

УДК 616-77

КОМПОЗИТНЫЕ МАТРИКСЫ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ТРАВМАТОЛОГИИ И РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

Омелько Н.А., Халимов Р.И.

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», Барнаул,

e-mail: omelkokola@mail.ru, asu.nii@mail.ru

В этом обзоре рассматривается влияние функционализации коллагеном и желатином на свойства хитозановых каркасов (скаффолдов, от англ. *scaffold*), применяемых в биомедицине. Хитозан является перспективным материалом для создания подобных скаффолдов за счет своих уникальных свойств. Эти свойства обеспечивают эффективное применение материалов на основе хитозана в качестве основы для искусственных тканеинженерных конструкторов. Хитозановые скаффолды с успехом применяются в качестве материалов в травматологии и регенеративной медицине, включая создание искусственных органов. В обзоре рассматриваются результаты основных исследований за последние годы, посвященных применению биокомпозитных скаффолдов на основе хитозана в качестве раневых покрытий. Также описаны исследования биокомпозитов *in vivo*, а также *in vitro* на первичных и перевиваемых культурах клеток. Помимо этого, в обзоре рассмотрены работы, в которых биокомпозитные материалы на основе хитозана с желатином и коллагеном использовались для регенерации хрящевой и костной тканей. Описываемые исследования влияния композитных биоматериалов на регенерацию костной и хрящевой тканей выполнены главным образом *in vitro*, однако часть работ также выполнена на животных моделях. В заключение дана сравнительная оценка применению хитозановых биокомпозитов.

Ключевые слова: хитозан, коллаген, желатин, альбумин, фибрин, скаффолд, регенеративная медицина

COMPOSITE MATRIXES FOR USE IN TRAUMATOLOGY AND REGENERATIVE MEDICINE

Omelko N.A., Khalimov R.I.

Altai State University, Barnaul, e-mail: omelkokola@mail.ru, asu.nii@mail.ru

This review considers influence of collagen and gelatin functionalization on properties of chitosan scaffolds that are used in the biomedicine. Chitosan is a prominent material for creation of such scaffold due to its unique properties. This properties ensure effective application of chitosan-based materials as base for artificial tissue engineering constructs. Chitosan scaffold are effectively used as materials in traumatology and regenerative medicine, including the creation of artificial organs. In this review the results of main research of the recent years dedicated to usage of chitosan scaffold as wound covering are described. Studies of biocomposites *in vivo* as well as *in vitro* in primary and continuous cell cultures are also described. Additionally, review examines works in which biocomposite materials based on chitosan with collagen and gelatin were used for bone and cartilage tissue regeneration. Described studies of composite biomaterials' influence on bone and cartilage regeneration were performed, mostly, *in vitro*, however some works were performed in animal models. In conclusion comparative evaluation of chitosan biocomposites usage is given.

Keywords: chitosan, collagen, gelatin, albumin, firbin, scaffold, regenerative medicine

Травмы являются одной из ведущих причин гибели от неестественных причин. Существенную роль в патологии травм играют повреждения кожи и органов опорно-двигательного аппарата, поэтому ученые ищут различные средства восстановления структурной и функциональной целостности их тканей. Одно из перспективных решений данной проблемы – создание тканеинженерных каркасов для регенерации костной и хрящевой ткани, а также биоразлагаемых раневых покрытий. Для создания таких продуктов зачастую используется хитозан из-за его антибактериальных и физико-химических свойств. Хитозан заинтересовал ученых еще с XIX в. Хитин был открыт в 1811 г. Н. Brasconnot и А. Odier, а хитозан – в 1959 г., спустя 48 лет, С. Rouget. Биологическая активность хитозана недостаточна

для некоторых случаев биомедицинского применения, поэтому в настоящее время изучаются композитные материалы на основе хитозана и биополимеров, когда к хитозановой основе добавляются различные добавки. Одной из таких добавок является коллаген или его производные, в частности желатин. Коллаген – это белок, который составляет основу соединительной ткани и придает композитным материалам прочность и эластичность. Также активно изучаются материалы на основе хитозана с фибрином и альбумином, которые повышают биосовместимость композитов.

Цель работы – описать состояние исследований влияния функционализации коллагеном и его производными (желатином), а также фибрином и альбумином на свойства хитозановых каркасов и раневых покрытий.

*Раневые покрытия на основе
компози́тов хитозана
с коллагеном и желати́ном*

Одним из самых распространенных биополимеров, вводимых в продукты на основе хитозана, является коллаген. Достоинства коллагена, такие как биосовместимость, доступность и простота получения, обуславливают значительную широту его применения.

Хитозан-коллагеновые продукты могут быть использованы как каркасы для тканевой инженерии кожи. Так, известны повязки, а также пористые губки и мембраны, полученные лиофильным высушиванием [1–3]. Кроме того, рядом авторов путем электроспиннинга были получены волокнистые скаффолды [4–6]. Подобные продукты могут быть функционализированы различными соединениями для достижения противомикробного или ранозаживляющего эффекта [2, 4, 6]. Хитозан-коллагеновые продукты повышают адгезию и пролиферацию первичных и перевиваемых линий фибробластов. Также было продемонстрировано повышение секреции цитокинов фибробластами на композитных хитозан-коллагеновых губках [3]. Ряд авторов также проводил исследования хитозан-коллагеновых каркасов *ex vivo* и *in vivo*, в ходе которых была выявлена высокая степень неоваскуляризации формирующихся на каркасе тканей, а также ускорение эпителизации раны [1, 4, 5]. Помимо повышенной эпителизации, в моделях ран было также продемонстрировано увеличение скорости пролиферации и повышение клеточной адгезии кератиноцитов *in vitro* [2, 7, 8].

Также многие коллективы исследуют желатин-хитозановые раневые покрытия, поскольку желатин является широкодоступной и дешевой в получении частично гидролизованной формой коллагена [9, 10].

В работе Алехина и Гаенко было продемонстрировано, что обработка культурального пластика хитозаном и желатин-хитозановым композитом повышала адгезию эмбриональных фибробластов мыши 3T3-J2 по сравнению с контролем. При этом в первые сутки наблюдалась тенденция к более быстрой адгезии клеток на поверхности, обработанной желатин-хитозановой смесью [11]. Использование смеси желатина и хитозана для обработки децеллюляризованных клеточных матриксов также повышает скорость адгезии фибробластов [12]. Добавление желатина вместо коллагена увеличивает коэффициент набухания и скорость биodeградации, но уменьшает проницаемость для воздуха и для паров

воды, что является важной характеристикой раневого покрытия. Исследования Mousavi и соавторов демонстрируют увеличение скорости пролиферации фибробластов как при добавлении коллагена, так и при добавлении желатина к хитозановому гелю. При этом использование желатина повышало пролиферацию в большей степени, нежели добавление коллагена [13]. Ferreira и соавт. методом электроспиннинга получали желатин-хитозановые волокна с добавлением экстракта *Undaria pinnatifida*, что приводило к усилению антимикробной активности, а также гидрофильности сеток, изготовленных из волокон. Данные сетки обеспечивали условия, достаточные для адгезии и пролиферации фибробластов человека, определенной по метаболической активности в резуриновой пробе. При этом добавление экстракта *U. pinnatifida* не приводило к снижению пролиферации фибробластов, однако была установлена обратная зависимость между пролиферацией клеток и плотностью сетки [14].

*Матри́ксы для регенера́ции костной
ткани на основе компози́тов хитозана
с коллагеном и желати́ном*

Хитозан-коллагеновые матриксы можно использовать также для культивирования мезенхимальных стромальных клеток (MSC). MSC, в свою очередь, используются в регенеративной медицине для инженерии костной ткани. Так, известны мембраны, губки, нановолокна и микрочастицы на основе хитозан-коллагена с добавлением дополнительных компонентов. К таким добавкам относятся обогащенная тромбоцитами плазма (тромбоцитарный концентрат, PRP), диоксид титана, частицы кремния. Подобные материалы повышали жизнеспособность MSC и стимулировали остеогенную дифференциацию, что было показано путем измерения активности щелочной фосфатазы, а также анализа экспрессии генов RUNX-2, COL-I, ОС и VEGF методом qPCR [15]. Кроме того, была продемонстрирована повышенная адгезия MSC к мембране из хитозан-коллагена с добавлением гидроксиапатита [16].

Кроме того, были разработаны плотные гибридные и фотополимеризуемые гидрогели, на основе коллагена и хитозана. Коллаген-хитозановые гели улучшают адгезию, миграцию, пролиферацию и остеогенную дифференцировку стромальных клеток костного мозга мышей, а также жизнеспособность клеток MC3T3-E1 [17]. Аналогичные данные были также получены для лиофильно высушенных коллаген-хитозановых губок с добавлением нано-

гидроксипатита и гиалуроновой кислоты [18]. Каркасы на основе коллаген-хитозана и биоактивного стекла значительно повышают пролиферацию и дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (BMSC). Также они могут стимулировать экспрессию транскрипционного фактора Runx2, активируемого киназой Erk1/2. Этот сигнальный путь является одним из главных путей в дифференцировке остеобластов [19]. Кроме того, было установлено, что композитные скаффолды из хитозана-коллагена с добавлением фиброина шелка являются биологически совместимыми с остеобластоподобными клетками MG-63 [20].

Вместо коллагена в тканевой инженерии кости также используется желатин [21]. Желатин и коллаген разделяют многие биологические свойства, и различия в эффективности их применения являлись и являются направлением многочисленных исследований [22]. Одним из недостатков желатина является его переменная скорость биодеградации, зависящая от способа получения, а также повышенная по сравнению с коллагеном водорастворимость в условиях организма. Для решения этой проблемы были предложены различные способы дальнейшей модификации смесей хитозана и желатина, такие как перекрестная сшивка молекул этих полимеров [23]. Так, известны способы сшивания хитозан-желатиновых каркасов с использованием глутарового альдегида, генипина и глицерола. Полученные продукты обладают улучшенными механическими свойствами и не проявляют цитотоксичности по отношению к клеткам MG-63 [20]. Georgopoulou и соавт. сравнивали сшивание молекул глутаровым альдегидом и генипином. При сшивании глутаровым альдегидом выживаемость и пролиферация, а также адгезия и инфильтрация преостеобластов MC3T3-E1 были выше, чем при сшивании генипином [24]. Альтернативным способом поперечной сшивки молекул желатина является обработка ультрафиолетовым излучением [25].

Chi и соавт. указывают на недостаточную высокую эффективность желатин-хитозановых гелей и предлагают добавление PRF (тромбоцитарный фибрин). В проведенном ими исследовании лиофильно высушенные желатин-хитозановые каркасы лишь незначительно увеличивали пролиферацию и ускоряли адгезию мезенхимальных стромальных клеток костного мозга. При этом добавление PRF вызвало статистически достоверное повышение данных показателей [22].

Матрицы для регенерации хрящевой ткани на основе композитов хитозана с коллагеном и желатином

Одним из применений коллаген-хитозановых продуктов является регенерация хрящевой ткани. Так, Korpayev и соавт. предлагают создание каркаса, который моделирует нижний костный слой, промежуточный кальцифицированный хрящевой слой и верхний хрящевой слой. При этом костный слой был изготовлен путем лиофилизации из хитозана и коллагена I типа с добавлением наногидроксипатита. Промежуточный и верхний хрящевые слои представляли собой гели, полученные из хитозана и коллагена II типа, при этом в промежуточном слое также содержался наногидроксипатит. В полученном продукте преостеобласты MC3T3-E1 в слое кости и клетки ATDC5, находящиеся в остальных слоях, показали высокую жизнеспособность в МТТ-тесте и по содержанию ДНК. Кроме того, анализ экспрессии генов путем RT-qPCR показал, что в клетках MC3T3-E1 возросла экспрессия щелочной фосфатазы и собственного коллагена I типа, а в клетках ATDC5 – собственного коллагена II типа [26].

Многие авторы предлагают создание гелей и пористых скаффолдов для регенерации хрящевой ткани из коллагена и хитозана. Известны гели, функционализированные наночастицами биоактивного стекла, TGF- β 1, а также коллагеном II типа и хондроитинсульфатом [27–29]. В первом случае армирование наночастицами увеличивало жесткость и не вызывало токсической реакции. Во втором случае добавление TGF- β 1 способствовало клеточной агрегации и хондрогенной дифференцировке инкапсулированных клеток. Добавление хондроитинсульфата и коллагена II типа в хитозановый матрикс значительно усиливало клеточную пролиферацию и синтез гликозаминогликанов. Также были получены биоразлагаемые пористые скаффолды из сшитого генипином коллагена и хитозана. При посеве на данные каркасы хондроцитов кролика было достигнуто увеличение пролиферации клеток в МТТ-тесте [30].

Для регенерации хрящевой ткани возможно использовать не только коллаген-хитозановые, но и желатин-хитозановые композиты [31]. Так Shu Wen Whu и соавторы предлагают создание каркаса из желатин-хитозана, сшитого карбодиимидом. Исследование показало, что полученный продукт, засеянный хондроцитами, способствовал регенерации дефекта суставного хряща кроликов [32].

*Матрицы для регенерации костной
ткани на основе композитов хитозана
с фибрином и альбумином*

Фибрин активно применяется в регенеративной медицине. Поэтому он нашел свое применение и как добавка к хитозану. Хитозан-фибриновые изделия применяются для создания раневых покрытий [33]. Хитозан без добавления фибрина проявляет достаточную антибактериальную активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий, а добавление фибрина улучшает биосовместимость и дополнительно увеличивает антибактериальный эффект [34].

Еще одним направлением применения хитозан-фибриновых биокомпозитов является регенерация костной ткани [35, 36]. Так, Zhang и соавт. предлагают создание трехслойного композитного каркаса. Первый слой изготовлен из гидрогеля на основе хитозана, поли- γ -глутаминовой кислоты и гидроксиапатита путем лиофилизации для обеспечения osteoconductivity. Второй слой состоит из богатого тромбоцитами фибрина и является источником факторов роста, способствующих osteoinduction. Третий слой включает в себя нановолоконную пленку, изготовленную из поликапролактона и желатина методом электропрядения, и действует как барьер, предотвращающий миграцию в каркас клеток из окружающих соединительных тканей. Полученный композит вводился в дефект кости поэтапно. Данные каркасы стимулировали пролиферацию клеток 3T3 и активность щелочной фосфатазы в клетках пульпы зуба человека (HDPSC) [37].

Несмотря на то, что в тканевой инженерии кости активно используются отдельно биокомпозитные матрицы на основе хитозана с фибрином, а также отдельно – матрицы на основе хитозана с коллагеном или желатином, существует крайне мало исследований, посвященных применению матриц, включающих одновременно хитозан, фибрин и коллаген/желатин [38]. Учитывая успехи, достигнутые Ansarizadeh и соавт., изучение композиций с подобным составом может оказаться ключом к созданию биологически активных матриц с регулируемой физическими свойствами [39].

Хитозан-фибриновые биокомпозиты нашли широкое применение в терапии патологий опорно-двигательного аппарата, включая восстановление хрящевой ткани. Следует, однако, отметить малое количество исследований, посвященных тематике восстановления хряща.

Помимо этого, хитозан-фибриновые биокомпозиты используются в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии [40]. Так,

Sarkar и соавт. указывают, что гидрогель из хитозана показывает лучший кровоостанавливающий эффект, нежели гель фибрина богатого тромбоцитами, однако фибриновый гель обладает преимуществом при заживлении ран [41]. Ducret и соавт. утверждают, что фибриновый гель и хитозан-фибриновый гель обладают одинаково низкой токсичностью в отношении стромальных клеток пульпы зуба (DP-MSC). При этом хитозан-фибриновый гель обладает более сильным антибактериальным действием [42]. Также Renard и соавт. подтверждают, что жизнеспособность популяции клеток пульпы зуба в фибриновом геле аналогична жизнеспособности в хитозан-фибриновом геле [43]. Приведенные данные указывают на целесообразность создания композитов из хитозана и фибрина, объединяя положительные характеристики данных веществ.

Альбумин является самым распространенным белком в плазме крови и обеспечивает высокую биосовместимость биокомпозитных материалов. Также химическая структура и конформация альбумина позволяет ему связываться со многими лекарственными веществами, поэтому он является отличным носителем лекарственных средств. Из-за своих свойств альбумин активно применяется совместно с хитозаном в регенеративной медицине [44].

Также хитозан совместно с альбумином применяется для регенерации костной ткани [45]. Так, Lin и соавт. предлагают создание каркаса из нановолокна, содержащего наночастицы бычьего сывороточного альбумина, стабилизированного хитозаном, для доставки абалопаратида и аспирина. Полученный каркас продемонстрировал высокую пролиферацию и скорость адгезии клеток MC3T3-E1. Также каркас способствовал дифференцировке остеобластов. Все это указывает на то, что такие каркасы могут использоваться для регенерации костной ткани [46].

Заключение

Исследователи активно разрабатывают полимерные композиции, которые могли бы улучшать свойства хитозана. Так, ведется множество исследований в области добавления в хитозановые каркасы коллагена или желатина. Добавление коллагена улучшает пролиферацию и адгезию фибробластов, ускоряет эпителизацию ран и пролиферацию кератиноцитов. В свою очередь, добавление желатина повышает адгезию эмбриональных фибробластов мыши 3T3-J2, также увеличивает пролиферацию хондроцитов. Добавление желатина увеличивает коэффициент набухания и скорость

биодegradации, но уменьшается проницаемость для воздуха и для паров воды. Такие свойства желатина делают его актуальным при добавлении его в хитозановые скаффолды для регенерации хрящевой и костной ткани. При этом для раневых покрытий имеет преимущество добавление коллагена, так как желатин ухудшает проницаемость материала, что оказывает негативное влияние на заживление раны.

Биодegradируемые матриксы на основе хитозана с добавлением различных биополимеров являются перспективным объектом исследований в области регенеративной медицины, для регенерации костной и хрящевой ткани.

Работа выполнена в рамках гранта Губернатора Алтайского края в форме субсидий для разработки качественно новых технологий, создания инновационных продуктов и услуг в сферах переработки и производства пищевых продуктов, фармацевтического производства и биотехнологий в соответствии с п. 4 ст. 78.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации по теме «Разработка технологии получения биологически активного культурально-клеточного матрикса» (соглашение № 5 от 12 апреля 2022 года).

Партнер проекта – ООО «Диаэм».

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Zhang M.X., Zhao W.Y., Fang Q.Q., Wang X.F., Chen C.Y., Shi B.H., Zheng B., Wang S.J., Tan W.Q., Wu L.H. Effects of chitosan-collagen dressing on wound healing in vitro and in vivo assays. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*. 2021. Vol. 19. P. 2280800021989698. DOI: 10.1177/2280800021989698.
2. Wang F., Wang M., She Z., Fan K., Xu C., Chu B., Chen C., Shi S., Tan R. Collagen/chitosan based two-compartment and bi-functional dermal scaffolds for skin regeneration. *Materials Science and Engineering: C*. 2015. Vol. 52. P. 155–162. DOI: 10.1016/j.msec.2015.03.013.
3. Sun L.P., Wang S., Zhang Z.W., Wang X.Y., Zhang Q.Q. Biological evaluation of collagen–chitosan scaffolds for dermis tissue engineering. *Biomedical Materials*. 2009. Vol. 4. No. 5. P. 055008. DOI: 10.1088/1748-6041/4/5/055008.
4. Chen K.Y., Liao W.J., Kuo S.M., Tsai F.J., Chen Y.S., Huang C.Y., Yao C.H. Asymmetric chitosan membrane containing collagen I nanospheres for skin tissue engineering. *Biomacromolecules*. 2009. Vol. 10. No. 6. P. 1642–1649. DOI: 10.1021/bm900238b.
5. Sarkar S.D., Farrugia B.L., Dargaville T.R., Dhara S. Chitosan-collagen scaffolds with nano/microfibrous architecture for skin tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2013. Vol. 101. No. 12. P. 3482–3492. DOI: 10.1002/jbm.a.34660.
6. Jirofti N., Golandi M., Movaffagh J., Ahmadi F.S., Kalalnia F. Improvement of the wound-healing process by curcumin-loaded chitosan/collagen blend electrospun nanofibers: In vitro and in vivo studies. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2021. Vol. 7. No. 8. P. 3886–3897. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.1c00131.
7. Grabska-Zielińska S., Pin J.M., Kaczmarek-Szczepańska B., Olewnik-Kruszkowska E., Sionkowska A., Monteiro F.J., Steinbrink K., Kleszczyński K. Scaffolds Loaded with Dialdehyde Chitosan and Collagen – Their Physico-Chemical Properties and Biological Assessment. *Polymers*. 2022. Vol. 14. No. 9. P. 1818. DOI: 10.3390/polym14091818.
8. Ullah S., Zainol I., Idrus R.H. Incorporation of zinc oxide nanoparticles into chitosan-collagen 3D porous scaffolds: Effect on morphology, mechanical properties and cytocompatibility of 3D porous scaffolds. *International journal of biological macromolecules*. 2017. Vol. 104. P. 1020–1029. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.080.
9. Fan L., Yang H., Yang J., Peng M., Hu J. Preparation and characterization of chitosan/gelatin/PVA hydrogel for wound dressings. *Carbohydrate polymers*. 2016. Vol. 146. P. 427–434. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.03.002.
10. Sakthiguru N., Sithique M.A. Fabrication of bioinspired chitosan/gelatin/allantoin biocomposite film for wound dressing application. *International journal of biological macromolecules*. 2020. Vol. 152. P. 873–883. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.289.
11. Алехин А.И., Гаенко Г.П. Сравнительное культивирование in vitro клеток фибробластов мышинных эмбрионов линии 3T3 Swiss J2 на модифицированных матрицах хитозана // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2016. Т. 161. № 3. С. 391–393.
12. Xu J., Fang H., Zheng S., Li L., Jiao Z., Wang H., Nie Y., Liu T., Song K. A biological functional hybrid scaffold based on decellularized extracellular matrix/gelatin/chitosan with high biocompatibility and antibacterial activity for skin tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021. Vol. 187. P. 840–849. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.07.162.
13. Mousavi S., Khoshfetrat A.B., Khatami N., Ahmadian M., Rahbarghazi R. Comparative study of collagen and gelatin in chitosan-based hydrogels for effective wound dressing: Physical properties and fibroblastic cell behavior. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019. Vol. 518. No. 4. P. 625–631. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.08.102.
14. Ferreira C.A.M., Januário A.P., Félix R., Alves N., Lemos M.F.L., Dias J.R. Multifunctional gelatin/chitosan electrospun wound dressing doped with Undaria pinnatifida phlorotannin-enriched extract for skin regeneration. *Pharmaceutics*. 2021. Vol. 13. No. 12. P. 2152. DOI: 10.3390/pharmaceutics13122152.
15. Ashraf R., Sofi H.S., Sheikh F.A. Methodology Involved in the Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells on Chitosan – Collagen Nanofibers Incorporated with Titanium Dioxide Nanoparticles. *Stem Cell Nanotechnology. Humana, New York, NY*, 2019. P. 85–94. DOI: 10.1007/7651_2019_257.
16. Kafi M.A., Aktar M.K., Phanny Y., Todo M. Adhesion, proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cell on chitosan/collagen composite scaffold. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2019. Vol. 30. No. 12. P. 1–12. DOI: 10.1007/s10856-019-6341-8.
17. Arakawa C., Ng R., Tan S., Kim S., Wu B., Lee M. Photopolymerizable chitosan – collagen hydrogels for bone tissue engineering. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2017. Vol. 11. No. 1. P. 164–174. DOI: 10.1002/term.1896.
18. Li M., Jia W., Zhang X., Weng H., Gu G., Chen Z. Hyaluronic acid oligosaccharides modified mineralized collagen and chitosan with enhanced osteoinductive properties for bone tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*. 2021. Vol. 260. P. 117780. DOI: 10.1016/j.carbpol.2021.117780.
19. Gao K., Wang X., Wang Z., He L., Lin J., Bai Z., Jiang K., Huang S., Zheng W., Liu L. Design of novel functionalized collagen-chitosan-MBG scaffolds for enhancing osteoblast differentiation in BMSCs. *Biomedical Materials*. 2021. Vol. 16. No. 6. P. 065028. DOI: 10.1088/1748-605X/ac3146.

20. Grabska-Zielińska S., Sionkowska A., Coelho C.C., Monteiro F.J. Silk fibroin/collagen/chitosan scaffolds cross-linked by a glyoxal solution as biomaterials toward bone tissue regeneration. *Materials*. 2020. Vol. 13. No. 15. P. 3433. DOI: 10.3390/ma13153433.
21. Oryan A., Alidadi S., Bigham-Sadeh A., Moshiri A. Comparative study on the role of gelatin, chitosan and their combination as tissue engineered scaffolds on healing and regeneration of critical sized bone defects: an in vivo study. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2016. Vol. 27. No. 10. P. 1–14. DOI: 10.1007/s10856-016-5766-6.
22. Chi H., Song X., Song C., Zhao W., Chen G., Jiang A., Wang X., Yu T., Zheng L., Yan J. Chitosan-gelatin scaffolds incorporating decellularized platelet-rich fibrin promote bone regeneration. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2019. Vol. 5. No. 10. P. 5305–5315. DOI: 10.1021/acsbomaterials.9b00788.
23. Ranganathan S., Balagangadharan K., Selvamurugan N. Chitosan and gelatin-based electrospun fibers for bone tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*. 2019. Vol. 133. P. 354–364. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.04.115.
24. Georgopoulou A., Papadogiannis F., Batsali A., Marakis J., Alpantaki K., Eliopoulos A.G., Pontikoglou C., Chatzinikolaidou M. Chitosan/gelatin scaffolds support bone regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2018. Vol. 29. No. 5. P. 1–13. DOI: 10.1007/s10856-018-6064-2.
25. Olguin Y., Acuna-Mendoza S., Otero C., Acevedo C.A., Covarrubias C. Osteoconductive Effect of a Nanocomposite Membrane Treated with UV Radiation. *Polymers*. 2022. Vol. 14. No. 2. P. 289. DOI: 10.3390/polym14020289.
26. Korpayev S., Kaygusuz G., Şen M., Orhan K., Oto Ç., Karakeçili A. Chitosan/collagen based biomimetic osteochondral tissue constructs: a growth factor-free approach. *International journal of biological macromolecules*. 2020. Vol. 156. P. 681–690. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.109.
27. Moreira C.D., Carvalho S.M., Mansur H.S., Pereira M.M. Thermogelling chitosan–collagen–bioactive glass nanoparticle hybrids as potential injectable systems for tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*. 2016. Vol. 58. P. 1207–1216. DOI: 10.1016/j.msec.2015.09.075.
28. Kim J., Lin B., Kim S., Choi B., Evseenko D., Lee M. TGF- β 1 conjugated chitosan collagen hydrogels induce chondrogenic differentiation of human synovium-derived stem cells. *Journal of biological engineering*. 2015. Vol. 9. No. 1. P. 1–11. DOI: 10.1186/1754-1611-9-1.
29. Choi B., Kim S., Lin B., Wu B.M., Lee M. Cartilaginous extracellular matrix-modified chitosan hydrogels for cartilage tissue engineering. *ACS applied materials & interfaces*. 2014. Vol. 6. No. 22. P. 20110–20121. DOI: 10.1021/am505723k.
30. Yan L.P., Wang Y.J., Ren L., Wu G., Caridade S.G., Fan J.B., Wang L.Y., Ji P.H., Oliveira J.M., Oliveira J.T., Mano J.F., Reis R.L. Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2010. Vol. 95. No. 2. P. 465–475. DOI: 10.1002/jbm.a.32869.
31. Sartore L., Manferdini C., Saleh Y., Dey K., Gabusi E., Ramorino G., Zini N., Almici C., Re F., Russo D., Mariani E., Lisignoli G. Polysaccharides on gelatin-based hydrogels differently affect chondrogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Materials Science and Engineering: C*. 2021. Vol. 126. P. 112175. DOI: 10.1016/j.msec.2021.112175.
32. Whu S.W., Hung K.C., Hsieh K.H., Chen C.H., Tsai C.L., Hsu S.H. In vitro and in vivo evaluation of chitosan – gelatin scaffolds for cartilage tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*. 2013. Vol. 33. No. 5. P. 2855–2863. DOI: 10.1016/j.msec.2013.03.003.
33. Vedakumari W.S., Ayaz N., Karthick A.S., Senthil R., Sastry T.P. Quercetin impregnated chitosan – fibrin composite scaffolds as potential wound dressing materials Fabrication, characterization and in vivo analysis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017. Vol. 97. P. 106–112. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.11.012.
34. Vedakumari W.S., Prabu P., Sastry T.P. Chitosan-fibrin nanocomposites as drug delivering and wound healing materials. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2015. Vol. 11. No. 4. P. 657–667. DOI: 10.1166/jbn.2015.1948.
35. Chi H., Song X., Song C., Zhao W., Chen G., Jiang A., Wang X., Yu T., Zheng L., Yan J. Chitosan-gelatin scaffolds incorporating decellularized platelet-rich fibrin promote bone regeneration. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2019. Vol. 5. No. 10. P. 5305–5315. DOI: 10.1021/acsbomaterials.9b00788.
36. Sathiyavimal S., Vasantharaj S., Lewis Oscar F., Pugazhendhi A., Subashkumar R. Biosynthesis and characterization of hydroxyapatite and its composite (hydroxyapatite-gelatin-chitosan-fibrin-bone ash) for bone tissue engineering applications. *International journal of biological macromolecules*. 2019. Vol. 129. P. 844–852. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.058.
37. Zhang L., Dong Y., Xue Y., Shi J., Zhang X., Liu Y., Midgley A.C., Wang S. Multifunctional triple-layered composite scaffolds combining platelet-rich fibrin promote bone regeneration. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2019. Vol. 5. No. 12. P. 6691–6702. DOI: 10.1021/acsbomaterials.9b01022.
38. Oryan A., Alidadi S., Bigham-Sadeh A., Moshiri A. Effectiveness of tissue engineered based platelet gel embedded chitosan scaffold on experimentally induced critical sized segmental bone defect model in rat. *Injury*. 2017. Vol. 48. No. 7. P. 1466–1474. DOI: 10.1016/j.injury.2017.04.044.
39. Ansarizadeh M., Mashayekhan S., Saadatmand M. Fabrication, modeling and optimization of lyophilized advanced platelet rich fibrin in combination with collagen-chitosan as a guided bone regeneration membrane. *International journal of biological macromolecules*. 2019. Vol. 125. P. 383–391. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.078.
40. Sadeghinia A., Davaran S., Salehi R., Jamalpoor Z. Nano-hydroxy apatite/chitosan/gelatin scaffolds enriched by a combination of platelet-rich plasma and fibrin glue enhance proliferation and differentiation of seeded human dental pulp stem cells. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 2019. Vol. 109. P. 1924–1931. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.11.072.
41. Sarkar S., Prashanth N.T., Shobha E.S., Rangan V., & Nikhila G. Efficacy of platelet rich fibrin versus chitosan as a hemostatic agent following dental extraction in patients on antiplatelet therapy. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. 2019. Vol. 9. No. 4. P. 336–339. DOI: 10.1016/j.jobcr.2019.07.003.
42. Ducret M., Montebault A., Josse J., Pasdeloup M., Celle A., Benchrih R., Mallein-Gerin F., Alliot-Licht B., David L., & Farges J.C. Design and characterization of a chitosan-enriched fibrin hydrogel for human dental pulp regeneration. *Dental Materials*. 2019. Vol. 35. No. 4. P. 523–533. DOI: 10.1016/j.dental.2019.01.018.
43. Renard E., Amiaud J., Delbos L., Charrier C., Montebault A., Ducret M., Farges J.C., David L., Alliot-Licht B., Gaudin A. Dental pulp inflammatory/immune response to a chitosan-enriched fibrin hydrogel in the pulpotomized rat incisor. *Eur Cell Mater*. 2020. Vol. 40. P. 74–87. DOI: 10.22203/eCM.v040a05.
44. Niaz T., Ihsan A., Abbasi R., Shabbir S., Noor T., Imran M. Chitosan-albumin based core shell-corona nano-antimicrobials to eradicate resistant gastric pathogen. *International journal of biological macromolecules*. 2019. Vol. 138. P. 1006–1018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.165.
45. Han L., Wang M., Sun H., Li P., Wang K., Ren F., Lu X. Porous titanium scaffolds with self-assembled micro/nano-hierarchical structure for dual functions of bone regeneration and anti-infection. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2017. Vol. 105. No. 12. P. 3482–3492. DOI: 10.1002/jbm.a.36178.
46. Lin P., Zhang W., Chen D., Yang Y., Sun T., Chen H., & Zhang J. Electrospun nanofibers containing chitosan-stabilized bovine serum albumin nanoparticles for bone regeneration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2022. Vol. 217. P. 112680. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2022.112680.