

DOI: 10.15825/1995-1191-2022-2-71-82

## ТЕСТИРОВАНИЕ ГИДРОГЕЛЯ Р-НЕМА В КАЧЕСТВЕ ИМПЛАНТАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ КОСТНО-ХРЯЩЕВЫХ ДЕФЕКТОВ У ЖИВОТНЫХ

Э.Б. Макарова<sup>1, 2</sup>, М.А. Корч<sup>3</sup>, Ф.А. Фадеев<sup>1, 4</sup>, Д.Г. Близначев<sup>2</sup>, А.В. Бугаёва<sup>1, 5</sup>, Т.Ф. Шкляр<sup>1, 5</sup>, А.П. Сафронов<sup>5</sup>, К.А. Нохрин<sup>5</sup>, Ф.А. Бляхман<sup>1, 5</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург, Российская Федерация

<sup>2</sup> ГАУЗ «Уральский институт травматологии и ортопедии имени В.Д. Чаклина» Минздрава Свердловской области, Екатеринбург, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Уральский государственный аграрный университет» Минсельхоза России, Екатеринбург, Российская Федерация

<sup>4</sup> ГАУЗ «Институт медицинских клеточных технологий» Минздрава Свердловской области, Екатеринбург, Российская Федерация

<sup>5</sup> ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» Минобрнауки России, Екатеринбург, Российская Федерация

**Цель исследования.** В экспериментах на животных оценить особенности репаративного хондрогенеза и остеогенеза при имплантации пористого поли-2-гидроксиэтилметакрилатного (р-НЕМА) гидрогеля в костно-хрящевые дефекты. **Материалы и методы.** Имплантаты р-НЕМА цилиндрической формы (5 мм в диаметре) были синтезированы методом радикальной полимеризации. Световая микроскопия и механические испытания имплантатов были применены для характеристики структуры и вязкоупругих свойств материала. В опытной серии № 1 четыре образца р-НЕМА были имплантированы в сформированные дефекты дистальных эпиметафизов бедренных костей кроликов. В опытной серии № 2 перед имплантацией на поверхность четырех образцов были нанесены аллогенные хондроциты. В контрольной серии четыре дефекта не замещали имплантатами. Регенерация тканей была исследована морфологическим и морфометрическим методами через 30 дней после операции. **Результаты.** Имплантаты р-НЕМА представляли собой неоднородные по структуре образцы с порами неправильной формы до  $30 \times 10$  мкм у поверхности и до  $300 \times 120$  мкм внутри. При статических компрессионных деформациях образцов более 10% модуль Юнга был равен 54,7 кПа. При динамических деформациях увеличение частоты циклов «сжатие–расслабление» от 0,01 до 20,0 Гц приводило к возрастанию модуля накопления в среднем с 20 до 38 кПа, а модуля потерь – с 2 до 10 кПа. Показатели полуколичественной оценки местной воспалительной реакции на имплантацию р-НЕМА имели следующие значения в баллах: р-НЕМА –  $4,7 \pm 0,3$ ; р-НЕМА с аллогенными хондроцитами –  $6,0 \pm 1,0$ ; контроль –  $4,3 \pm 0,3$ . Соотношения собственно соединительной, костной и хрящевой тканей в составе регенератов имели следующие соответствующие значения: р-НЕМА – 79, 20, 1%; р-НЕМА с хондроцитами – 82, 16, 2%; контроль – 9, 74, 17%. **Заключение.** В краткосрочном эксперименте имплантаты р-НЕМА не вызывали выраженной воспалительной реакции в прилежащих тканях и могут быть отнесены к биосовместимым материалам. Вместе с тем тестируемые имплантаты имели низкую кондуктивность для клеток костной и хрящевой тканей, которая может быть повышена за счет стабилизации размера пор и увеличения жесткости при синтезе материала.

*Ключевые слова:* костно-хрящевые дефекты, имплантаты, гидрогель р-НЕМА, физические свойства, биосовместимость, хрящевая ткань, костная ткань.

**Для корреспонденции:** Бляхман Феликс Абрамович. Адрес: 620068, Екатеринбург, ул. Репина, д. 3. Тел. (343) 214-86-96. E-mail: feliks.blyakhman@urfu.ru

**Corresponding author:** Felix Blyakhman. Address: 3, Repin str., Ekaterinburg, 620028, Russian Federation. Phone: (343) 214-86-96. E-mail: feliks.blyakhman@urfu.ru

# TESTING OF THE pHEMA HYDROGEL AS AN IMPLANTATION MATERIAL FOR REPLACEMENT OF OSTEOCHONDRAL DEFECTS IN ANIMALS

*E.B. Makarova<sup>1, 2</sup>, M.A. Korch<sup>3</sup>, F.A. Fadeyev<sup>1, 4</sup>, D.G. Bliznets<sup>2</sup>, A.V. Bugayova<sup>1, 5</sup>, T.F. Shklyar<sup>1, 5</sup>, A.P. Safronov<sup>5</sup>, K.A. Nokhrin<sup>5</sup>, F.A. Blyakhman<sup>1, 5</sup>*

<sup>1</sup> Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

<sup>2</sup> Chaklin Ural Institute of Traumatology and Orthopedics, Ekaterinburg, Russian Federation

<sup>3</sup> Ural State Agrarian University, Ekaterinburg, Russian Federation

<sup>4</sup> Institute of Medical Cell Technology, Ekaterinburg, Russian Federation

<sup>5</sup> Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

**Objective:** to evaluate the features of reparative chondrogenesis and osteogenesis in animal experiments with the implantation of porous poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA) hydrogel into osteochondral defects. **Materials and methods.** Cylindrical pHEMA implants (5 mm in diameter) were synthesized by radical polymerization. The implants were subjected to light microscopy and mechanical tests to characterize the structure and viscoelastic properties of the material. In experimental group #1, four pHEMA specimens were implanted into formed defects in the distal femoral epiphysis of rabbits. In experimental group #2, allogeneic chondrocytes were applied to the surface of four specimens before implantation. In the control series, four defects were not replaced with implants. Tissue regeneration was investigated by morphological and morphometric methods 30 days after operation. **Results.** The pHEMA implants were heterogeneous specimens with irregularly shaped pores – up to  $30 \times 10 \mu\text{m}$  at the surface and  $300 \times 120 \mu\text{m}$  inside. With  $>10\%$  static compressive stress, the Young's modulus was 54.7 kPa. For dynamic stress, increased frequency of compression-relaxation cycles from 0.01 Hz to 20.0 Hz led to increased storage modulus from 20 kPa to 38 kPa on average, and increased loss modulus from 2 kPa to 10 kPa. Indicators of semi-quantitative assessment of local inflammatory response to pHEMA implantation had the following values in points: pHEMA,  $4.7 \pm 0.3$ ; pHEMA with allogeneic chondrocytes,  $6.0 \pm 1.0$ ; control,  $4.3 \pm 0.3$ . The ratio of connective, bone, and cartilage tissues proper in the regenerates had the following respective values: pHEMA, 79%, 20%, 1%; pHEMA with chondrocytes, 82%, 16%, 2%; control, 9%, 74%, 17%. **Conclusion.** In a short-term experiment, pHEMA implants did not trigger a pronounced inflammatory response in the surrounding tissues and can be classified as biocompatible materials. However, the tested implants had low conductivity with respect to bone and cartilage cells, which can be improved by stabilizing the pore size and increasing the rigidity when synthesizing the material.

*Keywords: osteochondral defects, implants, pHEMA hydrogel, physical properties, biocompatibility, cartilage tissue, bone tissue.*

## ВВЕДЕНИЕ

Фокальные остеохондральные повреждения суставов обнаруживаются у 61–63% пациентов при артроскопии [1]. Спонтанное восстановление дефектов хряща крайне ограничено, а их наличие провоцирует развитие деформирующего остеоартроза и снижение качества жизни пациентов [1]. Поэтому лечение остеохондральных повреждений суставов является актуальной задачей настоящего времени.

Для стимуляции регенерации суставного хряща применяют ряд методик, показавших удовлетворительные среднесрочные результаты лечения. К их числу относят: мозаичную хондропластику (mosaicplasty) [2]; аутохондрогенез (АМГ), индуцированный на матрице для культивирования клеток (scaffold) [3]; трансплантацию аутогенных хондроцитов (АЦИ) [4], включая ассоциированных с коллагеновой матрицей (МАСТ/МАЦИ) [5], а также введение

мезенхимальных стромальных клеток [6]. Вместе с тем на сегодняшний день не существует метода лечения, обеспечивающего органоспецифическое восстановление гиалинового хряща и полноценную долгосрочную клиническую ремиссию [7]. Данное обстоятельство вынуждает искать новые способы замещения дефектов хряща, в том числе и новые матрицы для трансплантации клеток.

Известен широкий спектр материалов для клеточных матриц, среди которых гидрогели занимают значимую нишу. Гель – это полимер, набухший в растворителе, по своему составу может содержать до 99% жидкости. Синтетические гидрогели рассматривают в качестве биомиметиков биологических тканей, поскольку при соответствующем химическом составе и определенных физических и/или химических воздействиях они демонстрируют схожие с живыми тканями механические свойства [8, 9].

В настоящей работе в качестве материала для костно-хрящевых имплантатов был использован поли-2-гидроксиэтилметакрилатный (р-НЕМА) гидрогель. Известно, что р-НЕМА нетоксичен, инертен, обладает биосовместимостью [10]. За счет контролируемого синтеза физические свойства р-НЕМА можно приблизить к свойствам биологических тканей. В частности, вязкоупругие свойства р-НЕМА, его проницаемость для кислорода и содержание растворителя в нем могут соответствовать характеристикам внеклеточного матрикса [11].

Биосовместимость р-НЕМА и его физико-химические свойства обеспечили использование этого материала для изготовления контактных линз, искусственной роговицы, систем доставки лекарственных средств, а также матриц для контролируемой дифференциации стволовых клеток [12]. В ортопедии обсуждается возможность применения р-НЕМА для изготовления искусственного хряща, протеза пульпозного ядра межпозвонкового диска, а также использование его в качестве демпфера механических колебаний при изготовлении тотального эндопротеза межпозвонкового диска [11, 13].

С точки зрения аппликации синтетических материалов в медицине гидрогели р-НЕМА имеют преимущество, связанное с возможностью создания в ходе синтеза различных морфологических структур в форме пор [14]. Пористая структура р-НЕМА позволяет вводить в них различные биологически активные соединения, в том числе и с антимикробной активностью [15]. Кроме того, пористые синтетические гидрогели хорошо зарекомендовали себя в качестве трехмерных матриц для культивирования клеток, используемых в заместительной терапии и регенеративной медицине [12].

Исходя из вышесказанного цель настоящего исследования состояла в изучении регенерации хрящевой и костной тканей при заполнении костно-хрящевых дефектов эпиметафизов бедренной кости имплантатами из пористого гидрогеля р-НЕМА в экспериментах на животных *in vivo*. Представлены результаты оценки структуры и вязкоупругих свойств имплантатов р-НЕМА, данные о протекании репаративных процессов тканей после имплантации гидрогелей без клеток и с аллогенными хондроцитами.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Синтез имплантатов на основе гидрогеля р-НЕМА

Синтетические гидрогели р-НЕМА были получены методом радикальной полимеризации в водном растворе мономера (гидроксиэтилметакрилата – НЕМА) при 70 °С в присутствии сшивающего агента – N,N'-метиленадиакриламида (МДАА). Концентрация мономера составляла 2 моль/дм<sup>3</sup> (2 М), а

концентрации МДАА – 0,02 моль/дм<sup>3</sup> (0,02 М). Это обеспечивало формирование сетчатой полимерной структуры, в которой мольное соотношение узлов сетки и звеньев в линейных фрагментах составляло 1 : 100. В качестве инициатора полимеризации использовали персульфат аммония в концентрации 3 мМ. Полимеризацию проводили в цилиндрических формах из полиэтилена в течение одного часа, после чего образцы извлекали из форм и промывали в дистиллированной воде в течение двух недель при ежедневной смене воды.

В результате были получены образцы р-НЕМА диаметром ~5 мм и длиной 120–150 мм, после чего они были укорочены скальпелем до размера имплантата (~5,5 мм). Для аттестации эластических свойств р-НЕМА были синтезированы образцы большего диаметра (~9 мм).

### Механические испытания гидрогелей р-НЕМА

Оценка вязкоупругих свойств гелей была проведена на специальном оборудовании для механических испытаний и подробно изложена в наших ранних публикациях [16, 17]. Кратко: установка для механических испытаний гелей содержала прецизионные датчики силы и перемещений, а также линейный электромагнитный мотор для задания образцам деформаций произвольной формы. Образцы р-НЕМА цилиндрической формы диаметром ~9 мм и высотой ~5 мм помещали в кювету, заполненную раствором, в котором гель предварительно набухал. Один конец образца жестко крепился к датчику силы, другой – к рычагу мотора.

Для получения зависимости «напряжение–деформация» образцам задавали ступенчатые деформации на сжатие с шагом 50 мкм и регистрировали величину упругой силы, возникающей в образце. Для установления реологических характеристик материала, модулей накопления (G') и потерь (G'') образцам прикладывали синусоидальные деформации на сжатие с амплитудой ~3% от начальной высоты образца и частотой от 0,01 до 20 Гц. Метод задания и анализа эффектов низкоамплитудных периодических деформаций широко используется для определения вязкоупругих свойств материалов, в том числе и гидрогеля р-НЕМА [18].

### Экспериментальные животные и группы исследования

В работе использованы половозрелые кролики-самцы (возраст 5 месяцев, вес 2,8–3,5 кг) породы «советская шиншилла» (сертификат на животных № 2020/2КШ от 12 апреля 2020 г.). Содержание, оперативные вмешательства и эвтаназия животных были выполнены в соответствии с требованиями и прин-

ципами биомедицинских исследований с участием позвоночных животных, изложенными в Европейской конвенции (1986 г.), и протокола к ней от 1998 г. (European Convention, 1986). Протокол эксперимента был одобрен Этическим комитетом Уральского государственного медицинского университета (протокол № 2 от 28 февраля 2020).

В эксперименте были использованы 6 кроликов, которым создавали стандартные большие костно-хрящевые дефекты суставной пателлярной поверхности эпиметафизов обеих бедренных костей ( $n = 12$ ). При таких дефектах не происходило полного замещения тканей при спонтанном репаративном процессе, что соответствует данным литературы [19]. На протяжении всего эксперимента гибели животных и гнойных осложнений не наблюдалось. Животные были подвижны, опороспособность и правильное положение конечностей сохранены. Одного кролика использовали в качестве донора хондроцитов.

Животные были разделены на 3 группы, по 2 кролика в каждой. В контрольной серии (КС) дефекты не замещали имплантатами ( $n = 4$ ). В опытной серии № 1 (ОС-1) дефекты замещали имплантатами из р-НЭМА ( $n = 4$ ), в опытной серии № 2 (ОС-2) дефекты были заполнены имплантатами из р-НЭМА с адгезированными на них аллогенными хондроцитами ( $n = 4$ ). Через 30 суток после операции все животные были выведены из эксперимента, после чего исследовали эпиметафизы бедренных костей.

### **Подготовка имплантатов р-НЭМА с адгезированными хондроцитами**

Культуру хондроцитов получали из хрящевой ткани коленного сустава кролика, использованного в качестве донора. Хондроциты из ткани выделяли путем диссоциации с помощью коллагеназы-I. Для этого хрящевая ткань суставных поверхностей тазобедренных и колленных суставов была измельчена и проинкубирована при 37 °С в растворе коллагеназы с концентрацией 3 мг/мл в течение 90 мин. После этого раствор был заменен на свежий с концентрацией коллагеназы 0,5 мг/мл, инкубацию с этим раствором проводили в течение 16 часов при 37 °С.

Диссоциированные клетки выращивали в виде монослойной культуры в культуральных флаконах с использованием специализированной ростовой среды для хондроцитов Human Chondrocyte Growth Medium Kit (Cell Applications, Inc) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (37 °С, 5% CO<sub>2</sub>, 100% относительная влажность). По достижении монослоем 70% конfluenceности клетки были пересажены на второй пассаж. Снятие клеток с пластика осуществляли с помощью 0,25% раствора трипсина с ЭДТА. Для посева на имплантат использовали хондроциты второго пассажа. Фенотип

клеток подтверждали окрашиванием альциановым синим и ядерным красным.

Хондроциты высевали на одну из плоских поверхностей имплантатов р-НЭМА с высокой плотностью (300 000 клеток / см<sup>2</sup> поверхности имплантатов). Для этого стерильные гидрогели помещали в чашку Петри вертикально вплотную друг к другу и заливали хондроцитарной средой выше уровня их верхнего края. Хондроциты снимали с пластика трипсином и ресуспендировали в хондроцитарной среде. Полученную суспензию наносили на покрывающую имплантаты среду, после чего клетки оседали на поверхность имплантатов. Имплантаты инкубировали в течение суток в CO<sub>2</sub>-инкубаторе, после чего использовали для имплантации кроликам.

Для подтверждения адгезии хондроцитов на поверхности имплантатов часть образцов подвергали фиксации и окрашиванию пиразолоновым желтым (цитоплазма) и DAPI (ядра) по методике, описанной ранее [17]. Флуоресцентная микроскопия окрашенных образцов подтвердила адгезию хондроцитов на поверхности гидрогеля. При этом прикрепившиеся клетки распределялись по поверхности геля неравномерно, с образованием плотных многослойных скоплений.

### **Хирургическая процедура имплантации р-НЭМА**

Оперативные вмешательства были выполнены под общей анестезией (внутримышечно – рометар 2% – 8 мг/кг (Rometar 2% СПОФА, Чехия), изолетил – 6 мг/кг (Zoletil-100, VirbacSanteAnimale). Медиальным доступом с рассечением удерживающей связки надколенника выполняли артротомию с хирургическим вывихом надколенника латерально. Сверлом диаметром 5,0 мм с ограничителем формировали цилиндрический костно-хрящевой дефект (рис. 1, а) на передней поверхности дистального эпиметафиза бедренной кости в области поверхности пателло-фemorального сочленения.

Спицей диаметром 1,5 мм в дистальном эпиметафизе бедренной кости формировали два поперечных канала через боковые кортикальные стенки кости на уровне дефекта и на 4 мм проксимальнее дефекта. В дефекты устанавливали имплантаты диаметром 5 мм и высотой 5,5 мм (рис. 1, б), которые фиксировали к стенкам дефекта чрескостным швом через поперечные каналы (рис. 1, в, г). Операционную рану послойно ушивали с восстановлением целостности связки, удерживающей надколенник.

### **Методология морфологического исследования**

Материал для морфологического исследования (дистальные эпиметафизы бедренных костей) полу-

чали непосредственно после выведения животных из эксперимента. Фрагменты бедренной кости фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине (BioOptica). Костную ткань подвергали декальцинации, часть костного материала заливали в парафин. Исследуемый материал р-НЕМА в условиях стандартного протокола парафиновой проводки терял до 1/2 своего объема, что деформировало нежные новообразованные ткани, прилежащие к имплантатам, и нарушало топографическое единство препарата. Поэтому часть фрагментов костной ткани заливали в желатин и подвергали криотомии. Срезы эпиметафизов выполняли в сагиттальной плоскости.

В качестве обзорной окраски использовали гематоксилин и эозин. Для выявления компонентов соединительной ткани – метод Ван-Гизона. Для описательной морфологии использовали световой микроскоп Micros MS300. Оцифровку препаратов и морфометрические исследования выполняли на сканирующем микроскопе 3DHISTECH PANNORAMIC Midi с использованием программы Pannoramic Viewer.

Морфометрическая оценка регенерата включала определение высоты надимплантационного регенерата, толщину периимплантационной капсулы, глубину прорастания регенерирующих тканей в поры имплантата, площадь и соотношение тканевых компонентов в периимплантационной области, подсчет количества хондроцитов, их изогенных групп в новообразованной хрящевой ткани.

Местное биологическое действие имплантатов определяли путем полуколичественной оценки воспалительной реакции [20]. Воспалительную реакцию характеризовали наличием зон некроза, количеством провоспалительных клеток – полиморфноядерных лейкоцитов, тучных клеток, лимфоцитов, макрофа-

гов, плазматических клеток и гигантских многоядерных клеток в поле зрения при увеличении  $\times 400$ .

## Статистический анализ

Результаты представлены в виде  $X \pm m$ , где  $X$  – среднее арифметическое,  $m$  – ошибка среднего арифметического. При оценке различий между двумя независимыми выборками использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Допустимым уровнем статистической значимости принимали  $p \leq 0,05$ . Статистический анализ данных был выполнен с использованием лицензионного программного обеспечения Statistica 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Особенности архитектуры имплантатов р-НЕМА

Синтетические гидрогели р-НЕМА имеют ряд структурных особенностей, отличающих их от других гелей биомедицинского назначения, в частности, от широко распространенных гидрогелей полиакриламида. В отличие от последних гидрогели р-НЕМА представляют собой гетерогенную макропористую систему [18]. Мономер НЕМА хорошо растворим в воде, в то же время полимер р-НЕМА в воде растворяется ограниченно. Поэтому при синтезе гидрогеля изначально гомогенный раствор мономера по мере протекания полимеризации претерпевает фазовое разделение. При этом образующаяся нерегулярная полимерная сетка отделяется от водной среды и формирует макропористую структуру, которая схематично представлена на рис. 2, а.

В структуре гидрогеля р-НЕМА присутствуют крупные поры неправильной формы, заполненные жидкостью. Стенки пор сформированы нерегулярной сетчатой структурой р-НЕМА, которая, в свою оче-

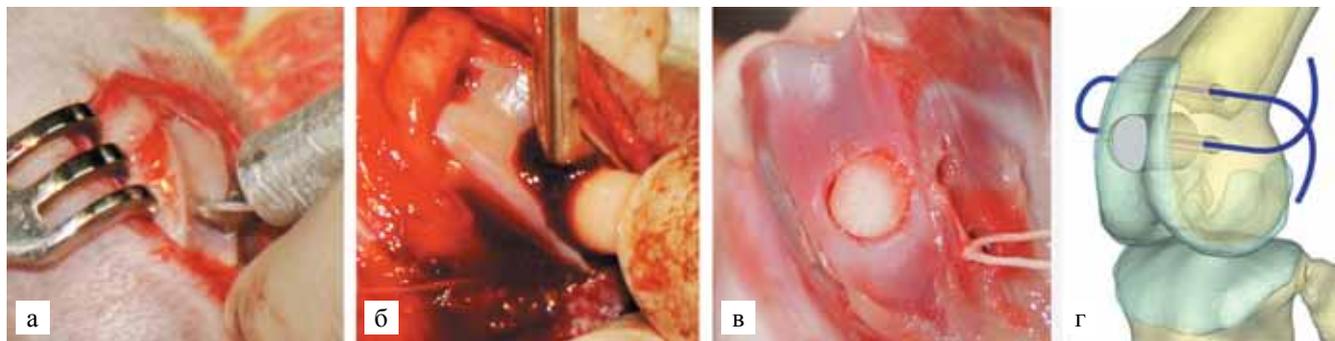


Рис. 1. Этапы операции по внедрению имплантатов в эпиметафиз бедренной кости кролика: а – формирование стандартного дефекта сверлом с ограничителем; б – введение имплантата; в – внешний вид суставной поверхности после установки имплантата; г – схема локализации имплантата и его фиксации чрескостным швом

Fig. 1. Stages of implant insertion in a rabbit's femoral epiphysis: а – formation of a standard defect with a drill with a stopper; б – implant insertion; в – the view of the articular surface after implant placement; г – diagram showing implant localization and its fixation with transosseous sutures

редь, также содержит воду и является проницаемой для растворенных в воде солей и простых соединений (сахаров, аминокислот и проч.). Гетерогенная природа гидрогеля р-НЭМА проявляется, в частности, в том, что его образцы не прозрачны, а являются молочно-белыми за счет рассеяния света на стенках макропор в структуре геля (рис. 1, б, в).

На рис. 2 приведены в качестве примера фото криосрезов имплантатов из р-НЭМА, зафиксированные до и после эксперимента (рис. 2, б, в). Хорошо видно, что в глубине образцов поры (на рис. 2, б – темные области, на рис. 2, в, поры заполнены рыхлой соединительной тканью) имеют неправильную форму, их размеры не превышают по длинной оси 300 мкм, по короткой оси – 120 мкм. В поверхност-

ном плотном слое имплантатов шириной 20–150 мкм располагаются поры существенно меньшего размера (по длинной оси – до 30 мкм, по короткой – до 10 мкм), при этом незначительное количество пор сообщаются с поверхностью.

В целом внутренняя архитектура имплантата может быть охарактеризована как сильно гидратированный макропористый полимерный материал с высокой степенью структурной неоднородности.

### Вязкоупругие свойства р-НЭМА

На рис. 3 приведены результаты механических испытаний образцов р-НЭМА в статическом (n = 5) и динамическом (n = 6) режимах нагрузок. При деформации сжатия геля с шагом 50 мкм были получены

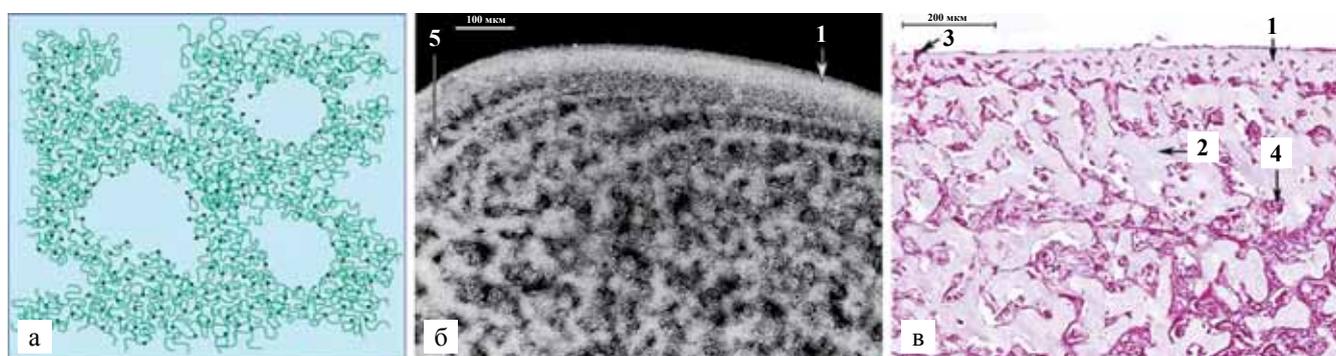


Рис. 2: а – схема молекулярного строения синтетического гидрогеля р-НЭМА; линии соответствуют линейным фрагментам полимерных цепей, точки – узлам сетки; б, в – примеры визуализации имплантатов, световая микроскопия: б – криосрез р-НЭМА до эксперимента (×100, цветопередача инвертирована); в – криосрез р-НЭМА через 30 суток после имплантации (×200, окраска гематоксилином и эозином). 1 – плотный поверхностный слой; 2 – р-НЭМА; 3 – пора, сообщающаяся с поверхностью; 4 – поры внутри имплантата с рыхлой соединительной тканью и остеоидом; 5 – концентрические слои внутри имплантата, содержащие мелкие поры

Fig. 2: a – diagram showing the molecular structure of synthetic pHEMA hydrogel; lines are the linear fragments of polymer chains, dots represent mesh nodes; б, в, – implant imaging examples, light microscopy; б – pHEMA cryosection before experiment (100× magnification, color rendering inverted); в – pHEMA cryosection 30 days after implantation (200× magnification, H&E stain). 1 – dense surface layer; 2 – pHEMA; 3 – pore communicating with the surface; 4 – pores inside the implant with loose irregular connective tissue and osteoid; 5 – concentric layers inside the implant containing small pores

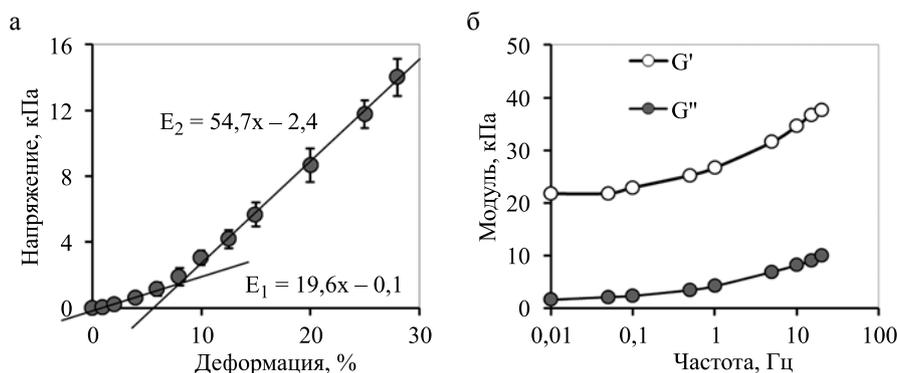


Рис. 3. Характеристики вязкоупругих свойств р-НЭМА: а – связь между механическим напряжением в геле и его деформацией; б – типичные зависимости модулей накопления ( $G'$ ) и потерь ( $G''$ ) от частоты деформации

Fig. 3. Viscoelastic properties of pHEMA: а – relationship between mechanical stress in the gel and its deformation; б – storage modulus ( $G'$ ) and loss modulus ( $G''$ ) versus angular frequency (representative graphs)

зависимости «напряжение–деформация» (рис. 3, а). Видно, что с возрастанием величины деформации механическое напряжение в геле увеличивается. В целом зависимость не является линейной и качественно напоминает таковую для биологических мягких тканей [21]. На кривой можно выделить две области, в которых связь имеет линейный характер и описывается уравнением линейной регрессии: первая – до 5–6% деформации, вторая – при деформациях более 10%. Коэффициент при первом члене уравнения, определяемый как тангенс угла наклона кривой, соответствует величине модуля Юнга, значение которого для первого и второго участков кривой равно 19,6 и 54,7 кПа соответственно.

Рис. 3, б, иллюстрирует результаты анализа механических испытаний р-НЭМА в динамическом режиме нагрузок. Приведены зависимые от частоты деформации значения для модуля накопления ( $G'$ ) как меры упругости геля и модуля потерь ( $G''$ ) как характеристики вязкости объекта. Видно, на предельно низких частотах р-НЭМА ведет себя в большей мере как упругое тело. Величина модуля накопления близка к определенному в статическом режиме модулю Юнга по первому диапазону малых деформаций. С увеличением частоты циклов «сжатие–расслабление» гелей от 0,01 до 20,0 Гц модуль накопления в среднем возрастает с 20 до 38 кПа, а модуль потерь – с 2 до 10 кПа. То есть вклад вязкостного компонента в механический ответ геля на деформацию начинает возрастать. В целом примерно одинаковая динамика модулей при значительном увеличении частоты деформации свидетельствует о хорошей стабилизации связей в структуре полимерной сети р-НЭМА. Это подразумевает высокую степень износостойкости геля в выбранном диапазоне нагрузок.

## Макроскопическое исследование костной и хрящевой тканей

Через 30 суток после операции в КС на суставных поверхностях дистальных эпиметафизов бедренных костей в областях, прилежащих к дефектам, были выявлены неровности и утолщения (рис. 4, а).

В ОС-1 и ОС-2 пространственное расположение имплантатов в течение всего эксперимента сохранялось. В ОС-1 имплантаты покрыты тонкими регенератами с небольшими зияющими участками, на дорсальной поверхности мыщелков – валиковидные утолщения (рис. 4, б). В ОС-2 обнаружены наибольшие изменения суставной поверхности – признаки регенераторной гипертрофии в виде валиковидных разрастаний по всей дорсальной поверхности дистального эпифиза. Регенераты над имплантатами тонкие с перфорациями (рис. 4, в).

## Микроскопическое исследование регенератов

Суставные поверхности в периимплантационной области имели выраженные дегенеративные изменения в поверхностной и промежуточной зонах хряща (рис. 5), а также признаки реактивно-продуктивной репарации. В частности, у животных всех серий были отмечены утолщения на суставных поверхностях, сформированные костными трабекулами с признаками активного остеогенеза, структурированным гиалиновым хрящом с фибрилляцией матрикса и широкой надхрящницей.

Структура регенерата с суставной поверхности различалась у животных опытных и контрольной серий. В КС регенерат был сформирован широким пластом частично структурированного гиалиноподобного хряща с тонким слоем плотной неоформленной соединительной ткани по типу надхрящницы.



Рис. 4. Макропрепараты дистальных эпифизов бедренных костей кроликов, 30 суток после операции: а – дефект не заполнен имплантатом; б – дефект заполнен имплантатом р-НЭМА; в – дефект заполнен имплантатом р-НЭМА с адгезировавшими аллогенными хондроцитами. 1 – валиковидные утолщения гребней

Fig. 4. Macro specimens of distal femoral epiphyses of rabbits, 30 days after surgery: а – defect not filled with implant; б – defect filled with pHEMA implant; в – defect filled with pHEMA implant with adherent allogeneic chondrocytes. 1 – roller-shaped bone crest thickenings

цы (рис. 5, а). На уровне субхондрального отдела и глубже полость была заполнена новообразованной костной тканью, субхондральная пластинка не была восстановлена. Процессы репарации не были завершены.

В ОС-1 и ОС-2 регенераты со стороны суставной поверхности были образованы плотной неоформленной соединительной тканью с локусами рыхлой соединительной ткани и признаками активного ангиогенеза. Процесс регенерации хрящевой ткани происходил только по краям имплантационной полости, ее основным источником развития, вероятно, были клетки-предшественницы хондроцитов из субхондральной костной ткани. В ОС-1 регенерат сформирован плотной неоформленной соединительной тканью с высокой клеточностью и относительно рыхло расположенными волокнами (рис. 5, б), в ОС-2 он был представлен соединительной тканью с более плотно расположенными коллагеновыми волокнами, что указывает на ее большую зрелость (рис. 5, в). Площадь регенерата (в области соответствующей проекции хряща до формирования дефекта), в ОС-1 и ОС-2 была меньше, чем в КС, в 2,9 и 2,3 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно.

В ОС-1 и ОС-2 на всем протяжении контакта с имплантационным ложем имплантаты были окружены соединительно-тканевыми капсулами, включавшими в себя отдельные локусы хондро- и остеогенеза. В ОС-1 и ОС-2 капсулы были сформированы плотной неоформленной соединительной тканью (рис. 6, а, б). Толщина капсул ОС-1 и ОС-2 ( $193 \pm 77$  и  $180 \pm 84$  мкм соответственно) и их площадь в опытных сериях значимо не различались. В периимплантационной области между новообразованными костными балками были обнаружены фрагменты

p-НЕМА, что указывает на частичное разрушение имплантатов *in vivo* (рис. 6, а).

Соотношения собственно соединительной (плотной и рыхлой), костной и хрящевой тканей в составе регенератов имели следующие соответствующие значения: p-НЕМА – 79, 20, 1%; p-НЕМА с хондроцитами – 82, 16, 2%; контроль – 9, 74, 17%. Хрящевая ткань в ОС-1 и ОС-2 была представлена небольшими бессосудистыми полями с одиночными и малочисленными изогенными группами хондроцитов (в ОС-2 была отмечена тенденция к их увеличению) с высокой плотностью клеток и незначительным объемом матрикса, что свидетельствовало о незрелости хряща и отличало опытные серии от контрольной.

В обеих опытных сериях волокна рыхлой соединительной ткани «врастали» в сообщающиеся с поверхностью открытые поры имплантата. Пористые пространства на всю глубину были заполнены преимущественно рыхлой соединительной тканью с новообразованными капиллярами и небольшими участками костной ткани (рис. 6, в, г). Поры боковых поверхностей имплантата, контактирующих с ложем полости, содержали очаги остеогенеза.

### Микроскопическая оценка местной воспалительной реакции

В ходе полуколичественной оценки местного биологического воздействия имплантатов p-НЕМА было выявлено, что показатели воспалительной реакции в опытных сериях были несколько выше, чем в контроле (КС –  $4,33 \pm 0,33$ , ОС-1 –  $4,7 \pm 0,33$ , ОС-2 –  $6,0 \pm 1,0$  балла), но различия не были статистически достоверны. Показатели воспалительной реакции были повышены преимущественно за счет увеличения ко-



Рис. 5. Регенерация суставной поверхности в области границы полости дефекта (дистальный эпифиз бедренной кости кроликов), 30 суток после операции: а – контрольная серия; б – опытная серия 1; в – опытная серия 2. 1 – суставной хрящ; 2 – граница полости; 3 – новообразованная ретикулофиброзная костная ткань; 4 – новообразованная хрящевая ткань; 5 – собственно соединительная ткань на поверхности имплантата; 6 – имплантат. Окраска гематоксилином и эозином. Световая микроскопия,  $\times 100$

Fig. 5. Regeneration of the articular surface (distal femoral epiphysis in rabbits) in the border area of the defect cavity, 30 days after surgery: а – control group; б – experimental group 1; в – experimental group 2. 1 – articular cartilage; 2 – cavity boundary; 3 – newly formed reticulofibrous bone tissue; 4 – newly formed cartilage tissue; 5 – connective tissue proper on the implant surface; 6 – implant. H&E stain. Light microscopy, 100 $\times$  magnification

личества макрофагов в прилежащих тканях в обеих сериях и выявленных в периимплантационных тканях ОС-2 тучных клеток. Гигантских многоядерных клеток в прилежащих тканях обнаружено не было.

Таким образом, в условиях данного эксперимента с учетом совокупной оценки выбранных критериев материал р-НЭМА *in vivo* не вызывал выраженной воспалительной реакции в прилежащих тканях.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе были исследованы репаративные процессы костной и хрящевой тканей при заполнении костно-хрящевого дефекта имплантатом на основе пористого гидрогеля р-НЭМА. Выбор

р-НЭМА опирался на данные литературы, согласно которым этот гель обладает хорошей биосовместимостью [10–13].

В результате эксперимента *in vivo* через 30 суток после внедрения имплантатов были выявлены единичные балочки ретикулофиброзной костной ткани, «прорастающие» в поверхностные поры имплантата. Это указывает на возможность остеоинтеграции материала в более отдаленные сроки наблюдения после операции. При использовании р-НЭМА с хондроцитами было установлено некоторое увеличение площади областей хондрогенеза по сравнению с имплантатами без клеток.

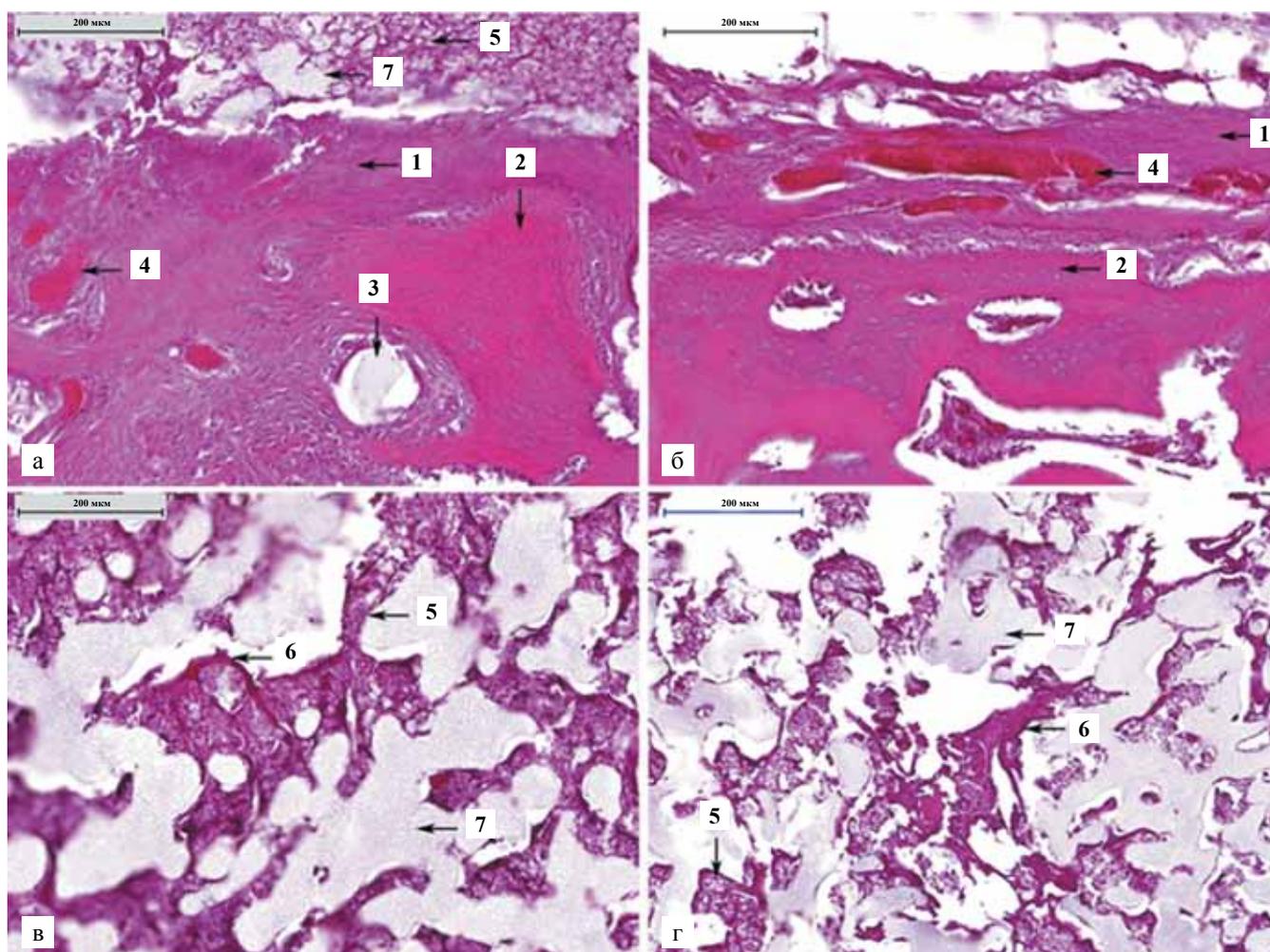


Рис. 6. Регенераты костно-хрящевых дефектов дистального эпифиза бедренной кости кроликов, 30 суток после имплантации: а, в – опытная серия 1; б, г – опытная серия 2; а, б – ложе имплантационной полости; в, г – имплантат. 1 – соединительно-тканная капсула в ложе имплантационной полости; 2 – костная ткань в толще капсулы; 3 – фрагменты р-НЭМА в толще новообразованной костной ткани; 4 – гиперемия сосудов; 5 – собственно соединительная ткань в порах имплантата; 6 – костная ткань в порах имплантата; 7 – имплантат р-НЭМА. Окраска гематоксилином и эозином. Световая микроскопия,  $\times 200$

Fig. 6. Regenerates of osteochondral defects of the distal femoral epiphysis of rabbits, 30 days after implantation: а, в – experimental group 1; б, г – experimental group 2; а, б – implant cavity bed; в, г – implant. 1 – connective tissue capsule in the implant cavity bed; 2 – bone tissue inside the capsule; 3 – pHEMA fragments inside the newly-formed bone tissue; 4 – vascular hyperemia; 5 – connective tissue proper in the implant pores; 6 – bone tissue in the implant pores; 7 – pHEMA implant. H&E stain. Light microscopy,  $200\times$  magnification

Вместе с тем вся совокупность полученных результатов указывает на плохую интеграцию костной и хрящевой тканей с полимерным матриксом р-НЭМА. По реакции тканей на внедренный имплантат используемую полимерную матрицу следует отнести к разряду биотолерантных материалов. Ответ организма характеризуется образованием соединительно-тканной капсулы, изолирующей полимерную матрицу от тканей, и внедрением в поры имплантата преимущественно соединительной ткани. Таким образом, имплантаты р-НЭМА при внедрении в костно-суставной дефект проявили минимальные кондуктивные свойства по отношению к костной и хрящевой тканям.

Полученный результат может быть связан с рядом физико-химических свойств используемой биоинженерной матрицы [22]. Известно, что архитектура порового пространства играет ключевую роль в системах доставки клеточных структур. Так, максимальный уровень миграции хондроцитов [23] и остеобластов [24] внутрь трехмерных матриц отмечается при наличии сообщающихся с поверхностью пор размером 250–325 мкм. Напротив, для фибробластов наиболее высокий уровень адгезии и миграции внутрь каркаса на основе геля наблюдался при размере пор менее 100–160 мкм [25].

В номенклатуре коллоидных систем р-НЭМА относится к разряду макропористых полимеров, то есть имеет размер пор более 1 мкм. В настоящем исследовании были использованы имплантаты р-НЭМА, которые, согласно результатам оптической микроскопии, имели поры неправильной формы, достигающие в размере  $300 \times 120$  мкм. Следует отметить, что из-за наличия в геле жидкой фазы трудно судить, в какой степени исследуемые криосрезы имплантатов (см. рис. 2, б, в) отражают нативную структуру материала. Вместе с тем полученные факты позволяют говорить о высокой степени неоднородности распределения пор по размеру в образцах. Действительно, поры непосредственно у поверхности имплантата имели принципиально меньший размер, чем поры в глубине образца.

Можно высказать гипотезу, согласно которой образование плотного мелкопористого слоя р-НЭМА связано с особенностями синтеза полимера в полиэтиленовых формах непосредственно под размер имплантата (5 мм в диаметре). Однако предположение о влиянии стенок формы на полимеризацию материала в приграничном слое пока не имеет четкого физико-химического обоснования.

Таким образом, поверхностная структура гидрогелей благоприятствовала миграции внутрь р-НЭМА фибробластов, но не способствовала миграции клеток хрящевой или костной тканей. Следовательно, можно предположить, что прорастание имплантата преимущественно рыхлой волокнистой соедини-

тельной тканью по отношению к незначительным объемам костной и хрящевой тканей обусловлено главным образом недостаточным количеством крупных пор на поверхности используемых имплантатов р-НЭМА.

Необходимо добавить, что возможной причиной крайне медленного прорастания костной и хрящевой тканей в имплантат может быть недостаточная жесткость используемой платформы р-НЭМА. Согласно результатам механических испытаний материала, абсолютные значения модуля упругости гидрогелей оказались примерно на порядок ниже, чем показатели, обеспечивающие хорошую пролиферацию хондроцитов на р-НЭМА [26]. При этом установленные закономерности о динамике механических модулей с увеличением скорости деформации (см. рис. 3, а), а также характер зависимости «деформация–напряжение» (см. рис. 3, б) качественно совпали с результатами аналогичных испытаний межпозвоночных дисков собак [27].

Совокупность данных гистологического исследования через 30 суток после операции подразумевает, что уровень реакции тканей на имплантацию гелей, в том числе с адгезированными аллогенными хондроцитами, можно признать умеренным на фоне реакции, вызванной хирургической травмой. Установленные факты не противоречат данным других исследований, в которых отмечено отсутствие иммунного отторжения трансплантируемых аллогенных хондроцитов у кроликов, в том числе, вероятно, за счет их иммуносупрессивной активности [28].

В целом полученные в работе сведения хорошо согласуются с известными фактами о влиянии физико-химических свойств и поверхностной структуры р-НЭМА на биологическую активность клеток в экспериментах *in vitro*. Данное обстоятельство позволяет сформулировать пути оптимизации синтеза р-НЭМА для увеличения биосовместимости этих гидрогелей при использовании в качестве имплантатов костно-хрящевых дефектов *in vivo*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа относится к ограниченному числу исследований *in vivo*, направленных на изучение возможной имплантации гидрогелей р-НЭМА для создания инженерных продуктов, имеющих близкие к нативной ткани физические свойства и структуру. Использованные в данной работе гидрогели не вызывали выраженных реакций отторжения при имплантации в эпиметафиз бедренной кости кроликов, но прорастали преимущественно волокнистой соединительной тканью при практически полном отсутствии в них костной и хрящевой тканей.

Совместимость гидрогеля с костной и хрящевой тканью может быть повышена путем создания крупнопористой структуры не только внутри, но, в пер-

вую очередь, у поверхности р-НЭМА. Представленные в работе результаты позволяют предположить, что уменьшение неоднородности распределения размеров пор в образце может быть достигнуто за счет синтеза р-НЭМА в объеме, значительно большем, чем это необходимо для изготовления имплантата. Это позволит минимизировать разницу в размере пор у поверхности и внутри полимера.

Кроме того, обращают на себя внимание и данные литературы, в которых рассматривается повышение биосовместимости имплантатов на основе гидрогелей за счет модификации структуры полимеров твердыми волокнами или частицами [29]. В частности, в ряде работ [16, 17, 30] мы показали, что включение в состав полиакриламидного геля магнитных наночастиц оксида железа приводит к значительному увеличению адгезии и пролиферации клеток на поверхности феррогелей в экспериментах *in vitro*. Таким образом, синтез образцов феррогелей р-НЭМА с оптимизированными размерами пор, а также оценка тканевой совместимости этих магнитных композитов являются направлением нашей дальнейшей работы.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Государственного задания Минздрава РФ (№ 121032300335-1).*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Jiang S, Guo W, Tian G, Luo X., Peng L, Liu S et al. Clinical Application Status of Articular Cartilage Regeneration Techniques: Tissue-Engineered Cartilage Brings New Hope. *Stem Cells International*. 2020; ID 5690252, 16 pages. <https://doi.org/10.1155/2020/5690252>.
- Hangody L, Kish G, Kárpáti Z, Udvarhelyi I, Szigeti I, Bély M. Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. *Orthopedics*. 1998; 21 (7): 751–756. PMID: 9672912.
- Benthien JP, Behrens P. Autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC): a one-step procedure for retropatellar articular resurfacing. *Acta Orthop Belg*. 2010; 76 (2): 260–263. PMID: 20503954.
- Davies RL, Kuiper NJ. Regenerative Medicine: A Review of the Evolution of Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) Therapy. *Bioengineering (Basel)*. 2019; 6 (1): 22. doi: 10.3390/bioengineering6010022.
- Behrens P, Bitter T, Kurz B, Russlies M. Matrix associated autologous chondrocyte transplantation: a 5 year follow up. *Knee*. 2006; 13 (3): 194–202. doi: 10.1016/j.knee.2006.02.012.
- Park YB, Ha CW, Rhim JH, Lee HJ. Stem Cell Therapy for Articular Cartilage Repair: Review of the Entity of Cell Populations Used and the Result of the Clinical Application of Each Entity. *The American journal of sports medicine*. 2018; 46 (10): 2540–2552. <https://doi.org/10.1177/0363546517729152>.
- Герасимов СА, Тенилин НА, Корыткин АА, Зыкин АА. Хирургическое лечение ограниченных повреждений суставной поверхности: современное состояние вопроса. *Полутравма*. 2016; 1: 63–69. Gerasimov SA, Tenilin NA, Korytkin AA, Zykin AA. Surgical treatment of localized injuries to articular surface: the current state of the issue. *Polytrauma*. 2016; 1: 63–69.
- Dobreikina A, Shklyar T, Safronov A, Blyakhman F. Biomimetic gels with chemical and physical interpenetrating networks. *Polym Int*. 2018; 67: 1330–1334. doi 10.1002/pi.5608.
- Tejo-Otero A, Fenollosa-Artés F, Achaerandio I, Rey-Vinolas S, Buj-Corral I, Mateos-Timoneda MÁ et al. Soft-Tissue-Mimicking Using Hydrogels for the Development of Phantoms. *Gels*. 2022; 8: 40. <https://doi.org/10.3390/gels8010040/>.
- Mokry J, Karbanova J, Lukas J, Paleckova V, Dvorankova B. Biocompatibility of HEMA copolymers designed for treatment of CNS diseases with polymer-encapsulated cells. *Biotechnol Prog*. 2020; 16: 897–904.
- Rotaru I, Oлару. Mechanical behaviour of p(HEMA) hydrogel for disc prosthesis on lumbar spine. *Optoelectronics and Advanced Materials*. 2014; 16 (7–8): 881–886.
- Kubínová Š, Horák D, Hejcl A, Plichta Z, Kotek J, Proks V et al. SIKVAV-modified highly superporous PHEMA scaffolds with oriented pores for spinal cord injury repair. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015; 9: 1298–1309.
- Cao J, Liu Z, Zhang L, Li J, Wang H, Li X. Advance of Electroconductive Hydrogels for Biomedical Applications in Orthopedics. *Advances in Materials Science & Engineering*. 2021; 1–13. doi: 10.1155/2021/6668209.
- Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliver Rev*. 2012; 64: 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.010>.
- Kukolevska JS, Gerashchenko II, Borysenko MV, Pakhlov EM, Machovsky M, Yushchenko TI. Synthesis and Examination of Nanocomposites Based on Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) for Medicinal Use. *Nanoscale Research Letters*. 2017; 12: 133. doi 10.1186/s11671-017-1881-7.
- Blyakhman FA, Safronov AP, Makeyev OG, Melekhin VV, Shklyar TF, Zubarev AYU et al. Effect of the polyacrylamide ferrogel elasticity on the cell adhesiveness to magnetic composite. *J Mechanics in Medicine and Biology*, 2018; 18 (6): 1850060 (13 pages) <https://doi.org/10.1142/S0219519418500604>.
- Blyakhman FA, Makarova EB, Fadeyev FA, Lugovets DV, Safronov AP, Shabadrov PA et al. The Contribution of Magnetic Nanoparticles to Ferrogel Biophysical Properties. *Nanomaterials*. 2019; 9: 232. doi: 10.3390/nano9020232.
- Karpushkin E, Dušková-Smrčková M, Šlouf M, Dusek K. Rheology and porosity control of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. *Polymer* 2013; 54: 661–672. <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2012.11.055>.
- Ступина ТА, Петровская НВ, Степанов МА. Изучение регенерации хрящевой и костной ткани при

- моделировании щелевидного костно-хрящевого дефекта пателлярной поверхности мыщелков бедра в эксперименте. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2015; 5-1: 68–71. *Stupina TA, Petrovskaya NV, Stepanov MA*. Study regeneration of cartilage and bone tissue in modeling slit-shaped osteochondral defects patellar femoral condyle surface in experiment. *International Journal of applied and fundamental research*. 2015; 5-1: 68–71. URL: <https://applied-research.ru/ru/article/view?id=6764>.
20. ГОСТ Р ИСО 10993.6-2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации. GOST R ISO 10993.6-2011 Izdeliya meditsinskikh izdeliy. Chast' 6. Issledovaniya mestnogo deystviya posle implantatsii.
  21. *Fung YC, Cowin SC*. Biomechanics. Mechanical Properties of Living Tissues. *Journal of Biomechanical Engineering*. 1994; 61 (4): 1007. doi: 10.1115/1.2901550.
  22. *Chen L, Yan C, Zheng Z*. Functional polymer surfaces for controlling cell behaviors. *Materials Today*. 2018; 21 (1): 38–59. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.07.002>.
  23. *Lien SM, Ko LY, Huang TJ*. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomater*. 2009; 5 (2): 670–679. doi: 10.1016/j.actbio.2008.09.020.
  24. *Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ*. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2010; 31 (3): 461–466. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.063.
  25. *Harley BA, Kim HD, Zaman MH, Yannas IV, Lauffenburger DA, Gibson LJ*. Microarchitecture of three-dimensional scaffolds influences cell migration behavior via junction interactions. *Biophys J*. 2008; 95 (8): 4013–4024. doi: 10.1529/biophysj.107.122598.
  26. *Passos MF, Carvalho NMS, Rodrigues AA, Bavaresco VP, Jardini AL, Maciel MRW et al*. PHEMA hydrogels obtained by infrared radiation for cartilage tissue engineering. *International journal of chemical engineering*. 2019; ID 4249581. <https://doi.org/10.1155/2019/4249581>.
  27. *Gloria A, Causa F, De Santis R, Netti PA, Ambrosio L*. Dynamic-mechanical properties of a novel composite intervertebral disc prosthesis. *J Mater Sci: Mater Med*. 2007; 18: 2159–2165 doi 10.1007/s10856-007-3003-z.
  28. *Moskalewski S, Hyc A, Osiecka-Iwan A*. Immune response by host after allogeneic chondrocyte transplant to the cartilage. *Microsc Res Tech*. 2002; 58 (1): 3–13. doi: 10.1002/jemt.10110.
  29. *Александров ВН, Соколова МО, Комаров АВ, Михайлова ЕВ, Кокорина АА, Кривенцов АВ*. Клеточные технологии для регенерации хрящевой ткани. *Цитология*. 2020; 62 (3): 160–172. *Aleksandrov VN, Sokolova MO, Komarov AV, Mikhailova EV, Kokorina AA, Kriventsov AV*. Cell technologies in cartilage regeneration. *Tsitologiya*. 2020; 62 (3): 160–172. doi: 10.31857/S0041377120030025.
  30. *Kurlyanskaya GV, Blyakhman FA, Makarova EB, Buznikov NA, Safronov AP, Fadeyev FA et al*. Functional magnetic ferrogels: From biosensors to regenerative medicine. *AIP Advances*. 2020; 10: 125128. <https://doi.org/10.1063/9.0000021>.

Статья поступила в редакцию 25.04.2022 г.

The article was submitted to the journal on 25.04.2022