулирующих поляризацию макрофагов в M1 или M2 фенотип. В качестве основных маркеров M1 макрофагов мы выбрали TNF α , IL-1 β и IL-8, поскольку известно, что ГА играет роль провоспалительного агента на ранних стадиях заживления и может стимулировать выделение данных цитокинов макрофагами [64]. Дополнительно, мы использовали в качестве M1 маркеров IL6 как классический провоспалительный цитокин, и хитиназоподобный белок YKL40 (CHI3L1).

TNF α – многофункциональный цитокин, являющийся основным компонентом острого воспалительного ответа. Он индуцирует экспрессию ICAM-1, адгезию нейтрофилов и моноцитов, созревание и дифференцировку В клеток, и миграцию других воспалительных клеток. TNF α также стимулирует выделение других провоспалительных цитокинов, например IL1 β [68]. Результаты определения концентрации TNF α методом ELISA в супернатантах, собранных после кокультивирования M0, M1 и M2 макрофагов с тканеинженерными матриксами после 6 ч и на 6 день, показаны на рис. 8.

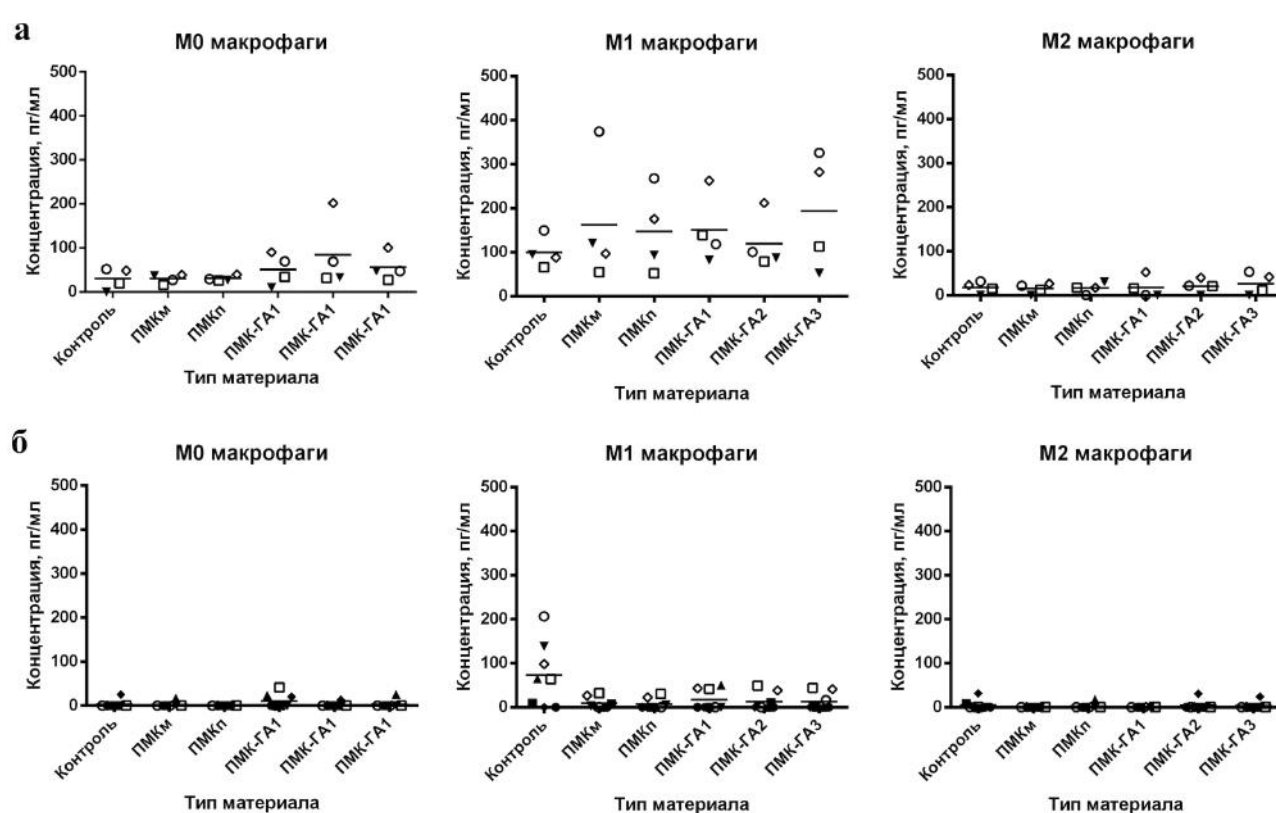


Рисунок 8 - Концентрация TNF α в супернатантах через 6 ч (панель а) и на 6 день (панель б) кокультивирования первичных макрофагов человека с тканеинженерными матриксами

Исследуемые материалы после 6 ч кокультивирования не стимулируют выделение TNF α M0 макрофагами индивидуальных доноров, за исключением матрикса PMK-ГА2, который стимулирует выделение TNF α у ID-8. У M1 макрофагов донора ID-8 матриксы PMKп и PMK-ГА всех типов стимулируют

выделение TNF α . У M1 макрофагов донора ID-6 матриксы ПМКм, ПМКп и ПМК-ГА3 также стимулируют выделение TNF α . M2 макрофаги всех доноров секретируют TNF α на уровне бэкграунда. На 6 день кокультивирования с материалами M0 и M2 макрофаги всех доноров практически не выделяют TNF α , при этом M1 макрофаги 5 из 8 доноров (включая ID-6 и ID-8, у которых TNF α был повышен после 6 ч) выделяют меньшее количество TNF α по сравнению с контролем (у остальных 3 доноров концентрация TNF α на уровне контроля).

Участие в острой фазе воспаления принимает также цитокин IL1 β . Его функции во многом перекрываются с функциями TNF α – он также индуцирует экспрессию ICAM-1, созревание и дифференцировку В и Т клеток [69-70]. Результаты определения концентрации IL1 β методом ELISA в супернатантах, собранных после кокультивирования M0, M1 и M2 макрофагов с тканеинженерными матриксами на 6 день, показаны на рис. 9.

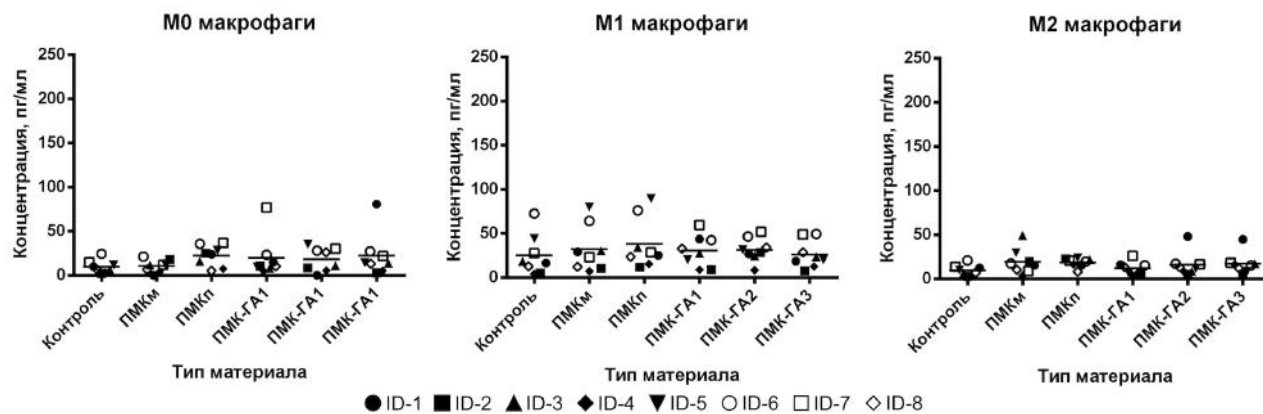


Рисунок 9 - Концентрация IL1 β в супернатантах на 6 день кокультивирования первичных макрофагов человека с тканеинженерными матриксами

Исследуемые материалы не стимулируют выделение IL1 β M0 макрофагами индивидуальных доноров, за исключением матриксов ПМК-ГА1 и ПМК-ГА3, которые стимулируют небольшое увеличение концентрации IL1 β у ID-7 и ID-1 соответственно. У M1 макрофагов донора ID-5 матриксы ПМКм и ПМКп незначительно стимулируют выделение IL1 β . M2 макрофаги всех

доноров секретируют IL1 β на уровне бэкграунда, за исключением небольшого увеличения секреции у макрофагов донора ID-1, кокультивируемых с материалами ПМК-ГА2 и ПМК-ГА3.

Другим важным медиатором воспаления является IL6. Данный цитокин секретируется макрофагами в ответ на присутствие патоген-ассоциированных молекулярных структур (PAMPs) [71]. IL6 стимулирует продукцию антител В клетками; в комбинации с IL1 способствует появлению регуляторных В клеток, секретирующих IL10. IL6 влияет на активацию и дифференцировку Т клеток, например, через STAT3 усиливает экспрессию Bcl-6, что приводит к появлению T_{FH} клеток. [72]. Кроме того, IL6 индуцирует экспрессию белков острой фазы [71]. Также IL6 направляет поляризацию моноцитов в макрофаги, а не дендритные клетки, благодаря своей способности контролировать экспрессию m-CSF [73]. Результаты определения концентрации IL6 методом ELISA в супернатантах, собранных после кокультивирования M0, M1 и M2 макрофагов с тканеинженерными матриксами на 6 день, показаны на рис. 10.

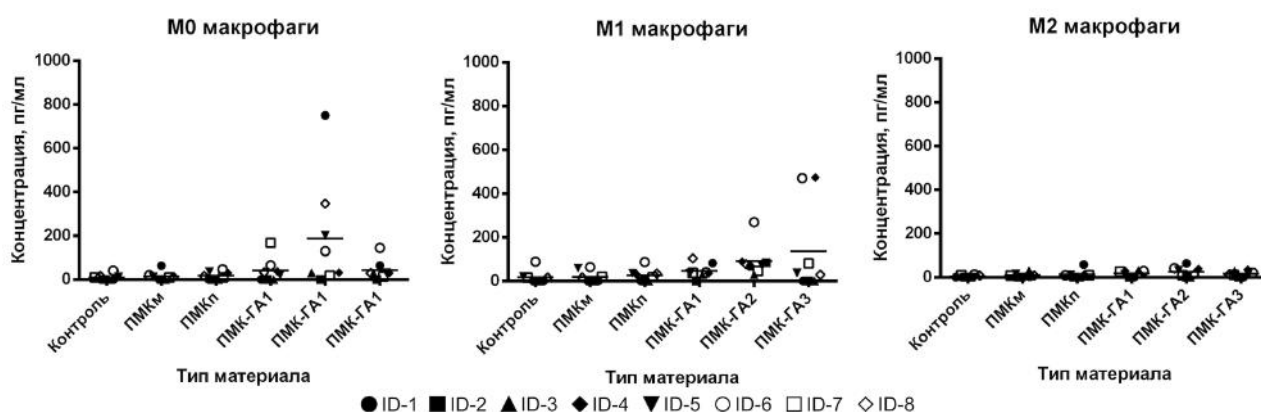


Рисунок 10 - Концентрация IL6 в супернатантах на 6 день кокультивирования первичных макрофагов человека с тканеинженерными матриксами

Наблюдается значительное усиление секреции IL6 M0 макрофагами, кокультивируемыми с ПМК-ГА2, у 3 из 8 доноров (ID-1, ID-5 и ID-8), при этом остальные материалы не вызывают подобной реакции. Выделение IL6 M1 макрофагами 2 доноров (ID-4 и ID-6) носит ГА-концентрационно-зависимый

характер: чем больше ГА на поверхности матрикса, тем выше концентрация IL6. Остальные доноры не проявляют специфической реакции на какие-либо из материалов. M2 макрофаги всех доноров не секретируют IL6.

Классическим маркером M1 макрофагов также является IL8 – цитокин, имеющий двоякую роль. С одной стороны, он стимулирует хемотаксис нейтрофилов и лимфоцитов; индуцирует у нейтрофилов экспрессию Mac-1 и CR-1, а также стимулирует их адгезию к эндотелиальным клеткам [74]. С другой стороны, IL8 является макрофагальным медиатором ангиогенеза [75] – важного процесса для интеграции скаффолда. Таким образом, IL8 стимулирует как острое воспаление, так и образование новых сосудов. Результаты определения концентрации IL8 методом ELISA в супернатантах, собранных после кокультивирования M0, M1 и M2 макрофагов с тканеинженерными матриксами на 6 день, показаны на рис. 11.

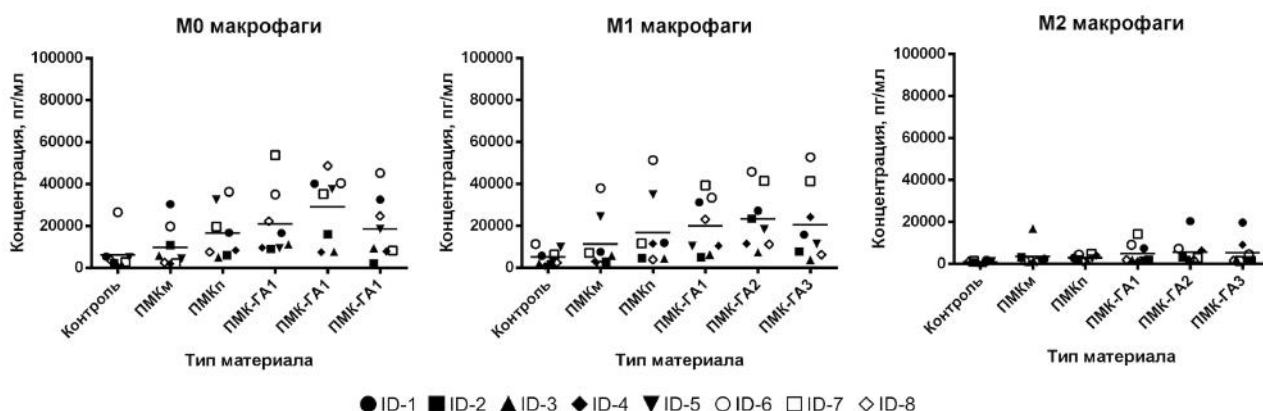


Рисунок 11 - Концентрация IL8 в супернатантах на 6 день кокультивирования первичных макрофагов человека с тканеинженерными матриксами

Все матриксы с иммобилизованной ГА на поверхности стимулирует секрецию IL8 у M0 и M1 макрофагов 50% доноров, тогда как ПМКм и ПМКп стимулирует выделение IL8 у M0 и M1 макрофагов только ID-5 и ID-6. Наблюдается небольшое увеличение концентрации IL8 у M2 макрофагов 1 донора (ID-1), M2 макрофаги других доноров секретируют IL8 на уровне бэкграунда.

Последний из рассматриваемых нами маркеров воспаления - YKL40 (CHI3L1) – хитиназоподобный белок, секретируемый различными клетками, и в том числе макрофагами. Присутствие YKL40 ассоциировано с острым и хроническим воспалением; в патологических условиях приводит к фиброзу [76]. В нескольких работах было показано, что YKL40 может стимулировать ангиогенез, увеличивая экспрессию VEGF за счет высокой аффинности к гепарину. В структуре YKL40 есть две аминокислотных последовательности, которые потенциально могут связывать гиалуронан [77-78]. Неизвестно, может ли YKL40 присоединяться к ГА, однако он способен распознавать гиалуронан, а значит может влиять на его концентрацию и процессы, связанные с восстановлением тканей. Результаты определения уровня экспрессии гена CHI3L1 методом qRT-PCR у M0, M1 и M2 макрофагов, кокультивированных с тканеинженерными матриксами, на 6 день, показаны на рис. 12 в виде тепловой карты.

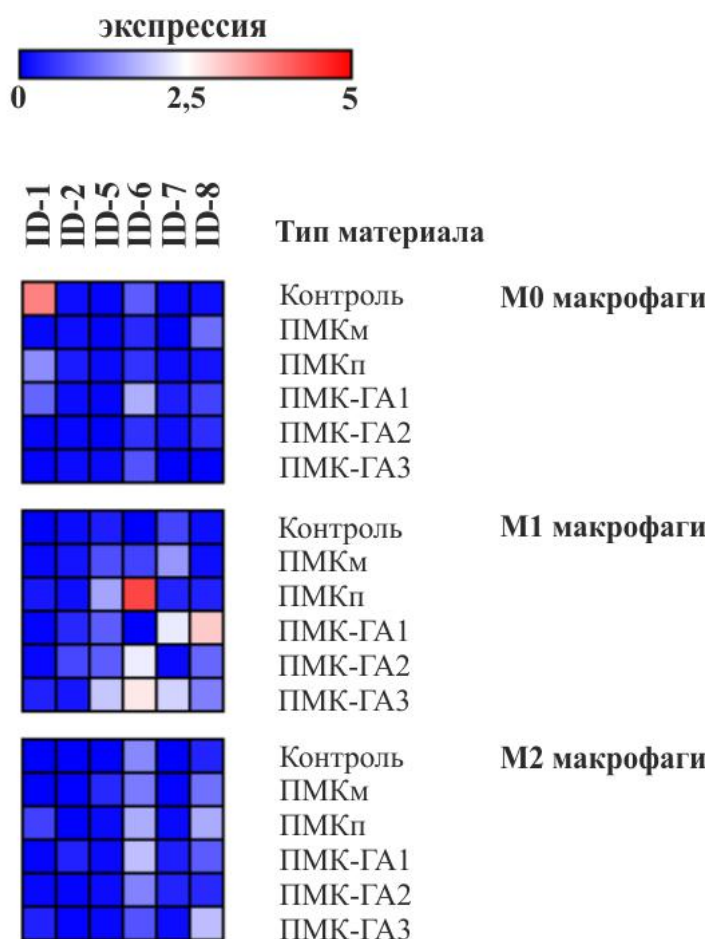


Рисунок 12 - Тепловая карта, отражающая экспрессию гена CH13L1 первичными макрофагами человека, кокультивированными с тканеинженерными матриксами в течение 6 дней. В качестве референсного гена был использован «house-keeping» ген GAPDH

У M0 и M2 макрофагов всех доноров не наблюдается усиление экспрессии CH13L1 при кокультивировании с материалами, за исключением ID-6, у M2 макрофагов которого экспрессия CH13L1 увеличивается, но не больше, чем в 2 раза. У M1 макрофагов этого же донора экспрессия CH13L1 увеличивается более, чем в 2,5 раза при кокультивировании с PMK_P, PMK-ГA2 и PMK-ГA3. Также при кокультивировании M1 макрофагов с PMK-ГA1 и PMK-ГA3 экспрессия CH13L1 увеличивается у ID-7, ID-8 и ID-5, ID-7 соответственно.

4.3 Исследование влияния матриксов на выделение M2-ассоциированных цитокинов макрофагами

M2 макрофаги являются «альтернативой» M1, так как стимулируют за процесс заживления и секретируют противовоспалительные цитокины [79]. В качестве маркеров M2 макрофагов нами были выбрали IL1ra, TGF β , IL-10 и CCL18.

IL1ra секретируется макрофагами в ответ на IL1 для того, чтобы ингибировать провоспалительное действие последнего. Он связывается с рецептором IL1, препятствуя активации внутриклеточного сигнального каскада этого цитокина. Для подавления эффекта IL1 необходима концентрация IL1ra, в 100 раз превышающая концентрацию IL1. Дисбаланс между IL1 и IL1ra приводит к развитию ряда заболеваний, включая артрит, воспалительное заболевание кишечника, отторжение трансплантата и др. [69]. Результаты определения концентрации IL1ra методом ELISA в супернатантах, собранных после кокультивирования M0, M1 и M2 макрофагов с тканеинженерными матриксами на 6 день, показаны на рис. 13.

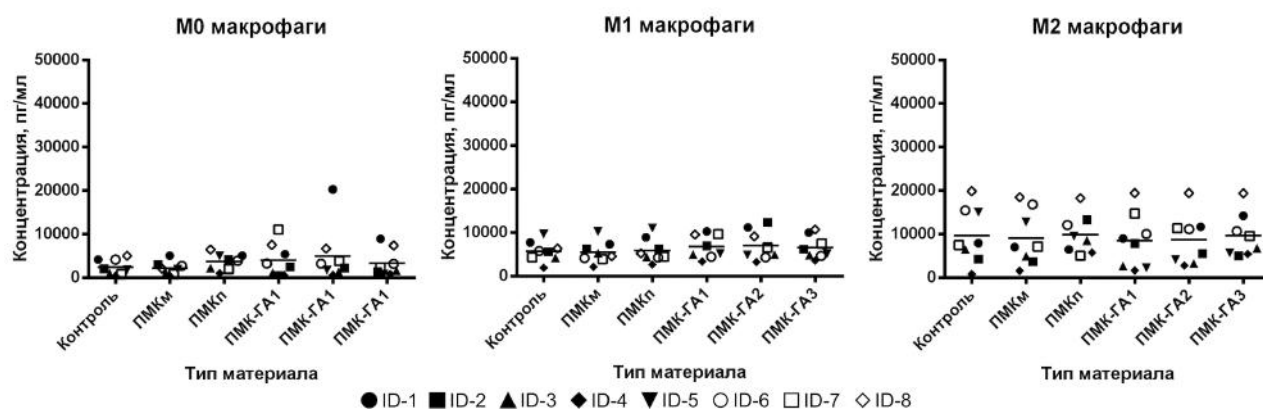


Рисунок 13 - Концентрация IL1ra в супернатантах на 6 день кокультивирования первичных макрофагов человека с тканеинженерными матриксами

Секреция IL1ra M0, M1 и M2 макрофагами, кокультивированными с тканеинженерными матриксами, незначимо отличается от контроля, за

исключением M0 макрофагов донора ID-1, культивированных с ПМК-ГА2. Концентрация выделяемого макрофагами IL1 α в 100 раз превышает концентрацию IL1 β .

IL10 является сильным супрессором эффекторных функций макрофагов, Т-клеток и NK-клеток, ингибирует секрецию IL1, IL6, TNF α и IL12 макрофагами и продукцию IFN γ Т-лимфоцитами [80-81]. TGF β 1 блокирует активацию и пролиферацию макрофагов, а также продукцию ими ROS [82]. Вместе эти цитокины обладают сильным иммуносупрессивным и противовоспалительным действием. Однако, было показано, что TGF β 1 может способствовать развитию фиброза через активацию фибробластов [79]. Результаты определения концентрации TGF β 1 методом ELISA в супернатантах, собранных после кокультивирования M0, M1 и M2 макрофагов с тканеинженерными матриксами на 6 день, показаны на рис. 14.

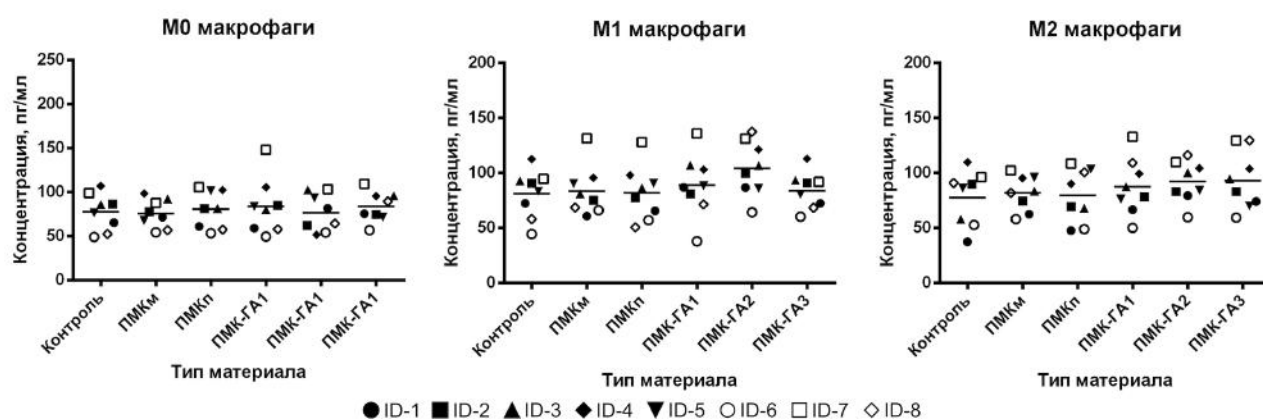


Рисунок 14 - Концентрация TGF β 1 в супернатантах на 6 день кокультивирования первичных макрофагов человека с тканеинженерными матриксами

Секреция TGF β 1 M0, M1 и M2 макрофагами, кокультивированными с тканеинженерными матриксами, не отличается от контроля. Секрети IL10 не было обнаружено ни в каких исследуемых условиях.

Дополнительным маркером M2 макрофагов является CCL18. Данный хемокин способен направлять поляризацию макрофагов в M2 фенотип [83],

однако было показано, что CCL18 участвует в развитии и поддержании хронического воспаления, а также в развитии Th2-опосредованных заболеваний [84]. Результаты определения концентрации CCL18 методом ELISA в супернатантах, собранных после кокультивирования M0, M1 и M2 макрофагов с тканеинженерными матриксами на 6 день, показаны на рис. 15.

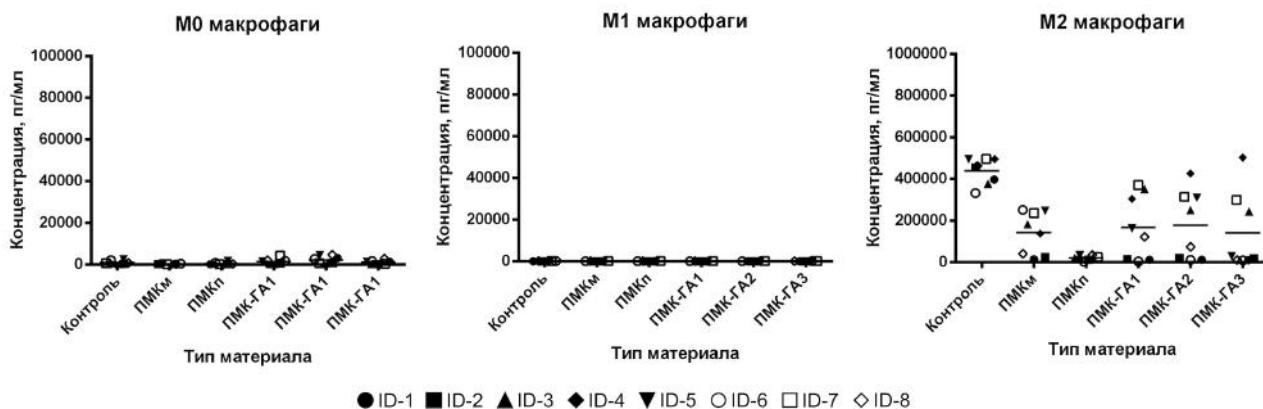


Рисунок 15 - Концентрация CCL18 в супернатантах на 6 день кокультивирования первичных макрофагов человека с тканеинженерными матриксами

Матрицы, обработанные плазмой (ПМКп), являются сильными супрессорами CCL18 (CCL18 понижается у 100% доноров). Остальные материалы либо не влияют на концентрацию CCL18 (~50% доноров), либо понижают ее (~50% доноров). M0 и M1 макрофаги всех доноров не секретируют CCL18.

4.4 Исследование влияния матриц на ремоделирование ЭЦМ макрофагами

Макрофаги не только выделяют медиаторы воспаления или заживления, но и принимают участие в преобразовании ЭЦМ как напрямую, секретируя матриксные металлопротеиназы (MMPs) – ферменты, способные деградировать белки ЭЦМ, так и косвенно, выделяя цитокины, стимулирующие фибробласты или синовиальные клетки секретировать MMPs [85]. В нашей работе мы

оценивали влияние тканеинженерных матриксов на концентрацию MMP7 и MMP9.

Макрофаги секретируют MMP7 при стимуляции LPS, поэтому MMP7 является маркером бактериального воспаления [86]. Проферментная форма MMP7 активируется плазмином. MMP7 деградирует казеин, желатин, фибронектин и др. белки ЭЦМ. Кроме того, MMP7 активирует MMP2 и MMP9, расщепляя их проферментную форму [87].

MMP9 секретируется макрофагами в виде профермента под воздействием PGE_2 и IL6 [88]. MMP9 деградирует коллаген, желатин, эластин, агрекан и др. белки ЭЦМ [89]; проявляет проангиогенную активность, так как способствует высвобождению активной формы VEGF из ЭЦМ [90]. MMP9 способна также активировать цитокины/переводить их в более активную форму (pro-IL1 β и IL-8) или инактивировать их (СТАР-III, PF-4, GRO α) [89]. Результаты определения концентрации MMP7 и MMP9 методом ELISA в супернатантах, собранных после кокультивирования M0, M1 и M2 макрофагов с тканеинженерными матриксами на 6 день, показаны на рис. 16.

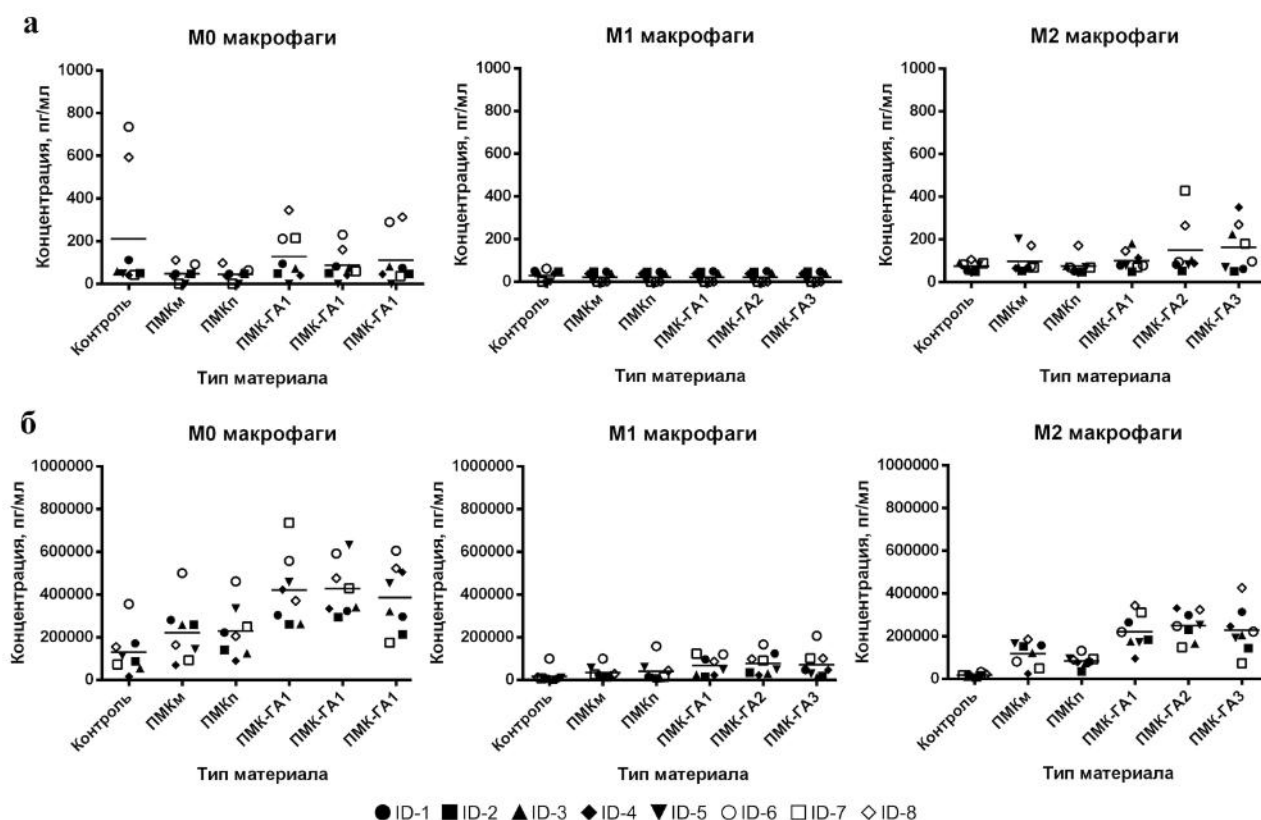


Рисунок 16 - Концентрация MMP7 (панель а) и MMP9 (панель б) в супернатантах на 6 день кокультивирования первичных макрофагов человека с тканеинженерными матриксами

Тканеинженерные матриксы, модифицированные ГА, не влияют на секрецию MMP7 M0 макрофагами большинства доноров, у двух доноров наблюдается понижение концентрации MMP7 (ID-6, ID-8) и только у одного – повышение (ID-7). PMK-ГА2 стимулирует выделение MMP7 M2 макрофагами двух доноров (ID-7, ID-8) из восьми, тогда как PMK-ГА3 стимулирует выделение MMP7 M2 макрофагами 50% доноров. M1 макрофаги не секретируют MMP7. Тканеинженерные матриксы стимулируют выделение MMP9 M0 и M2 макрофагами, при этом концентрация MMP9 в супернатантах от PMK-ГА1-3 примерно в 2 раза больше, чем от PMKм и PMKп. M1 макрофаги выделяют MMP9 на уровне бэкграунда, при этом концентрация MMP9 в супернатантах от PMK-ГА1-3 слегка повышена.

4.5 Предполагаемая гипотеза и обсуждение результатов

Тепловая карта, на которой представлены результаты ELISA для всех измеренных цитокинов для всех доноров, представлена на рис. 17. Биологические функции цитокинов кратко представлены в таблице 4. Наблюдаемые реакции первичных макрофагов человека на исследуемые матриксы являются донор-специфичными. Среди доноров можно выделить группу респондеров, у которых выражен провоспалительный ответ на наличие матриксов, и нереспондеров, у которых отсутствуют специфические реакции или наблюдается противовоспалительный ответ. В группу респондеров входят ID-1, ID-6, ID-7 и ID-8. У донора ID-6 выражен воспалительный ответ на материалы, модифицированные ГА: повышена секреция IL-6, IL-8 и YKL40 (CHI3L1) у M0 или M1 макрофагов на день 6 и секреция TNF α после 6 ч кокультивирования. В то же время, у него понижена секреция MMP7 M0 макрофагами. Донор ID-1 также реагирует на ПМК-ГА повышением секреции IL-6 и IL-8 M0 и M1 макрофагами, при этом у него повышается IL1 α . M0 и M1 макрофаги доноров ID-7 и ID-8 отвечают на матриксы ПМК-ГА повышенной секрецией IL-8 и экспрессией YKL40 (CHI3L1). У ID-8 повышено выделение TNF α после 6 ч кокультивирования. Остальные доноры не проявляют выраженных общих провоспалительных реакций на все материалы, поэтому можно подобрать матрикс с оптимальным типом модифицирования.

Можно выявить общие тренды в реакции макрофагов индивидуальных доноров на материалы:

- 1) На 6 день все типы матриксов способствуют понижению секреции TNF α M1 макрофагами;
- 2) ПМК-ГА2 способствует повышению секреции IL6 M0 макрофагами и MMP7 M2 макрофагами;
- 3) ПМК-ГА3 способствует повышению секреции IL6 M1 макрофагами и MMP7 M2 макрофагами;

- 4) Матрицы, модифицированные ГА, стимулируют выделение IL8 и MMP9, при этом, чем больше концентрация ГА на поверхности, тем больше доноров отвечают выделением этих белков;
- 5) У всех доноров повышение уровня IL8 сопровождается повышением концентрации MMP9;
- 6) ПМКп является сильным супрессором CCL18;
- 7) Матрицы, модифицированные ГА, или супрессируют, или не стимулируют выделение CCL18 M2 макрофагами;
- 8) Все матрицы не ингибируют выделение противовоспалительных цитокинов M0 и M2 макрофагами.

Таким образом, можно выдвинуть следующую общую гипотезу: так как нанесенная на поверхность матриц ГА имеет распределение по молекулярной массе, то в ее составе присутствуют олигомеры ГА, которые, связываясь с рецепторами на поверхности M0 и M1 макрофагов CD44, RHAMM, TLR2 индуцируют экспрессию и выделение IL8 и MMP9 большинством доноров, и TNF α (после 6 ч) и IL1 β у некоторых доноров. Возможно, что присутствие ГА как компонента ЭЦМ стимулирует выделение MMP макрофагами уже на первый день кокультивирования. MMP9 деградирует ГА, в результате к 6 дню повышается концентрация IL8. Выделившиеся TNF α и IL1 β у респондеров вызывают повышение IL6. Таким образом, с одной стороны, матрицы ПМК-ГА могут стимулировать острое воспаление, хемотаксис нейтрофилов и лимфоцитов. С другой стороны, присутствующая высокомолекулярная ГА блокирует секрецию провоспалительных цитокинов, поэтому к 6 дню концентрация TNF α понижается. Так как наблюдается увеличение секреции нескольких проангиогенных факторов: IL8, MMP9 и увеличена экспрессия CHI3L1, то предположительно матрицы, покрытые гиалуроновой кислотой, стимулируют ангиогенез. При этом, матрицы ПМК-ГА не стимулируют хроническое воспаление, так как секреция CCL18 не повышена, но и не ингибируют эффекторные функции макрофагов, так как не наблюдается выделение IL10 или усиление секреции TGF β (рис. 17).

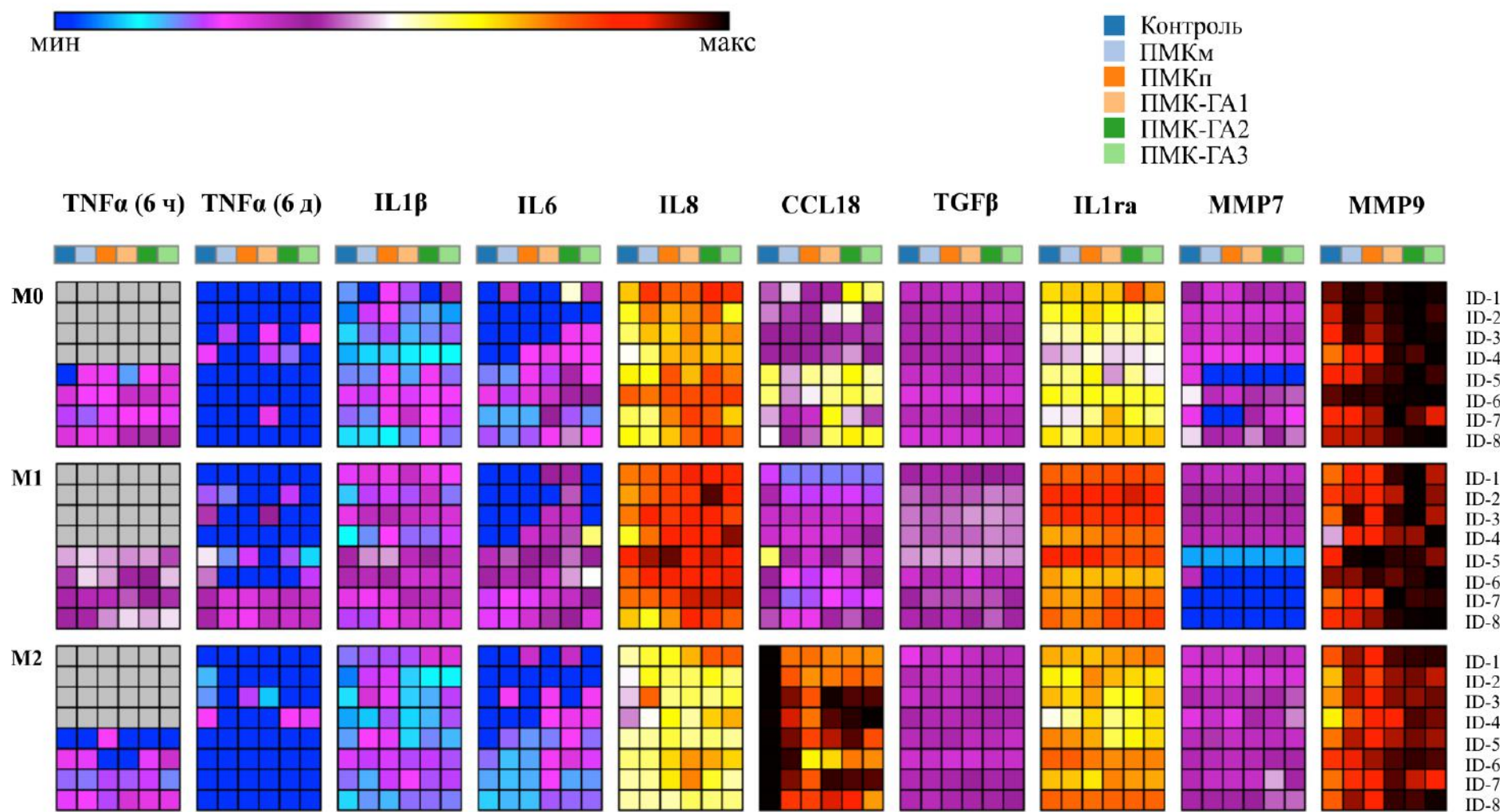


Рисунок 17 - Общая тепловая карта, построенная по результатам ELISA для всех измеренных цитокинов для всех доноров

Таблица 4 - Белки, используемые в качестве маркеров М1 и М2 макрофагов, и их биологические функции

Белок	Функции
TNFα	ICAM-1 $\uparrow$ IL1 β $\uparrow$ IL6 $\uparrow$ стимулирует адгезию нейтрофилов и моноцитов, созревание и дифференцировку В клеток
IL1β	ICAM-1 $\uparrow$ IL6 $\uparrow$ стимулирует созревание и дифференцировку В и Т клеток
IL6	активируется в ответ на PAMP стимулирует продукцию антител В клетками, активацию и дифференцировку Т клеток, а также экспрессию белков острой фазы MMP9 $\uparrow$
IL8	стимулирует хемотаксис нейтрофилов и лимфоцитов; индуцирует у нейтрофилов экспрессию Mac-1 и CR-1
YKL40	ассоциирован с острым и хроническим воспалением VEGF $\uparrow$
IL1ra	IL1 $\downarrow$
TGFβ	ингибирует пролиферацию В клеток и макрофагов, а также продукцию ROS макрофагами IFN γ $\downarrow$ TNF α $\downarrow$ IL2 $\downarrow$
IL10	супрессор эффекторных функций макрофагов, Т-клеток и NK-клеток IL1 $\downarrow$ IL6 $\downarrow$ TNF α $\downarrow$ IL12 $\downarrow$ IFN γ $\downarrow$
CCL18	участвует в развитии и поддержании хронического воспаления, а также в развитии Th2-опосредованных заболеваний CXCL8 $\uparrow$ CCL2 $\uparrow$ CCL3 $\uparrow$ CCL22 $\uparrow$
MMP7	маркер бактериального воспаления, активирует MMP2 и MMP9
MMP9	высвобождает VEGF, активирует (или переводит в более активную форму) pro-IL-1b, IL-8

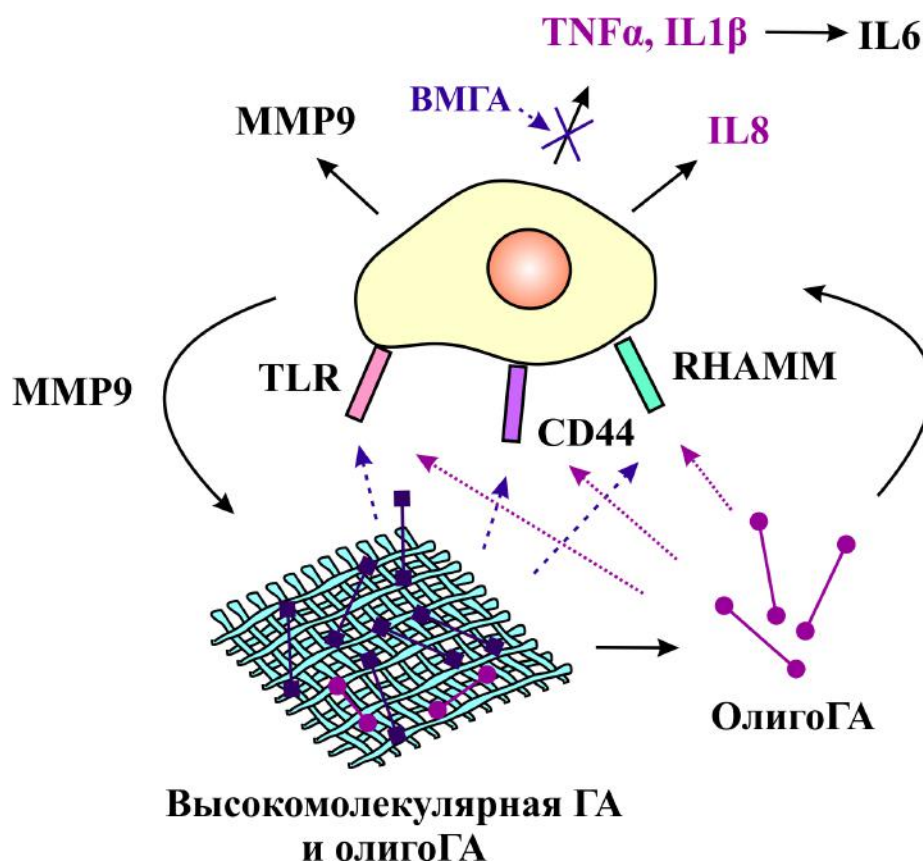


Рисунок 18 - Схема взаимодействия матриц ПМК-ГА с макрофагами (M0 и M1)

Среди матриц, модифицированных ГА, ПМК-ГА1 является наиболее биосовместимым, так как не стимулирует выделение IL6 и IL1β M0 и M1 макрофагами ни у одного из доноров, при этом наблюдается наименьшая секреция IL8 и экспрессия CHI3L1. Таким образом, данный матрикс потенциально обладает проангиогенными свойствами и не стимулирует воспалительный ответ. Если рассматривать все исследуемые материалы, то хорошей биосовместимостью обладает матрикс, модифицированный плазмой атмосферного давления. Он не стимулирует выделение провоспалительных цитокинов M0 и M1 макрофагами, кроме того является сильным супрессором CCL18. Однако его проангиогенные свойства выражены в меньшей степени, так как понижена концентрация IL8.

4.6 *In vitro* ангиогенез

Для того, чтобы исследовать влияние матриксов, модифицированных ГА, на ангиогенез, мы культивировали HUVEC на матрикеле без добавления ростовых факторов в супернатантах, собранных после кокультивирования M0 и M1 макрофагов с ПМК-ГА1, так как наиболее биосовместимым материалом среди ПМК-ГА. Результаты эксперимента представлены на рис. 19 и на рис. 20.

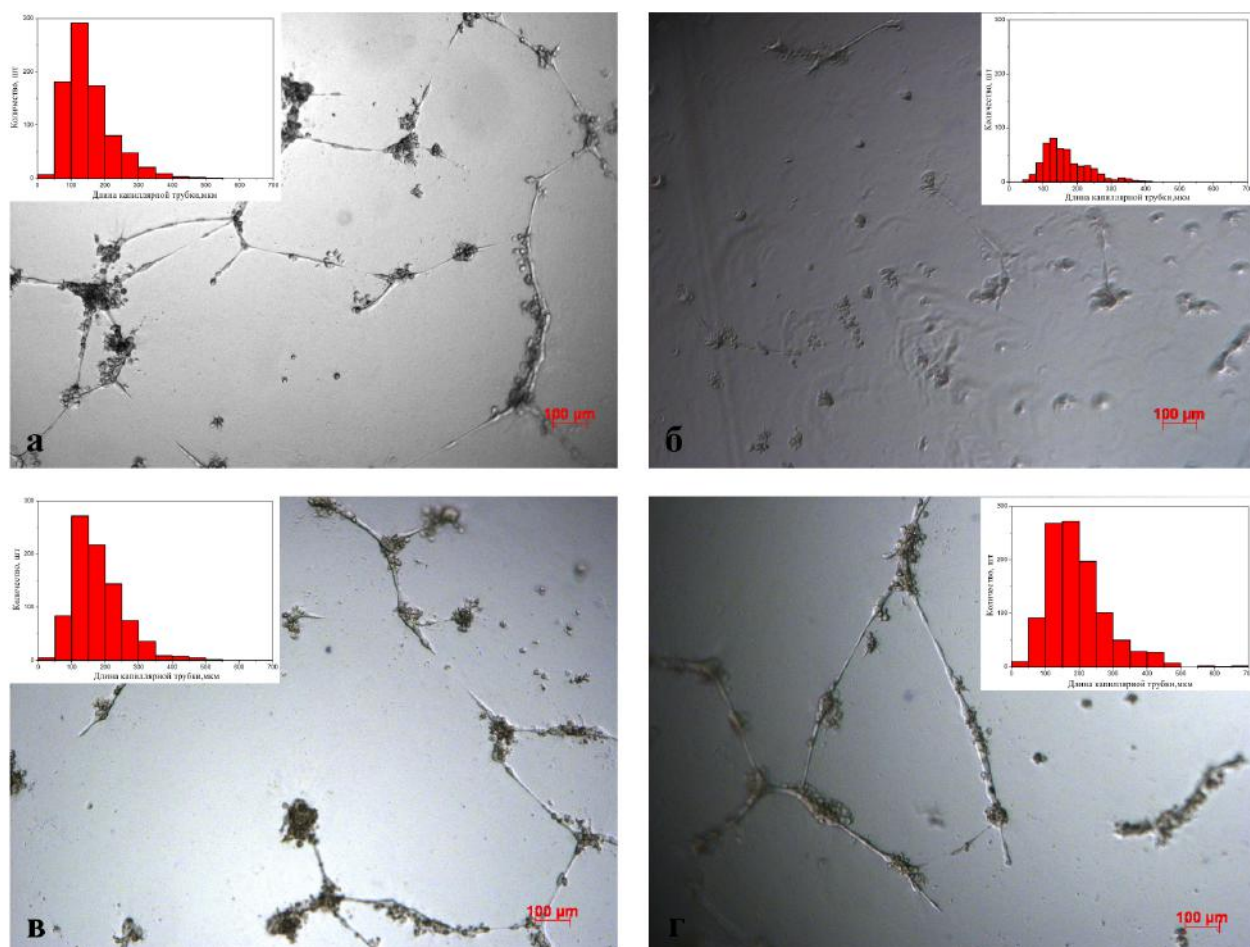


Рисунок 19 - Формирование капиллярных трубок HUVEC: а) Положительный контроль (100 нг/мл YKL40); б) Негативный контроль (супернатанты, собранные после культивирования макрофагов в присутствии 100 нг/мл IFN γ); в) супернатанты, собранные после кокультивирования макрофагов с ПМК-ГА1 матриксами; г) супернатанты, собранные после кокультивирования макрофагов с ПМК-ГА1 матриксами в присутствии 100 нг/мл IFN γ . Для каждого

исследуемого образца показано распределение по длине образуемых капиллярных трубок

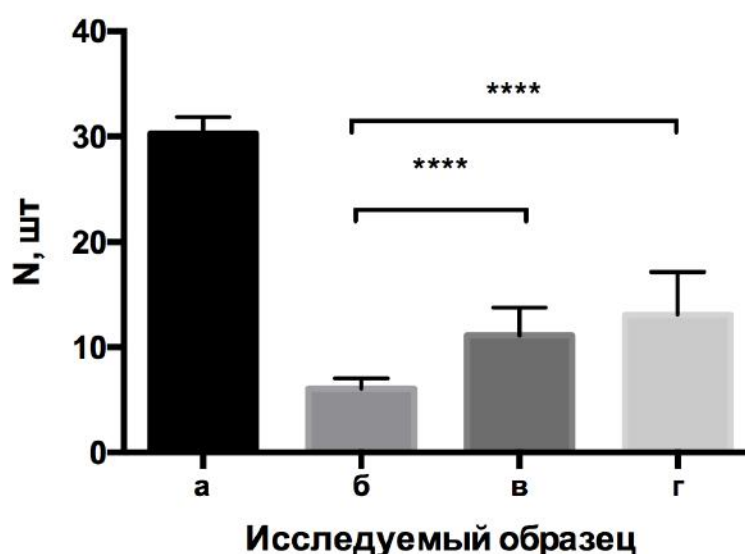


Рисунок 20 - Количество капиллярных трубок HUVEC в поле микроскопа (N, шт): а) положительный контроль (100 нг/мл YKL40); б) негативный контроль (супернатанты, собранные после культивирования макрофагов в присутствии 100 нг/мл IFN γ); в) супернатанты, собранные после кокультивирования макрофагов с ПМК-ГА1 матриксами; г) супернатанты, собранные после кокультивирования макрофагов с ПМК-ГА1 матриксами в присутствии 100 нг/мл IFN γ . **** - $p < 0,0001$, $n = 3$, тест Манна-Уитни

Супернатанты, собранные после кокультивирования макрофагов с ПМК-ГА1 матриксами, стимулируют формирование капиллярных трубок HUVEC. Количество сформированных трубок меньше, чем в положительном контроле, но значительно больше, чем в негативном контроле. Ангиогенный эффект ПМК-ГА1 матриксов скорее всего обусловлен тем, что в ответ на ГА макрофаги секретируют коктейль проангиогенных факторов (IL8, YKL40) (как было описано ранее). M0 и M1 макрофаги доноров ID-6, ID-7 и ID-8 секретируют в среднем 35 нг/мл IL8 (было показано, 10 нг/мл IL8 способны стимулировать *in vitro* ангиогенез [91]), при этом экспрессия YKL40 M1 макрофагами 2-2,5 раза больше, чем в контроле. Тем не менее, разница между

ангиогенным эффектом M1 и M0 незначима. Средняя длина капиллярных трубок представлена в таблице 5.

Таблица 5 - Длина сформированных капиллярных трубок

Исследуемый образец	Длина капиллярных трубок (Mean±SD), мкм
Положительный контроль	151,8±70,7
Негативный контроль	166,9±66,5
ПМК-ГА1	178,7±75,05
ПМК-ГА1 (100 нг/мл IFN γ)	193,47±89,37

Все величины длин сформированных капиллярных трубок значимо отличаются между собой. Матрикс ПМК-ГА1 способствует формированию более длинных капиллярных трубок.

Таким образом, показано, что матриксы, покрытые ГА, обладают проангиогенными свойствами за счет того, что стимулируют выделение проангиогенных факторов макрофагами.

Выводы

- 1) Реакции первичных макрофагов человека на исследуемые тканеинженерные матриксы являются донор-специфичными.
- 2) Наиболее биосовместимыми среди исследуемых материалов являются матрикс, модифицированный в плазме атмосферного давления, и матрикс с наименьшим количеством иммобилизованной на поверхности гиалуроновой кислоты, так как они не стимулируют секрецию провоспалительных цитокинов и не ингибируют секрецию противовоспалительных цитокинов первичными макрофагами человека.
- 3) Матриксы с иммобилизованной на поверхности гиалуроновой кислотой стимулируют ангиогенез.
- 4) Использованный набор маркеров может быть применен в качестве тест-системы для экспресс-оценки индивидуальной совместимости тканеинженерных матриксов с организмом.
- 5) Полученные данные могут быть использованы для создания smart-имплантатов - биоматериалов с программируемыми физико-химическими и иммуномодулирующими свойствами.
- 6) Сравнение значений интегральных показателей эффективности показало, что использованная для исследования влияния тканеинженерных матриксов на первичные макрофаги человека *in vitro* тест-система является наиболее эффективным вариантом решения поставленной в магистерской диссертации задачи с позиции финансовой и ресурсной эффективности.
- 7) Разработан комплекс мероприятий технического, организационного, режимного и правового характера, минимизирующих негативные последствия, возникающие в результате исследования влияния тканеинженерных матриксов на первичные макрофаги человека.

Список публикаций студента

1. Stankevich K.S., Gudima A., Filimonov V.D., Kluter H., Mamontova E.M., Tverdokhlebov S.I., Kzhyshkowska J. Surface modification of biomaterials based on high-molecular polylactic acid and their effect on inflammatory reactions of primary human monocyte-derived macrophages: perspective for personalized therapy // Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. – 2015. – V. 51. – P. 117-126.
2. Tverdokhlebov S.I., Stankevich K.S., Bolbasov E.N., Khlusov I.A., Kulagina I.V., Zaytsev K.V. Nonwoven Polylactide Scaffolds Obtained by Solution Blow Spinning and the In Vitro Degradation Dynamics // Advanced Materials Research. – 2014 – V. 872. – P. 257-263.
3. Хлусов И.А., Зайцев К.В., Жукова О.Б., Гостюхина А.А., Абдулкина Н.Г., Зайцев А.А., Кулагина И.В., Твердохлебов С.И., Больбасов Е.Н., Станкевич К.С. Динамика in vitro деградации нетканых матриксов из полимолочной кислоты в модельной биологической жидкости // Бюллетень сибирской медицины. – 2013 – Т. 12. – №. 6. – С. 73-81.
4. Kzhyshkowska J., Gudima A., Stankevich K.S., Filimonov V.D., Kluter H., Mamontova E.M., Tverdokhlebov S.I. A monocyte-based in-vitro system for testing individual responses to the implanted material: future for personalized implant construction // The EPMA Journal. – 2016. – V. 7(Suppl 1). – P. A45.
5. Станкевич К.С., Асташкина А.П., Больбасов Е.Н., Тамурко А.Ю., Твердохлебов С.И. Биodeградируемые материалы медицинского назначения и оценка их деструкции // Актуальные вопросы биомедицинской инженерии: сборник материалов II Всероссийской заочной научной конференции для молодых ученых, студентов и школьников , Саратов, 15 Октября-15 Декабря 2012. – Москва: Информрегистр, 2012 – С. 300-305.
6. Станкевич К.С., Асташкина А.П., Твердохлебов С.И. Биodeградируемые материалы медицинского назначения и оценка их деструкции

- [Электронный ресурс] // Перспективы развития фундаментальных наук: сборник научных трудов X Международной конференции студентов и молодых ученых, Томск, 23-26 Апреля 2013. – Томск: ТПУ, 2013 – С. 454-546. - Режим доступа: http://science-persp.tpu.ru/Previous%20Materials/Konf_2013.pdf
7. Станкевич К.С. Модификация поверхности материалов на основе высокомолекулярной полимолочной кислоты с целью придания биологической активности // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XV Международной научно- практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва: в 2 т., Томск, 26-29 Мая 2014. - Томск: ТПУ, 2014 – Т. 1 – С. 228-229.
 8. Станкевич К.С., Даниленко Н.В. Многослойные функциональные биоматериалы на основе полимолочной кислоты // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XVI Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 115-летию со дня рождения профессора Л.П. Кулёва: в 2 т., Томск, 25-29 Мая 2015. - Томск: ТПУ, 2015 – Т. 2 – С. 307-309.
 9. Даниленко Н.В., Станкевич К.С. Модифицирование поверхности поликапролактона для увеличения гидрофильных свойств // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XVI Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 115-летию со дня рождения профессора Л.П. Кулёва: в 2 т., Томск, 25-29 Мая 2015. – Томск: ТПУ, 2015 – Т. 2 – С. 267-268.
 10. Горенинский С.И., Станкевич К.С. Иодсодержащие материалы на основе полимолочной кислоты // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XVI Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 115-летию со дня рождения профессора Л.П. Кулёва: в 2 т., Томск, 25-29 Мая 2015. – Томск: ТПУ, 2015 - Т. 2 - С. 265-267.

11. Goreninsky S.I., Stankevich K.S., Efimova E.V., Danilenko N.V., Tverdokhlebov S.I., Filimonov V.D. New preparation method of PLA-based biomaterials containing molecular iodine layer on their surface // Recent advances on Mathematical Models for Engineering Science: Proceedings of the 12th International Conference on Mathematical Biology and Ecology, East Lansing, September 20-22, 2015. – Greece: WSEAS Press, 2015 – P. 25-30.
12. Станкевич К.С., Гудима А., Филимонов В.Д., Твердохлебов С.И., Кжышковска Ю.Г. Новые гибридные биоматериалы: шаг навстречу персонализированной медицине // Материалы и технологии XXI века: сборник тезисов всероссийской школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Казань, 11-12 Декабря 2014. – Казань: КФУ, 2014 – С. 60.
13. Даниленко Н.В., Станкевич К.С., Филимонов В.Д., Твердохлебов С.И. Новые материалы на основе поликапролактона с гидрофильной и гидрофобной поверхностью // Материалы и технологии XXI века: сборник тезисов всероссийской школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Казань, 11-12 Декабря 2014. – Казань: КФУ, 2014 – С. 29.
14. Горенинский С.И., Станкевич К.С., Филимонов В.Д., Твердохлебов С.И. Биоразлагаемые иодосодержащие материалы на основе полимолочной кислоты // Материалы и технологии XXI века: сборник тезисов всероссийской школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Казань, 11-12 Декабря 2014. – Казань: КФУ, 2014 – С. 27
15. Filimonov V.D., Stankevich K.S., Goreninsky S.I., Danilenko N.V., Tverdokhlebov S.I. Novel Multilayer Functional Hybrid Biomaterials on the Base of Polylactic Acid // 3rd International Conference on Chemical Technology: Book of Abstracts, Mikulov, April 13-15, 2015. – Prague: CSIC, 2015 – P. 49
16. Goreninsky S.I., Stankevich K.S., Efimova E.V., Danilenko N.V., Surgutskaya N.S., Trusova M.E., Bolbasov E.N., Tverdokhlebov S.I., Akhmedov S.D.

Development of coronary stents coated with magnetic nanoparticles for atherosclerosis treatment // International Conference on Nanoscience, Nanotechnology and Advanced Materials: Abstracts, Rushikobda, December 14-17, 2015. – Rushikobda: Gitam University, 2015 – P. 133

17. Efimova E.V., Stankevich K.S., Goreninsky S.I., Danilenko N.V., Surgutskaya N.S., Bolbasov E.N., Akhmedov S.D., Tverdokhlebov S.I. Investigation of the temperature treatment influence on the composite material made of polylactic acid and magnetic nanoparticles // International Conference on Nanoscience, Nanotechnology and Advanced Materials: Abstracts, Rushikobda, December 14-17, 2015. – Rushikobda: Gitam University, 2015 – P. 69

Список использованных источников

1. Шумаков В.И. Достижения и перспективы развития трансплантологии и искусственных органов в России // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2005. – № 3. – С. 6-9.
2. Стратегия развития медицинской науки в российской федерации на период до 2025 года. – Режим доступа к ст.: http://www.biometrica.tomsk.ru/SRMN_2025.pdf.
3. Аналитический обзор литературы в области регенеративной медицины, существующих и описанных методов создания тканей и органов, руководств, парадигм и возможностей. – // Режим доступа к ст.: http://www.regmedgrant.com/files/review1_rus.pdf.
4. Guo B., Lei B., Li P., Ma P.X. Functionalized scaffolds to enhance tissue regeneration // Regenerative Biomaterials. – 2015. – V. 2. – P. 47–57.
5. Sridharan R., Cameron A.R., Kelly D.J., Kearney C.J., O'Brien F.J. Biomaterial based modulation of macrophage polarization: a review and suggested design principles // Materials Today. – 2015. – V. 18. – P. 313-325.
6. Murugan R., Ramakrishna S. Design strategies of tissue engineering scaffolds with controlled fiber orientation // Tissue Engineering. – 2007. – V. 13. – P. 1845–1866.
7. Collins M.N., Birkinshaw C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review // Carbohydrate Polymers. – 2013. – V. 92. – P. 1262–1279.
8. Chen G.P., Ushida T., Tateishi T. Scaffold design for tissue engineering // Macromolecular Bioscience. – 2002. – V. 2. – P. 67–77.
9. O'Brien F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering // Materials Today. – 2011. – V. 14. – P. 88–95.
10. Anderson J.M., Rodriguez A., Chang D.T. Foreign body reaction to biomaterials // Semin. Immunol. – 2008. – V. 20. – P. 86–100.

- 11.Mantovani A., Biswas S.K., Galdiero M.R., Sica A., Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodeling // J. Pathol. – 2013. – V. 229. – P. 176–185.
- 12.Mosser D.M. The many faces of macrophage activation // J. Leukoc. Biol. – 2003. – V. 73. – P. 209–212.
- 13.Rees A.J. Monocyte and macrophage biology: an overview // Semin. Nephrol. – 2010. – V. 30. – P. 216–233.
- 14.Kzhyshkowska J., Gudima A., Riabov V., Dollinger C., Lavalley P., Vrana N.E. Macrophage responses to implants: prospects for personalized medicine // J Leukoc Biol. – 2015. – V. 98. – P. 953-962.
- 15.Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A., Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization // Trends Immunol. – 2004. – V. 25. – P. 677–686.
16. Gordon S. Alternative activation of macrophages // Nat. Rev. Immunol. – 2003. – V. 3. – P. 23–35.
- 17.Martinez F.O., Helming L., Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective // Annu. Rev. Immunol. – 2009. – V. 27. – P. 451–483.
- 18.Gordon S., Martinez F.O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions // Immunity. – 2010. – V. 32. – P. 593–604.
- 19.Mosser D.M., Edwards J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation // Nat. Rev. Immunol. – 2008. – V. 8. – P. 958–969.
- 20.Koh T.J., DiPietro L.A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage // Expert Rev. Mol. Med. – 2011. – V. 13. – P. 23.
- 21.Stout R.D., Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments // J. Leukoc. Biol. – 2004. – V. 76. – P. 509–513.
- 22.D’Andrea A., Ma X., Aste-Amezaga M., Paganin C., Trinchieri G. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL- 13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and

- tumor necrosis factor alpha production // J. Exp. Med. – 1995. – V. 181. – P. 537–546.
23. Brown B.N., Ratner B.D., Goodman S.B., Amar S., Badylak S.F. Macrophage polarization: an opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine // Biomaterials. – 2012. – V. 33. – P. 3792–3802.
24. Wynn T.A., Chawla A., Pollard J.W. Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease // Nature. – 2013. – V. 496. – P. 445–455.
25. Zaveri T.D., Lewis J.S., Dolgova N.V., Clare-Salzler M.J., Keselowsky B.G. Integrin-directed modulation of macrophage responses to biomaterials. // Biomaterials. – 2014. – V. 35. – P. 3504–3515.
26. Love R.J., Jones K.S. The recognition of biomaterials: pattern recognition of medical polymers and their adsorbed biomolecules // J. Biomed. Mater. Res. – 2013. – V. A 101. – P. 2740–2752.
27. Hutmacher D.W. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues — state of the art and future perspectives // J. Biomater. Sci. Polymer Edn. – 2001. – V. 12. – P. 107–124.
28. Vroman I., Tighzert L. Biodegradable Polymers // Materials. – 2009. – V. 2. – P. 307–344.
29. Tokiwa Y., Calabia B.P., Ugwu C.U., Aiba S. Biodegradability of Plastics // Int. J. Mol. Sci. – 2009. – V. 10. – P. 3722–3742.
30. Rasal R.M., Janorkar A.V., Hirt D.E. Poly(lactic acid) modifications // Progress in Polymer Science. – 2010. – V. 35. – P. 338–356.
31. Nicolette R., dos Santos D.F., Faccioli L.H. The uptake of PLGA micro or nanoparticles by macrophages provokes distinct in vitro inflammatory response // Int Immunopharmacol. – 2011. – V. 11. – P. 1557–1563.
32. Yoon S.J., Kim S.H., Ha H.J., Ko Y.K., So J.W., Kim M.S., Yang Y.I., Khang G., Rhee J.M., Lee H.B. Reduction of inflammatory reaction of poly(D,L-lactic-co-glycolic Acid) using demineralized bone particles // Tissue Eng Part A. – 2008. – V. 14. – P. 539–547.

33. Iwasaki Y., Sawada S., Ishihara K., Khang G., Lee H.B. Reduction of surface-induced inflammatory reaction on PLGA/MPC polymer blend // *Biomaterials*. – 2002. – V. 23. – P. 3897-3903.
34. Parks A.C., Sung K., Wu B.M. A three-dimensional in vitro model to quantify inflammatory response to biomaterials // *Acta Biomater.* – 2014. – V. 10. – P. 4742-4749.
35. Zhu J H., Yang F., Tang B., Li X.M., Chu Y.N., Liu Y.L., Wang S.G., Wu D.C., Zhang Y. Mesenchymal stem cells attenuated PLGA-induced inflammatory responses by inhibiting host DC maturation and function // *Biomaterials*. – 2015. – V. 53. – P. 688-698.
36. Stankevich K.S., Gudima A., Filimonov V.D., Kluter H., Mamontova E.M., Tverdokhlebov S.I., Kzhyshkowska J. Surface modification of biomaterials based on high-molecular polylactic acid and their effect on inflammatory reactions of primary human monocyte-derived macrophages: perspective for personalized therapy // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* – 2015. – V. 51. – P. 117-126.
37. Bos R.R.M., Rozema F.R., Boering G., Nijenhuis A.J., Pennings A.J., Verwey A.B., Nieuwenhuis P., Jansen H.W.B., Debruijn W.C. Degradation of and Tissue Reaction to Biodegradable Poly (L-Lactide) for Use as Osteosynthesis // *Biomaterial-Tissue Interfaces*. – 1992. – V. 10. – P. 405-411.
38. Ramot Y., Zada M.H., Domb A.J., Nyska A. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2016. Epub ahead of print.
39. Kim B., Mooney D.J. Engineering smooth muscle tissue with a predefined structure // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1998. – V. 41. – P. 322-332.
40. Mikos A.G., Sarakinos G., Vacanti J.P., Langar R.S., Cima L.G. Biocompatible polymer membranes and methods of preparation of three dimensional membrane structures // U.S. patent 5 514 378. – 1996.
41. Ma P.X., Langer R. Fabrication of biodegradable polymer foams for cell transplantation and tissue engineering / Eds. Morgan J., Yarmush M. // *Tissue Engineering Methods and Protocols*. Humana Press – NJ, 47.

42. Mooney D.J., Baldwin D.F., Suh N.P., Vacanti J.P., Langer R. Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents // *Biomaterials*. – 1996. – V. 17. – P. 1417-1422.
43. Kim T.G., Yoon J.J., Lee D.S., Park T.G. Gas foamed open porous biodegradable polymeric microspheres // *Biomaterials*. – 2006. – V. 27. – P. 152-159.
44. Smith L.A., Beck J.A., Ma P.X. Nano fibrous scaffolds and their biological effects / Eds. Kumar C. // *Tissue Cell and Organ Engineering*. – 2006. – P. 195.
45. Zeltinger J., Sherwood J.K., Graham D.A., Mueller R., Griffith L.G. Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation and matrix deposition // *Tissue Eng.* – 2001. – V. 7. – P. 557-572.
46. Hutmacher D.W. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues-state of the art and future perspectives // *J. Biomat. Sci. Polym. Ed.* – 2001. – V. 12. – P. 107-124.
47. Li W., Laurencin C.T., Caterson E.J., Tuan R.S., Ko F.K. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2002. – V. 60. – P. 613-621.
48. Sanders J.E., Bale S.D., Neumann T. Tissue response to microfibers of different polymers: polyester, polyethylene, polylactic acid, and polyurethane // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2002. – V. 62. – P. 222–227.
49. Almeida C.R., Serra T., Oliveira M.I., Planell J.A., Barbosa M.A., Navarro M. Impact of 3-D printed PLA- and chitosan-based scaffolds on human monocyte/macrophage responses: unraveling the effect of 3-D structures on inflammation // *Acta Biomater.* – 2014. – V. 10. – P. 613–622.
50. Siow K.S., Britcher L., Kumar S., Griesser H.J. Plasma methods for the generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and cell colonization - A review // *Plasma Process Polym.* – 2006. – V. 3. – P. 392–418.

51. De Geyter N., Morent R. Influence of dielectric barrier discharge atmosphere on PLA surface modification / Prof. Dhanjoo N. Ghista (Ed.). – Biomedical Science, Engineering and Technology, InTech. – 2012. – P. 225-246.
52. Vergne C., Buchheit O., Eddoumy F., Sorrenti E., Di Martino J., Ruch D. Modifications of the Polylactic Acid Surface Properties by DBD Plasma Treatment at Atmospheric Pressure // J. Eng. Mater. Technol. – 2011. – V. 133. – P. 030903-030903-7.
53. Liu C., Cui N., Brown N.M.D, Meenan B.J. Effects of DBD plasma operating parameters on the polymer surface modification // Surface and Coatings Technology. – 2004. – V. 185. – P. 311-320.
54. De Geyter N., Morent R., Desmet T., Trentesaux M., Gengembre L., Dubruel P., Leys C., Payen E. Plasma modification of polylactic acid in a medium pressure DBD // Surf. Coat. Technol. – 2010. – V. 204. – P. 3272-3279.
55. Pankaj S.K., Bueno-Ferrer C., Misra N.N., O'Neill L., Jiménez A., Bourke P., Cullen P.J. Characterization of polylactic acid films for food packaging as affected by dielectric barrier discharge atmospheric plasma // Innovative Food Science & Emerging Technologies. – 2014. – V. 21. – P. 107-113.
56. De Geyter N. Influence of dielectric barrier discharge atmosphere on PLA surface modification // Surface and Coatings Technology. – 2013. – V. 214. – P. 69–76.
57. Sharma C.P., Chandy T., Sunny M.C. Inhibition of platelet adhesion to glow discharge modified surfaces // Journal of biomaterials applications. – 1987. – V. 1. – P. 533-552.
58. Chandy T., Das G.S., Wilson R.F., Rao G.H. Use of plasma glow for surface-engineering biomolecules to enhance bloodcompatibility of Dacron and PTFE vascular prosthesis // Biomaterials. – 2000. – V. 21. – P. 699-712.
59. Garg HG., Hales CA. Chemistry and biology of hyaluronan. – Elsevier Science, 2004. – P. 1-10.

- 60.Fakhari A., Berkland C. Applications and emerging trends of hyaluronic acid in tissue engineering, as a dermal filler and in osteoarthritis treatment // *Acta Biomater.* – 2013. – V. 9. – P. 7081–7092.
- 61.Jiang D., Liang J., Noble P.W. Hyaluronan in Tissue Injury and Repair // *Ann Rev Cell Dev Biol.* – 2007. – V. 23. – P. 435–461.
- 62.Morra M. Engineering of Biomaterials Surfaces by Hyaluronan // *Biomacromolecules.* – 2005. – V. 6. – P. 1205-1223.
- 63.Maharjan A.S., Pilling D., Gomer R.H. High and Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Differentially Regulate Human Fibrocyte Differentiation // *PLoS ONE.* – 2011. – V. 6. – P. e26078.
- 64.Kobayashi H., Terao T. Hyaluronic acid-specific regulation of cytokines by human uterine fibroblasts. // *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* – 1997. – V. 273. – P. 1151–1159.
- 65.Rayahin J.E., Buhrman J.S., Zhang Y., Koh T.J., Gemeinhart R.A. High and Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Differentially Influence Macrophage Activation // *ACS Biomater Sci Eng.* – 2015. – V. 1. – P. 481-493.
- 66.ГОСТ Р ИСО/ТС 10993-20-2009. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 20. Принципы и методы исследования иммуотоксичности медицинских изделий // СПС КонсультантПлюс.
- 67.O'Brien J., Wilson I., Orton T., Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity // *The FEBC Journal.* – 2000. – V. 267. – P. 5421–5426.
- 68.Baugh J.A., Bucala R. Mechanisms for modulating TNF alpha in immune and inflammatory disease // *Current Opinion in Drug Discovery & Development.* – 2001. – V. 4. – P. 635-650.
- 69.William P. Arend The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease // *Cytokine & Growth Factor Reviews.* – 2002. – V. 13. – P. 323–340.

70. Akira S., Hirano T., Taga T., Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF) // The FASEB Journal. – 1990. – V. 4. – P. 2860-2867.
71. Mihara M., Hashizume M., Yoshida H., Suzuki M., Shiina M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions // Clinical Science. – 2012. – V. 122. – P. 143-159.
72. Hunter C.A., Jones S.A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease // Nature Immunology. – 2015. – V. 16. – P. 448-457.
73. Chomarat P., Banchereau J., Davoust J., Palucka A.K. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages // Nature immunology. – 2000. – V. 1. – P. 510-514.
74. Harada A., Sekido N., Akahoshi T., Wada T., Mukaida N., Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation // Journal of Leukocyte Biology. – 1994. – V. 56. – P. 559-564.
75. Koch A.E., Polverini P.J., Kunkel S.L., Harlow L.A., DiPietro L.A., Elner VM, Elner SG, Strieter RM. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis // Science. – 1992. – V. 258. – P. 1798-1801.
76. Kzhyshkowska J., Yin S., Liu T., Riabov V., Mitrofanova I. Role of chitinase-like proteins in cancer // Biol Chem. – 2016. – V. 397. – P. 231-247.
77. Malinda K.M., Ponce L., Kleinman H.K., Shackelton L.M., Millis A.J. Gp38k, a protein synthesized by vascular smooth muscle cells, stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells // Exp Cell Res. – 1999. – V. 250. – P. 168–173.
78. Nishikawa K.C., Millis A.J. gp38k (CHI3L1) is a novel adhesion and migration factor for vascular cells // Exp Cell Res. – 2003. – V. 287. – P. 79–87.
79. Wynn T.A., Vannella K.M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis // Immunity. – 2016. – V. 44. – P. 450-462.
80. Saraiva M., O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells // Nature Reviews, Immunology. – 2010. – V. 10. – P. 170-181.

- 81.Boehler R.M., Kuo R., Shin S., Goodman A.G., Pilecki M.A., Leonard J.N., Shea L.D. Lentivirus delivery of IL-10 to promote and sustain macrophage polarization towards an anti-inflammatory phenotype // *Biotechnol. Bioeng.* – 2014. – V. 111. – P. 1210–1221.
- 82.Letterio J.J., Roberts A.B. Regulation of immune responses by TGF-beta // *Annu. Rev. Immunol.* – 1998. – V. 16. – P.137–161.
- 83.Schraufstatter I.U., Zhao M., Khaldoyanidi S.K., Discipio R.G. The chemokine CCL18 causes maturation of cultured monocytes to macrophages in the M2 spectrum // *Immunology.* – 2012. – V. 135. – P. 287–298.
- 84.Schutysen E., Richmond A., Van Damme J. Involvement of CC chemokine ligand 18 (CCL18) in normal and pathological processes // *Journal of Leukocyte Biology.* – 2005. – V. 78. – P. 14-26.
- 85.Xie B., Laouar A., Huberman E. Fibronectin-mediated Cell Adhesion Is Required for Induction of 92-kDa Type IV Collagenase/Gelatinase (MMP-9) Gene Expression during Macrophage Differentiation // *The journal of biological chemistry.* – 1998. – V. 273. – P. 11576–11582.
- 86.Lopez-Boado Y.S., Wilson C.L., Hooper L.V., Gordon J. ., Hultgren S.J., Parks W.C. Bacterial exposure induces and activates matrilysin in mucosal epithelial cells // *J. Cell Biol.* – 2000. – V. 148. – P. 1305-1315.
- 87.Burke B. The role of matrix metalloproteinase 7 in innate immunity // *Immunobiology.* – 2004. – V. 209. – P. 51–56.
- 88.Kothari P., Pestana R., Mesraoua R., Elchaki R., Khan K.M., Dannenberg A.J., Falcone D.J. IL-6-mediated induction of matrix metalloproteinase-9 is modulated by JAK-dependent IL-10 expression in macrophages // *J Immunol.* – 2014. – V. 192. – P. 349-357.
- 89.Vandooren J., Van den Steen P.E., Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade // *Crit Rev Biochem Mol Biol.* – 2013. – V. 48. – P. 222–272.

90. Riabov V., Gudima A., Wang N., Mickley A., Orekhov A., Kzhyshkowska J. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis // *Front Physiol.* – 2014. – V. 5. – P. 75.
91. Li A., Dubey S., Varney M.L., Dave B.J., Singh R.K. IL-8 Directly Enhanced Endothelial Cell Survival, Proliferation, and Matrix Metalloproteinases Production and Regulated Angiogenesis // *The Journal of Immunology.* – 2003. – V. 170. – P. 3369-3376.
92. Biomaterials Market – Global Forecasts to 2017. – Режим доступа к ст.: <http://marketsandmarkets.com>.
93. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение: учебно-методическое пособие / И.Г. Видяев, Г.Н. Серикова, Н.А. Гаврикова, Н.В. Шаповалова, Л.Р. Тухватулина З.В. Криницына; Томский политехнический университет. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2014. – 36 с.
94. ГОСТ 5964-93. Спирт этиловый. Правила приемки и методы анализа // СПС КонсультантПлюс.
95. Registry of Toxic Effects of Chemical Substances. Produced by Micromedex. Inc. @27 NFPA (1996).
96. ГОСТ 2184-2013. Кислота серная техническая. Технические условия // СПС КонсультантПлюс.
97. Строительные нормы и правила СНиП 23-05-95 "Естественное и искусственное освещение" (утв. постановлением Минстроя РФ от 2 августа 1995 г. N 18-78) // СПС КонсультантПлюс.
98. Санитарные нормы СН 2.2.4/2.1.8.562-96. "Шум на рабочих местах, в помещениях жилых, общественных зданий и на территории жилой застройки" (утв. постановлением Госкомсанэпиднадзора РФ от 31 октября 1996 г. N 36) // СПС КонсультантПлюс.
99. ГОСТ 12.1.029-80. Система стандартов безопасности труда. Средства и методы защиты от шума. Классификация // СПС КонсультантПлюс.

100. СН 4557-88. Санитарные нормы ультрафиолетового излучения в производственных помещениях // СПС КонсультантПлюс.
101. Санитарные правила и нормы СанПиН 2.2.4.548-96. «Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений» // СПС КонсультантПлюс.
102. СП 1.3.3118-13. "Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)" // СПС КонсультантПлюс.
103. ГОСТ Р 12.1.019-2009. Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты // СПС КонсультантПлюс.
104. ГОСТ Р 12.3.047-98. Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность технологических процессов. Общие требования. Методы контроля // СПС КонсультантПлюс.
105. Санитарные правила и нормы СанПиН 2.2.2.542-96 "Гигиенические требования к видеодисплейным терминалам, персональным электронно-вычислительным машинам и организации работы" (утв. постановлением Госкомсанэпиднадзора РФ от 14 июля 1996 г. №14) // СПС КонсультантПлюс.
106. СанПиН N2.1.7.2790-10 от 12 декабря 2010 года " Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами" // СПС КонсультантПлюс.
107. Федеральный закон от 30.12.2009 N 384-ФЗ «Технический регламент о безопасности зданий и сооружений» // СПС КонсультантПлюс.
108. Федеральный закон от 30.12.2001 N 197-ФЗ «Трудовой кодекс Российской Федерации» (ред. от 28.12.2013) // СПС КонсультантПлюс.
109. Межгосударственный стандарт ГОСТ 12.0.230-2007. "Система стандартов безопасности труда. Системы управления охраной труда. Общие требования ILO-OSH2001" // СПС КонсультантПлюс.

Приложение 1

Раздел 4 Результаты проведенного исследования

Студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ41	Станкевич К.С.		

Консультант кафедры БИОХ

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор каф. БИОХ ИФВТ	Потапов А.С.	д.х.н., доцент		

Консультант – лингвист кафедры иностранных языков

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель кафедры иностраных языков ФТИ	Сумцова О.В.			

4. Results of the conducted research

4.1 The cell viability investigation

The results of the cell viability assay are shown in Fig. 7.

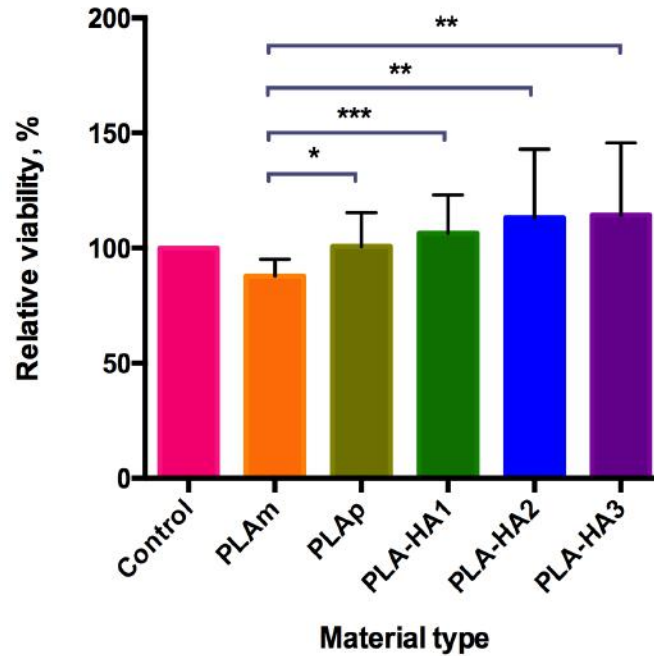


Figure 7 - The results of the cell viability assay, Alamar Blue (non-stimulated monocytes were co-cultured with the materials for 6 days in X-VIVO 10). *- $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$; $n = 5$; Mann-Whitney test

According to the equation (1), the cell viability of the M0 macrophages co-cultured with the materials was 90% for all the material types. Thus, investigated scaffolds are non-toxic. Meanwhile, the cell viability of the M0 macrophages co-cultured with the modified matrices (PLAp, PLA-HA1, PLA-HA2, PLA-HA3) increased significantly in comparison with the cell viability of the M0 macrophages co-cultured with the non-modified matrices (PLAm). Thus, the results confirm that the atmospheric pressure plasma treatment and the atmospheric pressure plasma assisted immobilization of hyaluronic acid enhance scaffold biocompatibility.

4.2 Investigation of the scaffold influence on the M1-associated cytokines release by macrophages

As it was mentioned previously, the immune cells response, in particular, macrophage reaction to the tissue-engineering scaffold defines the further success of the implantation procedure. Macrophages have two main polarization states - M1-like phenotype (M1) appearing under inflammatory stimuli like IFN γ or LPS (in the present research macrophages polarized under IFN γ will be assigned as M1) and M2-like phenotype (M2) arising under IL4, IL13, and IL10 stimulation (in the present research macrophages polarized under IL4 will be assigned as M2). M1 macrophages are responsible for the inflammatory reactions while M2 macrophages favour wound healing [11-14]. In the scaffold implantation site both types of macrophages could be found. However, under influence of the biomaterial physicochemical cues, a shift in M1:M2 ratio could appear leading to pathological processes [5]. In order to investigate the effect of produced PLA-based tissue engineering scaffolds modified with HA on macrophages CD14⁺ monocytes were isolated out of buffy coats of healthy donors and co-cultured with the biomaterials for 6 days in the presence of IFN γ or IL-4 as major cytokines driving prototypical M1 and M2 macrophage polarization. Regarding the fact that HA may act as a pro-inflammatory agent in early stage of wound healing stimulating TNF α , IL-1 β , and IL-8 release, these three cytokines were chosen as inflammatory markers [64]. Moreover, two additional M1 markers were investigated: IL-6 as a classical inflammatory cytokine and chitinase-like protein YKL40 (CHI3L1).

TNF α is a multifunctional cytokine involved in acute inflammatory reaction. It induces ICAM-1 expression, neutrophils and monocytes adhesion, the growth and differentiation of B cells, and the migration of other inflammatory cells to the injury site. Moreover, TNF α stimulates the secretion of other proinflammatory cytokines such as IL1 β [68]. TNF α concentration levels in supernatants collected after the co-culture of the M0, M1, and M2 macrophages with the tissue engineering matrices after 6 h and on day 6 determined by ELISA are shown in Fig. 8.

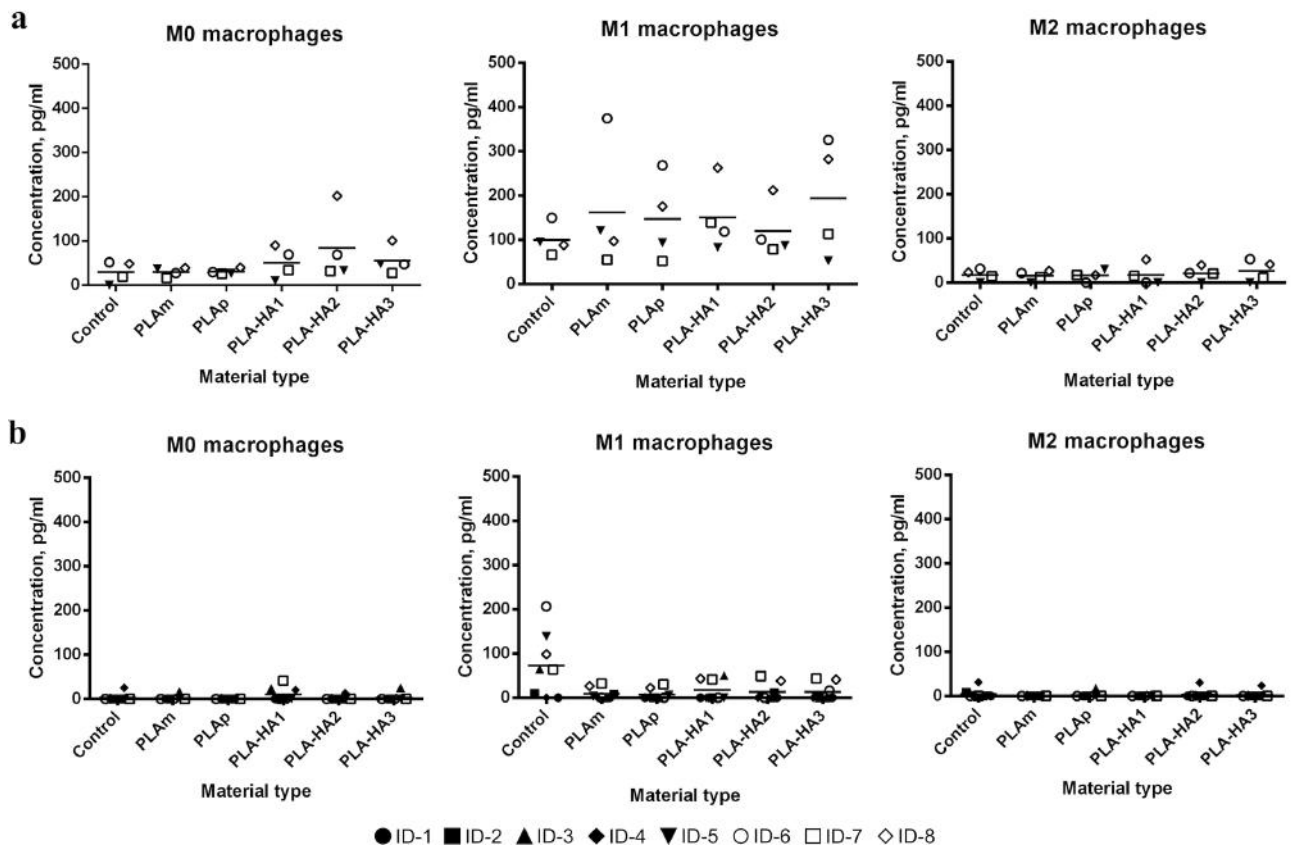


Figure 8 - TNF α concentration levels in supernatants after 6 h (panel a) and on day 6 (panel b) of the co-culture of the primary human monocyte-derived macrophages with the tissue engineering matrices

All the investigated materials don't up-regulate TNF α secretion by M0 macrophages after 6 h of co-culture, except PLA-HA2, which stimulates TNF α release by ID-8 macrophages. ID-8 M1 macrophages respond with an elevated TNF α production to PLAp and PLA-HA (all types). ID-6 M1 macrophages display a similar reaction: they respond with an increased TNF α secretion to PLAp, PLAp and PLA-HA3. M2 macrophages of all the donors produce TNF α at the background level.

M0 and M2 macrophages of all the donors did not secrete a significant concentration of TNF α on the day 6 of the co-culture with the materials. At the same time M1 macrophages of 5 out of 8 donors (including ID-6 and ID-8, who had TNF α up-regulated after 6 h) have TNF α down-regulated in comparison with control (the other 3 donors have TNF α concentration on the control level).

Another cytokine involved in the acute inflammation stage is IL1 β . Its functions overlap with the functions of TNF α : IL1 β also induces ICAM-1 expression,

growth and differentiation of B and T cells [69-70]. IL1 β concentration levels in supernatants collected after the co-culture of the M0, M1, and M2 macrophages with the tissue engineering matrices on day 6 determined by ELISA are shown in Fig. 9.

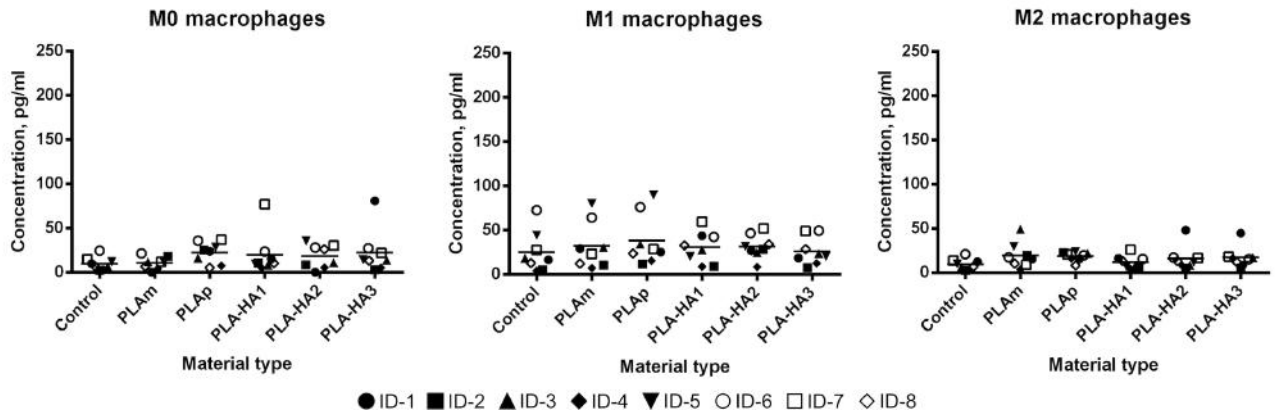


Figure 9 - IL1 β concentration levels in supernatants on day 6 of the co-culture of the primary human monocyte-derived macrophages with the tissue engineering matrices

All the investigated materials did not up-regulate IL1 β secretion by M0 macrophages, except PLA-HA2 and PLA-HA3 that stimulate a slight increase of IL1 β concentration in supernatants collected from ID-7 and ID-1 cells. PLAm and PLAp insignificantly up-regulate IL1 β in ID-5 M1 macrophages. M2 macrophages of all the donors produce IL1 β at the background level except slight increase of IL1 β concentration in supernatants collected from ID-1 macrophages co-cultured with PLA-HA2 and PLA-HA3.

IL-6 is an important mediator of the acute inflammation secreted by macrophages in response to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) [71]. It induces an antibody production in B cells; in combination with IL1 promotes the appearance of regulatory B cells, which secrete IL10. IL6 influences the T cells activation and differentiation, for example, it enhances Bcl-6 expression through activation of STAT3 that leads to T_{FH} cells appearance [72]. Besides, IL6 stimulates the expression of acute-phase proteins [71]. In addition, IL-6 influences the macrophage polarization skewing monocytes differentiation towards macrophages instead of dendritic cells owing to its ability to drive m-CSF expression [73]. IL6

concentration levels in supernatants collected after the co-culture of the M0, M1, and M2 macrophages with the tissue engineering matrices on day 6 determined by ELISA are shown in Fig. 10.

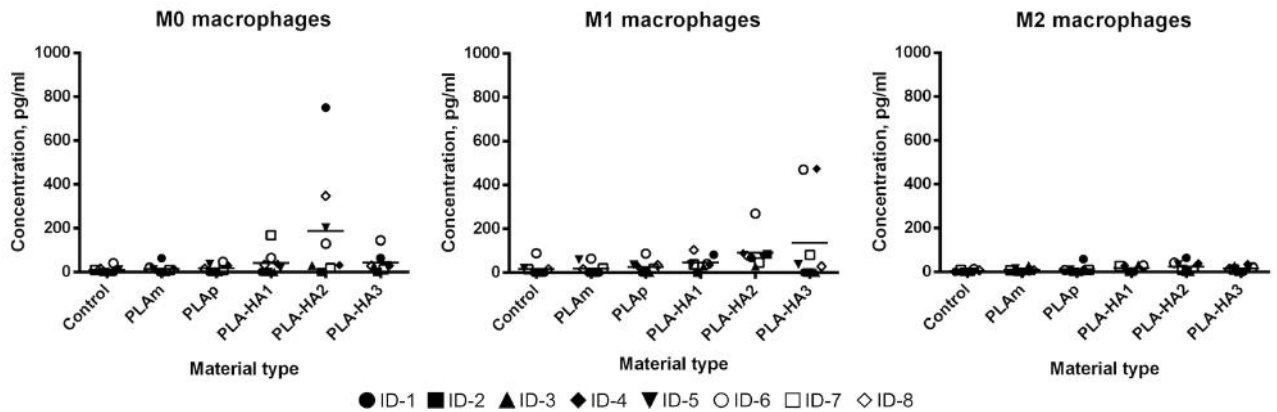


Figure 10 - IL6 concentration levels in supernatants on day 6 of the co-culture of the primary human monocyte-derived macrophages with the tissue engineering matrices

A dramatic increase of IL6 secretion by M0 macrophages co-cultured with PLA-HA2 was observed in 3 out of 8 donors (ID-1, ID-5, and ID-8). Meanwhile, the other materials did not cause such a reaction. IL6 is released by M1 macrophages of 2 donors (ID-4 and ID-6) in a HA dose-dependent manner: the more HA is immobilized on the surface the higher IL6 concentration is in supernatants. The rest of the donors did not display any specific reaction to any of the material types. No IL6 secretion by M2 macrophages was found.

IL8 is a classical marker of M1 macrophages playing a dual role. On the one hand, IL-8 is a cytokine that exhibits chemotactic activity against neutrophils and lymphocytes. It induces neutrophils to express Mac-1 and CR-1 and to adhere to endothelial cells [74]. On the other hand, IL8 is a macrophage-derived mediator of angiogenesis [75]. The latter role is very important for the tissue engineering scaffold integration to the host. Thus, IL8 promotes an acute inflammation and neovascularization as well. IL8 concentration levels in supernatants collected after the co-culture of the M0, M1, and M2 macrophages with the tissue engineering matrices on day 6 determined by ELISA are shown in Fig. 11.

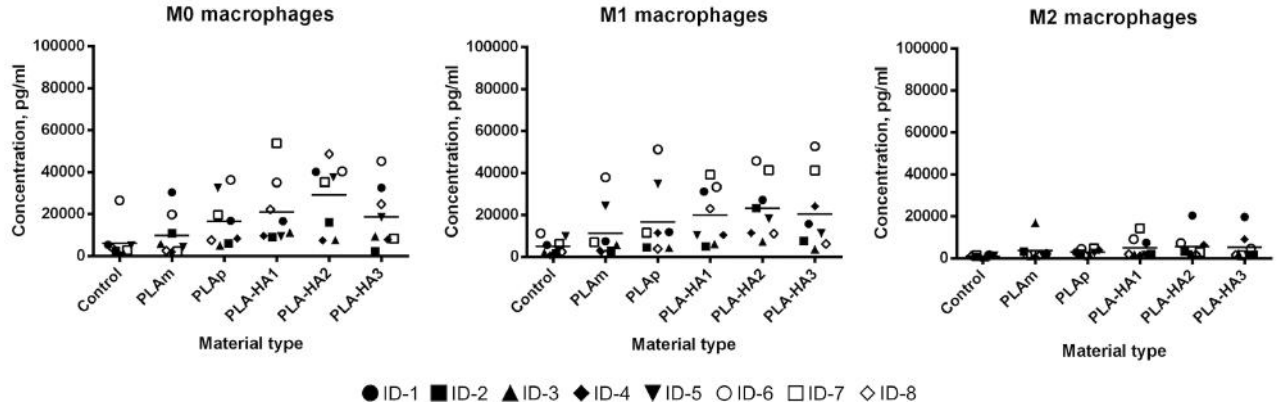


Figure 11 - IL8 concentration levels in supernatants on day 6 of the co-culture of the primary human monocyte-derived macrophages with the tissue engineering matrices

All the PLA-HA materials up-regulate IL-8 production by M0 and M1 macrophages in at least 50% of donors, whereas PLA and PLAp cause elevated IL-8 secretion by M0 and M1 macrophages only in ID-5 and ID-6. A slight increase of IL8 concentration was observed in M2 macrophages of ID-1. M2 macrophages of the other donors produced IL8 at the background level.

The last inflammatory marker considered by us is YKL40 (CHI3L1) - chitinase-like protein secreted by a variety of cells including macrophages. It is a marker of acute and chronic inflammation. Its presence in pathological conditions leads to tissue fibrosis [76]. In several studies it was shown, that YKL40 can promote angiogenesis, in particular, owing to its heparin-binding affinity resulting in up-regulation of VEGF expression. YKL40 has two potential hyaluronan binding motifs [77-78]. It is not known whether YKL40 could bind hyaluronan. However, if YKL40 could recognize it, it could effect on hyaluronic acid levels and events related to the tissue remodeling. CHI3L1 expression on day 6 by M0, M1, and M2 macrophages co-cultured with the tissue engineering matrices determined by qRT-PCR is shown in Fig. 12 as a heat map.

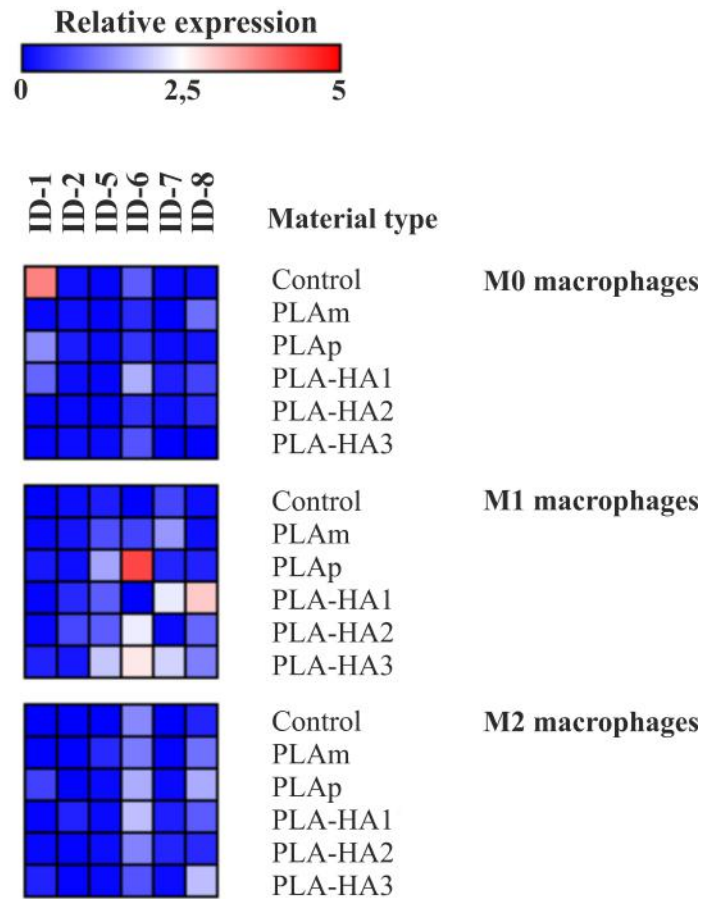


Figure 12 - Heat map of CHI3L1 expression by primary human monocyte-derived macrophages co-cultured with the tissue engineering matrices during 6 days. House-keeping gene GAPDH was used as a reference

No increased CHI3L1 expression was observed in M0 and M2 macrophages of all the donors except ID-6. M2 macrophages of this donor have CHI3L1 up-regulated but not more than 2-fold in comparison with the control. M1 macrophages of the same donor have increased CHI3L1 expression up to 2.5 times when co-cultured with PLAp, PLA-HA2, and PLA-HA3. In addition, M1 macrophages of the ID-7, ID-8, and ID-5, ID-7 have increased CHI3L1 expression when co-cultured with the PLA-HA1 and PLA-HA3 respectively.

4.3 Investigation of the scaffold influence on the M2-associated cytokines release by macrophages

Opposite to the classically activated M1-like macrophages is anti-inflammatory M2 phenotype [79]. M2 macrophages promote wound healing and secrete anti-inflammatory cytokines. IL1ra, TGF β , IL10, and CCL18 were chosen as markers of M2 phenotype.

IL1ra is secreted in response to IL1 in order to inhibit the pro-inflammatory effect of the last. It binds to the IL1 receptor preventing activation of the intercellular signalling switching by this cytokine. To inhibit the effect of IL1, the concentration of IL1ra has to be 100 times higher. Unbalance between IL1 and IL1ra leads to the development of several diseases such as arthritis, inflammatory bowel disease, rejection, etc. [69]. IL1ra concentration levels in supernatants collected after the co-culture of the M0, M1, and M2 macrophages with the tissue engineering matrices on day 6 determined by ELISA are shown in Fig. 13.

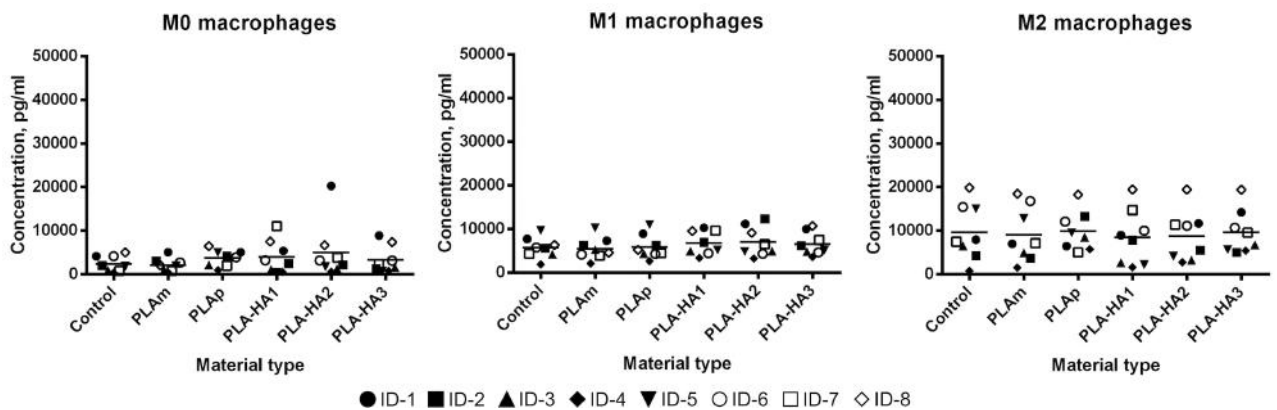


Figure 13 - IL1ra concentration levels in supernatants on day 6 of the co-culture of the primary human monocyte-derived macrophages with the tissue engineering matrices

IL1ra secretion by M0, M1, and M2 macrophages cultured with tissue engineering matrices did not vary significantly in comparison with the control, except M0 macrophages of ID-1 co-cultured with PLA-HA2. Concentration of IL1ra exceeds IL1 β by 100 times.

IL10 is a strong suppressor of the effector functions of macrophages, T-cells, and NK-cells. It inhibits secretion of IL1, IL6, TNF α , and IL12 by macrophages and IFN γ production by T-lymphocytes [80-81]. TGF β 1 also suppresses a macrophage activation and proliferation, as well as ROS production [82]. Together these cytokines exhibit a strong immunosuppressive and anti-inflammatory effect inducing resolution of inflammation. However, it was shown that elevated TGF β 1 secretion could contribute to fibrosis through fibroblast activation [79]. TGF β 1 concentration levels in supernatants collected after the co-culture of the M0, M1, and M2 macrophages with the tissue engineering matrices on day 6 determined by ELISA are shown in Fig. 14.

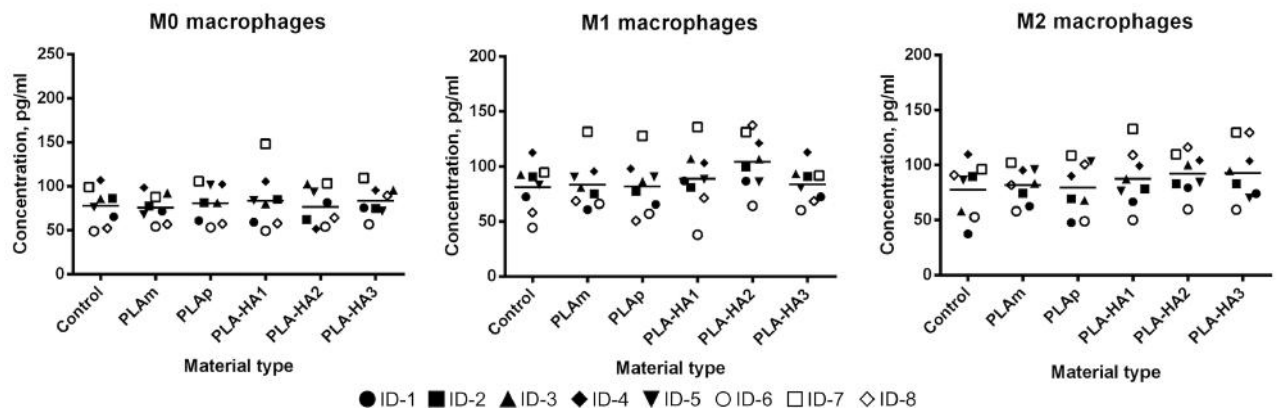


Figure 14 - TGF β 1 concentration levels in supernatants on day 6 of the co-culture of the primary human monocyte-derived macrophages with the tissue engineering matrices

TGF β 1 secretion by M0, M1, and M2 macrophages co-cultured with tissue engineering matrices did not vary significantly in comparison with the control. No IL10 release by any macrophage subpopulation was found.

An additional marker of M2 macrophages is CCL18. This chemokine is able to induce the M2 macrophages polarization [83], however, it is supposed to be involved in chronic Th2-mediated diseases and chronic inflammation [84]. CCL18 concentration levels in supernatants collected after the co-culture of the M0, M1, and

M2 macrophages with the tissue engineering matrices on day 6 determined by ELISA are shown in Fig. 15.

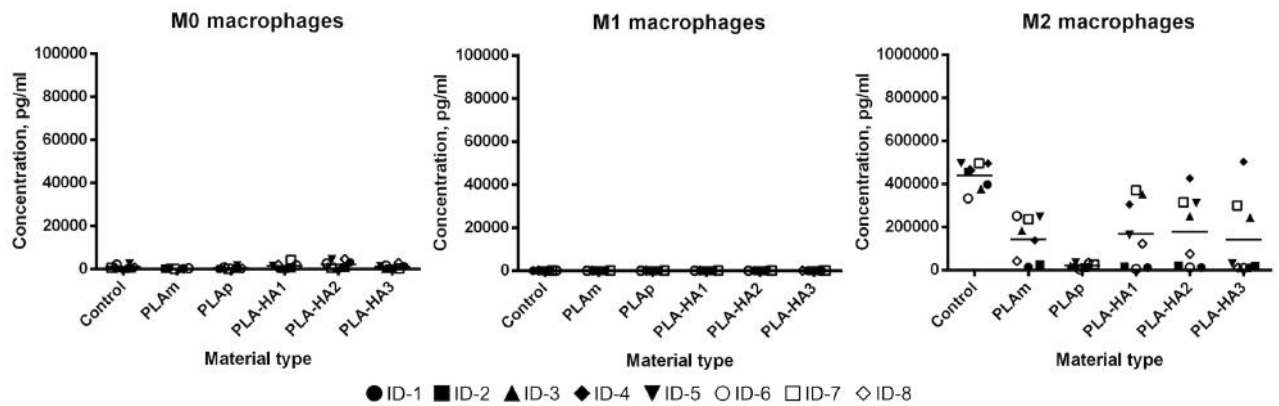


Figure 15 - CCL18 concentration levels in supernatants on day 6 of the co-culture of the primary human monocyte-derived macrophages with the tissue engineering matrices

PLAp down-regulates CCL18 in M2 macrophages of all the donors, while other materials either do not affect ($\approx 50\%$ of donors) or suppress CCL18 ($\approx 50\%$ of donors). No CCL18 secretion was found in M0 or M1 macrophages.

4.4 Investigation of the scaffold influence on matrix remodelling by macrophages

Macrophages not only mediate inflammation or wound healing but also take part in the extracellular matrix (ECM) conversion either directly by secreting matrix metalloproteinases (MMPs) - enzymes able to degrade ECM proteins or by releasing cytokines stimulating fibroblasts or synovial cells to secrete MMPs [85]. In our research the influence of tissue engineering scaffolds on MMP7 and MMP9 secretion was investigated.

In macrophages MMP7 is strongly induced by LPS and is a marker of bacteria-induced inflammation [86]. MMP7 proenzyme form is activated by plasmin. MMP7 is able to degrade collagen, gelatine, elastin, aggrecan, and other ECM proteins. Besides, MMP7 activates MMP2 and MMP9 through cleaving their proenzyme form [87].

MMP9 is secreted by macrophages in proenzyme form in response to PGE₂ and IL-6 [88]. It is also able to degrade collagen, gelatine, elastin, aggrecan, and other ECM proteins [89]. MMP9 exhibits a pro-angiogenic activity, since it promotes release of bioactive VEGF from its ECM-bound form VEGF-A [90]. Moreover, MMP9 is able either to activate several cytokines/convert them into more active form (pro-IL1 β и IL-8) or to inactivate them (CTAP-III, PF-4, GRO α) [91]. MMP7 and MMP9 concentration levels in supernatants collected after the co-culture of the M0, M1, and M2 macrophages with the tissue engineering matrices on day 6 determined by ELISA are shown in Fig. 16.

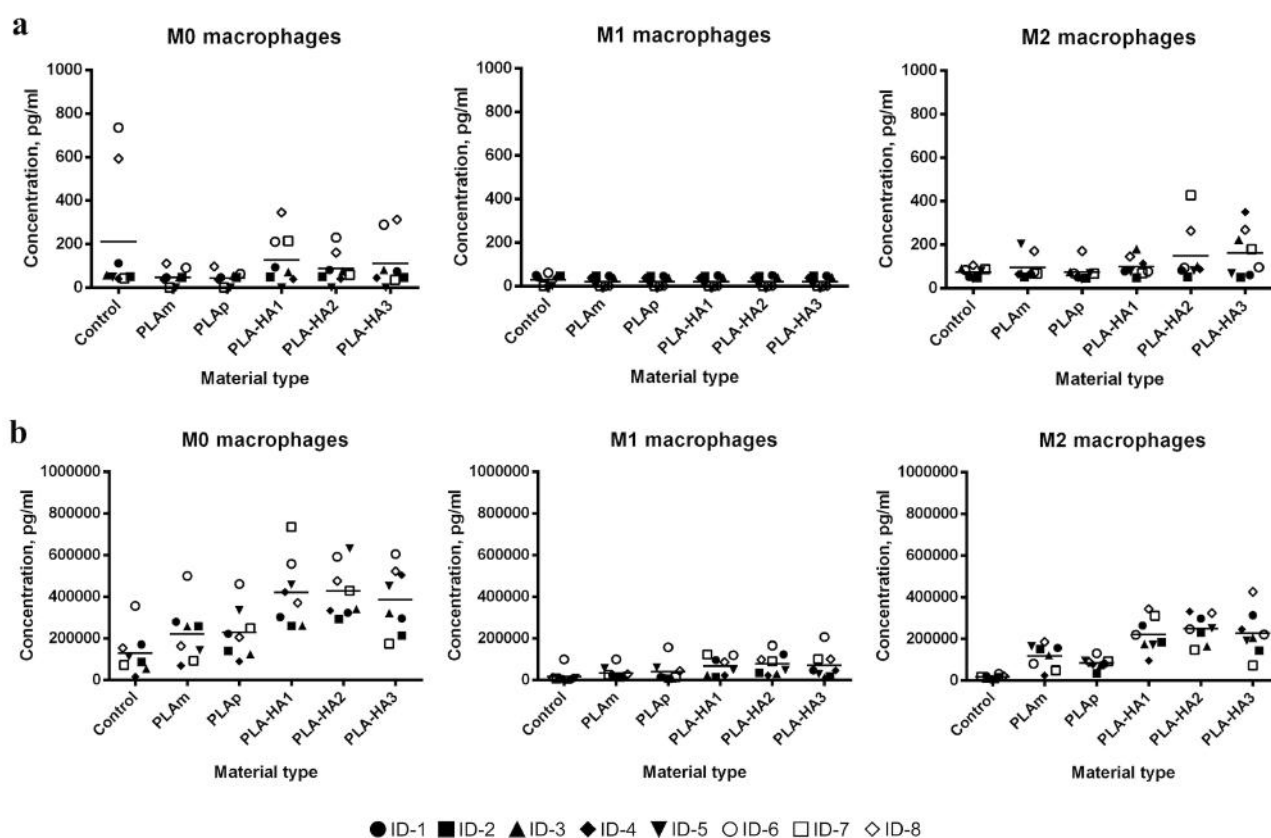


Figure 16 - MMP7 (panel a) and MMP9 (panel b) concentration levels in supernatants on day 6 of the co-culture of the primary human monocyte-derived macrophages with the tissue engineering matrices

Tissue engineering matrices modified with HA did not influence on MMP7 secretion by M0 macrophages in the majority of donors; two of them had MMP7 down-regulated (ID-6, ID-8) and one - up-regulated (ID-7). PLA-HA2 stimulated

MMP7 release by M2 macrophages of 2 (ID-7, ID-8) out of 8 donors while PLA-HA3 stimulated MMP7 release by M2 macrophages of 50% of donors. M1 macrophages did not secrete MMP7. Tissue engineering matrices up-regulate MMP9 in M0 and M2 macrophages. The MMP9 concentration measured in supernatants from PLA-HA was 2 times higher than in supernatants from PLAm and PLAp. M1 macrophages secrete MMP9 at the background level, however when cells co-cultured with PLA-HA materials the MMP9 production was slightly increased.

4.5 The estimated hypothesis and discussion of the results

The heat map reflecting the all the measured cytokines concentrations secreted by all the macrophage phenotypes of all the donors is shown in fig. 17. Biological functions of all the cytokines are summarized in table 4. The observed reactions of primary human monocyte-derived macrophages to the investigated matrices were donor-specific. All the donors could be divided into two groups: responders - those who have a pronounced pro-inflammatory reaction to the scaffold presence, and non-responders - those who have no specific immune reaction to the scaffold presence. The following donors can be included to the responders group: ID-1, ID-6, ID-7, and ID-8. ID-6 had a pro-inflammatory response to all the materials modified with HA: the secretion of IL-6, IL-8, and YKL40 (CHI3L1) by his M0 and M1 macrophages on day 6 was increased. In addition his M0 and M1 macrophages show elevated TNF α release after 6 h of the co-culture. Meanwhile ID-6 has MMP7 down-regulated in M0 macrophages. Although ID-1 had IL1ra up-regulated, his M0 and M1 macrophages secreted elevated levels of IL6 and IL8 when co-cultured with PLA-HA. M0 and M1 macrophages of ID-7 and ID-8 released an increased concentration of IL8 and YKL40 (CHI3L1) in response to PLA-HA. ID8 had also TNF α up-regulated after the 6 h of the co-culture with matrices. The rest of the donors belonged to the non-responders group and did not exhibit any specific reaction to the materials. Thus an optimal material type for them could be found.

There are some general trends that can be revealed in the donor reaction to the investigated materials:

1. All biomaterials down-regulate TNF α production by M1 macrophages on day 6;
2. PLA-HA2 material up-regulates IL6 in M0 macrophages and MMP7 in M2 macrophages on day 6;
3. PLA-HA3 material up-regulates IL6 in M1 macrophages and MMP7 in M2 macrophages on day 6;
4. PLA-HA materials up-regulate IL8 and MMP9 production by M1 and M0 macrophages on day 6; moreover, higher concentration of HA results in more pronounced response;
5. Elevated IL8 secretion is accompanied by increased MMP9 concentration;
6. PLAp strongly suppresses CCL18 production by M2 macrophages;
7. PLA-HA either suppresses or does not affect CCL18 production by M2 macrophages;
8. All biomaterials do not suppress anti-inflammatory cytokines production by M2 and M0 macrophages;

Thus, the following general hypothesis can be formulated. Considering the fact that HA immobilized on the scaffold surface possesses a certain molecular weight distribution, it contains HA oligomers in its composition. These oligomers bind to intracellular receptors CD44, RHAMM, and TLR2 expressed by M0 and M1 macrophages. This leads to the induction of the expression and secretion of IL8 and MMP9 in the majority of donors and increases TNF α (after 6 h) and IL1 β in some donors. Apparently, the presence of HA (as the major ECM component) stimulates the secretion of MMPs by macrophages already on the first day of the co-culture. MMP9 degrades HA, resulting in an elevated concentration of IL8 on day 6. The secreted TNF α and IL1 β cause an increased release of IL6 in responders. Thus, on the one hand, PLA-HA matrices can stimulate an acute inflammation and chemotaxis of lymphocytes and neutrophils. On the other hand, the presence of HA with high molecular weight blocks the secretion of proinflammatory cytokines (TNF α

concentration decreases on day 6). Since an elevated secretion of the number of proangiogenic factors is observed including IL8, MMP9, and increased expression of CHI3L1, then scaffolds coated with hyaluronic acid presumably stimulate angiogenesis. At the same time, PLA-HA matrices do not stimulate chronic inflammation, as CCL18 secretion is not increased. However, they do not inhibit macrophage effector functions, since no increased secretion of IL10 or TGF β (Fig. 17) was found.

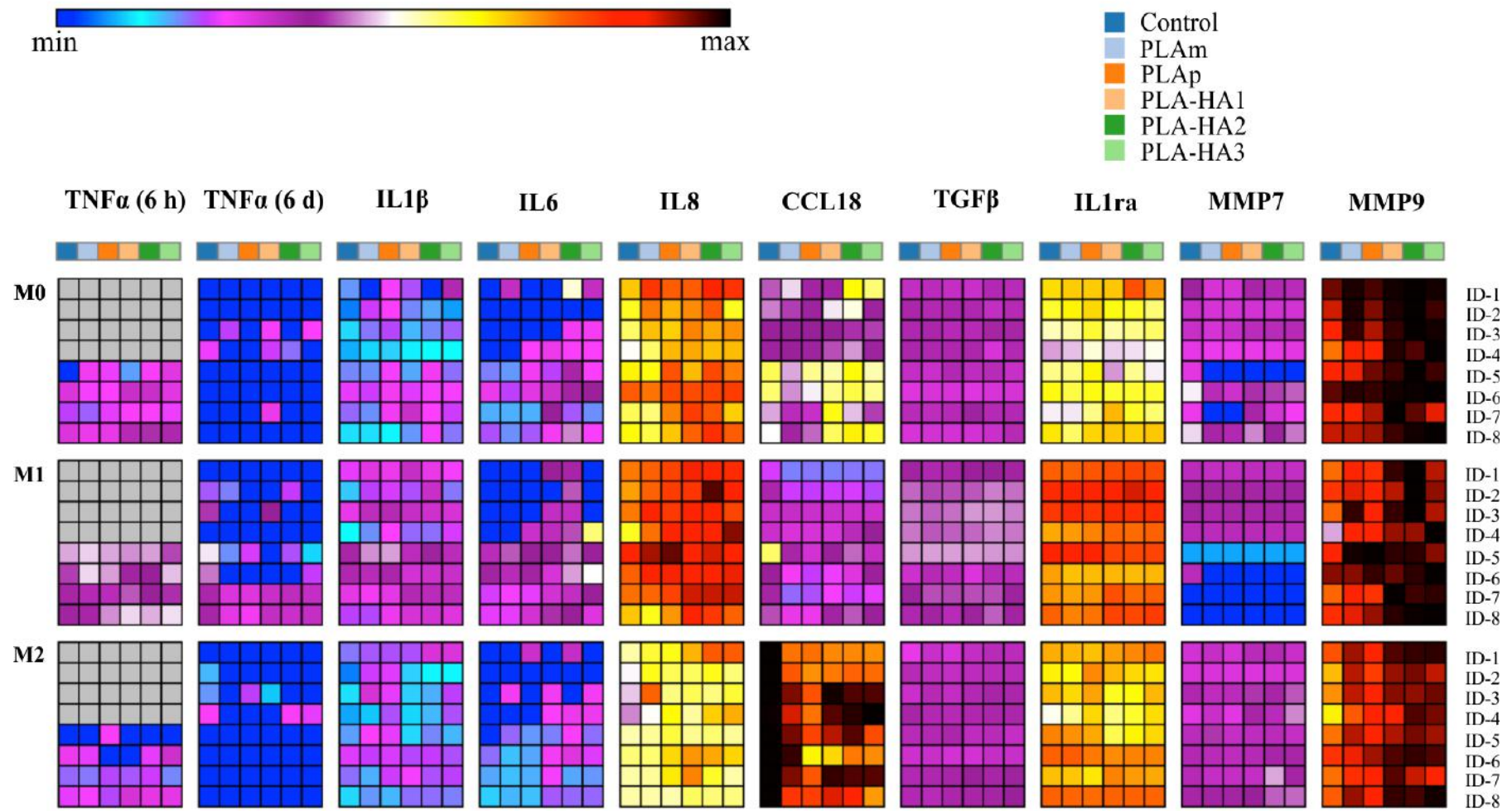


Figure 17 - The heat map reflecting the all the measured cytokines concentrations secreted by all the macrophage phenotypes of all the donors

Table 4 - Proteins that can be used as M1 and M2 macrophage markers and their biological functions

Protein	Function
TNFα	ICAM-1 $\uparrow$ IL1 β $\uparrow$ IL6 $\uparrow$ Stimulates neutrophils and monocytes adhesion, growth and differentiation of B cells
IL1β	ICAM-1 $\uparrow$ IL6 $\uparrow$ Stimulates growth and differentiation of B and T cells
IL6	Secreted in response to PAMP Stimulates an antibody production by B cells, activation and differentiation of T cells, expression of the acute phase proteins MMP9 $\uparrow$
IL8	Stimulates lymphocyte and neutrophil chemotaxis; induces an expression of Mac-1 and CR-1 by neutrophil
YKL40	Associated with acute and chronic inflammation VEGF $\uparrow$
IL1ra	IL1 $\downarrow$
TGFβ	Inhibits the proliferation of B cells and macrophages and the production of ROS by macrophages IFN γ $\downarrow$ TNF α $\downarrow$ IL2 $\downarrow$
IL10	Suppresses an effector functions of macrophages, T-cells, and NK-cells IL1 $\downarrow$ IL6 $\downarrow$ TNF α $\downarrow$ IL12 $\downarrow$ IFN γ $\downarrow$
CCL18	Is involved in chronic Th2-mediated diseases and chronic inflammation CXCL8 $\uparrow$ CCL2 $\uparrow$ CCL3 $\uparrow$ CCL22 $\uparrow$
MMP7	a marker of bacteria-induced inflammation, activates MMP2 and MMP9
MMP9	Contribute to VEGF release, activates or make more active pro-IL-1b, IL-8

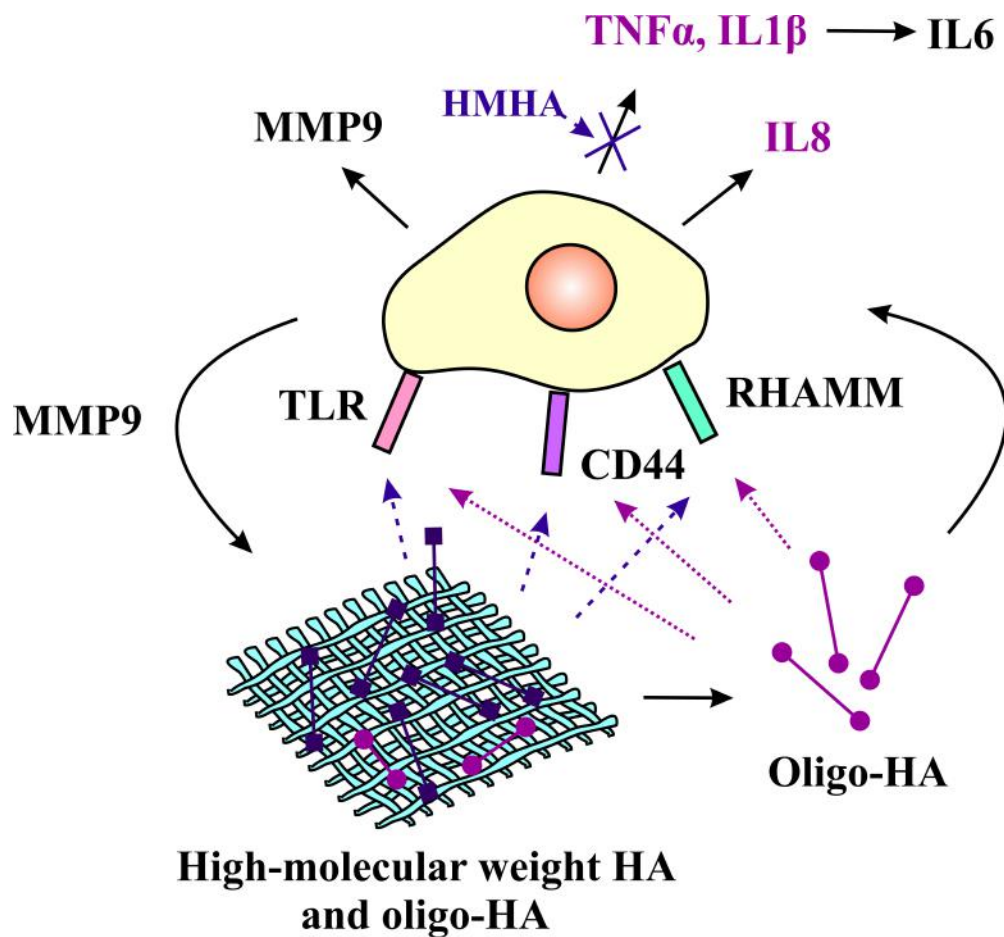


Figure 18 - The scheme of the interaction of PLA-HA scaffolds with macrophages (M0 and M1)

Among the matrices modified with HA, PLA-HA1 can be considered as the most biocompatible one, since it does not stimulate the release of IL6 and $\text{IL1}\beta$ by M0 and M1 macrophages of any donor. In addition, the lowest secretion of IL8 and expression CHI3L1 in response to this material is observed. Thus, this scaffold potentially has the pro-angiogenic properties and does not stimulate the inflammatory response. Among all the studied materials, there is one more scaffold with good biocompatibility, which was treated with atmospheric pressure plasma. It does not stimulate the release of proinflammatory cytokines in M0 and M1 macrophages and, moreover, is a strong suppressor of CCL18 . However, its pro-angiogenic properties are less pronounced, as the concentration IL8 is decreased.

4.6 *In vitro* angiogenesis

In order to investigate the effect of PLA-HA scaffolds on angiogenesis, we cultured HUVEC on matrigel without the addition of growth factors in supernatants collected after the co-culture of M0 and M1 macrophages with PLA-HA1. PLA-HA1 was chosen since it was considered as the most biocompatible material among PLA-HA. The results are shown in Fig. 19 and Fig. 20.

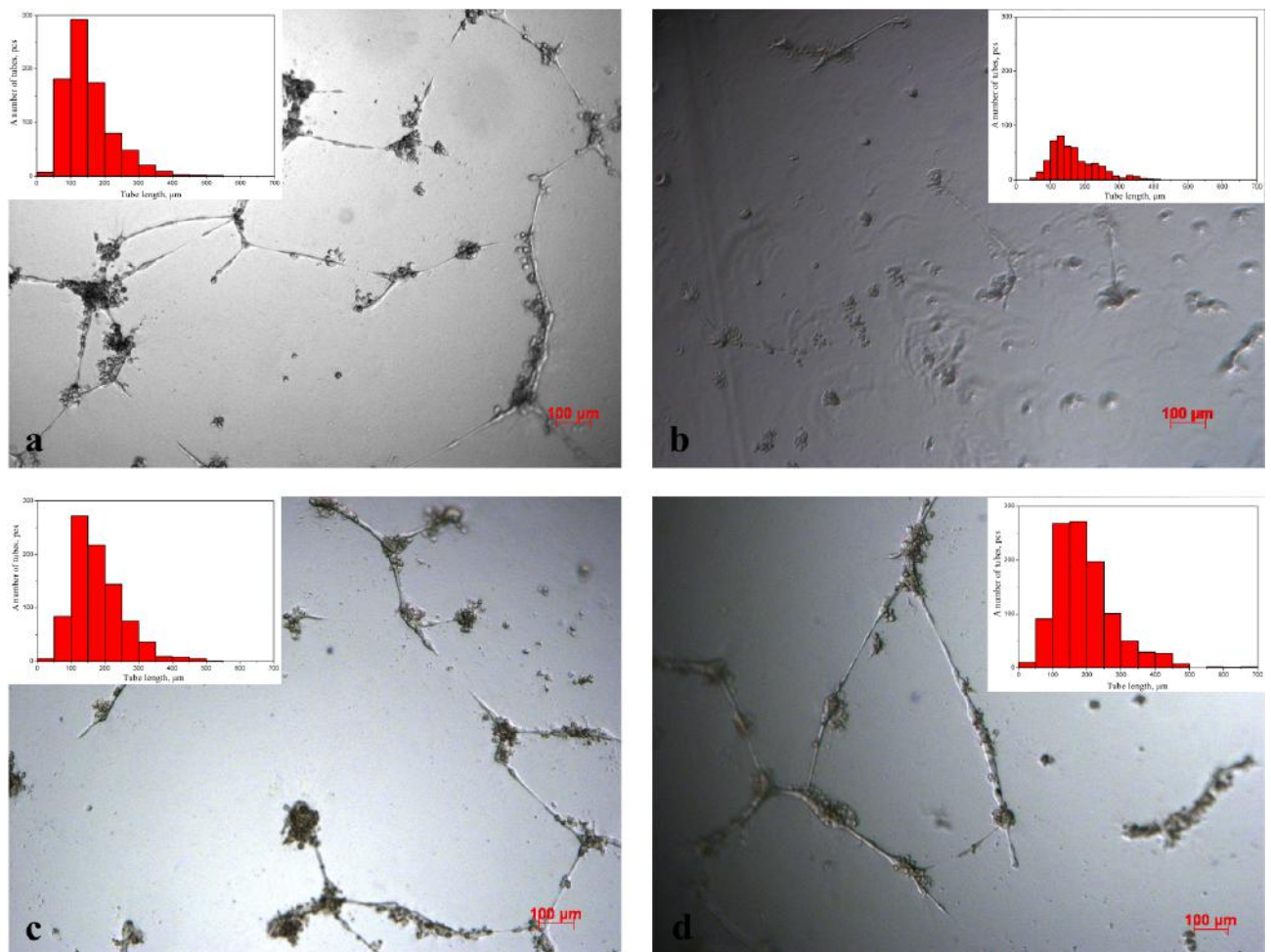


Figure 19 - HUVEC tube formation: a) The positive control (100 ng/ml YKL40); b) The negative control (supernatants were collected after culturing macrophages in the presence of 100 ng/ml IFN γ); c) The supernatants, which were collected after co-culture of PLA-HA1 scaffolds with macrophages; d) The supernatants, which were collected after co-culture of PLA-HA1 scaffolds with macrophages in the presence of 100 ng/ml IFN γ . For each sample the tube length distribution is shown

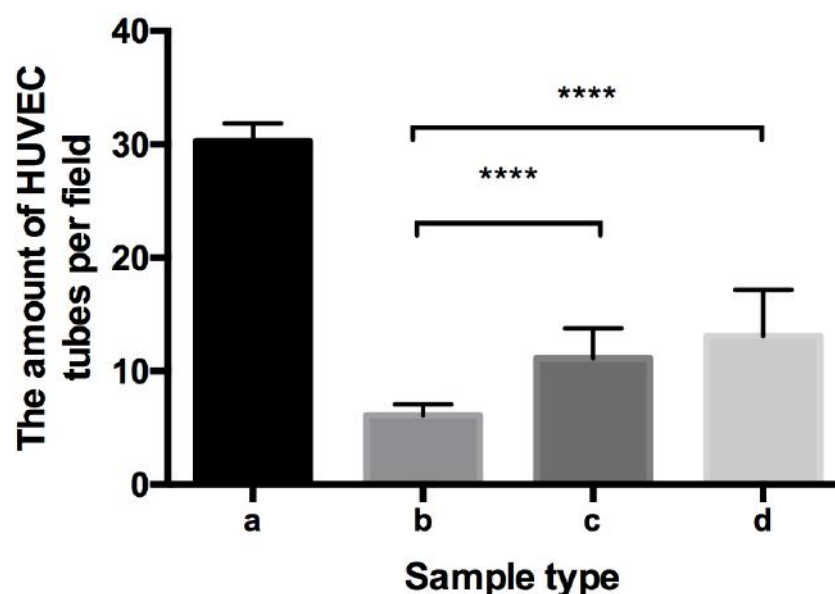


Figure 20 - The amount of HUVEC tubes per field: a) The positive control (100 ng/ml YKL40); b) The negative control (supernatants were collected after culturing macrophages in the presence of 100 ng/ml IFN γ); c) The supernatants, which were collected after co-culture of PLA-HA1 scaffolds with macrophages; d) The supernatants, which were collected after co-culture of PLA-HA1 scaffolds with macrophages in the presence of 100 ng/ml IFN γ . **** - $p < 0.0001$, $n = 3$, Mann-Whitney test

The supernatants, which were collected after the co-culture of macrophages with PLA-HA1 scaffolds, stimulate the HUVEC tube formation. The number of the formed tubes is smaller than in the positive control, but significantly higher than in the negative control. The angiogenic effect of PLA-HA1 matrices is likely caused due to the fact that in response to HA macrophages secrete a cocktail of pro-angiogenic factors (IL8, YKL40) (as was described previously). M0 and M1 macrophages of ID-6, ID-7, and ID-8 secreted an average IL8 concentration of 35 ng/ml (it was shown that 10 ng/ml IL8 was sufficient to contribute *in vitro* angiogenesis [92]). M1 macrophages simultaneously expressed YKL40 2-2.5 times more than in the control. However, the difference in the angiogenic effect of PLA-HA1 co-cultured with M0 and M1 was not significant. The average length of the formed tubes is presented in table 5.

Table 5 - The average length of the formed HUVEC tubes

Investigated sample	Length of the HUVEC tubes (Mean±SD), μm
The positive control	151,8±70,7
The negative control	166,9±66,5
PLA-HA1	178,7±75,05
PLA-HA1 (100 ng/ml IFNγ)	193,47±89,37

All the length values differ significantly. PLA-HA1 scaffold contributes to the formation of the longer capillary tubes.

Thus, it was shown that the scaffolds coated with HA have pro-angiogenic properties owing to the fact that they stimulate the secretion of pro-angiogenic factors by macrophages.

CD диск. Магистерская диссертация (файл Станкевич.docx в формате Microsoft Word)