

<https://doi.org/10.47183/mes.2026-441>

УДК 57.085.23



БИОИНЖЕНЕРНЫЙ СКАФФОЛД НА ОСНОВЕ ГИДРОГЕЛЯ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ МЫШЦ

М.М. Боброва¹✉, А.Л. Лусс¹, П.П. Куликов¹, И.С. Фадеева², А.С. Сенотов², В.В. Минайчев², А.Ю. Тетерина²,
М.И. Кобякова³, А.А. Кескинов¹

¹ Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия

³ Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук, Москва, Россия

Введение. Травмы, резекции опухолей и дегенеративные заболевания могут привести к обширным дефектам скелетных мышц и, следовательно, функциональным нарушениям и тяжелой инвалидности. В последние десятилетия были разработаны различные стратегии тканевой инженерии скелетных мышц, однако по-прежнему наблюдается высокий спрос на создание новых высокоэффективных методов и материалов, способствующих функциональной регенерации, которые могли бы быть использованы при терапии мышечных дефектов в клинической практике.

Цель. Разработка медицинского изделия (биоинженерного скаффолда) на основе полимерного гидрогеля для заживления обширных дефектов скелетных мышц.

Материалы и методы. Образцы биоинженерного скаффолда получены путем криоструктурирования гидрогеля с последующей лиофилизацией. Микроструктуру и морфологию скаффолда анализировали при помощи сканирующего электронного микроскопа TESCAN VEGA III. Анализ механических свойств, прочность на разрыв и относительное удлинение проводили при помощи испытательной машины Instron ElectroPuls E3000. Цитотоксичность скаффолда была изучена с помощью флуоресцентной микроскопии на культуре мышечных фибробластов Balb/3T3 клон А31 и культуре NCTC клон 929. Статистическую значимость отличий определяли с помощью одностороннего дисперсионного анализа ANOVA с последующим множественным сравнением Холма – Сидака, критический уровень значимости α приняли равным 0,05.

Результаты. Разработан модифицированный скаффолд, представляющий собой слоистую конструкцию на основе комбинации натуральных полимеров, коллагена и гиалуроната натрия с добавлением сшивающих агентов для формирования слоев с различными сроками резорбции и протеолитической деградации. Выявлено, что скаффолды обладали многослойной пористой губчатой структурой: средний слой (толщиной $1,2 \pm 0,1$ мм) имел крупную равномерную взаимосвязанную пористость, форма пор была близка к сферической, размер 100–150 мкм, толщина стенок полимерного каркаса менее 5 мкм. Верхний слой (толщиной 300–500 мкм) имел более плотную слоистую структуру, толщина стенок полимерного каркаса менее 2 мкм, форма пор щелевидная размером до 200 мкм в длину и 50 мкм в ширину. В сравнении с центральным слоем наблюдали значительно меньше взаимосвязанности пор, также практически отсутствовала канальная структура, а поры в основном были изолированы друг от друга стенками полимера. Прочность на разрыв составила $50 \pm 0,5$ кПа, относительное удлинение $26 \pm 6\%$; стерилизация не оказывала влияния на показатели прочности и относительное удлинение. Показано отсутствие цитотоксического действия полученной конструкции: статистически значимых различий в количестве погибших клеток относительно контрольных условий на всех сроках наблюдений (24 и 96 ч) выявлено не было.

Выводы. Пористая структура образцов скаффолда была получена с помощью комбинации методов послойной заливки / формирования с пошаговой заморозкой и контролем структуры с последующим лиофильным высушиванием. Подобран протокол стерилизации разработанной конструкции с помощью этиленоксида, а также продемонстрировано отсутствие влияния процесса стерилизации на показатели прочности и относительное удлинение. Разрабатываемые методы создания биосовместимых конструкций на основе полимерного гидрогеля и способы их модификации позволят получать изделия с высокой степенью биосовместимости для улучшения регенерации тканей.

Ключевые слова: биоинженерный скаффолд; коллаген; гиалуронат натрия; альбумин; гидрогель; цитотоксичность; механические свойства

Для цитирования: Боброва М.М., Лусс А.Л., Куликов П.П., Фадеева И.С., Сенотов А.С., Минайчев В.В., Тетерина А.Ю., Кобякова М.И., Кескинов А.А. Биоинженерный скаффолд на основе гидрогеля для регенерации мышц. *Экстремальная биомедицина*. 2026;28(2):242–249. <https://doi.org/10.47183/mes.2026-441>

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «ЦСП» ФМБА России № 388-00083-25-00 на проведение прикладных научных исследований.

Соответствие принципам этики: исследование не требовало заключения локального биоэтического комитета. В работе использовали эмбриональные мышечные фибробласты CCL 1 (NCTC клон 929) и CCL 163 (Balb/3T3 клон А31), полученные из Российской коллекции клеточных культур (ИНЦ РАН, Санкт-Петербург).

Потенциальный конфликт интересов: А.А. Кескинов — научный редактор журнала «Экстремальная биомедицина», остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Боброва Мария Михайловна Mbobrova@cspfmba.ru

Статья поступила: 16.12.2026 **После доработки:** 24.02.2026 **Принята к публикации:** 10.03.2026 **Online first:** 28.04.2026

BIOENGINEERED HYDROGEL-BASED SCAFFOLD FOR MUSCLE REGENERATION

Maria M. Bobrova^{1,2}, Anna L. Luss¹, Pavel P. Kulikov¹, Irina S. Fadeeva², Anatoly S. Senotov², Vladislav V. Minaychev², Anastasia Yu. Teterina², Margarita I. Kobayakova³, Anton A. Keskinov¹

¹ Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russia

² Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

³ Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Introduction. Injuries, tumor resections, and degenerative diseases can lead to extensive skeletal muscle defects, and consequently, to functional impairment and severe disability. Over the past few decades, various approaches to skeletal muscle tissue engineering have been developed. However, there remains a high demand for new effective methods and materials that promote functional regeneration, which could be used in the clinical treatment of muscle defects.

Objective. Development of a bioengineered polymer hydrogel-based scaffold for extensive skeletal muscle defects.

Materials and methods. Bioengineered scaffold samples were obtained by hydrogel cryostructuring followed by lyophilization. The microstructure and morphology of the scaffold were analyzed using a Tescan VEGA III scanning electron microscope. The mechanical properties, tensile strength, and relative elongation were analyzed using an Instron ElectroPuls E3000 testing instrument. The cytotoxicity of the scaffold was studied using fluorescence microscopy on a culture of murine fibroblasts Balb/3T3 clone A31 and NCTC clone 929 culture. The statistical significance of differences was determined using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Holm–Šidák multiple comparison test, with the critical significance level α set at 0.05.

Results. A modified scaffold was developed, representing a layered construct based on a combination of natural polymers, collagen, and sodium hyaluronate, with the addition of crosslinking agents to form layers with varying resorption rates and proteolytic degradation profiles. The scaffold samples were found to possess a multilayered porous spongy structure. The core layer (1.2 ± 0.1 mm thick) exhibited high — uniform and interconnected — porosity with nearly spherical pores ranging from 100–150 μm in size and a polymer framework wall thickness of less than 5 μm . The outer layer (300–500 μm thick) had a denser, lamellar structure with a polymer framework wall thickness of less than 2 μm and slit-shaped pores up to 200 μm in length and 50 μm in width. Compared to the core layer, significantly lower pore interconnectivity was observed, a channel structure was virtually absent, and pores were mostly isolated from one another by polymer walls. Tensile strength was 50 ± 0.5 kPa, and relative elongation was $26 \pm 6\%$. Sterilization had no effect on the strength and elongation parameters. The absence of a cytotoxic effect of the obtained construct was demonstrated: no statistically significant differences in the number of dead cells compared to the control were detected at any of the observation time points (24 and 96 h).

Conclusions. Scaffold samples with a porous structure were obtained using a combination of layer-by-layer casting/molding methods with stepwise freezing and structure control, followed by lyophilization. For the developed construct, an ethylene oxide sterilization protocol was established. The sterilization process was found to have no effect on the strength and elongation parameters. The developed methods for obtaining biocompatible constructs based on polymer hydrogels and their modification techniques will make it possible to obtain devices with a high degree of biocompatibility for enhanced tissue regeneration.

Keywords: bioengineered scaffold; collagen; sodium hyaluronate; albumin; hydrogel; cytotoxicity; mechanical properties

For citation: Bobrova M.M., Luss A.L., Kulikov P.P., Fadeeva I.S., Senotov A.S., Minaychev V.V., Teterina A.Yu., Kobayakova M.I., Keskinov A.A. Bioengineered hydrogel-based scaffold for muscle regeneration. *Extreme Medicine*. 2026;28(2):242–249. <https://doi.org/10.47183/mes.2026-441>

Funding: the study was carried out within the framework of the State assignment of Centre for Strategic Planning of the Federal Medical and Biological Agency No. 388-00083-25-00 for applied scientific research.

Compliance with the ethical principles: the study did not require approval from a local bioethics committee. The work utilized embryonic murine fibroblasts CCL 1 (NCTC clone 929) and CCL 163 (Balb/3T3 clone A31), obtained from the Russian Cell Culture Collection (Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg).

Potential conflict of interest: Anton A. Keskinov is a scientific editor of *Extreme Medicine*. The other authors declare no conflict of interest.

✉ Maria M. Bobrova Mbobrova@cspfmba.ru

Received: 16 Dec. 2026 **Revised:** 24 Feb. 2026 **Accepted:** 10 Mar. 2026 **Online first:** 28 Apr. 2026

ВВЕДЕНИЕ

Разработка инновационных тканеинженерных конструкций является одним из приоритетных направлений современной регенеративной медицины. Регенерация скелетных мышц — это комплексный процесс, который зависит от миграции различных типов клеток в раневое ложе, сигнальных молекул, механических сигналов межклеточного матрикса и его физико-химических свойств. В последние десятилетия были разработаны различные стратегии тканевой инженерии скелетных мышц, однако по-прежнему наблюдается высокий спрос на создание новых высокоэффективных методов и материалов, способствующих восстановлению структуры скелетных мышц и функциональной регенерации, которые могли бы быть

использованы при терапии мышечных дефектов в клинической практике [1].

Регенерация мышц зависит от наличия гетерогенной популяции резидентных мышечных стволовых клеток (также называемых сателлитными клетками), наличия интерстициальных клеток и образования кровеносных сосудов *de novo* и в основном контролируется белками межклеточного матрикса и факторами, ассоциированными с ними (TGF- β , IL-4) [2]. Наиболее часто применяемым клиническим подходом для заживления дефектов мышечной ткани является трансплантация аллогенных мышечных клеток. Однако данная терапия имеет существенные ограничения из-за риска развития реакций отторжения, наличия у донора различных патологий и недостаточного количества донорских клеток [3]. Кроме того, доставка и удержание

клеток в мышцах неэффективны, что препятствует устойчивой регенерации, необходимой для достаточного функционального восстановления [4, 5]. Поэтому требуется внедрение альтернативных стратегий. Скаффолды на основе биоматериалов являются мощным инструментом для восстановления клеточного микроокружения и обеспечения регенерации скелетной мышцы, сила сокращения которой в полной мере соответствует здоровой ткани [5–8].

Для индукции регенерации скелетных мышц необходима имитация нативного микроокружения для клеток не только за счет воссоздания межклеточного матрикса путем подбора биоматериалов и способа получения трехмерного скаффолда, но и посредством включения в состав конструкции биологически активных соединений. Современные разрабатываемые скаффолды по микро- и наноструктуре и физико-химическим свойствам представляют собой искусственный межклеточный матрикс для клеток, воспроизводя свойства нативной ткани. Кроме того, биологически активные агенты, такие как белки и факторы роста, включенные в состав скаффолда, необходимы для поддержания адгезии и пролиферации клеток, а также для стимуляции синтеза собственного межклеточного матрикса. С целью достижения оптимальных для регенерации скелетных мышц механических, структурных, физико-химических и биологических свойств скаффолда был разработан ряд многофункциональных биоматериалов, способных выполнять несколько важных функций, таких как воздействие на миграцию и пролиферацию клеток [9], доставка лекарственных препаратов [10] и регуляция дифференцировки стволовых клеток [11].

Одним из наиболее перспективных типов конструкций для регенерации скелетных мышц являются скаффолды, полученные на основе гидрогелей. Гидрогели представляют собой трехмерные сшитые гидрофильные полимерные матрицы с высоким содержанием воды, которые имитируют нативную водную среду организма [7, 12]. Гидрогели имеют сходство с естественным межклеточным матриксом по структуре; кроме того, полученные на их основе конструкции могут быть разной формы [4].

Биосовместимые материалы, используемые для получения скаффолдов на основе гидрогелей, должны обладать следующими характеристиками: скорость деградации и механические свойства, соответствующие нативной ткани мышцы; отсутствие токсического эффекта и низкий риск развития воспаления; способность поддерживать миграцию, адгезию и пролиферацию клеток [13, 14].

Для регенерации скелетных мышц применяется широкий спектр материалов, как природных, так и синтетических. Синтетические полимеры, такие как поли-L-молочная кислота (PLA) [15, 16], поли(L-лактид-со-гликолид) (PLGA) [16], поликапролактон [17–20], полиэтиленгликоль (ПЭГ) [21–23] и их сополимеры [24] и различные полиуретаны [25–28], являются наиболее часто используемыми материалами для тканевой инженерии мышечной ткани. Преимуществами синтетических полимеров являются простота в обработке и структурировании, возможность контроля механических свойств и скорости высвобождения биологически

активных соединений. Однако зачастую такие материалы обладают низким уровнем биосовместимости и образуют токсичные продукты резорбции либо являются небiodeградируемыми [6, 29]. Современные стратегии разработки высокоэффективных конструкций для заживления мышечных дефектов базируются на создании скаффолдов на основе природных материалов по причине сочетания их биосовместимости и биodeградируемости с образованием нетоксичных соединений [7]. Наиболее часто в роли таких материалов выступают компоненты межклеточного матрикса, такие как коллаген [30, 31], фибрин [32, 33], гиалуроновая кислота [34] и др. Также широко применяются полимеры природного происхождения: альгинат [35–37], фиброин шелка, желатин [12, 30, 38].

Несмотря на преимущества природных полимеров, создание конструкций на их основе сопряжено со множеством проблем, таких как недостаточная механическая прочность и эластичность, низкая растворимость, отсутствие стабильности в физиологических условиях и сложность в структурировании материалов. На сегодняшний день эффективные клинические подходы для восполнения обширных дефектов скелетных мышц по-прежнему включают только трансплантацию мышечных аутографтов, при этом в настоящее время проходит клинические испытания один материал, который представляет собой децеллюляризованную кожу свиньи (XenMatrix™ AB Surgical Graft, BD, США). Поэтому поиск новых материалов и разработка подходов к созданию эффективных конструкций для регенерации дефектов скелетных мышц остаются актуальными задачами тканевой инженерии.

Цель работы — разработка медицинского изделия (биоинженерного скаффолда) на основе полимерного гидрогеля для заживления обширных дефектов скелетных мышц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение биоинженерного скаффолда

Внутренний слой скаффолда представляет собой смесь 2% коллагена (Лужский завод «Белкозин», Россия), 1% гиалуроната натрия, приготовленного на 0,9% NaCl, («Платина», Россия) и раствора 10% альбумина («Ивановская областная станция переливания крови», Россия) в объемном соотношении 70:20:10 соответственно. Средний слой состоит из 2% коллагена, 1% гиалуроната натрия и 10% раствора альбумина в объемном соотношении 30:35:35. Внешний слой скаффолда состоит из 2% раствора коллагена, 1% раствора гиалуроновой кислоты и 10% раствора альбумина в объемном соотношении 10:80:10 соответственно. В качестве сшивающего агента был использован раствор, состоящий из 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (EDC) (Macklin LLC, Китай) и N-гидроксисукцинимид (NHS) (Sigma-Aldrich, США) в соотношении 4:1. Для формирования скаффолда смесь биополимерных гидрогелей вспенивали и заливали в отпечатанные с помощью 3D-прототипирования формы, далее образцы поэтапно замораживали и высушивали в лиофильной сушке (Labconco, США).

Стерилизация

В качестве метода стерилизации была выбрана газовая низкотемпературная стерилизация этиленоксидом в соответствии с ГОСТ ISO 11135-2017¹.

Каждый образец скаффолда индивидуально заключали в двойную газопроницаемую упаковку — пленку Tyvek (DuPont de Nemours, Inc., Делавер, США). Стерилизация осуществлялась с помощью газового стерилизатора/аэрата Steri-Vac 8XL (224 л) (3M Health Care, Сент-Пол, США). Программа стерилизации № 1 по ГОСТ ISO 11135-2017: температура стерилизации — 37 °С, стерилизационная выдержка — 180 мин, концентрация этиленоксида — 100%. С целью выявления точной концентрации в камере стерилизатора осуществляли взвешивание баллона до и после стерилизации. По результатам проведенных расчетов концентрация этиленоксида непосредственно в камере должна составлять не менее $730,0 \pm 30,0$ мл/л. Аэрация образцов после стерилизации этиленоксидом стерильным воздухом проводилась 12 ч.

Сканирующая электронная микроскопия

Микроструктуру и морфологию поверхности и срезов образцов изучали с помощью микроскопа Tescan VEGA III (сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), Брно, Чехия), оснащенного системой энергодисперсионной спектроскопии (ЭДС; INCA Energy Oxford Instruments, Абингдон, Великобритания) для анализа химического состава. Образцы предварительно покрывали золотом по технологии Q150R Quorum Technologies (Льюс, Великобритания). Изображения поверхности материалов были получены при давлении $7,3 \times 10^{-2}$ Па в колонке и $1,5 \times 10^{-1}$ Па в камере.

Анализ механических свойств полученного скаффолда

Для определения прочностных характеристик на разрыв из полученных скаффолдов вырезали образцы гантелеобразной формы с размерами, указанными на рисунке 1. Образцы подготавливали в одно время и в одинаковых условиях. При подготовке образцов следили за тем, чтобы вся поверхность была ровной, без видимых дефектов. Подготовленные образцы помещали в физиологический раствор (0,9% раствор NaCl) при температуре 37 ± 2 °С на полчаса, после чего помещали их в зажимы испытательной машины. При закреплении следили, чтобы зажимы не скользили по образцу, не разрушали образец в месте крепления.

Прочность на разрыв и эластичность полученных материалов исследовали на испытательной машине Instron ElectroPuls E3000 (Instron, США) при скорости нагружения 5,0 мм/мин с использованием 5 образцов для каждой серии. Эксперименты проведены в физиологическом растворе (0,9% водный раствор NaCl) при температуре 37 ± 2 °С. Перед началом испытаний образцы выдерживали полчаса в физиологическом растворе при температуре 37 ± 2 °С, после чего

закрепляли в держателях. В ходе эксперимента образец растягивали вдоль его главной продольной оси, измеряя выдерживаемую нагрузку с погрешностью не более 1% от измеряемой величины.

Прочность при разрыве вычисляли по формуле (1):

$$\sigma = \frac{F \times 1000}{S} \times 100\%, \quad (1)$$

где F — растягивающая нагрузка, при которой образец разрушился (Н); S — поперечное сечение образца (мм^2); σ — прочность при разрыве (кПа).

Испытания по исследованию эластичности схожи с испытаниями на разрыв. Из образцов скаффолда также вырезали образцы гантелеобразной формы с размерами, указанными на рисунке 1. Образцы подготавливали в одно и то же время при одинаковых условиях после визуальной оценки их на целостность.

Относительное удлинение при разрыве вычисляли по формуле (2):

$$\varepsilon = \frac{l_2^* - l_2}{l_2} \times 100\%, \quad (2)$$

где l_2 — изначальная длина узкой части образца (мм); l_2^* — длина узкой части образца в момент разрыва (мм); ε — относительное удлинение при разрыве (%).

Для определения модуля объемного сжатия как отношения приращения напряжения к соответствующему приращению относительной деформации сжатия из полученных скаффолдов вырезали образцы прямоугольной формы размерами 80 ± 2 на 10 ± 2 мм, толщина образцов составляла $4 \pm 0,5$ мм. Образцы подготавливали в одно время и в одинаковых условиях. При подготовке образцов следили за тем, чтобы вся поверхность была ровной, без видимых дефектов.

Оценка цитотоксического действия разработанных материалов в отношении клеток CCL 1 (NCTC клон 929) и CCL 163 (Balb/3T3 клон A31) с помощью флуоресцентной микроскопии

Исследование цитотоксичности полученного скаффолда было проведено согласно ГОСТ ISO 10993-5-2011².

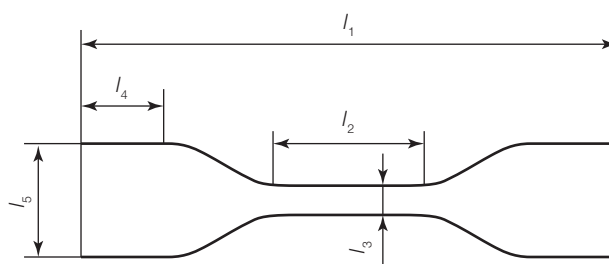


Рисунок подготовлен авторами

Рис. 1. Образец гантелеобразной формы для механических испытаний на разрыв: l_1 — общая длина ($60,0 \pm 5,0$ мм); l_2 — длина узкой части ($20,0 \pm 0,5$ мм); l_3 — ширина узкой части ($10,0 \pm 0,5$ мм); l_4 — длина для закрепления зажимов ($10,0 \pm 0,5$ мм); l_5 — общая ширина ($20,0 \pm 0,2$ мм); толщина образца — $4,0 \pm 0,5$ мм

¹ ГОСТ ISO 11135-2017 «Межгосударственный стандарт. Стерилизация медицинской продукции. Этиленоксид. Требования к разработке, валидации и текущему управлению процессом стерилизации медицинских изделий».

² ГОСТ ISO 10993-5-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*».

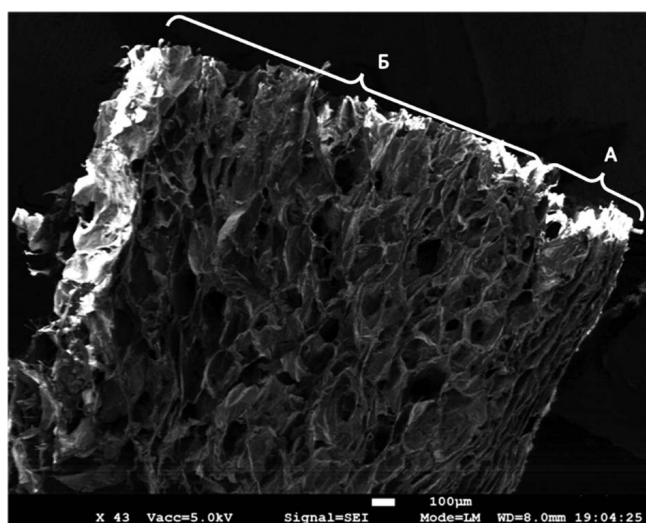
Метод основан на определении соотношения живых и погибших клеток, культивируемых на материале, путем окрашивания клеток диацетатом флуоресцеина (окрашивает цитоплазму живых клеток в зеленый цвет) и йодидом пропидия (окрашивает ядра погибших клеток в красный цвет), методом флуоресцентной или сканирующей конфокальной микроскопии.

Клетки культивировали в смеси питательных сред DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HiMedia Laboratories, Индия), 40 мкг/мл сульфата гентамицина (Sigma-Aldrich, США) при 37 °С в условиях 5% содержания CO₂ в газовой смеси. Для анализа клетки высевали в лунки 96-луночного планшета (SPL Life Sciences, Южная Корея), содержащие образцы разработанных материалов, в концентрации 5 × 10⁴ клеток/мл. После 24 и 96 ч инкубации на разработанном материале клетки окрашивали в среде L-15 (Sigma-Aldrich, США) с 1% эмбриональной бычьей сывороткой (HiMedia Laboratories, Индия), содержащей 1 мкг/мл диацетата флуоресцеина (Sigma-Aldrich, США) и 2 мкг/мл йодида пропидия (Sigma-Aldrich, США), в течение 25 мин при 37 °С. По истечении времени инкубации клетки промывали два раза средой L-15 с добавлением 1% эмбриональной бычьей сыворотки. Анализ живых и погибших клеток осуществляли с использованием микроскопической станции Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Япония) и сканирующего конфокального микроскопа TCS SP5 (Leica, Германия). Для анализа оценивали более 500 клеток.

Количество живых клеток после инкубации на разработанном материале рассчитывали в процентах относительно контроля по формуле (3):

$$\text{Количество живых клеток} = \frac{\text{ЧЖК}_9}{\text{ЧЖК}_к} \times 100\%, \quad (3)$$

где ЧЖК₉ — число живых клеток после инкубации на разработанном материале; ЧЖК_к — число живых клеток в контрольных условиях (не инкубировавшихся на разработанном материале).



Снимок подготовлен авторами

Рис. 2. Микроструктура образца биоинженерного скаффолда: А — верхний слой; Б — средний слой (сканирующая электронная микроскопия, ув. ×43)

Статистическая обработка данных

Статистический анализ проводили с использованием языков программирования Python 3 (версия 3.9.16) и R (версия 4.3.0) в средах разработки Spyder (версия 5.4.1) и RStudio (версия 2023.03.0+386) соответственно, с применением пакетов Pandas (версия 1.5.3), Numpy (версия 1.23.5), Scipy (версия 1.10.0) и PMCMRplus (версия 1.9.10). Результаты представляли в виде среднего значения и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Опыты проводили не менее чем в трех повторах ($n \geq 3$). Статистическую значимость отличий определяли с помощью одностороннего дисперсионного анализа ANOVA с последующим множественным сравнением Холма – Сидака, критический уровень значимости α приняли равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования был получен пористый биоинженерный скаффолд, который представляет собой слоистую конструкцию на основе комбинации натуральных полимеров, коллагена и гиалуроната натрия с добавлением EDC и NHS для формирования слоев с различными сроками резорбции и протеолитической деградации [40]. Добавление сшивающих агентов в том числе необходимо ввиду того, что коллагеновые скаффолды обладают низкими показателями механической прочности и структурной стабильности при гидратации, что ограничивает их применение в определенных тканях.

Пористая структура образцов скаффолда была получена с помощью комбинации методов послойной заливки / формования вспененных полимеров и последующей пошаговой заморозки.

В ходе анализа микроструктуры с использованием СЭМ было выявлено, что полимерные скаффолды обладают многослойной пористой губчатой структурой. Выявлено (рис. 2), что средний слой толщиной 1,2 ± 0,1 мм имел крупную равномерную взаимосвязанную пористость, форма пор была близка к сферической, размер 100–150 мкм, толщина стенок полимерного каркаса менее 5 мкм. Верхний слой толщиной 300–500 мкм имел более плотную слоистую структуру, толщина стенок полимерного каркаса менее 2 мкм, форма пор щелевидная, размером до 200 мкм в длину и 50 мкм в ширину. В сравнении с центральным слоем наблюдали значительно меньше взаимосвязанности пор, также практически отсутствовала канальная структура, а поры в основном были изолированы друг от друга стенками полимера. Такая архитектура конструкции была достигнута за счет криоструктурирования путем пошаговой заморозки образца, что согласуется с литературными данными [41].

Для последующих экспериментов был подобран протокол стерилизации разработанной конструкции с помощью этиленоксида. Данный метод является наиболее подходящим способом для полимерных имплантируемых изделий [42].

Были проведены исследования по оценке механических свойств полученного скаффолда: прочность на разрыв составила 50 ± 0,5 кПа, относительное удлинение — 26 ± 6%. Более того, было показано,

что стерилизация не оказывала влияния на показатели прочности и относительное удлинение (рис. 3). Также стоит отметить, что данные значения показателей механической прочности обеспечивали проведение хирургических манипуляций, что особенно важно при проведении дальнейших исследований *in vivo* [43].

Исследование цитотоксичности *in vitro* является критическим первым этапом оценки безопасности любых медицинских изделий. Это позволяет исключить потенциально опасные материалы на ранних стадиях, минимизируя риски для живых организмов и сокращая количество последующих испытаний на животных. В результате проведенного исследования цитотоксического действия образцов пористого биоинженерного скаффолда было показано отсутствие цитотоксического действия полученной конструкции (рис. 4). Статистически значимых различий в количестве

погибших клеток относительно контрольных условий на всех сроках наблюдений (24 и 96 ч) выявлено не было. Цитотоксичные компоненты (продукты деградации, остаточные мономеры) провоцируют клеточный стресс, что в живом организме ведет к хроническому воспалению и фиброзу вместо регенерации ткани *de novo*. Скелетная мышечная ткань обладает ограниченными ресурсами для самовосстановления при объемных повреждениях [44]. Отсутствие цитотоксичности позволяет заключить, что имплантат не будет подавлять пролиферацию и миграцию миобластов и сателлитных клеток, необходимых для формирования новых мышечных волокон [45].

Полученные результаты стали объектом заявки на государственную регистрацию интеллектуальной собственности: получен патент на изобретение «Способ получения биоинженерного скаффолда на основе гидрогеля» [46].

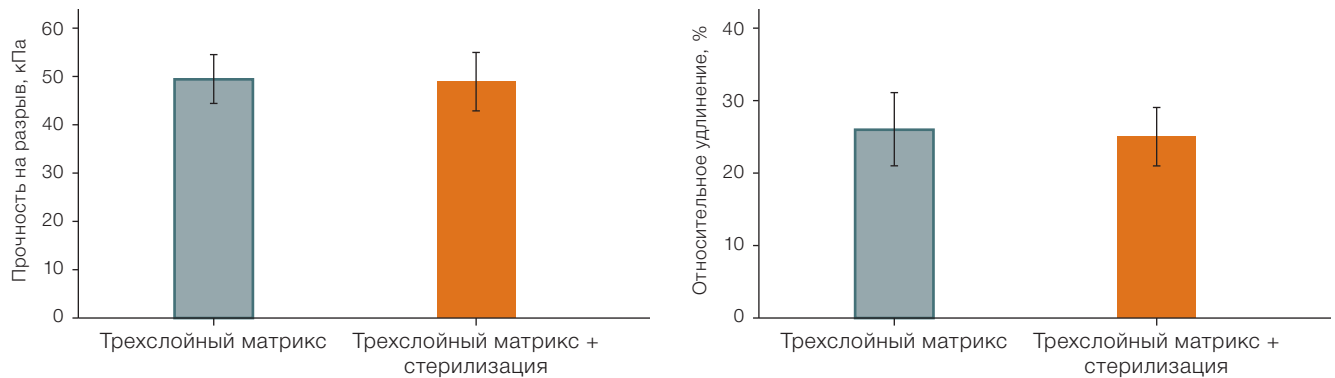


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 3. Прочность на разрыв и относительное удлинение образцов биоинженерного скаффолда

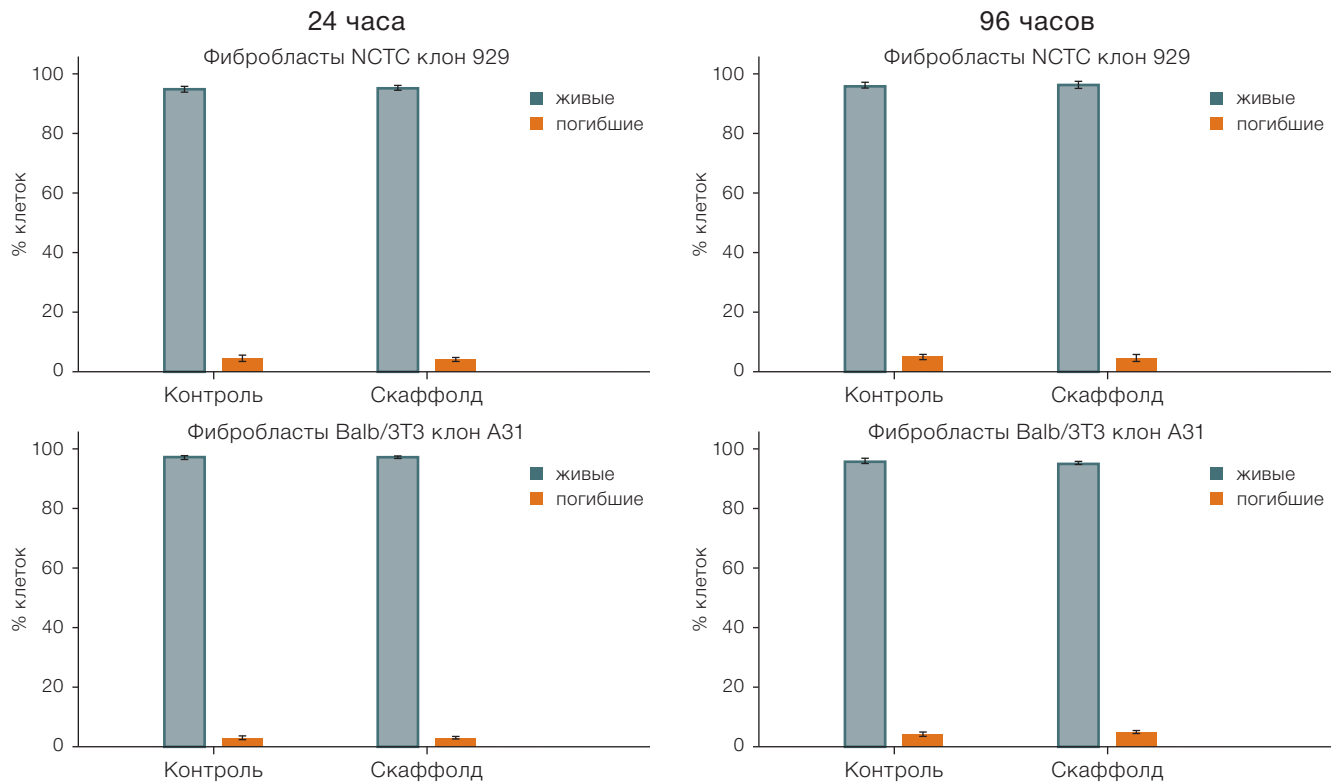


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 4. Оценка цитотоксичности биоинженерного скаффолда

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан пористый биоинженерный скаффолд на основе смеси природных полимеров. Пористая структура образцов скаффолда была получена с помощью комбинации методов послойной заливки / формования с пошаговой заморозкой и контролем структуры с последующим лиофильным высушиванием. Подобран протокол стерилизации разработанной конструкции с помощью этиленоксида, а также было продемонстрировано отсутствие влияния процесса стерилизации на показатели

прочности и относительное удлинение. В результате проведенных *in vitro* тестов на клетках мышечных фибробластов Balb/3T3 клон A31 и NCTC клон 929 было установлено, что разработанный биоинженерный скаффолд не оказывал цитотоксического действия. Разрабатываемые методы создания биосовместимых конструкций на основе полимерного гидрогеля и способы их модификации позволяют расширить спектр препаратов, доступных для клинического применения, что будет способствовать повышению качества жизни пациентов и снижению инвалидизации населения.

Литература / References

- Alarcin E, Bal-Öztürk A, Avci H, Ghorbanpoor H, Dogan Guzel F, Akpek A, et al. Current Strategies for the Regeneration of Skeletal Muscle Tissue. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(11):5929. <https://doi.org/10.3390/ijms22115929>
- Forcina L, Cosentino M, Musarò A. Mechanisms Regulating Muscle Regeneration: Insights into the Interrelated and Time-Dependent Phases of Tissue Healing. *Cells*. 2020;9(5):1297. <https://doi.org/10.3390/cells9051297>
- Zhou L, Ge J, Wang M, Chen M, Cheng W, Ji W, et al. Injectable muscle-adhesive antioxidant conductive photo-thermal bioactive nanomatrix for efficiently promoting full-thickness skeletal muscle regeneration. *Bioactive Materials*. 2021;6:1605–17. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.11.005>
- Lev R, Seliktar D. Hydrogel biomaterials and their therapeutic potential for muscle injuries and muscular dystrophies. *Interface*. 2018;15(138):20170380. <https://doi.org/10.1098/rsif.2017.0380>
- Mei X, Cheng K. Recent Development in Therapeutic Cardiac Patches. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2020;7:610364. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.610364>
- Nakayama KH, Shayan M, Huang NF. Engineering Biomimetic Materials for Skeletal Muscle Repair and Regeneration. *Advanced Healthcare Materials*. 2019;8(5):1801168. <https://doi.org/10.1002/adhm.201801168>
- Fischer KM, Scott TE, Browe DP, McGaughey TA, Wood C, Wolyniak MJ, et al. Hydrogels for Skeletal Muscle Regeneration. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*. 2021;7:353–61. <https://doi.org/10.1007/s40883-019-00146-x>
- Smoak MM, Mikos AG. Advances in biomaterials for skeletal muscle engineering and obstacles still to overcome. *Materials Today Bio*. 2020;7:100069. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2020.100069>
- Basurto IM, Mora MT, Gardner GM, Christ GJ, Callari SR. Aligned and electrically conductive 3D collagen scaffolds for skeletal muscle tissue engineering. *Biomaterials Science*. 2021;9:4040–53. <https://doi.org/10.1039/D1BM00147G>
- Cezar CA, Mooney DJ. Biomaterial-based delivery for skeletal muscle repair. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015;84:188–97. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.09.008>
- Xing F, Li L, Zhou C, Long C, Wu L, Lei H, et al. Regulation and Directing Stem Cell Fate by Tissue Engineering Functional Microenvironments: Scaffold Physical and Chemical Cues. *Stem Cells International*. 2019;2019:180925. <https://doi.org/10.1155/2019/2180925>
- Camci-Unal G, Annabi N, Dokmeci MR, Liao R, Khademhosseini A. Hydrogels for cardiac tissue engineering. *NPG Asia Materials*. 2014;6:e99. <https://doi.org/10.1038/am.2014.19>
- Pollet BE, Rathbone CR, Wenke JC, Guda T. Natural polymeric hydrogel evaluation for skeletal muscle tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials*. 2018;106:672–9. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33859>
- Boso D, Maghin E, Carraro E, Giagante M, Pavan P, Piccoli M. Extracellular Matrix-Derived Hydrogels as Biomaterial for Different Skeletal Muscle Tissue Replacements. *Materials*. 2020;13(11):2483. <https://doi.org/10.3390/ma13112483>
- Rico P, Rodrigo-Navarro A, Salmerón-Sánchez M. Borax-Loaded PLLA for Promotion of Myogenic Differentiation. *Tissue Engineering Part A*. 2015;21:2662–72. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2015.0044>
- Levenberg S, Rouwkema J, Macdonald M, Garfein ES, Kohane DS, Darland DC, et al. Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nature Biotechnology*. 2005;23:879–84. <https://doi.org/10.1038/nbt1109>
- Wolf MT, Dearth CL, Sonnenberg SB, Lobo EG, Badylak SF. Naturally derived and synthetic scaffolds for skeletal muscle reconstruction. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015;84:208–21. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.08.011>
- Ostrovidov S, Salehi S, Costantini M, Suthiwanich K, Ebrahimi M, Sadeghian RB, et al. 3D Bioprinting in Skeletal Muscle Tissue Engineering. *Small*. 2019;15:1805530. <https://doi.org/10.1002/sml.201805530>
- Apsite I, Uribe JM, Posada AF, Rosenfeldt S, Salehi S, Ionov L. 4D biofabrication of skeletal muscle microtissues. *Biofabrication*. 2020;12:015016. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab4ccc4>
- Kook YM, Hwang S, Kim H, Rhee KJ, Lee K, Koh WG. Cardiovascular tissue regeneration system based on multiscale scaffolds comprising double-layered hydrogels and fibers. *Scientific Reports*. 2020;10:20321. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77187-8>
- Salimath AS, Garcia AJ. Biofunctional hydrogels for skeletal muscle constructs. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2016;10:967–76. <https://doi.org/10.1002/term.1881>
- Han WM, Mohiuddin M, Anderson SE, Garcia AJ, Jang YC. Co-delivery of Wnt7a and muscle stem cells using synthetic bioadhesive hydrogel enhances murine muscle regeneration and cell migration during engraftment. *Acta Biomaterialia*. 2019;94:243–52. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.06.025>
- Han WM, Anderson SE, Mohiuddin M, Barros D, Nakhai SA, Shin E, et al. Synthetic matrix enhances transplanted satellite cell engraftment in dystrophic and aged skeletal muscle with comorbid trauma. *Science Advances*. 2018;4:eaar4008. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aar4008>
- Xie M, Wang L, Guo B, Wang Z, Chen YE, Ma PX. Ductile electroactive biodegradable hyperbranched polylactide copolymers enhancing myoblast differentiation. *Biomaterials*. 2015;71:158–67. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.08.042>
- Riboldi SA, Sampaolesi M, Neuenschwander P, Cossu G, Mantero S. Electrospun degradable polyesterurethane membranes: potential scaffolds for skeletal muscle tissue engineering. *Biomaterials*. 2005;26:4606–15. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.11.035>
- Naureen B, Haseeb ASMA, Basirun WJ, Muhamad F. Recent advances in tissue engineering scaffolds based on polyurethane and modified polyurethane. *Materials Science and Engineering: C*. 2021;118:11228. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.11228>
- Ergene E, Yagci BS, Gokyser S, Eyidogan A, Aksoy EA, Yilgor Huri P. A novel polyurethane-based biodegradable elastomer as a promising material for skeletal muscle tissue

