

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова

биологический факультет

на правах рукописи

ЖАРКОВА ИРИНА ИГОРЕВНА

МАТРИКСЫ ИЗ БИОСИНТЕТИЧЕСКОГО СОПОЛИМЕРА ПОЛИ-3-
ОКСИБУТИРАТА С ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ ДЛЯ ИНЖЕНЕРИИ
КОСТНОЙ ТКАНИ

03.01.06 — биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н. А.П. Бонарцев

Москва — 2016

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ 5

ГЛАВА 1. Литературный обзор 9

1.1. Биоматериалы 9

1.1.1. История применения биоматериалов. Биосовместимость. Типы материалов 9

1.1.2. Металлы 15

1.1.3. Керамика 17

1.1.4. Натуральные полимерные материалы 21

1.1.5. Полимерные материалы искусственного происхождения 25

1.2. Полиоксибутират 28

1.2.1. Строение и синтез ПОБ 30

1.2.2. Синтез сополимеров ПОБ 32

1.2.3. Синтез ПОБ-ПЭГ 34

1.2.4. Дегградация ПОБ 35

1.3. Мезенхимальные стволовые клетки 37

1.4. Матриксy для регенерации костной ткани 41

1.4.1. Требования к материалам для инженерии костной ткани 41

1.4.2. Способы изготовления матриксов для тканевой инженерии 45

1.4.3. Модификации методов в комбинации с другими техниками и материалами 51

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 54

2.1. Условия синтеза ПОБ и его сополимеров 54

2.2. Исследования материалов 55

2.2.1. Определение молекулярной массы полимера 55

2.2.2. Ядерно-магнитный резонанс 56

2.2.3. Изготовление полимерных пленок 57

2.2.4. Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) 58

2.2.5. Измерение контактных углов 58

2.2.6. Водопоглощение 59

2.2.7. Атомно-силовая микроскопия	59
2.2.8. Механические свойства полимерных материалов	61
2.2.9. Биосовместимость <i>in vitro</i>	61
2.3. Получение и первичные исследования матриксов	63
2.3.1. Метод газообразования с использованием бикарбоната аммония ((NH ₄) ₂ CO ₃)	63
2.3.2. Метод выщелачивания на пористом 3D шаблоне с использованием сахарозы (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	64
2.3.3. Первичные исследования	64
2.3.3.1. Пористость и размер пор	64
2.3.3.2. Проверка на остаточные соли	65
2.3.3.3. Рост клеток на матриксах	65
2.4. Плоские пористые матриксы, полученные методом выщелачивания с использованием бикарбоната аммония	65
2.4.1. Пористость и размер пор	66
2.4.2. Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК)	66
2.4.3. Адсорбция белков	66
2.4.4. Биосовместимость	66
2.4.4.1. Получение мезенхимальных стволовых клеток МСК	66
2.4.4.2. Фенотипирование МСК мыши методом проточной цитометрии	67
2.4.4.3. Цитотоксичность и поддержание роста МСК	67
2.4.4.4. Сканирующая электронная микроскопия	68
2.4.4.5. Конфокальная микроскопия	68
2.4.5. Остеонаправленная дифференцировка МСК	68
2.4.5.1. Окраска ализариновым красным	69
2.4.5.2. Щелочная фосфатаза	69
2.4.6. Имплантация <i>in vivo</i> и тканевая реакция на мелких лабораторных животных	70

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Синтез полимера ПОБ и его сополимеров	72
--	----

3.2. Исследование физико-химических свойств полимерных материалов	77
3.2.1. Физико-термические свойства полимеров	78
3.2.2. Гидрологические свойства сополимеров	80
3.2.3. Исследование ультратонких пленок из сополимеров	81
3.2.4. Механические свойства полимерных материалов	84
3.2.5. Биосовместимость полученных полимеров <i>in vitro</i>	86
3.3. Получение и первичные исследования матриксов	90
3.3.1. Полученные изделия и их структура	90
3.3.2. Проверка на остаточные соли	91
3.3.3. Биосовместимость <i>in vitro</i>	92
3.4. Плоские пористые матриксы, полученные методом выщелачивания с использованием бикарбоната аммония	94
3.4.1. Структура плоских матриксов из различных материалов	94
3.4.2. Термические свойства плоских матриксов	97
3.4.3. Адсорбция белка	98
3.4.4. Мезенхимальные стволовые клетки	101
3.4.5. Биосовместимость пористых матриксов	102
3.4.6. Направленная остеогенная дифференцировка	107
3.4.6.1. Окраска ализариновым красным	108
3.4.6.2. Сканирующая электронная микроскопия	108
3.4.6.3. Щелочная фосфатаза	110
3.4.6.4. Экспрессия поверхностных маркеров МСК	111
3.4.7. Имплантация <i>in vivo</i> и тканевая реакция на мелких лабораторных животных	115
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	120
ВЫВОДЫ	122
БЛАГОДАРНОСТИ	124
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	125

ВВЕДЕНИЕ

За последние годы тканевая инженерия стала одним из перспективных и важных направлений в экспериментальной биомедицине. Одной из наиболее важных областей исследований в тканевой инженерии является заместительная терапия. Клетки могут быть трансплантированы в организм в двух формах - в виде суспензии или прикрепленными к какому-либо твердому носителю. Причем второй тип конструкции является более предпочтительным для терапии твердых соединительных тканей. Широкое применение в данной области медицины получают полимерные материалы и их подбор для реализации тех или иных биологических задач является актуальным.

Наиболее широко применяемыми в клинической медицинской практике являются полимерные материалы синтетического происхождения, такие как полимолочная и полигликолевая кислоты, поликапролактон и другие. Из преимуществ этих материалов можно выделить достаточно доступное сырье для производства, возможность производства в промышленных масштабах, низкую токсичность. Но данные материалы имеют некоторые недостатки, основными из которых являются химический способ производства, который приводит к остаточному содержанию неорганических примесей в процессе производства, достаточно быстрая биодegradация и, связанное с этим локальное закисление среды, вызывающее местное хроническое воспаление. В связи с этим полимерные материалы микробиологического происхождения, такие как полиоксиалканоаты постепенно выходят на первый план и их изучение становится более востребовано.

Наряду с проблемой выбора самого материала, не менее актуальной является форма полимерного конструкта. Что касается твердой соединительной ткани, то здесь наиболее приоритетными свойствами имплантата являются прочность и пористость. Но, к сожалению, эти

характеристики являются взаимоисключающими, т.е. логично, что чем более пористый матрикс, тем он менее прочный.

Биоматериалы и тканевую инженерию с их использованием можно назвать одними из наиболее широко распространенных направлений изучения как на прикладном, так и на фундаментальном уровне.

Одной из наиболее острых проблем биоматериалов и изделий, получаемых на их основе, является неудовлетворительное взаимодействие поверхности имплантата с окружающими тканями. Другими словами, повышение свойств биосовместимости материалов является первоочередной задачей исследователей.

Чаще всего стратегией при создании какого-либо медицинского изделия является выбор материала- основы, удовлетворяющий наибольшему количеству параметров исходя из предназначения изделия. Остальные свойства обычно улучшают с помощью различных добавок. Одной из стратегий улучшения свойств биополимеров для их использования в тканевой инженерии является создание новых биоматериалов из сополимеров или композитов полимеров, различающихся по своим свойствам.

Наиболее широко распространенным представителем этого семейства полимеров является поли-3-оксибутират. В нашей лаборатории его получают микробиологическим биосинтезом с использованием штамма-продуцента *Azotobacter croococcum* 7Б. Основными свойствами гомополимера ПОБ являются биосовместимость, биodeградация, то, что ПОБ является твердым достаточно прочным веществом и гидрофобность. Одним из популярных методов модификации гидрофобности является использование полиэтиленгликоля (ПЭГ). Он биосовместим, используется в фармацевтике и медицине и является вязким, пластичным материалом с высокой гидрофильностью.

В данном исследовании проводилась работа по сравнению свойств материалов, а также изделий на основе ПОБ и ПЭГ. В одном случае это был

материал, полученный микробиологическим синтезом, и представляющий собой сополимер поли-3-оксибутират-со-полиэтиленгликоль (ПОБ-ПЭГ), а в другом случае это был композитный материал, полученный механическим смешиванием ПОБ и ПЭГ, и, конечно, в качестве контроля использовался чистый гомополимер ПОБ.

Таким образом, **целью** данной работы было:

Разработка пористых полимерных конструкций на основе сополимера поли-3-оксибутирата-со-полиэтиленгликоля для инженерии костной ткани.

В соответствии с целью исследования были сформулированы следующие задачи:

- Биосинтез сополимера поли-3-оксибутирата с полиэтиленгликолем и изучение его физико-химических свойств; Разработка методики создания пористых матриц из полученного полимера
- Изучение физико-химических свойств и биосовместимости полученных матриц
- Исследование роста и дифференцировки МСК в остеогенном направлении *in vitro* на полученных матрицах
- Исследование остеокондуктивных способностей матриц в условиях *in vivo*

Научная новизна. В ходе данной работы из нескольких сополимерных материалов, впервые полученных с использованием штамма *Azotobacter chroococcum* 7В, был выбран ПОБ-ПЭГ как обладающий максимальными параметрами гидрофильности. Впервые на основе этого сополимера была разработана методика получения плоских пористых конструкций со средним диаметром пор 100 мкм для тканевой инженерии. Впервые была показана способность матриц из сополимера ПОБ-ПЭГ влиять на степень дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток, а также продемонстрирована биосовместимость полученных матриц с костной тканью и их остеокондуктивные свойства

Практическая значимость работы. Полученные полимерные конструкции из биосинтетического ПОБ-ПЭГ обладают хорошей биосовместимостью, поддерживают рост мезенхимальных стволовых клеток, а также показывают высокую совместимость с костной тканью в условиях *in vivo* и остеокондуктивные свойства. На основании этих результатов, мы можем предложить возможное практическое использование данных конструкций в тканевой инженерии, и, в частности, в инженерии костной ткани, с целью разработки новых медицинских изделий для челюстно-лицевой хирургии.

Апробация работы.

Основные положения диссертационной работы были доложены на Первой международной конференции "Неделя клеточных технологий " (Украина, Киев, май 2013), на Пятой Всероссийской научно-практической конференции "Стволовые клетки и регенеративная медицина" (Москва, ноябрь 2013), на Второй международной конференции по биоинформатике и биомедицинской инженерии (Испания, Гранада, апрель 2014), на Международной конференция Клеточные технологии на рубеже: Исследования и практика (Санкт-Петербург, апрель 2016), на одиннадцатом симпозиуме «Поликонденсация 2016» 9 Москва, сентябрь 2016.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.

1.1. Биоматериалы.

1.1.1. История применения биоматериалов. Биосовместимость.

Типы материалов.

Биоматериалами обычно называют синтетические и природные материалы, которые используются в контакте с биологическими системами. Интерес к этому предмету рос с каждым годом и почти за полвека его существования стал одним из ключевых в области хирургии, тканевой инженерии и имплантологии. Он включает в себя аспекты медицины, биологии, химии и материаловедения.

История протезирования и использования биоматериалов берет начало с древних времен. На рисунке 1 мы видим фотографию протеза, выполненного из дерева и обтянутого лоскутами кожи для фиксации. Данная находка датируется 1065-740 г. до н.э.[Nerlich A.G., 2000]

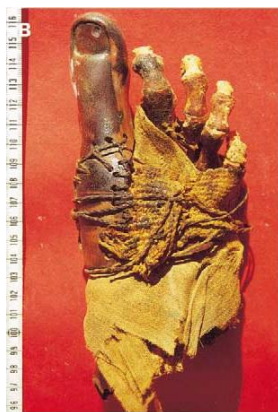


Рисунок 1.Протез 1065-740 г. до н.э.[Nerlich A.G., 2000]

Начало развития биоматериалов связано, прежде всего, с их использованием в кровеносно-сосудистой системе для закрытия поврежденных сосудов и остановки кровотечения. Природные и синтетические нити и волокна сих пор используются для восстановления раневых участков. Но с древнейших времен только коллагеновые материалы, такие как кетгут нашли в наше время большое распространение в качестве рассасывающихся швов, хотя множество других материалов было

опробовано за столь долгое время. Sushruta, индийский хирург, описывал рассасывающиеся швы, полученные из животных жил в 600 до н.э. В 1759 году хирург из Ньюкасла в Англии Ричард Ламберт писал о своем предложении коллеге Самюэлю Хэллоуэллу о способе закрытия сосудов;

Хэллоуэлл выполнил процедуру успешно, используя деревянный штифт и лигатуру для репарации плечевой артерии. В 1880-х годах для этих целей также использовались зажимы из слоновой кости и нити из шелка.

Первый рассасывающийся синтетический материал, поли (гликолевая кислота), был разработан американской компанией Cyanoamid в 1960-е годы; этот материал по-прежнему используется в качестве шовного и для изготовления матриц для тканевой инженерии. Полимеры используются в качестве биоматериалов в стоматологии более 100 лет.

Вулканизированный каучук впервые был применен в 1854, а в 1868 году был использован целлулоид (пластик из нитроцеллюлозы), а поли (метилметакрилат) используется с 1930 года как материал для зубных протезов, пломб и пр. Многие новые полимеры появились в 1930-х годах, в том числе полиамид, сложные полиэфиры, и полиэтилен. В 1947 году первым имплантированным синтетическим полимерным биоматериалом был, по-видимому, поли (метилметакрилат), который был использован в качестве протеза тазобедренного сустава. Полиэтилен и другие полимеры были использованы в качестве имплантатов в среднем ухе в начале 1950-х годов, показывая хорошие начальные результаты, но местное воспаление ограничило их использование. Также полимерные материалы применяли для изготовления катетеров.

Fritz Bleichroeder стал первым человеком, выполнившим катетеризацию - он вставил катетер в собственную бедренную артерию [Hamilton E.,2009]. Молодым врачом совершив первую катетеризацию сердца в 1929 году был Вернер Форсманн, который будучи 23-летним студентом - урологом, ввёл уретральный катетер через локтевую вену в сердце. Сообщается, что с этим катетером Форсманн поднялся по лестнице в

рентгеновский кабинет, где он документально запечатлел этот эксперимент, который, в конечном счете, принёс ему Нобелевскую премию [Altman L. K., 1987].

Хотя, биоматериалы, прежде всего, используются для изготовления предметов медицинского назначения, они также применяются, например, в молекулярной биологии при создании биочипов [Park J. K., 2002] или в ветеринарии, для контроля рождаемости крупного рогатого скота [Rathbone M. J.,1998].

В медицинских целях биоматериалы редко используются обособленно и чаще интегрированы в какие-либо медицинские устройства или имплантаты. На благоприятное поведение имплантируемого устройства влияют как материал, из которого оно сделано, так и конструкция самого устройства. Кроме того, биоматериал всегда должен рассматриваться в виде окончательно сфабрикованной, стерилизованной формы. Например, когда имплантат сердечного клапана из полиуретанового эластомера отливается из раствора, он может вызвать иную реакцию организма, чем когда он же изготавливается методом литья под давлением [Akutsu T., 1959].

Определение понятия "биоматериал", данное около 30 лет назад, но до сих пор применяемое экспертами в данной области звучит как

Биоматериал - это нежизнеспособный материал, используемый в медицинском изделии, предназначенный для взаимодействия с биологическими системами [Williams D. F., 1999].

Если убрать слово "медицинское", это определение охватывает более широкий спектр применения, описанный выше. Если убрать слово "нежизнеспособный", определение начинает нести еще более общий характер и может включать также многие тканеинженерные и гибридные конструкции, где используются живые клетки.

Область науки, занимающаяся изучением биоматериалов, включает их физические и биологические исследования, а также взаимодействие с окружающей средой. В настоящее время наиболее интенсивное развитие получают такие направления исследования биоматериалов как синтез, оптимизация их качеств, тестирование и исследования их взаимодействия с живым организмом.

Большинство биоматериалов вызывают стандартную неспецифичную биологическую реакцию. Значительное количество текущих исследований направлены на оптимизацию поверхности биоматериалов, для более быстрого и точного взаимодействия с белками и клетками, в зависимости от предназначения того или иного материала.

Важным определением, необходимым для более полного понимания цели (особенности и применения) науки о биоматериалах, является понятие "биосовместимость."

Биологическая совместимость- способность материала при конкретном применении выполнять свои функции, вызывая при этом адекватный ответ со стороны живого организма [Williams D. F.,1999].

Под " адекватным ответом "понимают отсутствие нарушений в процессе свертывания крови, отсутствие бактериальной контаминации, и нормальное заживление без осложнений. Примерами конкретных изделий могут служить мембрана для гемодиализа, мочевого катетер, протез тазобедренного сустава.

Это общее понятие биосовместимости был расширено в контексте "тканевой инженерии" в которой *in-vitro* и *in-vivo* патофизиологические процессы сопряжены с тщательным отбором клеток, материалов и подбором метаболических и биомеханических условий для восстановления функций тканей.

Таким образом, этими определениями и рассуждениями мы вводим параметры, которые отграничивают семейство биоматериалов от большинства материалов в материаловедении.

В таблице 1 представлены некоторые биоматериалы и области их применения.

Применение	Материал
Опорно-двигательная система -восстановление суставов (тазобедренный, коленный) -костная пластика при переломах -костный цемент -восстановление кости -искусственные сухожилия и связки -дентальный имплантат для зубной фиксации Сердечно-сосудистая система -протезирование сосудов -сердечные клапаны -катетеры Внутренние органы -искусственное сердце -восстановление кожи -искусственная почка -аппарат искусственного кровообращения Органы чувств -восстановление ушной улитки -искусственный хрусталик - контактные линзы -бандаж для роговицы	Титан, сплав Ti–Al–V, нержавеющая сталь, полиэтилен Нержавеющая сталь, сплав Co-Cr Полиметилметакрилат Гидроксиапатит Тефлон, дакрон Титан, алюминий, фосфат кальция Дакрон, тефлон, полиуретан Обработанная нативная ткань, нержавеющая сталь, карбон Тефлон, полиуретан, силоксановый каучук Полиуретан Силикон-коллагеновые композиты Целлюлоза, полиакрилонитрил Силоксановый каучук Платиновый электрод Полиметилметакрилат, силоксановый каучук, гидрогель Силиконакрилат, гидрогель Коллаген, гидрогель

Таблица 1. Некоторые биоматериалы и области их применения.

Биоматериалы можно разделить на четыре основных класса: полимерные материалы, металлы, керамика (включая углеволокно, стеклокерамику и стекло) и натуральные материалы (растительного и животного происхождения). Иногда два различных класса материалов объединяются в композиционный материал, например, кремниевая резина или углеродное волокно, армированное полимолочной кислотой. Такие композиты составляют пятый класс биоматериалов.

Со времен окончания второй мировой войны до начала 1960-х годов относительно небольшое число хирургов использовали коммерчески доступные полимеры и металлы для изготовления из них имплантатов и компонентов медицинских изделий, а также применяли их в клинической практике. Некоторые из этих изделий имели успех, но также имели место и довольно серьезные неудачи. Это подтолкнуло хирургов обратиться за содействием к ученым – физикам, биологам, материаловедам и инженерам, и так произошло образование новой междисциплинарной области «биоинженерия».

Ученые не только осознавали необходимость контролировать состав, чистоту, и физические свойства материалов, которые они использовали, но они также признавали необходимость разработки новых материалов с новыми свойствами. Это стимулировало получение и исследование многих новых материалов в 1970-х годах. Новые материалы разрабатывались специально для медицинского применения, например, биоразлагаемые полимеры и биологически активная керамика. Некоторые из них были получены из существующих материалов с использованием новых технологий, например, полиэфирные волокна в виде трубочек для использования в качестве сосудистых трансплантатов, или ацетат целлюлозы из которого изготавливают пучки полых волокон для использования в искусственной почке. Некоторые материалы были "заимствованы" из неожиданных источников, например, пиролитический углерод или сплавы титана, которые используются в авиационной и космической технике. Такие материалы подверглись некоторым изменениям, чтобы обеспечить особые биологические свойства, такие как, например, отсутствие эффекта повышения свертываемости крови при контакте.

Последнее время в области науки о биоматериалах повышается интерес к использованию естественных тканей и полимеров в комбинации с живыми клетками. Это особенно заметно в области тканевой инженерии, которая фокусируется на репарации или восстановлении тканей и органов.

1.1.2. Металлы

Металлические материалы – это неорганические вещества, которые редко используются в виде чистого элемента, а смешиваются с другими элементами и образуют сплав. Это, как правило, сочетания металлических элементов (железа, титана, алюминия, золота), которые могут также содержать небольшие количества неметаллических элементов (углерода, азота и кислорода).

В ортопедии широко используются три следующих класса металлов: нержавеющая сталь, сплавы кобальта-хрома (Co–Cr) и титановые сплавы (Таблица 2). Нержавеющая сталь 316L устойчива к коррозии в богатых солью жидкостях организма благодаря высокому содержанию хрома (17–20% по весу) и низкому содержанию углерода (менее 0,03%). Добавление молибдена (Mo) к сплаву улучшает устойчивость к питтинговой коррозии (ведущей к образованию язв, полостей в металле, начинающихся с его поверхности); никель добавляется для стабилизации аустенитической фазы железа при комнатной температуре и для усиления устойчивости к коррозии. Механические свойства 316L в значительной степени зависят от отжига или холодной обработки. Холоднообработанный (кованный) металл значительно прочнее. Хотя существуют менее дорогие металлы: нержавеющие стали, как правило, используются для временных имплантатов из-за чувствительности к локальной коррозии, где происходят концентрации напряжений и кислородное истощение, как это имеет место под винтами пластины, используемой для фиксации перелома.

В ортопедии используются два типа кобальтохромовых сплавов: один сплав для изготовления продукции посредством литья (Co–Cr–Mo: F75) и другой – кованых устройств (Co–Cr–W–Ni: F90) [Hench L.,2007].

Материал	Свойства	Применение
Нержавеющая сталь	Низкая стоимость изготовления	Хирургическая проволока, шпилька, пластина, винты, интрамедуллярные гвозди

Сплавы кобальта- хрома	Высокая стоимость, высокая плотность и модуль, трудны для изготовления	Хирургическая проволока, интрамедуллярные гвозди
Сплавы титана	Высокая стоимость, низкая плотность и модуль, хорошая костная интеграция	Хирургическая проволока, шпилька, пластина, винты, интрамедуллярные гвозди

Таблица 2. Основные металлические биоматериалы, используемые в тканевой инженерии.

Металлические биоматериалы широко используются в качестве имплантатов, подвергающихся сильной нагрузке и устройств для внутренней фиксации из-за их отличной механической прочности и устойчивости, например, ортопедические, стоматологические имплантаты, и даже сосудистые и внесосудистые стенты. Несмотря на прогресс в исследовании и разработке металлических имплантатов с хорошей весовой нагрузкой, фиксация имплантатов в живом организме остается проблемой.

Несоответствие между модулем упругости материала имплантата и кости, а также низкая биологическая активность материала, часто приводит к плохому контакту поверхностей между имплантатом и биологическими тканями [Jung H. D., 2015].

Поэтому все большее внимание получают исследования, направленные на 1) оптимизацию самой поверхности металла, а также 2) связывание определенных биомолекул с металлической поверхностью имплантата для достижения необходимого межфазного взаимодействия и нормальной реакции живых тканей.

Необходимо обратить внимание, что внутренние свойства материалов металлических имплантатов – такие как модуль упругости, предел текучести, или усталостная прочность - являются не единственным фактором, определяющим производительность и успех имплантата. Конечно, недостаточное внимание к свойствам материала может привести к неудаче. Тем не менее, даже с лучшим материалом, устройство может не правильно функционировать из-за неправильного использования имплантата, хирургической ошибки, или недостаточно точной конструкции имплантата [Carew E. O., 2004].

1.1.3. Керамика

Керамика – это твердые материалы, состоящие из неорганических, неметаллических веществ. Общей характеристикой всех керамических материалов является то, что во время своего изготовления или применения они подвергаются высокотемпературной обработке ($>500^{\circ}\text{C}$). Как правило, керамика – это оксид металла, борид, карбид или нитрид, смесь или соединение таких материалов, т.е. она включает анионы, играющие важную роль в их атомной структуре и свойствах. Главными характеристиками керамики являются ее высокая твердость, изолирующие свойства теплоты и электричества, устойчивость к теплоте и коррозии, а также хрупкость и ломкость без деформации.

Наиболее распространенными кристаллическими структурами в керамике являются следующие:

- 1) простые кубические, например CsCl, CsBr, CsI;
- 2) плотно упакованные кубические: это вариант гранецентрированной кубической структуры (f.c.c.), например CaO, MgO, FeO, BaO и т.д.;
- 3) плотно упакованные гексагональные, например Al_2O_3 , Fe_2O_3 , Cr_2O_3 и т.д.

Стеклокерамика представляет собой особый класс керамики. Это поликристаллические материалы, имеющие мелкие керамические кристаллиты (обычно размером < 1 мкм) в стеклянной кристаллической решетке. Они производятся посредством управляемой кристаллизации стекла с помощью соответствующей термообработки. Расположение кристаллов (зерен) и различных фаз представляет собой микроструктуру материала. Как правило, керамические микроструктуры состоят из отдельных кристаллов (зерен), разделенных пограничными слоями, и заполненных газом пор. Наблюдается широкий диапазон размеров зерна, как правило, в пределах 1–1000 мкм.

Керамика, используемая для имплантатов и в регенерации пораженных заболеванием или поврежденных частей организма, называется биокерамикой. Биокерамику можно классифицировать на биоинертную, биоактивную и растворяющуюся в организме (резорбирующую). На выбор керамики и стекла в качестве биоматериалов оказывают влияние три фактора: 1) физические и механические свойства, 2) распад материала в организме и 3) биосовместимость.

Примерами биокерамики могут служить оксид алюминия(Al_2O_3), двуокись циркония(ZrO_2), окись титана(TiO_2), трикальцийфосфат($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), гидроксилapatит ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), алюминаты кальция ($m\text{CaO} \cdot n\text{Al}_2\text{O}_3$), биоактивные стекла(SiO_2) и стеклокерамика ($\text{Li}_2\text{O} \cdot \text{ZnO} \cdot \text{SiO}_2$).

Биокерамика главным образом используется для регенерации твердых тканей, таких как кости, суставы или зубы. Выбор конкретного биокерамического материала зависит от типа требующегося крепления биокерамического материала к ткани. Плотные, непористые, почти инертные керамические материалы, такие как Al_2O_3 и ZrO_2 , прикрепляются в результате роста кости к шероховатостям поверхности путем цементирования устройства к ткани или путем впрессовывания в дефект (механическая фиксация). Если эти имплантаты имеют поры с диаметром более 100 мкм, может происходить вставка кости (биологическая фиксация). У поверхностно реактивных керамических материалов, в частности таких, как гидроксилapatит, материалы прикрепляются с помощью химических связей с костью (биоактивная фиксация). Биоактивные керамические материалы также используются в качестве покрытий на металлических имплантатах.

Поглощаемые биокерамические материалы предназначены для постепенного распада и замены природной тканью организма-хозяина. Однако разработка рассасывающихся керамических материалов представляет сложности главным образом из-за проблем, связанных с согласованием скорости рассасывания со скоростью замены природной тканью организма-

хозяина и сохранением прочности и стабильности стыков в период распада. Скорость роста ткани у разных пациентов разная и зависит от типа ткани.

Основная проблема, связанная с использованием керамики в организме в качестве постоянных имплантатов, заключается в замене старой, распадающейся кости на материал, который может функционировать в течение остальных лет жизни пациента. Выживаемость биокерамического материала требует формирования стабильного соприкосновения с живой тканью. Если в контакте может возникать перемещение, имплантат быстро ослабляется. Ослабление непременно ведет к клиническому отказу в виде разлома имплантата или кости, смежной имплантату. В случае использования инертных биокерамических материалов кость на стыке является очень часто структурно слабой из-за заболевания, локализованной гибели кости или экранирования напряжения, которое происходит из-за того, что более высокий модуль упругости имплантата препятствует созданию соответствующей нагрузки кости.

Подходом к решению проблем стыкового крепления является использование биоактивных материалов. Это материалы, вызывающие конкретную биологическую реакцию на стыке материала, которая обеспечивает формирование связи между тканями и материалом.

Гидроксиапатиты и трикальцийфосфат (ТСР) в виде порошка успешно применяются в клинике как костный наполнитель. Синтетический гидроксилапатит используется наиболее регулярно, поскольку он имеет аналогичный состав, строение и модуль Юнга с материалом кости. β -ТСР также аналогичен материалу кости в том смысле, что они оба являются керамическими материалами на основе фосфата кальция, однако β -ТСР рассасывается. В пористой форме керамические материалы гидроксилапатит и β -ТСР могут колонизироваться костной тканью. Проблема, связанная с внедрением пор в керамику, заключается в том, что прочность на сжатие материала резко уменьшается.

Встречающиеся в природе пористые структуры рассматриваются для производства из них каркасов гидроксилapatита. Часто используемой структурой является коралл. Используются гидротермические и растворотермические методы для преобразования природного коралла в гидроксилapatит после удаления органического компонента посредством, например, погружения в гидрохлорит натрия.

Механические свойства биокерамики, в особенности ее низкая трещиностойчивость, являются недостатком для прямого использования в качестве заменителя кости в сферах применения под нагрузкой. Обычно биокерамика сочетается с полимерами и металлами, эффективно образуя композитные материалы с усиленными механическими свойствами и упругими константами, соответствующими упругим константам кости. В таблице 3 представлены основные керамические материалы, применяемые в тканевой инженерии.

Материал	Применение	Результат
Сульфат кальция	Синуслифтинг*	способствует образованию новой костной ткани с сосудами
		высокая резорбция (1 месяц)
Гидроксилapatит	Костный имплант	способствует образованию новой костной ткани
	Синуслифтинг	уменьшает образование тромбов
		повышает объем кости через 8 недель
		способствует минерализации в месте соединения кости и имплантата на обширной площади
β -ТСР	Регенерация кости	не индуцирует воспаление
	Синуслифтинг	Остеокондуктивный эффект
	Костный имплант	подвергается деградации макрофагами и остеокластами
Двухфазный фосфат кальция HA: β -ТСР	Костный имплант	повышает объем кости через 8 недель
	Синуслифтинг	остеокондуктивный
		способствует стабильности имплантата
		способствует образованию новой костной ткани
Bioglass®	Костный имплант	увеличивает объем кости
	Синуслифтинг	высокая биоактивность
		способствует образованию новой

		костной ткани
BONITmatrix®	Костный имплант	стимулирует экспрессию гена IGF-1
		повышает экспрессию Coll-1
Biocoral®	Костный имплант	способствует формированию сосудисто-волокнутой ткани
	Синуслифтинг	повышение минерализации новой кости на 39%
Fisiograft®	Синуслифтинг	повышение объема кости на 33%
		высокая абсорбция
OSSANOVA®	костный имплант	стимулирует экспрессию гена IGF-1

Таблица 3. Основные керамические изделия, применяемые в тканевой инженерии [Saska S. et al.,2015]

**хирургическая операция, целью которой является восстановление объема костной ткани верхней челюсти до толщины, необходимой для надежной установки имплантата (длиной более 10 мм), путем введения на дно гайморовых пазух костного вещества (остеопластического материала)*

1.1.4. Натуральные полимерные материалы

Природные полимеры обладают тем преимуществом, что очень похожи, часто идентичны высокомолекулярным веществам, которые биологическая среда может распознать и с которыми может взаимодействовать в процессе обмена веществ (Таблица 4). Таким образом, проблем, связанных с токсичностью, хронической воспалительной реакцией, а также плохим распознаванием клетками, которые часто бывают спровоцированы многими синтетическими полимерами, можно избежать. Кроме того, сходство с естественными веществами вводит интересную возможность проектирования биоматериалов на молекулярном уровне. С другой стороны, естественные полимеры часто весьма иммуногены. Кроме того, так как они структурно намного сложнее, чем большинство синтетических полимеров, то различные технологические манипуляции, проводимые с ними, являются гораздо более сложными.

Однако, эти факторы приводят к значительному числу приложений, в которых использование природных полимеров, или их химически

модифицированных версий, является оптимальным. Интересным свойством природных полимеров является их способность к расщеплению естественными ферментами, что является гарантией того, что имплантат в конечном итоге деградирует под влиянием физиологических механизмов.

Это свойство может показаться на первый взгляд недостатком, так как это является показателем невысокой прочности имплантата. Тем не менее, это является преимуществом таких биоматериалов в случаях, когда его использование желательно для непродолжительного периода времени, после чего имплантат, как ожидается, полностью деградирует и утилизируется в ходе нормальных метаболических процессов. Так, кроме того, можно контролировать и скорость деградации, и, соответственно, срок службы имплантата полимера с помощью химической сшивки или других модификаций.

Потенциальной проблемой, которая имеет место, когда белки используются в качестве биоматериалов, является их иммуногенность, которая происходит именно из-за их сходства с естественными тканями. Иммунологическая реакция организма хозяина направлена против отдельных участков (антигенных детерминант) в молекуле белка. Эта реакция может вызываться определенными молекулами биологических жидкостей организма - иммуноглобулинами. Одна такая молекула (антитело) связывается с одной или несколькими антигенными детерминантами. Иммунологическая реакция также может быть опосредована молекулами, которые находятся на поверхности иммунных клеток (лимфоцитов). Имплантат в конечном итоге разрушается. Реакцию можно практически исключить при химической модификации антигенных детерминант. Иммуногенность полисахаридов, как правило, намного ниже, чем у белков. И коллагены обладают пониженной иммуногенностью по отношению к большинству белков.

Другой потенциальной проблемой при использовании природных полимеров в качестве биоматериалов является то, что эти полимеры обычно

разлагаются или претерпевают пиролизическую модификацию при температурах ниже точки плавления, тем самым, ограничивая использование методов обработки при высокой температуре, например экструзию из расплава, при изготовлении имплантата. Тем не менее, процессы экструзии при комнатной температуре этих полимеров были разработаны.

Еще одним серьезным недостатком является вариабельность в структуре высокомолекулярных веществ животного происхождения. Каждый из этих полимеров химически отличается не только от аналогичного или выделенного из другого вида (видовой), но также и от выделенного из другой ткани (тканевой специфичности). Это, конечно, становится проблемой для производителей имплантатов, когда требуется придерживаться жестких правил вариабельности различных партий продуктов. Поэтому в данном случае должны быть использованы строгие методы контроля сырья.

Большинство природных полимеров, используемых сегодня в качестве биоматериалов, входят в состав внеклеточного матрикса (ECM) соединительной ткани и их можно встретить в сухожилиях, связках, коже, кровеносных сосудах и в кости. Из различных компонентов внеклеточного матрикса, используемых в индустрии биоматериалов, коллаген является одним из наиболее распространенных. Другими важными полимерами природного происхождения являются протеогликаны и эластан.

Класс веществ	Название	Материал для получения	Применение
Белки	Шелк	Синтезируется членистоногими	матрикса для моделирования различных биологических процессов (репарации и клеточной миграции) (Пустовалова дисер)
	Кератин	Волосы	регенерация кожи

Полисахариды	Коллаген	Соединительная ткань (связки, кожа и др.)	-эндопротезы мягких тканей - компоненты материалов для лечения кожного покрова, -эндопротезы жидкостных протоков и органов зрения, - регенерация кожи, связок периферических нервов - клапаны сердца - шовный материал -хирургические клеи (Книга Воловой)
	Желатин	Частично аморфный коллаген	-направленная доставка лекарств - матриксы для выращивания клеток in vitro - покрытие кожного покрова - тканевой адгезив в офтальмологии, - гемостатический агент для сосудистой и лицевой хирургии,
	Фибриноген	Кровь	- композиции для заполнения дефектов костей («Bioplast»)
	Целлюлоза	Растения	- мембраны для гемодиализа - доставка лекарств
	Крахмал	Растения	- получение полимолочной кислоты
	Декстран	Синтезируется бактериями	- эндопротезы
	Альгинат	Водоросли Микроорганизмы	- ранозаживляющий материал - матриксы для культивирования клеток

	Хитозан	Насекомые Ракообразные	- перевязочный материал, - матриксы для клеточной и тканевой инженерии - заживляющие покрытия, - системы доставки клеток, лекарственных веществ и различных факторов роста, - шовный материал - тканевые адгезивы
	Гликозаминогликаны	Соединительная ткань	генная терапия генная терапия - матриксы для культивирования in vitro
Полинуклеотиды	ДНК РНК	Ядра клеток Ядра клеток	- эндопротезы твердых и мягких (Эласто ПОБ) тканей
Полиоксиалканоаты	ПОБ(поли- α -оксибутират) и его сополимеры	Синтезируется бактериями	

Таблица 4. Основные природные полимеры, применяемые в тканевой инженерии.

1.1.5. Полимерные материалы искусственного происхождения.

Синтетические полимеры могут быть получены в контролируемых условиях и, следовательно, обладают в общем предсказуемыми и воспроизводимыми механическими и физическими свойствами, такими как прочность на разрыв, модуль упругости и скорость деградации. Еще одним преимуществом этих полимеров является контроль примесей. Возможные риски, такие как токсичность, иммуногенность и возможность внесения инфекций встречаются реже при использовании чистых синтетических полимеров состоящих из хорошо изученных простых мономерных единиц. В таблице 5 представлены некоторые синтетические полимеры и их физические свойства.

Наиболее часто применяемыми синтетическими материалами для изготовления 3D – матриц в тканевой инженерии являются предельные полиэферы, такие как полимолочная кислота (PLA) и полигликолевая кислота (PGA), а так же их сополимеры (PLGA)

Химические свойства этих полимеров обуславливают гидролитическое разложение и после деградации мономерные компоненты каждого полимера удаляются естественными путями. Наш организм содержит специальные механизмы для полного удаления мономеров молочной и гликолевой кислот. PGA расщепляется в процессе метаболизма или устраняется с помощью других механизмов, PLA деградирует в процессе цикла трикарбоновых кислот. Из-за этих свойств PLA и PGA используются в таких продуктах, как, например, биоразлагаемые швы.

PLA и PGA легко поддаются обработке – их темпы деградации, физические и механические свойства могут регулироваться в широком диапазоне посредством подбора различных молекулярных весов и сополимеров. Однако, эти полимеры подвергаются процессу объемной эрозии, поэтому они могут привести к преждевременному разрушению биоинженерных каркасов. Кроме того, резкое высвобождение из них кислых продуктов деградации может вызвать сильную воспалительную реакцию [Martin C., 1996].

Биологически деградация полиэфира происходит вследствие поглощения воды с последующим гидролизом сложноэфирных связей. Различные факторы влияют на кинетику деградации: химический состав, конфигурация, молекулярная масса, полидисперсность, условия окружающей среды, стресс и напряжение, кристалличность, размер изделия, морфология (например, пористость), распределение химически активных соединений в матриксе, добавки [Dunn A. S., 2001] и другие.

В объемных образцах этих полимеров может иметь место гетерогенная деградация, которая может быть обусловлена следующими причинами [Jagur-Grodzinski J., 1999]: 1) диффузия растворимых олигомеров с

поверхности во внешнюю среду происходит легче, чем изнутри, и 2) концевые карбоновые группы, расположенных на поверхности, нейтрализуются внешним буферным раствором (*in vitro* или *in vitro*). Эти явления способствуют снижению кислотности вблизи поверхности, в то время как в объеме скорость разложения усиливается из-за автокатализа концевых карбоновых групп.

Изначальная степень кристалличности полиэфира влияет на скорость гидролитической деструкции, так как сегменты кристалла химически более стабильны, чем аморфные и они уменьшают проникновение воды в матрицу.

Особое значение в тканевой инженерии имеют остатки и кристалличность побочных и, особенно, кислых продуктов распада PLA, PGA, PCL и их сополимеров, которые вызывают побочные реакции окружающих тканей. В некоторые материалы специально включают основные части для стабилизации pH и контроля деградации. Для этого применяются биологически активное стекло и фосфат кальция [Martin C., 1996, Heidemann W., 2001].

Полимер	Температура плавления, °C	Температура кристаллизации	Время биodeградации (мес)	Модуль упругости (ГПа)
PDLLA	Аморфный	55-60	12-16	Пленка 1.9-2.4
PLLA	173-178	60-65	>24	Пленка 1.2-3.0 Нить 10-16
PGA	225-230	35-40	6-12	7-14
PLGA	Аморфный	45-55	1-12 (регулируется)	1.4 – 2.8
PCL	58	-72	>24	
PHA	120-177	-2- +4	Bulk не знаю как перевести	

Таблица 5. Основные искусственные полимеры, применяемые в тканевой инженерии [Rezwan K., 2006].

1.2. Полиоксибутират

Полиоксиалканоаты (ПОА) являются биологическими полимерами микробиологического происхождения. Это семейство природных полиэфиров, основным представителем которого является поли (3-оксибутират) (ПОБ) и его производные. На самом деле насчитывается около 100 различных различных гидроксиполкоаноатов, входящих в состав биосинтетических ПОА в качестве элементарных звеньев [Волова Т. Г., 2006].

Первым из полиоксиалканоатов был открыт полиоксибутират. Впервые он был обнаружен в начале XX века в клетках *Azotobacter chroococcum* [Meyer A., 1903], а его химическая структура и название - поли-β-гидроксибутират была идентифицирована спустя около 20 лет в культуре *Bacillus megaterium* [Lemoigne M., 1926]. Но он не представлял никакой ценности для исследователей вплоть до конца 1950-х, когда была опубликована работа, посвященная синтезу ПГБ у бактерий рода *Bacillus* [Macrae R.M., 1958]. В ней было показано, что в клетках синтезируется тем больше ПГБ, чем больше соотношение С/Н в среде культивирования, а внутриклеточная деградация ПГБ происходит в отсутствие экзогенного источника углерода.

Затем начались фундаментальные исследования распространенности ПГБ среди микроорганизмов, физических и химических свойств, методов определения, механизмов внутриклеточной деградации, регуляции биосинтеза и т.п. К концу 60х гг. накопилось достаточное количество исследований, свидетельствующих о том, что синтез этого резервного полимера - широко распространенное явление среди грамотрицательных бактерий. В обзоре, опубликованном в 1973 г. [Dawes E.A., 1973], поли-3-гидроксибутират рассматривался, как бактериальное резервное вещество, аналогичное крахмалу и гликогену у эукариот.

Следующим этапом в изучении бактериальных ПГА было клонирование и описание генов, участвующих в биосинтезе резервных полиэфиров. Ключевым в биосинтезе ПГА является фермент, ответственный за реакцию полимеризации и названный ПГА-синтазой. К настоящему времени клонировано около 38 структурных генов ПГА-синтазы из более чем 32 разных видов бактерий [Yin J., 2015; Foong C. P., 2014].

До 70-х гг. интерес к ПГБ в основном определялся его физиологической ролью в микроорганизмах, хотя в 60-х гг. появились первые патенты по получению ПГБ путем микробной ферментации [Noel, 1962]. В середине 70-х гг. начинают разрабатываться технологии промышленного производства ПГБ путем микробиологической ферментации. В обзоре [Holms, 1985] уже говорится о возможности использования ПГБ как возобновляемого источника сырья, о его биodeградации и первые предположения об его применении в медицинских целях. В дальнейшем эти направления изучения полимера получили широкое распространение и явились стимулом для увеличения его масштабного производства.

Пионером в этой области была английская компания ICI (Imperial Chemical Industries), которая в качестве продуцента использовала бактерию *Ralstonia eutropha*. Компанией ICI были получены патенты на разные способы производства [Hughes, Richardson, 1981; Richardson, 1984].

В 1996 компания Monsanto (USA), которая продавала сополимер ПОБВ под торговым именем Biopol, купила все права на производство полимера у ICI. Однако, её права на Biopol были проданы американской компании Metabolix в 2001 году. Monsanto приостановила свою деятельность до 2004 года, когда она стала заниматься получением ПОБ из растений с помощью генной инженерии, но затем в связи с шумом вокруг гено-модифицированных продуктов, её деятельность стала менее заметной.

В июне 2005 года компания Metabolix получила грант Presidential Green Chemistry Challenge Awards на развитие и производство полиоксиалканоатов, включая полиоксибутират.

В настоящее время несколько компаний работают над разработкой методов производства PHA из сточных вод, в том числе Micro Midas [<http://www.cnet.com/news/micromidas-to-test-sludge-to-plastic-tech/>] и её дочерняя компания Veolia Anoxkaldnes [<http://circulatenews.org/2015/09/a-new-way-to-make-plastic/>].

1.2.1. Строение и синтез ПОБ

В данной работе использовался полиоксибутират и его сополимер с полиэтиленгликолем, полученные из бактерий штамма *Azotobacter croococcum* 7Б.

Поли - 3- оксибутират является наиболее изученным представителем семейства полиоксиалканоатов. В большинстве штаммов, обладающих способностью синтезировать ПОБ : *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp [J.A. López, 2012], *Ralstonia* sp.(до недавнего времени известный как *Alcaligenes*) и даже в рекомбинантных *E.coli* [Leong Y. K., 2014], процесс синтеза полимерной цепи идет по одинаковой схеме.

Как правило, синтез ПОБ начинается от центрального метаболизма углеродных соединений, т.е. синтеза ацетил- кофермента А (КоА). На первом этапе 3-кетотиолаза (ЕС 2.3.1.16) связывает два остатка ацетил- КоА с образованием ацетоацетил-КоА, затем ацетоацетил КоА редуктаза (ЕС 1.1.1.36) катализирует восстановление ацетоацетила-КоА с помощью NADPH в D-3-гидроксибутирил КоА, причем в данном случае важную роль играет именно оптическая изомерия – в дальнейшей реакции участвуют только D-изомеры [Tsuge T., 2005], на последнем этапе ПГБ-синтаза (ЕС 2.3.1.B2 - тип I) присоединяет эфирной связью образовавшиеся мономеры к растущей цепи поли-3-гидроксибутирата (Рисунок 2).

В *Rhodospseudomonas rubrum* путь немного отличается на второй ступени, когда ацетоацетил КоА восстанавливается NADH –зависимой редуктазой до L- гидроксibuтирил КоА, а он в свою очередь преобразуется в D- гидроксibuтирил-КоА двумя иноил-КоА- гидратазами.

Еще одно отличие в биосинтезе наблюдается у рода *Pseudomonas*, который принадлежит к рРНК – группе I. *P. oleovorans* и другие накапливают ПОБ, состоящий из цепей средней длины, если клетки культивируются в среде, в которой присутствуют алканы, алифатические спирты или алкановые кислот [Gross R. A., 1989]. У других представителей этого рода, относящихся к группе рРНК – II этот путь включает в себя синтез сополиэфиров, состоящих из цепей средней длины различных 3 – оксиалканоатов. Этот путь до конца не изучен [Khanna S., 2005].

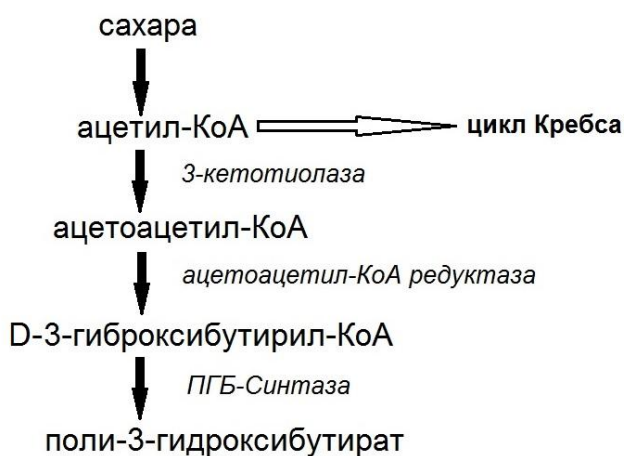


Рисунок 2.Схематичное изображение основных процессов синтеза ПОБ.

В нормальных условиях 3- кетотиолаза ингибируется избытком кофермента А, высвобождающемся в цикле Кребса. Но когда вхождение ацетил-КоА в цикл Кребса ограничено (при недостатке питательных веществ) избыток ацетил-КоА направляется по пути синтеза ПОБ [Ratledge C. , 2001].

1.2.2. Синтез сополимеров ПОБ

ПОА обладают набором уникальных свойств: высокой механической прочностью и термопластичностью, что обеспечивает простоту переработки и позволяет получать широкий спектр изделий, способностью к образованию композитов с синтетическими полимерами, неорганическими материалами и лекарственными веществами, а также к полному биоразложению с образованием нетоксичных продуктов, биосовместимостью (в том числе гемосовместимостью) с тканями и органами человека и животных и экологической безопасностью. Однако гомополимер ПОБ обладает и некоторыми недостатками: высокой гидрофобностью и кристалличностью, длительной биodeградацией и низкой пластичностью, что в ряде случаев серьезно ограничивает его применение в качестве биоинженерного материала. В связи с этим разработка новых биотехнологических методов получения новых сополимеров ПОБ биомедицинского назначения с оптимальным сочетанием физико-химических и биологических свойств и биоматериалов на их основе считается наиболее перспективным направлением в современной биоинженерии [Shtilman M.I., 2003; Volova T., 2003].

Целенаправленный синтез на основе гидроксипантеновых кислот и их лактонов был впервые предпринят авторами работы [Van Natta F.I., 1932]. В настоящее время ПГА могут быть получены с использованием ионной, гидролитической, радиационно- и УФ-инициированной полимеризации и сополимеризации ряда лактонов. Некоторые ПГА, например, поли(ϵ -гидроксигексаноат) являются промышленными продуктами.

Возможность применения для синтеза ПГА бактериальных методов была установлена более 40 лет назад, когда в цитоплазме бактерий *Alcaligenes eutrophus* наблюдалось накопление гранул поли(3-оксибутирата) (ПОБ). Основной стратегией получения новых сополимерных материалов

микробиологическим синтезом служит использование в качестве источников углерода дополнительных органических веществ.

Биосинтез гомо- и сополимерных ПОА с использованием штаммов различных бактериальных культур изучен рядом исследователей на таких штаммах, как *Alcaligenes eutrophus* [Peoples O. P., 1989.], *Alcaligenes latus* [Berwig K. H., 2016], *Ralstonia eutropha* [Volova T., 2003], *Azotobacter croococcum* 7B [Bonartsev A.P., 2013a] и т.п.

Ранее мы показали возможность биосинтеза различных сополимеров ПОБ в высокоэффективном штамме-продуcente ПОА *Azotobacter chroococcum* 7Б с использованием различных методических подходов, провели комплексное исследование физико- химических и биологических свойств полученных полимеров. Этот штамм характеризуется неприхотливостью к условиям культивирования и биотехнологического процесса (необходимо только самое базовое оборудование, не требуются высокоспецифичные культуральные среды, газовое питание, высокоточный контроль специальных параметров и т.п.), высокой продуктивностью (высокий выход биомассы, содержание полимера и сухой биомассы в клетках до 80% и выше), высокой молекулярной массой синтезируемого полимера (более 1.5×10^6 Да). Такие характеристики крайне важны для биотехнологической продукции полимеров биомедицинского назначения в связи с необходимостью технически простой и глубокой очистки, помимо обеспечения их эффективной наработки [Бонарцев А.П., 2011]. Однако у таких продуцентов имеются ограничения в синтезе сополимеров ПОБ, содержащих мономеры 3-оксикарбоновых кислот с длиной более пяти атомов углерода [Pettinari M. J. , 2001]

Биосинтез нового сополимера ПОБ, поли- 3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерата, показан с использованием таких бактериальных продуцентов, как *Ralstonia eutropha*, *Burkholderia* sp., *Chromobacterium* sp., способных к биосинтезу ПОА с короткоцепочечными и длинноцепочечными мономерами карбоновых кислот [Lau N. S., 2011; Saika A., 2014]. Однако химическая

структура этого сополимера (мономер 3-окси-4- метилвалерат имеет Y-образную R-группу) особенно интересна для изучения его биосинтеза именно такими бактериальными продуцентами, как *Azotobacter* sp., из-за указанных ограничений.

1.2.3. Синтез ПОБ-ПЭГ

Впервые сополимер поли-3- оксибутирата и полиэтиленгликоля был получен 1996 году Р. Гроссом и коллегами [Shi F., 1996] на культуре *Alcaligenes eutrophus*, затем он был получен на других штаммах, таких как *Rhodococcus* and *Nocardia species* [Alvarez H. M., 1997], *Pseudomonas oleovorans* [Sanguanchaipaiwong V., 2004].

Было замечено, что в зависимости от времени добавления в среду полиэтиленгликоля (ПЭГ) происходит уменьшение или увеличение молекулярной массы получаемого полимера [Kim O., 2000].

В целом, изменения, которые происходят в синтезе поли-3 оксибутирата зависят от штамма, условий культивации, молекулярной массы добавляемого ПЭГ. Механизм встраивания ПЭГ в полимерную цепь изучался многими исследователями [Madden L. A. ,1999; Sanguanchaipaiwong V., 2004] и его суть на данный момент представляется следующим образом- ПЭГ садится на конец синтезируемой цепи, обрывая синтез. Таким образом становится очевидным, почему происходит изменение молекулярной массы – подбирая условия мы можем регулировать время, когда произойдет сополимеризация и синтез молекулы остановится. Харрис [Harris J. M 2003] ввел специальный термин ПЭГиление, для описания химического блокирования концевых группы с помощью ПЭГа. ПЭГилению могут подвергаться многие природные и синтетические полимеры (PEGylation), поэтому в данном случае, говорит Харрис, предпочтительнее употреблять термин «биоПЭГиление», для подчеркивания естественности этого процесса.

Однако, данный метаболический путь становится активным лишь в случае, когда ПЭГ имеет молекулярную массу 300кДа и ниже и это не

удивительно, благодаря способности малых молекул проникать в клетку. Фостерс и коллеги также показали аналогичный эффект при культивации *P. oleovorans* в среде с ДЭГ – он также обладает способностью проникать в клетку и обрывать синтез полимерной молекулы, садясь на конец цепи [Foster L. J. R., 2005].

Можно предположить, что PEG с молекулярной массой между 300 и 2000 может поддерживать гладкость мембраны, но, из-за размера, не проникает в клетку и / или не действует как агент обрыва цепи. ПЭГ же с молекулярной массой от 2000 кДа и выше совсем не влияет на свойства ПГБ. Таким образом, вероятность ПЭГа встроиться в растущую полимерную цепь ПГБ уменьшается с ростом молекулярной массы ПЭГа, добавляемого в среду при культивировании микроорганизмов [Foster L. J. R., 2007].

1.2.4. Дегградация ПОБ

Под действием ПГБ-деполимеразы и 3-гидроксibuтиратдегидрогеназы в условиях ослабления стресса в клетке происходит катаболизм накопленного поли-3-гидроксibuтирата, причем состав продуктов распада зависит от вида бактерий. Различные исследования подтверждают одновременное наличие в клетке ПГБ-синтазы и деполимеразы, что позволяет говорить о равновесии метаболических процессов с участием ПГБ, определяемом условиями культивирования клеточной культуры [Uchino K., 2007]. Предполагается, что деполимеризации препятствует ингибитор, находящийся на поверхности везикулы, для прекращения действия которого предусмотрен термостабильный белок-активатор и его термостабильный кофактор. Связующим звеном метаболического цикла является синтез ацетил-КоА из ацетоацетила -КоА под действием -кетотиолазы.

К настоящему времени накоплено достаточно много данных о механизме действия внеклеточной деполимеразы [Freier T., 2002; Shishatskaya E. I., 2005], в отличие от механизма действия внутриклеточного

фермента. Известно, что гидролизующие ферменты специфичны к состоянию полиэфира. Например, внеклеточная ПГБ-деполимераза гидролизует выделенный, частично кристаллический, полимер, лишенный поверхностного белкового слоя. В то время, как внутриклеточная деполимераза специфична к нативной форме полигидроксibuтирата, и, возможно, к выделенному аморфному ПГБ [Jendrosseck D., 2006]. Такое разделение сфер действия внутриклеточных и внеклеточных ПГБ-деполимераз является достаточно условным, поскольку есть данные о новом типе внутриклеточной деполимеразы, проявляющей большую активность в отношении выделенного ПГБ при достаточно низкой специфичной активности к нативным гранулам полиэфира [Abe H., 2005]. Ряд исследований позволяет предположить содержание нескольких видов ПГБ-деполимераз в таких бактериях, как *Alcaligenes entrophus*, *Wautersia eutropha* и *Cupriavidus necator* [Handrick R., 2004].

1.3. Мезенхимальные стволовые клетки

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) были впервые выделены из костного мозга и идентифицированы более, чем 40 лет назад [Friedenstein A. J., 1970]. В 1970 году Friedenstein и коллеги показали, что в костном мозге содержатся как гематopoэтические стволовые клетки, так и малое количество колониеобразующих фибробластоподобных клеток, способных к адгезии на пластике (примерно 1 клетка на 10000 гематopoэтических). В течение 1980-х годов была показана способность этих клеток дифференцироваться в остеобласты, хондроциты и адипоциты [Piersma A. H., 1985]. Термин «мезенхимальные стволовые клетки» (МСК) был введен Caplan [Caplan A. I., 1991] в 1991 году для описания выделенных из костного мозга однородных клеток, адгезированных на пластике, которые пролиферируют *ex vivo* и способны к дифференцировке в различные типы клеток. Также они показали, что обновление костной и хрящевой ткани происходит за счет МСК, и микроокружение этих клеток имеет критическое значение в индукции дифференцировки по тому или иному направлению. В 1990-е годы была показана способность МСК к миогенной дифференцировке [Wakitani S., 1995], а в конце 1990-х, Kopen и др [Kopen G. C., 1999] описал способность МСК трансформироваться в ткани, развивающиеся из эктодермы. В начале 21-го века, в естественных условиях исследования показали, что человеческие МСК могут трансформироваться в клетки эндодермы и кардиомиоциты [Sato Y., 2005; Toma C., 2002]. В настоящее время известно, что места локализаций МСК в организме (так называемые МСК-ниши) довольно разнообразны. Основными нишами являются циркулирующая кровь, костный мозг взрослого организма и плода, селезенка, околоплодные жидкости, хрящи, сухожилия мышц, плацента, жировая ткань, эмбриональные ткани, надкостница, синовиальная жидкость, тимус, трабекулярная кость, дерма, пульпа и легкие. На данный момент продемонстрирована способность направленной дифференцировки МСК не

только в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлении, но и в другие типы тканей: мезодермальные (миоциты, остециты, эндотелий, адипоциты, кардиомиоциты), эктодермальные (нейроны) и энтодермальные (печени, поджелудочной железы, эпителия дыхательных путей) происхождений (Рисунок 3).

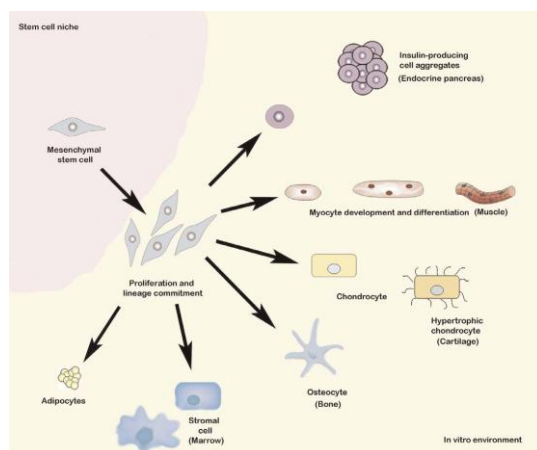


Рисунок 3. Потенциал дифференциации МСК [Kode J. A., 2009].

Уникальные свойства МСК - такие как относительно легкое выделение из тканей, иммунологическая толерантность [Uccelli A., 2008], а также способность к мультипотентной дифференцировке – явились причиной их глубокого изучения, в том числе и с точки зрения использования в клеточной терапии.

Стволовые клетки рассматриваются в качестве инструментов для обновления, регенерации или замены мертвых, стареющих или поврежденных клеток и тканей. После имплантации, стволовые клетки способны взаимодействовать с окружающей микросреды и облегчает регенерацию близлежащих тканей путем секреции определенных факторов и обновления биологических функций, например, иммунной системы, или трофически поддерживая окружающие клетки. Терапия с использованием стволовых клеток основывается на двух ключевых элементах: тип исходной популяции клеток и окружающая среда, в которой эти клетки существуют. Таким образом, основными подходами в терапии с использованием стволовых клеток являются: (I) имплантацию стволовых клеток или клеток-

предшественников, которые дифференцируются через некоторое время после трансплантации; и (II) трансплантацию дифференцированных стволовых клеток, после различных воздействий в лабораторных условиях.

МСК давно известны своими иммуномодулирующими свойствами. Общий эффект, как полагают, заключается в том, что они как бы «искажают» иммунный ответ, а именно, инициируют переход от Т-хелперов 1-го типа (Th1) в направлении Th2, снижают высвобождение интерферона гамма натуральными киллерами и уменьшают продуцирования антител В-клеток. Они регулируют лимфопоез и подавляют иммунный ответ. МСК костного мозга участвуют в развитии эффекта от Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов через факторы роста, цитокины и молекулы адгезии (Рисунок 4).

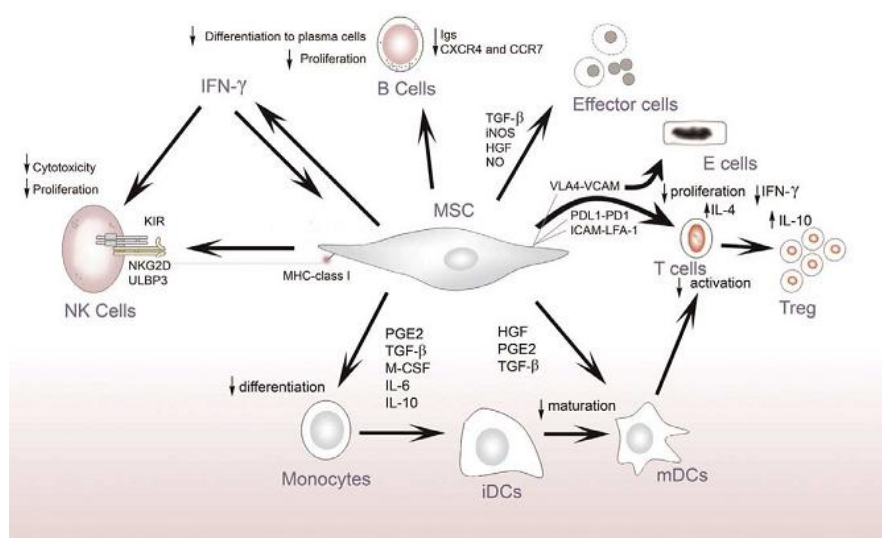


Рисунок 4. Иммуномодуляция МСК. МСК-иммуномодуляция происходит на нескольких уровнях: МСК-индуцированное подавление включает в себя первичные Т-клетки и памяти. МСК ингибируют пролиферацию и дифференцировку В-клеток в плазматические клетки, тем самым снижая образование антител. MSC подавляют пролиферацию NK-клеток, производство ИФН- γ , уменьшают цитотоксический потенциал NK-клеток против клеток мишеней с помощью некоторых растворимых факторов. МСК тормозят дифференцировку моноцитов в незрелые дендритные клетки (МЦД) и их дальнейшее созревание в зрелые DC (MDC) [Kode J. A., 2009].

Для фенотипирования МСК применяют ряд признаков, утвержденных Международным сообществом клеточной терапии [Dominici M., 2006]. Этими критериями являются 1) адгезия к пластику в стандартных условиях культивирования; 2) экспрессия поверхностных маркеров CD73, CD90, и CD105, при отсутствии экспрессии CD34, CD45, HLA-DR, CD14 или CD11b, CD79a, или CD19; 3) способность к дифференцировке в остеобласты,

хондробласты и адипоциты. Эти критерии были созданы для стандартизации изолированных МСК человека, но не могут применяться единообразно к другим видам. Например, было показано [Peister A., 2004], что мышинные МСК отличаются от человеческих по экспрессии маркеров и поведению. МСК обладают видовой специфичностью, что делает неоднозначным их определение в разных биологических моделях. Стволовые клетки классически определяются параметрами возможности их самообновления и мультипотентности. Некоторые ставят под сомнение являются ли МСК истинными стволовыми клетками или скорее мультипотентными клетками-предшественниками. МСК, выделенные из различных тканей взрослого организма обладают разной морфологией, возможностью дифференциации и экспрессии генов [Nombela-Arrieta C., 2011]. Эти наблюдения позволяют предположить, что МСК из различных тканей не могут быть биологически эквивалентными и демонстрируют разные механизмы самообновления и различный мультипотентный потенциал. Поэтому необходимо дальнейшее изучение и выявление более четких закономерностей роста и дифференцировки МСК, которые локализуются в различных органах различных биологических видов.

Крысы служат в качестве важнейших моделей для изучения многочисленных заболеваний, где используется клеточная терапия. Наиболее перспективным направлением является использование в клеточной терапии стволовых клеток, которые способны под воздействием определенных факторов дифференцироваться в клетки соответствующей ткани. В настоящей работе мы использовали МСК, полученные из костного мозга крысы. Их фенотипирование основывалось на критериях, предложенных в работе [Harting M. T., 2008]. Авторы подтверждают такие параметры, как адгезия к пластику и способность к дифференцировке по остео-, хондро- и адипогенному направлению. По поводу иммунофенотипирования с использованием FACS, авторы предлагают набор маркеров: CD11b (-) , CD45 (-) , CD29(+) , CD49e(+) , CD73(+) , CD90(+) , CD105(+), Stro-1(+) , но при

этом утверждают, что после восьмого пассажа фенотип клеток меняется, и исследование с использованием данных меток может приводить к неверным результатам.

1.4. Матрикс для регенерации костной ткани

1.4.1. Требования к материалам для инженерии костной ткани

В идеале, материалы и изделия из этих материалов, используемые в инженерии костной ткани, должны отвечать ряду требований. Так, например, биосовместимость является необходимым условием для всех материалов, используемых в тканевой инженерии, в том числе и для потенциальных продуктов их деградации.

❖ Пористость, размер и открытость пор, микроструктура

Хотя аутогенные трансплантаты кости уже давно считаются золотым стандартом, с которым сравниваются все альтернативные виды трансплантатов, полная имитация структуры кости не является абсолютно необходимым требованием для скаффолдов, используемых в инженерии костной ткани. Хорошо известно, что более высокая пористость, размер пор и их связанность приводят к более активному прорастанию кости в естественных условиях. Размер пор больше, чем 300 мкм, считается оптимальным для поддержания перемещения тканей, переноса питательных веществ и формирования капилляров, в то время как соединяющие поры должны быть больше, чем 100 мкм. Микроструктура играет важную роль в остеогенезе [Habibovic P., 2005].

❖ Механические свойства и интеграция с костной тканью

Скаффолды, а также регенеративная костная ткань должна быть в состоянии выдержать силу и напряжение от повседневной деятельности. Механические свойства имеют важное значение как на микроскопическом, так и на макроскопическом уровнях [Liebschner M. A., 2004]. Помимо механических

свойств, такие параметры, как интеграция скаффолдов и регенерация кости в тесном контакте с тканью хозяина, имеют большое значение для функциональности трансплантата, они могут быть дополнительно усилены за счет добавления керамики.

❖ Управляемая деградация

Регенерации кости и последующее ремоделирование происходит в течение нескольких месяцев, поэтому для скаффолдов важным параметром является скорость деградации и возможность её контроля, для того, чтобы вновь регенерированная костная ткань постепенно восполняла потери механической поддержки со стороны родной кости с необходимой скоростью [Hutmacher D.W., 2000]. Тем не менее, большинство современных исследований уделяет больше внимания микроструктуре и механическим свойствам скаффолдов, и гораздо меньше внимания скорости деградации [Hollister S. J., 2002].

❖ Остеоиндуктивные свойства

Подложки в идеале должны способствовать регенерации костной ткани с помощью процесса, который носит название остеоиндукция. Этот процесс зависит от многих факторов, например, от временной экспрессии генов, характерной для дифференцировки остеобластов [Hollinger J. O., 2004], от микроструктуры (т.е. пористости) [Wildemann B., 2007] и др. Различные системы доставки факторов роста были разработаны для воздействия на целевые клетки и поддержки их дифференцировки и созревания *in vivo* [Chen R. R., 2003].

Остеоиндуктивные факторы могут быть извлечены и очищены из кортикальной кости животного или человека, или синтезированы рекомбинантным способом перед введением в полимерную подложку.

❖ Совместимость с другими технологиями и биоматериалами

Поскольку ни одна индивидуальная технология не может вызвать регенерацию костной ткани оптимально, то сочетание различных технологических платформ является наиболее адекватной стратегией для инженерии костной ткани. Следовательно, крайне важно, чтобы разрабатываемые подложки были совместимы с другими скаффолдами и биоматериалами. В частности, подложки должны обладать достаточной гибкостью, чтобы также служить в качестве наполнителей или носителей для роста клеток, доставки белка или генной терапии.

❖ Индивидуальный дизайн

Состав и механические свойства костной ткани имеют очевидные различия в зависимости от пола, этнического происхождения, возраста и конкретного места в живом организме. Кроме того, механизмы регенерации различны при различных стратегиях терапии, и даже в одном и том же организме, этот процесс не будет однородным. Знания индивидуальных особенностей пациента, несомненно, являются необходимыми для создания максимально эффективной подложки.

Различные виды коммерческих продуктов для регенерации костной ткани из каждой основной категории биоматериалов приведены в таблице 6.

Материал	Название	Форма	Достоинство	Недостаток
ГА/трифосфат кальция	Ossatura (IsoTis Orthobiologics)	Композит ГА и β -ТКФ; 80/20	Остеокондуктивное и остеоиндуктивное действие	Только заполняет повреждение, не закрепляет
Трифосфат кальция	Norion skeletal repair system (Norian Corp. of Cupertino)	Жидкая паста	Трансплантация в виде инъекции	Трудность контроля утечки из места назначения
Карбонат кальция	Biocoral (Biocoral Inc.)	Натуральный коралл	Механика и морфология идентичны костным	Быстрая деградация

Сульфат кальция	OsteoSet	Осадок	Носитель антибиотика	Воспалительная, аллергическая реакция
Коллаген	Collagraft, Healos (Orquest)	Фибриллярный коллаген с фосфатом кальция	Носитель для белков, ГА, остеопрогениторных клеток	Низкая механическая прочность и сильные вариации от партии к партии
	Healos (Orquest)	Минерализованная губка		Возможность переноса инфекции
ПЛГА	TruGraftTM (Osteobiologics)	Гранулы	Легкое производство, хорошая биосовместимость, возможность контроля формы и скорости деградации	Низкая механическая прочность и быстрая деградация
Смола	Cortoss (Orthovita)	В виде инъекции	Хорошая интеграция с костью, подходящие механические свойства,	Не разлагается, применяется только для заполнения дефектов
Биостекло	Bioglass (Porex Surgical)	В виде частиц	Хорошая интеграция с костью	Хрупкость

Таблица 6. Коммерческие скаффолды для регенерации костной ткани.

Подытожив все вышесказанное, можно сказать, что оптимальные тканеинженерные конструкции должны соответствовать следующим критериям:

(1) иметь правильную поверхность и внутреннюю структуру для того, чтобы поддерживать клеточную адгезию, пролиферацию и дифференцировку, (2) иметь механические свойства, аналогичные участкам восстанавливаемых тканей, (3) являться биологически совместимыми, и (4) в случае регенерации костной ткани, конструкции должны иметь скорость деградации равную скорости её регенерации.

1.4.2. Способы изготовления матриц для тканевой инженерии

За последние десятилетия было разработано большое количество различных техник получения пористых подложек, в том числе формование окунанием в раствор, метод разделения фаз, лиофильное высушивание, полимеризация, порообразование с использованием газов и т.д.

Преимуществами этих традиционных методов изготовления являются, как правило, простота процесса изготовления без необходимости специализированного оборудования, а также возможность комбинации с другими методами. Среди общих недостатков можно отметить: (1) возможное сохранение токсичного растворителя в полимере, (2) наличие денатурирующих биоактивных молекул, введенных в полимер, (3) ограничение в формах, которые можно получить, (4) неконтролируемое распределение добавляемой керамики и (5) трудности в стандартизации размеров пор в заранее определенных формах [Atala A L., 2002].

❖ Формование из раствора и послойное формование мембран

Формование из раствора обычно используется для изготовления плоских листов и трубочек путем растворения полимера в подходящем растворителе и заливания в определенную форму, с последующим удалением растворителя. Пористость может быть достигнута комбинацией с методом выщелачивания или лиофилизацией. Плоские листы, получаемые из литья растворителя и послойным формованием мембран, используются для контролируемого высвобождения лекарственных средств и белков [Atala A L., 2002].

❖ Фазовое разделение

Разделение фаз включает в себя разделение фаз жидкости, которая содержит различные компоненты, т.е. твердая – жидкая фазы или жидкая-жидкая фазы. Это разделение может быть вызвано термическими изменениями или

химическими веществами. В разделении твердой - жидкой фаз, полимер выталкивается из растворителя во время его кристаллизации [Ма Р Х., 2001]. В разделении фаз жидкость-жидкость, раствор полимера разделяется на богатые полимером и полимер-дефицитные фазы. Пористые структуры образуются после того, как растворитель затем удаляют. Пористость и размер пор можно контролировать с помощью типа растворителя, концентрации полимера, скорости кристаллизации и температурного градиента.

❖ Лيوфильное высушивание

В этом методе используется эмульсия, которая создается путем гомогенизации полимерного раствора и воды, с последующим быстрым охлаждением эмульсии. Сублимационная сушка используется для удаления растворителя и воды, чтобы создать пористую структуру. Пористые структуры для регенерации костной ткани, изготовленные путем сублимационной сушки, освещаются в работе [Deschamps A A., 2002].

❖ Полимеризация

Пористые каркасы также могут быть изготовлены методом полимеризации *in situ*. В теории, это простой процесс, и нет необходимости включать другие более сложные процедуры, как удаление растворителя или соли. Тем не менее, основным ограничением метода возможность синтеза только небольшого количества полимера, а также использование высоких температур и металлических добавок, которые могут отрицательно влиять на биосовместимость. Пористый полимерная конструкция из ϵ -капролактона для костной регенерации описывается в работе [Huang M H., 2004].

❖ Порообразование с использованием газов

-Использование сверхкритического CO₂

При получении и модификации полимерных материалов в качестве сверхкритической жидкости в основном используется диоксид углерода. Это экологически безопасное, нетоксичное и дешевое соединение, которое легко удаляется из материала по завершении процесса. Диоксид углерода обладает способностью относительно легко проникать внутрь и пластифицировать многие полимерные материалы. При нахождении полимера в среде CO₂ при повышенном давлении происходит сорбция газа полимером, приводящая к существенному снижению температуры стеклования. Таким образом, такой полимер характеризуется повышенной подвижностью сегментов и цепей и увеличенным расстоянием между ними [Залепугин Д. Ю., 2006].

Преимущества этого метода заключаются в отсутствии органических растворителей и высоких температур, а также стабильность метода. Это дает возможность использования биоактивных молекул и повышения биосовместимости. Пористые матриксы, полученные таким методом из поли (молочной-со гликолевой кислоты) (PLGA) чаще всего используются для доставки факторов роста [Sheridan M H., 2004].

-Использование карбоната аммония

Помимо вышеуказанного физического метода, пористые каркасы также могут быть изготовлены методом химического газового вспенивания. Чаще всего в качестве газообразующего агента используют карбонат аммония. При опускании полученных конструкций в горячую воду, аммиак и диоксид углерода вспенивают скаффолд, образуя макропоры [Nam Y S., 2000].

❖ Компрессионное формование

Материал помещается в предварительно нагретую форму так, чтобы все его части контактировали с ней. Тепло и давление поддерживаются в форме до момента затвердения формируемого материала. Преимуществом компрессионного формования является изготовление сложных форм, простота процесса и возможность комбинации с другими методами, а также приспособленность к крупномасштабному производству. К недостаткам

можно отнести сравнительно большие первоначальные расходы на пресс-форму и утомительную оптимизацию протокола. О пористых скаффолдах для регенерации костной ткани, изготовленной прессованием сообщается в работе [Wu L., 2005].

❖ Спекание

Спекание представляет собой способ изготовления матриц из порошка, путем нагрева материала до тех пор, пока частицы не прилипнут друг к другу. Традиционно этот способ используется для изготовления предметов из керамики, а также используется в изготовлении полимерных скаффолдов. В работе [Borden M., 2002] представлено изготовление 3D-пористых каркасов из PLGA с использованием техники спекания.

❖ Выщелачивание

Выщелачивание представляет собой процесс удаления растворимых компонентов под действием избирательного растворителя. Это простой, экономически эффективный и надежный процесс. Наиболее часто используемыми в выщелачивании веществами являются хлорид натрия и сахароза. Он широко используется при изготовлении пористых скаффолдов и легко сочетается с другими методами, такими как формование литьем, лиофильное высушивание, вспенивание с помощью газов, прямое прессование и экструзия. Основными недостатками этого метода являются отсутствие морфологического контроля внутренних структур матриксов и отсутствие контроля взаимосвязи между отдельными порами.

Новое поколение методов. Следует, однако, отметить, что используя эти традиционные методы, нельзя получать каркасы индивидуального дизайна. Для решения этой задачи в инженерии костной ткани используют такие методы, как быстрое прототипирование (RP) или метод solid free-form fabrication (SFF). Они представляют собой новые технологии изготовления

полимерных подложек сложной структуры. С помощью быстрого прототипирования можно получать сложные конструкции путем добавления слоев материала и твердых частиц в индивидуально разработанную форму, контролируя процесс с помощью компьютерной программы. Использование этой технологии для изготовления скаффолдов представлено в работе [Hutmacher D W., 2004].

❖ Моделирование методом наплавления

Моделирование подложек методом наплавления достигается за счет укладки расплавленного полимера слой за слоем в определенном режиме. Нити нагретого термопластичного полимера выдавливаются как зубная паста из тюбика. Термопластик наносят на основание ультратонким слоем, а затем быстро охлаждают. Конструкции, изготовленные этим методом, обладают превосходной целостностью структуры. Матрицы с различной структурой слоя и морфологией изготавливаются путем регулирования угла осаждения, а также длиной и расстоянием между полимерными элементами [Hutmacher D. W., 2001].

❖ Лазерная технология

Селективное лазерное спекание (SLS) и стереолитография являются примерами лазерных систем. SLS является быстрым и экономически эффективным методом, и не предполагает использование органических растворителей. Порошкообразный биоматериал только плавится, но не разлагается под действием лазерного луча, который селективно проходит по определенной площади поверхности в соответствии с запрограммированным дизайном. Температура сканируемой поверхности повышается до температуры стеклования, порошок начинает плавиться и спекается с частицами последующего слоя. Скаффолды для регенерации кости, изготовленные с использованием этой методики из поликапролактона представлены в работе [Williams J. M., 2005]. Недостатками метода являются усадка материала, неконтролируемая пористость, деградация, сшивание и

окисление полимеров, слабые механические свойства [Hutmacher D W, 2004]. Также SLS не подходит для изготовления подложек с интегрированными факторами роста, так как локальная температура слишком высока во время спекания.

В стереолитографии, УФ-лазер воздействует на расплав фотополимеризующегося полимерного материала в жидкой фазе. Представителями таких полимеров, которые уже используются в данном методе являются производные полиэтиленгликоля (ПЭГ) акрилат, ПЭГ-метакрилата, поливиниловый спирт (ПВС) и модифицированные полисахариды, такие как гиалуроновая кислота и декстран-метакрилат. Лазерный луч инициирует процесс полимеризации и движется постепенно от верхнего слоя расплава до нижнего в соответствии с запрограммированной моделью. Матрицы, изготовленные с помощью этого метода, представлены в работе [Cooke M. N., 2003]. Применение этого метода ограничено трудностью выбора фотополимеризуемых биоматериалов, которые обладают необходимыми механическими свойствами, биodeградацией и биосовместимостью.

❖ 3D – принтирование

3D печать все чаще используется в тканевой инженерии с тех пор как она была впервые разработана в Массачусетском технологическом институте [Sachs E. M., 1993]. Существуют разнообразные модификации, но основные – это печать на основе порошка и на основе расплава. Во время обработки, скорость потока и угол подачи полимерного материала может управляться с помощью автоматизированного проектирования (CAD) модели. Таким образом, этот метод может быть использован как для изготовления сложной внутренней структуры, так и для создания макрообъектов 3D формы. В тканевой инженерии с помощью 3D-печати могут создаваться как керамические [Seitz H., 2005], так и полимерные [Dutta Roy T., 2003 можно др] подложки. Сложность удаления несвязанного порошка внутри пористой

структуры и использование органических связующих растворителей являются основными недостатками метода.

❖ Электроспиннинг

Электроформование представляет собой способ производства волокон, под действием электрического поля из раствора. Процесс не требует высоких температур, что делает его подходящим для производства волокон с использованием биомолекул. Также существует вариация формования из расплава, в этом случае исключается попадание растворителя в полимерную конструкцию. Не требуя сложного оборудования и высоких энергетических затрат, метод в то же время обладает гибкостью в настройке параметров, позволяя получать продукцию с регулируемыми в широком диапазоне характеристиками. Спектр полимеров, используемых для электроформования, очень широк: от природных коллагена, целлюлозы или хитозана до сополимеров биологических и синтетических мономеров. При электроформовании есть вероятность возникновения в матриксе таких дефектов как прядей, узлов или вкраплений волокнообразующего полимера, ухудшающих качество материала, но этого можно избежать путём различных модификаций исходного прядильного раствора. В работе [Zhang S., 2015] представлены матриксы, полученные электроформованием для костной биоинженерии.

1.4.3. Модификации методов в комбинации с другими техниками и материалами

➤ Включения клеток, генов, белков

Клетки, гены и белки играют ключевую роль в остеогенезе, как *in vitro* так и в условиях *in vivo*. В настоящее время существуют две стратегии включения клеток в каркасы: (I) посев клеток на подложку после изготовления, (II), внедрение клеток в изделие во время процесса изготовления. Очевидно, что

второй процесс является значительно более привлекательным. Технология печати клеток является развивающейся и перспективной областью [Mironov V., 2003], и, потенциально, может преодолеть ограничения, связанные с обычным посевом клеток. Тем не менее, этот метод является в настоящее время незрелым и не интегрирован с другими технологиями изготовления матриц. Что касается генов и белков, там достигнут некоторый прогресс в их интеграции и контролируемом высвобождении из матриц [Huang Y. C., 2003], но, тем не менее, эта область нуждается в дополнительных исследованиях.

Таким образом, производимые тканеинженерные конструкции, должны иметь не только необходимые биологические и физические свойства, но и наиболее эффективно включать и высвобождать клетки, белки и другие биологические агенты.

➤ Добавление керамики

В настоящее время нет ни одного изделия, которое может удовлетворить все разнообразные потребности инженерии костной ткани, учитывая наши текущие знания о регенерации костной ткани и материаловедении. Неорганические материалы, включая фосфат кальция, гидроксиапатит, карбонат кальция и сульфат кальция, могут облегчить миграцию и дифференцировку остеопрогениторных клеток и интеграцию с родной костной тканью. Тем не менее, низкая прочность на растяжение и хрупкость ограничивают их использование в местах, подверженных значительной нагрузке [Kokubo T., 2003]. Тщательно разработанные композиты биоразлагаемых полимеров и биоактивной керамики обладают стабильными механическими свойствами, более выраженной биосовместимостью, улучшенным взаимодействием с тканями и остеокондуктивностью.

Будущие направления

В настоящее время одной из основных целей научных исследований в инженерии костной ткани является интеграция остеопрогениторных клеток в тканеинженерные конструкции с последующей пролиферацией и дифференцировкой. Другой важной предпосылкой в создании скаффолдов является возможность предотвращения миграции и роста фибробластов, что является основной причиной несращения переломов

Дальнейший прогресс в данной области будет зависеть от степени понимания механизмов клеточного хемотаксиса и более основательного изучения свойств материалов [Ge Z., 2008].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Условия синтеза ПОБ и его сополимеров.

Для биосинтеза полимеров использован высокоэффективный штамм-продуцент ПОБ *A. chroococcum* 7Б, несимбиотическая азотфиксирующая бактерия, способная к сверхпродукции полимера (до 80% от сухого веса клеток). Штамм был выделен из ризосферы пшеницы (дерново-подзолистая почва) и поддерживался на среде Эшби, содержащей 0.2 г/л $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0.2 г/л $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 г/л NaCl, 0.006 г/л $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 5.0 г/л $CaCO_3$, 20 г/л сахарозы и 20 г/л агара. Все эксперименты проведены в лабораторных условиях. Для достижения высокой продуктивности клеток культуру *Azotobacter* выращивали в качалочных колбах в микробиологической качалке Innova 43 (New Brunswick Scientific, США) при постоянном перемешивании и 30°C на среде Берка в условиях избыточного содержания источника углерода в среде, содержащей 0.4 г/л $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 г/л $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.006 г/л $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.5 г/л цитрата натрия, 0.1 г/л $CaCl_2$, 1.05 г/л $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0.2 г/л KH_2PO_4 и 17 г/л (50 мМ) сахарозы как основного источника углерода. Для биосинтеза сополимеров ПОБ в культуральную среду добавляли соли карбоновых кислот (валериановой, 4-метилвалериановой) или полиэтиленгликоль (ПЭГ) в качестве дополнительных источников углерода.

В качестве предшественника мономера 3-оксивалерата в составе ПОА в культуральную среду добавляли валериановую кислоту (ВК) в концентрации 5мМ через 12 ч культивирования штамма-продуцента [Мышкина В.Л., 2008]. В качестве потенциальных предшественников мономеров 3-окси-4-метилвалерата в составе синтезируемого ПОА в культуральную среду добавляли 4-метилвалериановую кислоту в концентрации 20 мМ через 12 ч культивирования штамма-продуцента и в концентрации 20 мМ через 0 ч. Такая концентрация этой карбоновой кислоты выбрана по аналогии с другими карбоновыми кислотами, используемыми для биосинтеза новых сополимеров ПОБ и согласно [Мышкина В.Л., 2010].

Для синтеза сополимера ПОБ-ПЭГ как дополнительный источник углерода использовали полиэтиленгликоль (ПЭГ) (ММ = 300 Да, Экос, Россия). Первоначально к среде был добавлен ПЭГ в концентрации 150 мМ. Было показано, что дальнейшее увеличение концентрации ПЭГ ингибирует рост, снижает синтез ПОА и его молекулярную массу. Таким образом, была использована оптимальная концентрация ПЭГ [Saha S. P, 2006, Мышкина, 2010; Мышкина, 2008].

Для синтеза тройного сополимера ПОБВ-ПЭГ сначала добавляли валериановую кислоту в концентрации 20мМ после 12 ч инкубации культуры, а после 18 часов инкубации еще добавляли ПЭГ-300 в концентрации 150мМ [Bonartsev A.P., 2013].

Независимо от получаемого продукта штамм-продуцент культивировали в течение 72 ч. Оптическую плотность культуральной среды контролировали при помощи нефелометрии. Рост и накопление полимера контролировали также при помощи световой микроскопии с использованием микроскопа Биомед-1 («Биомед», РФ) с цифровой камерой. Параметры биосинтеза сополимеров: урожай биомассы (г/л среды) и общее содержание полимера в клетках (вес. % от сухого веса клеток) измеряли согласно ранее разработанным методикам.

Процесс выделения и очистки полимеров из биомассы *A. chroococcum* заключался в многократном осаждении из раствора с последующим высушиванием при 37°C. В качестве растворителя и осадителя использовались соответственно хлороформ (CHCl₃) Ч (Экос, Россия) и изопропанол (CH₃CH(OH)CH₃) Ч (Экос, Россия).

2.2. Исследования материалов

2.2.1. Определение молекулярной массы полимера

Величину молекулярной массы поли-3-оксибутирата и сополимера ПОБ-ПЭГ определяли методом капиллярной вискозиметрии, используя

капиллярный стеклянный вискозиметр марки ВПЖ-2 (диаметр капилляра 0,56 мм).

Удельную вязкость рассчитывали по формуле:

$$\eta_{\text{уд}} = (t - t_0) / t_0$$

где: t_0 - время истечения растворителя, сек; t - время истечения раствора полимера, сек. Среднее время истечения раствора полимера в хлороформе определяли из 4-6 результатов. Для определения характеристической вязкости измерения проводили для 4-5 концентраций. Различные концентрации получали путем разбавления исходного раствора наибольшей концентрации хлороформом. Концентрация исследуемых образцов находилась в пределах 50-200 мг полимера на 100 мл хлороформа. Времена истечения растворов в эксперименте составляли от 40 до 115 сек.

Молекулярную массу вычисляли по уравнению Марка - Хаувинка - Куна, используя следующие коэффициенты:

$$[\eta] = 7,7 \times 10^{-5} \times M^{0,82} \quad [\text{Akita et al., 1975}].$$

Для определения (η) экспериментально полученные числовые значения отражали в системе координат, откладывая по оси абсцисс концентрацию раствора полимера C , по оси ординат - значения приведенной вязкости $(\eta_{\text{уд}} / C)$. Экстраполяцией полученной прямой до оси ординат получали значение характеристической вязкости (η) . Точность определения (η) составляет $\sim 1\%$. Точность определения молекулярной массы, вычисленной по уравнению Марка - Хаувинка - Куна, составляет 2-5% [Рафиков и др., 1978].

2.2.2 Ядерно-магнитный резонанс

Спектры ^1H ЯМР 1% (вес/об.) растворов полимеров в дейтерированном хлороформе были сняты на спектрометре MSL-300 300 МГц (Bruker, Германия) с экспериментальными параметрами: температура

313 К, релаксационная задержка 2.5 с, ширина спектрального окна 4000 Гц, и на спектрометре Bruker Avance III 500 МГц с трехканальным криодатчиком TCI Prodigy (Bruker, Германия) с экспериментальными параметрами: температура 310 К, релаксационная задержка 3.3 с, ширина спектрального окна 10000 Гц. Химические сдвиги (в миллионных долях) выставлены по сигналу остаточных протонов CDCl_3 (7.24 м.д. по ТМС). Процентное содержание мономеров 3-оксивалерата (ЗОВ) в сополимере ПОБВ и в сополимере ПОБВ-ПЭГ рассчитывали по соотношению интегральных интенсивностей сигнала метильной группы гидроксивалерата (0.89 м.д.) и суммарных сигналов метильной группы гидроксивалерата (0.89 м.д.) и метильной группы гидроксибутирата (1.27 м.д.) [29, 31]. Процентное содержание мономеров 3-окси-4-метилвалерата (ЗО4МВ) в сополимере ПОБ4МВ рассчитывали по соотношению суммы интегральных интенсивностей сигналов 4-метильной группы (g) (0.90 м.д.) и $-\text{CH}$ (f) (1.91 м.д.) и суммы интегральных интенсивностей сигналов 4-метильной и $-\text{CH}$ -групп остатка 3-окси-4 метилвалерата и метильной группы остатков 3-оксибутирата (1.27 м.д.) (рис. 2). Процентное содержание элементарных звеньев ЭГ в сополимере ПОБ-ПЭГ и в сополимере ПОБВ-ПЭГ рассчитывали по соотношению суммы интегральных интенсивностей сигнала группы $\text{EG}-\text{CH}_2$ - (3,61; 3,70; 3,66; 3,73; 4,24 ppm) к сумме интегральных интенсивностей сигналов метильной группы оксибутирата (1,27 ppm).

2.2.3. Изготовление полимерных пленок

Пленки из ПОБ, ПОБ-ПЭГ и ПОБ+ПЭГ были получены методом осаждения из 3% раствора полимеров в хлороформе на стеклянную чашку Петри. После медленного испарения хлороформа, оставшийся в пленках растворитель удаляли путем сушки в термостате при 37°C в течение двух дней. Толщина полимерных пленок составляла 40 ± 5 мкм.

2.2.4. Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК)

Тепловые свойства пленочных образцов из ПОБ, ПОБ-ПЭГ и ПОБ+ПЭГ были измерены с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC 204 F1 Phoenix, Netzsch, Германия). Около 1-4 мг полимерной пленки помещали в 25мкл алюминиевого тигеля. Образцы нагревали от 25 до 220°C при скорости нагрева 10 К/мин в атмосфере аргона. Для точной калибровки температуры и энтальпии в диапазоне температур от -100°C до 600°C в соответствии с инструкциями производителя был использован калибровочный набор Netzsch (образцы высокой чистоты KNO₃, In, Bi, Sn, Zn, CsCl, Hg, C₆H₁₂). Кристалличность структуры ПОБ (X_c) может быть рассчитана следующим образом [Zheng, 2005]:

$$X_c = (\Delta H_m + \Delta H_r) / \Delta H_m^0(\text{ПОБ}) \times 100\%,$$

где ΔH_r и ΔH_m – изменения энтальпии, вызванные рекристаллизацией и плавлением исследуемого образца, соответственно, $\Delta H_m^0(\text{ПОБ})$ – теоретическое значение для термодинамической энтальпии плавления, которое было бы получено для 100%-кристаллических образцов ПОБ (146,6 Дж/г) [Barham, 1984]. Все расчеты проводились для первого и второго циклов нагрева.

2.2.5. Измерение контактных углов

Измерение производилось на цифровом угломере - системе анализа формы капли Drop Shape Analysis System - DSA100 (KRÜSS, GmbH, Германия). Определяется динамический угол натекания. Исследуемый образец, зафиксированный на предметном стекле, помещается в поле зрения видеокамеры прибора перед источником света. Система дозирования прибора подает тестируемую жидкость (деаэрированную дистиллированную воду), на поверхность подготовленных образцов каплями, увеличивающимися в объеме от 1,5 до 5 мкл с постоянной скоростью (200 мкл/мин.) Прибор записывает момент подачи капли и ее постепенного увеличения на видео. Динамическое равновесие в системе наступает через

некоторое время, когда угол контакта становится постоянным. На полученной видеозаписи осуществляется поиск этого момента, выставляется базовая линия – поверхность раздела твердой и жидкой фазы – и производится измерение угла смачивания с помощью соответствующей компьютерной программы. Аппроксимация формы капли осуществляется методом Лапласа-Юнга.

2.2.6. Водопоглощение

Водопоглощение полимерных пленок измерялось в соответствии со стандартом [ISO U. 62: 2008]. Водопоглощение полимерных пленок рассчитывалось по формуле $\text{Водопоглощение (\%)} = (m_2 - m_0)/m_0 \times 100\%$,

где m_0 и m_2 - массы обезвоженного и насыщенного водой образцов соответственно.

Пленочные образцы выдерживали при $t=50^\circ\text{C}$ до постоянного значения массы (m_1). Это составляло 2-3 сут. После этого их погружали в деионизированную воду ($t=25^\circ\text{C}$) на определенное время. После удаления капель воды образцы взвешивали снова. Опыт проводили до того момента как увеличение массы не будет превышать 0,1 мг (m_2). После этого образцы снова высушивали при $t=50^\circ\text{C}$ в течение суток и взвешивали (m_3). При расчете использовали $m_1 = m_0$ при $m_1 < m_3$ и $m_3 = m_0$ при $m_3 < m_1$. Результат представлен как среднее значение ($n=3$).

2.2.7. Атомно-силовая микроскопия

Исследования макропленок

Микрофотографии поверхности пленок толщиной около 30 мкм из ПОА были получены методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) с помощью микроскопа Solver PRO-M (Зеленоград, Россия). Для получения АСМ изображений кусок пленки из ПОБ ($\sim 2 \times 2 \text{ мм}^2$) фиксировали на держателе образца на двустороннюю клейкую ленту. Сканирование проводили в полуконтактном режиме с использованием кантилеверов NSG01 (типичная жесткость 5.1 Н/м), частота сканирования составляла 1-3 Гц, размер кадров – от 3×3 до $20 \times 20 \text{ мкм}^2$, при каждом снимки были также

изучены топография и фазовые сигналы. Обработка изображений проводилась с использованием программного обеспечения анализа изображения (NT-MDT, Россия) и ФемтоСкан Онлайн (Центр перспективных технологий).

Для описания поверхности пленок, была посчитана средняя шероховатость образцов R_a :

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N |r_n|$$
, где N - средняя линия профиля; n - базовая длина; r_n - отклонение профиля.

Этот параметр был рассчитан по результатам сканирования трех областей $20 \times 20 \text{ мкм}^2$ (512×512 точек). Кроме того, для каждого образца были проведены несколько сканирований с более высоким разрешением ($5 \times 5 \text{ мкм}^2$ (512×512 точек)) для более подробного описания поверхности полимера.

Атомно-силовая микроскопия ультратонких пленок

Ультратонкие пленки готовили методом нанесения на вращающуюся подложку (spin-coating) [María et al., 2004]. ПОБ наносили на слюду методом spin-coating из раствора в дихлорметане с концентрацией 0,5 мг/мл (на одно нанесение использовали объем $V=50$ мкл). Частота вращения подложки составляла $\omega=3000-5000$ об/мин.

Сканирование осуществлялось на микроскопах Solver PRO и Smena фирмы ЗАО «Нанотехнология МДТ» (Россия, Зеленоград). При работе с ультратонкими пленками использовали микроскоп Solver PRO, оснащенный сканером с полем зрения 50x50x4 мкм. При работе с макроскопическими пленками использовали микроскоп Smena с полем зрения 100x100x7 мкм. Сканирование осуществляли в полуконтактном режиме на воздухе. Использовались кремниевые кантилеверы ETALON (радиус закругления 10 нм, жесткость – 3,5 (для 80 мкм кантилевера) и 12 Н/м (для 110 мкм кантилевера)) и NSG 11 (радиус закругления 10 нм, жесткость – 5,5-22,5 (для 100 мкм кантилевера) и 2,5-10 Н/м (для 130 мкм кантилевера)).

Для проведения измерений методом АСМ при заданной температуре использовали термостоллик атомно-силового микроскопа SU045NTF, максимальная температура нагрева которого равна 120°C. Для выбора области сканирования использовали оптическую систему, совмещенную с АСМ. АСМ-изображения обрабатывали с помощью программ Nova (ЗАО «Нанотехнология МДТ») и FemtoScan Online (ЗАО «Центр Перспективных Технологий»).

2.2.8. Механические свойства полимерных материалов.

Механические испытания полимерных материалов проводили на приборе Инстрон Zwick/Roell BZ 25/TN1S (Zwick Roell, Германия) при следующих параметрах: предварительная нагрузка - 0,05Н, скорость предварительной нагрузки 1мм/мин, начало и конец определения модуля Юнга - 0,1 и 0,15Н соответственно, скорость определения модуля Юнга - 2 мм/мин; тип захвата- вулкалан.

2.2.9. Биосовместимость *in vitro*

Для оценки биосовместимости полимерных пленок использовали метод оценки цитотоксичности, а также метод культивирования клеток на поверхности пленок. В данном случае была использована культура фибробластов COS-1 (Билот, Россия). Клетки культивировались в среде DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium, ПАНЭКО, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biological Industries, Израиль), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (ПАНЭКО, Россия) при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂, среда менялась каждые три дня. Для оценки цитотоксичности материалов клеточную суспензию из расчета 2000 клеток на лунку вносили в лунки 96-лучного планшета и оставляли на 2-3 часа для прикрепления клеток. После этого образцы пленок размером 5×5 мм (n=6) помещали в те же лунки. По прошествии определенного времени извлекали полимерные образцы из инкубационных планшетов и проводили биохимический тест в соответствии с инструкцией. К 100 мкл среды с клетками добавляли 50 мкл смеси реагента и активатора (1 мл + 20 мкл) и инкубировали 2 часа при 37 °C. Оптическую плотность измеряли при 450 нм (с поправкой на 620 нм для исключения шумов). Измерение проводилось на 1,3 и 4 сутки культивации.

Прикрепление и рост клеток на полимерных пленках оценивали с помощью световой микроскопии, а также с помощью биохимического теста ХТТ(ХТТ Cell Proliferation Kit, Biological Industries, Израиль), который основан на реакции преобразования нерастворимой соли тетразолия в растворимую окрашенную соль формазана, осуществляемой активными митохондриальными ферментами клеток [Sutherland M. W., 1997]. Клетки культивировались в среде DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium, ПАНЭКО, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biological Industries, Израиль), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (ПАНЭКО, Россия) при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂, среда менялась каждые три дня. Образцы пленок размером 5x5 мм (n=6) помещали в лунки 96-луночного планшета, клеточную суспензию наносили сверху из расчета 2000 клеток на образец. По прошествии

определенного времени переносили полимерные образцы из инкубационных планшетов в планшеты с чистой средой и в новых лунках проводили биохимический тест в соответствии с инструкцией. К 100 мкл среды с образцом добавляли 50 мкл смеси реагента и активатора (1 мл + 20 мкл) и инкубировали 2 часа при 37 °С. Затем извлекали полимерные подложки и измеряли оптическую плотность при 450 нм (с поправкой на 620 нм для исключения шумов). Измерение проводилось на 1,2,3 и 4 сутки культивации.

2.3. Получение и первичные исследования матриксов

2.3.1. Метод газообразования с использованием бикарбоната аммония ((NH₄)₂CO₃)

Матриксы изготавливались модифицированным методом выщелачивания. Эта модификация основана на температурном разложении твердой соли, в то время как стандартный метод подразумевает вымывание соли растворителем. В качестве соли использовали карбонат аммония, который при высокой температуре разлагается на аммиак, углекислый газ и воду $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3 \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$.

Данная модификация метода была предложена Park T.G. в 1999 году [Park T.G., 1999], а также описана в работах [Nublat C., 2006; Nam Y. S., 2000]. Для данной модификации необходимым условием является то, что используемый раствор полимера должен быть достаточно вязким. Поэтому концентрация полимера варьировалась от 40 (ПОБ ММ=485кДа, ПОБ/ПЭГ ММ ≈485кДа) до 80 мг/мл (ПОБ-ПЭГ ММ=217кДа). Раствор полимера смешивался с порошком бикарбоната аммония (Химмед, Россия) в соотношении 10:1 по массе [Num et al., 2000] и тщательно перемешивался шпателем. Размеры частиц соли варьировали в диапазоне 100-300мкм. Смесь помещали в стеклянную чашку Петри и оставляли при комнатной температуре до полного испарения органического растворителя (2-3 часа). После этого форму помещали в горячую дистиллированную воду (70°C) до

полного прекращения газообразования, промывали дистиллированной водой 5 раз и высушивали при 37°C в течение суток.

2.3.2. Метод выщелачивания на пористом 3D шаблоне с использованием сахарозы (C₁₂H₂₂O₁₁)

Первоначально в качестве шаблона мы использовали 2 конструкции. В качестве первой выступал кубик сахара- рафинада, в качестве второй – произвольная форма из полипропилена, заполненная сахарозой (размер частиц 400-600 мкм).

Обе конструкции пропитывались раствором полимера в хлороформе концентрации 120 мг/мл. После испарения растворителя процесс повторялся до полного насыщения полимером. После этого сахароза удаляли путем вымывания в дистиллированной воде.

2.3.3 Первичные исследования

2.3.3.1 Пористость и размер пор

Пористость матриц рассчитывали по формуле [Masaeli E., 2012]

$$\text{Плотность матрикса} \quad (\text{г} / \text{см}^3) = \frac{\text{масса}(\text{г})}{\text{толщина матрикса}(\text{см}) \times \text{площадь поверхности}(\text{см}^2)}$$

$$\text{Пористость}(\%) = \left(\frac{\text{Плотность матрикса} \quad (\text{г} / \text{см}^3)}{\text{Плотность материала}(\text{г} / \text{см}^3)} \right) \times 100\%$$

Поли-3-оксибутират имеет известную плотность 1.243 g/cm³ [Misra S. K., 2006] Массу образцов измеряли, с помощью весов Acculab AL-64, USA, размеры оценивали с помощью штангенциркуля (Krino, Italy) (n=8)

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Диаметр пор оценивали по фотографиям, полученным с помощью сканирующей электронной микроскопии (JSM-6380LA, JEOL, Japan). Было

исследовано по 5 образцов каждого матрикса, замеры производились по 8 полям зрения.

2.3.3.2. Проверка на остаточные соли

Изменение окраски индикатора

Матриксy заливали горячей дистиллированной водой и инкубировали на шейкере при 37 в течение 2 часов. После этого проверяли pH среды раствором фенолфталеина.

Антроновый тест на остаточные сахара.

Для определения количества сахара использовался антроновый метод определения сахаров по Моррису-Роэ. 100 мг исследуемого матрикса измельчили и поместили в 2 мл дистиллированной воды. После чего приготовили антронный реактив - 100 мг антрона растворили в 100 мл серной кислоты, разлили в стеклянные колбы по 3 мл. Вытяжки из матриксов по 1 мл (в двух повторях) аккуратно по стенке залили в пробирки, после чего перемешали и поставили на кипящую баню на 15 минут. В качестве контроля использовали пробирки, в которые вместо вытяжки добавляли дистиллированную воду, сахар (50 мкг/мл) или сахарозу (50 мкг/мл). После кипячения пробирки с растворами охладили до комнатной температуры и определили оптическую плотность в кювете №3 (длина хода светового луча 3 мм) при 610 нм против контрольной пробы (вода + антронный реактив). Концентрацию сахара определяли по калибровочной кривой.

2.3.3.3. Рост клеток на матриксах

Тест проводили аналогично тесту с пленочными материалами, только вместо образцов пленок в лунки помещали образцы исследуемых пористых конструкций.

2.4. Плоские пористые матриксy , полученные методом выщелачивания с использованием бикарбоната аммония

2.4.1 Пористость и размер пор

Измерения проводились по методике, изложенной в п. 2.3.3.1. В качестве образцов использовали плоские пористые матриксы из ПОБ, ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ.

2.4.2 Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК)

Термо-физические свойства матриксов из ПОБ, ПОБ-ПЭГ и ПОБ/ПЭГ были измерены с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии по методике, изложенной в п. 2.2.4. Вместо образцов в виде пленок использовали образцы плоских полимерных матриксов аналогичного состава..

2.4.3 Адсорбция белков

Полимерные матриксы инкубировали в растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА, Sigma,USA) концентрацией 1 мг/мл. После инкубации образцы отмывали в фосфатно-солевом буфере (pH=7,4) на шейкере при 37°C 1 ч, затем отмывали в буфере с 0,1 % SDS (Химмед, Россия) в тех же условиях. Количество белка в растворе оценивали методом адсорбционной спектроскопии при 280 нм (Hitachi-557, Япония)

Для визуализации адсорбированного белка был использован Фитц-меченый БСА (Фитц-БСА) (Sigma-Aldrich, США). Исследование адсорбированного белка на поверхность скэффолдов было проведено с использованием конфокального микроскопа LSM710 (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения Zeiss LSM Image Browser 4.2.0 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия), а также ImageG 1.45s (США) (n=10).

2.4.4 Биосовместимость

2.4.4.1 Получение мезенхимальных стволовых клеток МСК

Мезенхимальные стволовые клетки получали выделением из бедренных костей 3-дневных крыс породы Вистар. Забой животных проводили декапитацией. После этого выделяли бедренные кости, отрезали эпифизы и

удаляли костный мозг из диафизов путем промывания, используя шприц на 2 мм с иглой 27G. Затем полученную суспензию инкубировали в Среде DMEM с коллагеназой 1 типа (1075 ед/мл) (ПанЭко, Россия) 1 час при 37°C. Осадок, полученный после центрифугирования 10 мин 100об/мин, высаживали на культуральный пластик. На следующий день меняли ростовую среду и далее культивировали по появления первичной монослойной культуры.

2.4.4.2. Фенотипирование МСК мыши методом проточной цитометрии

Клетки снимали инкубацией в растворе Трипсин – ЭДТА (ПанЭко, Россия) (в случае, когда клетки снимали с полимерных подложек время инкубации в растворе Трипсин-ЭДТА увеличивалось до 15 мин), подсчитывали с помощью гемоцитометра и готовили суспензию 10^5 клеток в 100 мкл PE буфера (2 mM ЭДТА, 0,5% ЭТС в PBS) и инкубировали с антителами к поверхностным маркерам CD90, CD45, CD11b и CD29 в темноте в течение 20 минут при температуре +5°C . Клетки отмывали центрифугированием один раз в PBS и анализировали на проточном цитометре FACS Aria SORP. (Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета) .

2.4.4.3. Цитотоксичность и поддержание роста клеток

Для оценки цитотоксичности материалов *in vitro* использовали культуру клеток МСК крысы, а также фибробласты линии 3T3 (любезно предоставлены Мойсенович М.М.). Методика оценки цитотоксичности полностью повторяла методику из п. 2.2.9. Измерение проводилось на 1,2,4 сутки культивации.

Для оценки адгезивной и индуктивной способности материалов использовали метод культивирования клеток на их поверхности в соответствии с п. 2.2.9. Измерение оптической плотности проводилось на 1,2,4,7 сутки культивации.

2.4.4.4. Сканирующая электронная микроскопия.

Для исследования на сканирующем электронном микроскопе все образцы специальным образом подготавливали. Образцы, не содержащие живых компонентов, просто покрывались золотом на распылительном приборе (IB-3, Giko, Japan) .

Полимерные образцы с растущими на них живыми клетками подвергались дегидрированию в растворах с повышающейся концентрацией этанола 30%, 50%, 70%, 82%, и 96%, а затем в смеси спирта и ацетона 3:1, 1:1, 1:3 и в 100% ацетоне. В каждом типе раствора образцы инкубировали 5 мин и затем подвергали сушке в критической точке на аппарате Hitachi critical point dryer HCP-1.

Исследования проводились на электронных микроскопах JSM-25S (JEOL, Japan) и CAM-SCAN-S2 (Cambridge Instruments, Англия).

(Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета)

2.4.4.5. Конфокальная микроскопия

Для идентификации и визуализации прикрепленных и растущих в объеме матрикса клеток, а также для построения трехмерной модели роста клеток во всем объеме матрикса использовали конфокальный микроскоп LSM710 (Carl Zeiss, Germany). Предварительно клетки окрашивали кальцеином (Calcein AM, eBioscience, USA) в концентрации 2 мкМ в течении 15 мин при комнатной температуре, который имеет свойство проникать через мембраны живых клеток и под действием внутриклеточных эстераз гидролизовать в отрицательно заряженное флуоресцентное соединение [Gantenbein-Ritter B. et al., 2011]. Работа проведена совместно с сотрудниками группы Феофанова А.В.

2.4.5. Остеонаправленная дифференцировка МСК

Культуральная среда для остеодифференцировки МСК готовилась на основе DMEM и содержала 10% ЭТС (Biological Industries, Израиль), 100 ME/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, 0,1 мкМ дексаметазона (KRKA, Чехия), 10мМ β -глицерофосфата (Sigma) и 50 мМ аскорбиновой кислоты (Sigma) [Shakibaei M. et al., 2012]. Образцы с прикрепленными МСК инкубировали в остеогенной среде в течении 21 суток. В качестве контролей использовались матриксы с МСК, инкубировавшиеся в обычной ростовой среде, а также клетки, инкубировавшиеся на культуральном пластике, одна часть которых подвергалась, а вторая не подвергалась дифференцировке в остеогенном направлении.

2.4.5.1 Окраска ализариновым красным

Образцы фиксировали 10% формалином 10 мин и затем окрашивали 40мМ раствором Ализаринового красного S в ПБС и анализировали с помощью световой микроскопии (Carl Zeiss AxioLab A1FL, Германия).

2.4.5.2 Щелочная фосфатаза

Для определения щелочной фосфатазы использовали образцы полимерных матриксов диаметром 1 см. Изначально МСК засекали из расчета 20.000 клеток на образец и анализировали на 7, 14 и 21 сутки. Образцы, с растущими на них клетками, промывались 2 раза в ПБС, затем помещались в лизирующий буфер (250мМ NaCl, 0.1% Triton X-100, 50мМ HEPES, pH 7.5) и подвергались 3 циклам замораживания-оттаивания. Затем образцы центрифугировали 10 мин при 10.000об/мин и измеряли показатели щелочной фосфатазы. В 96-луночную плашку добавляли 100 мкл пробы и 50 мкл буфера (15 мМ н-нитрофенилфосфат (Sigma, USA), 2 мМ Mg Cl₂, pH=10), инкубировали в термостате 60 минут и измеряли оптическую плотность при 405 нм. Отрицательным контролем служил лизирующий буфер, также в качестве контроля использовали клетки, растущие на культуральном пластике.

2.4.6. Имплантация *in vivo* и тканевая реакция на мелких лабораторных животных.

Исследование биосовместимости пористых матриц *in vivo* включало 2 вида имплантации.

Самцы крыс породы Вистар массой 500 ± 50 г вводились в наркоз с помощью Золетила 50 (Virbac, Франция) в дозе 10 мг/кг в сочетании с Рометаром (Bioveta, Чехия) в дозе 6 мг/кг внутримышечно. Образцы пористых матриц имплантировали подкожно с двух сторон от белой линии живота в 2 см от неё. Гистологические исследования проводились на 7, 14 и 60 день после имплантации.

Другой вид имплантации был имплантация в костную ткань.

Для этого животных вводили в полный наркоз, с фиксацией на животе. Выстригали шерсть в месте предполагаемого разреза – в районе бедренной кости. Оголяли кость и просверливали несквозное отверстие в диафизе кости сверлом диаметром 1,5 мм и внутрь кости через это отверстие помещали пористый матрикс, одновременно используя его как тампон для остановки истечения костного мозга. Одну треть всех животных оставляли в качестве контроля, истечение костного мозга никак не останавливали, ждали, естественного прекращения процесса. В этом случае гистологические исследования проводились на 3, 7, 14, 40, 90 и 180 сутки.

Крысы умерщвлялись передозировкой диэтилового эфира (Химмед, Россия). Полимерные матрицы в случае подкожной имплантации удалялись с небольшим захватом окружающих тканей, а в случае внутрикостной имплантации удалялась вся кость целиком. До исследований образцы хранились в 4% формальдегиде.

Работа проведена в полном соответствии с этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.).

Гистологическое исследование

Кусочки ткани фиксировали в нейтральном формалине 24 часа. После чего промывали в проточной воде и обезвоживали в этиловом спирте восходящей концентрации (50%, 60%, 70%, 80%, 96%) вплоть до абсолютного. Затем спирт замещали ксилолом и помещали в расплавленный парафин с двукратной его сменой. После пропитывания парафином кусочков их заливали в блоки, из которых в последующем изготавливали гистологические срезы толщиной 5 мкм (Lowspeed saw Jet, Швейцария), удаляли парафин, окрашивали гематоксилин – эозином или по Папаниколау и заключали в монтирующую среду после стандартной гистологической проводки. Полученные препараты документировали с использованием микроскопа Leica 2500 оборудованной цифровой камерой EC3. Каждый образец анализировался по меньшей мере по 8 изображениям (3132 x 2325 пикселей).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3 1. Синтез полимера ПОБ и его сополимеров.

Штамм *Azotobacter chroococcum* 7Б является одним из наиболее эффективных продуцентов ПОБ, и способен накапливать до 80% от сухого веса клеток с хорошими параметрами роста биомассы [Bonartsev A.P., 2011; Myshkina V.L., 2010]. Изменение условий углеродного питания может приводить к синтезу не только гомополимеров, но и многокомпонентных ПОА для улучшения их физико-химических и биомедицинских свойств.

При биосинтезе полимера с использованием в качестве дополнительного источника углерода ВК был получен сополимер ПОБ с 3-оксивалератом(3ОВ) – ПОБВ. Включение 3ОВ в цепь сополимера было подтверждено с помощью ^1H ЯМР (Рисунок 5 (А))[Мышкина В.Л., 2010]. Было показано для бактерий рода *Azotobacter*, что валериановая кислота(ВК) включается в сополимер путем β -окисления: $\text{ВК} \rightarrow \text{валерил КоА} \rightarrow 3\text{-кетовалерил КоА} \rightarrow \text{D-3-оксивалерил КоА} \rightarrow 3\text{-оксивалерат}$ [Madison, 1999]. Было также показано, что молярное содержание 3ОВ в синтезируемом сополимере прямо зависит от концентрации ВК, добавляемой в культуральную среду и от времени добавления ВК в культуральную среду – наибольшее содержание 3ОВ в ПОБВ наблюдалось при добавлении ВК в среду через 12 ч культивирования ВК в концентрации 5мМ, т.е. в начале стационарной фазы роста культуры, когда начинает идти ускоренный синтез полимера [Мышкина В.Л., 2010].

Стратегия добавления в культуральную среду предшественников мономеров для синтеза новых сополимеров ПОБ оказалась эффективной и в случае использования в качестве таких добавок производных ПЭГ: ДЭГ, ТЭГ, ПЭГ-200, ПЭГ-300 и ПЭГ-400. Добавление этих компонентов в концентрации 150 мМ с сахарозой в качестве основного источника углерода также приводит к включению мономеров ЭГ в синтезируемый полимер ПОБ. Включение элементов ЭГ было подтверждено ^1H ЯМР-спектроскопией вновь

синтезированных сополимеров ПОБ-ПЭГ и ПОБВ-ПЭГ(Рисунок 5 (В,Г))[Bonartsev, 2013 a; Bonartsev 2013 b].

Используя этот метод, нам удалось синтезировать новый сополимер ПОБ4МВ, добавив в культуральную среду аналог ВК - 4-метилвалериановую кислоту в качестве дополнительного источника углерода и предшественника мономера 3-окси-4-метилвалерата(3О4МВ) в цепи сополимера. Вхождение остатков 3О4МВ в состав синтезированного полимера ПОБ4МВ было также подтверждено методом ¹H-ЯМР (Рисунок 5 (Б)). Мы предполагаем, что полученный сополимер так же как и ПОБВ является мульти-блок сополимером и его синтез осуществляется по следующей схеме: 4МВК → 4-метилвалерил-КоА → 3-кето-4-метилвалерил-КоА → D-3-окси-4метилвалерил-КоА → 3О4МВ в составе ПОБ4МВ. Максимальное вхождение мономеров 3О4МВ в состав синтезированного полимера ПОБ4МВ составляло 0.6 мол.% при добавлении в культуральную среду 4МВК в качестве дополнительного источника углерода в концентрации 20 мМ [Бонарцев А.П., 2016].

Условия биосинтеза и характеристики полученных сополимеров в сравнении с гомополимером ПОБ представлены в таблице 7.

Использование солей других карбоновых кислот в качестве дополнительных источников углерода: гексановой, гептановой, октановой, нонановой и додекановой кислот не приводило к биосинтезу новых сополимеров ПОБ [Мышкина В.Л., 2010].

Физико-химические свойства сополимеров в зависимости от состава могут существенно меняться. При повышении гидрофильности и снижении кристалличности повышается эластичность, улучшаются механические свойства материалов, и зачастую увеличивается адгезия клеток [Qu X. H, 2005; El-Hadi A. , 2002]. Поэтому все полученные полимеры были исследованы на гидрофильность и у всех была определена кристалличность (Таблица 7).

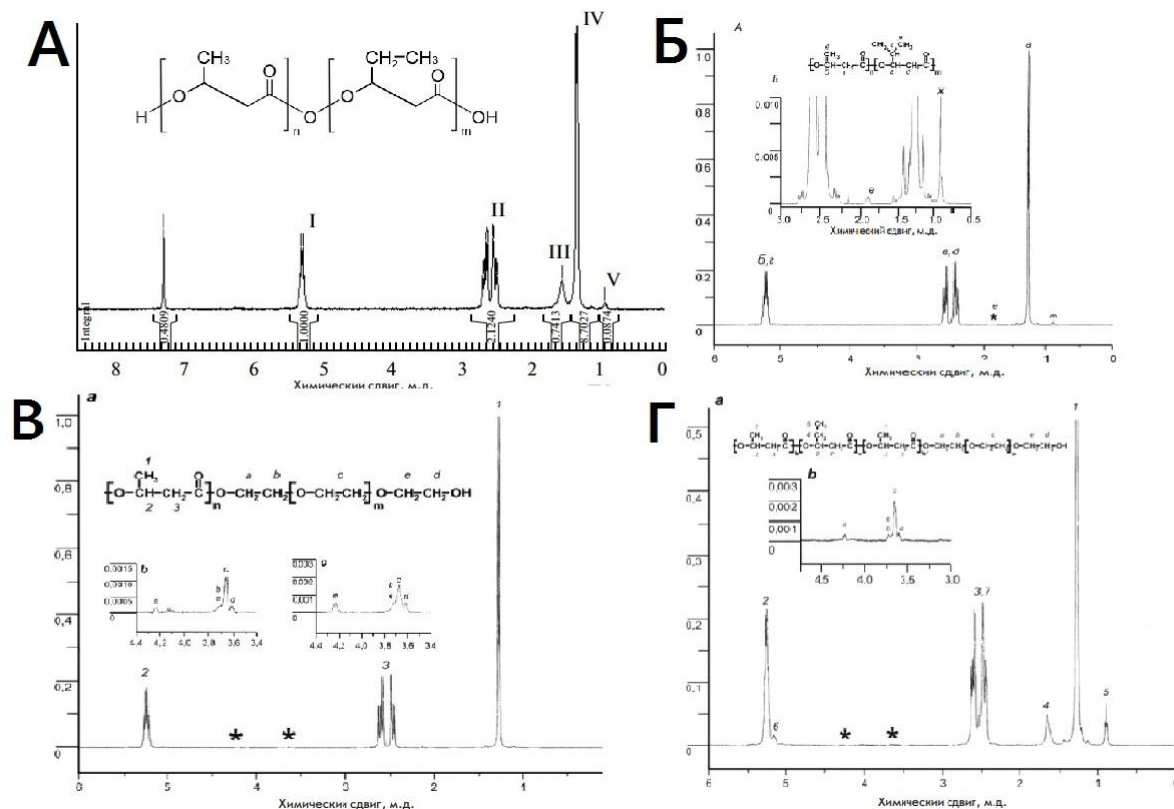


Рисунок 5. ^1H -ЯМР спектр сополимеров ПОБВ (А): I – CH (b), II – CH_2 (b), III – CH_2 (s)ГВ, IV – CH_3 (s)ГБ, V – CH_3 (s)ГВ, s – боковая цепь; b – основная цепь полимера [Мышкина, 2010],

ПОБ4МВ (Б): – полимерная цепь ПОБ: а – CH_3 (s), б – CH (b), в – CH_2 (b), полимерная цепь поли-3-окси-4-метилвалерата: г – CH_2 (s), д – CH_3 (s), е – CH (b), ж – CH_2 (b), 1 – боковые группы, 2 – основная полимерная цепь; * увеличенный участок графика изображен на врезке (Б) [Бонарцев, 2016],

ПОБ-ПЭГ(В) : а) цепь ПОБ: 1- CH_3 ; 2- CH ; 3- CH_2 б) цепь ПЭГ: а- $-\text{O}-\text{CH}_2$ (4.24 ppm), б- CH_2 (3.73), с- общий сигнал от срединных групп $[-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-]$ (3.66 ppm), е и д - концевые $-\text{CH}_2-$ (3.70 ppm) и $-\text{CH}_2-\text{OH}$ (3.61 ppm) [Bonartsev 2013 b],

ПОБВ-ПЭГ(Г): (а) – полимерная цепь ПОБ: 1 - CH_3 (s), 2 - CH (b), 3 - CH_2 (b), полимерная цепь ПОБВ: 4 - CH_2 (s), 5 - CH_3 (s), 6 - CH (b), 7 - CH_2 (b), s - главная цепь, and б- боковые группы; * увеличенный участок графика изображен на врезке (б); (б) цепь ПЭГ: “а” $-\text{O}-\text{CH}_2$ (4.24 ppm), “б” - CH_2 (3.73), “с” - общий сигнал от срединных групп $[-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-]$ (3.66 ppm), “е” и “д” концевые $-\text{CH}_2-$ (3.70 ppm) и $-\text{CH}_2-\text{OH}$ (3.61 ppm) группы [Bonartsev, 2013 a].

Полимеры	Условия культивации и характеристики роста			Состав полимера	
	Субстрат (концентрация, мМ/ время добавления, ч)	Выход биомассы (г/л ± CO)	Общее содержание полимера (вес. % ± CO)	3-оксивалерат, моль%	ПЭГ, моль%
ПОБ	Сахароза (50 мМ)	4,2 ± 0.4	69,3 ± 4,2	0	0
ПОБВ	Сахароза (50 мМ) + ВК (5 мМ)	4,4 ± 0.9	76,2 ± 3.0	2,5	0
ПОБ4МВ	Сахароза (50 мМ) + 4МВК (20 мМ)	3,4 ± 0,9	76,7 ± 3,3	0,6	0
ПОБ-ПЭГ	Сахароза (мМ) + ПЭГ 300 (150 мМ)	2,2 ± 0,4	34,2 ± 2,7	0	0,33
ПОБВ-ПЭГ	Сахароза (50 мМ) + ВК (20мМ)+ ПЭГ 300 (150 мМ)	3,2 ± 0,5	66,7 ± 3,1	7,5	0,23

Таблица 7. Условия биосинтеза и характеристики полученных сополимеров в сравнении с гомополимером ПОБ.

Полимеры	Температура плавления, нач. и пик. ($T_{п\text{ нач}}$ / $T_{п\text{ пик}}$, °C)	Кристалличность (X_c , %)	Контактный угол смачивания, град
ПОБ	166.8/176.9	74,7	70.1 $\pm$ 2.6
ПОБВ	166.0/174.8	52,8	70,2 $\pm$ 2,1
ПОБ4МВ	169.9/177.3	49.6	75.1 $\pm$ 1.1*
ПОБ-ПЭГ	157,4/177,8	59,1	52,3 $\pm$ 7,5
ПОБВ-ПЭГ	131.2/178.1	61,0	61.4 $\pm$ 2.5

Таблица 8 Физико-термальные свойства и и контактный угол смачивания полученных сополимеров. Физико-термальные свойства приведены по данным первого нагрева (n=3).

*Значения контактных углов измерялись на гладкой стороне пленок.

По итогам первичных исследований полученных сополимеров, для дальнейшей работы был выбран двойной сополимер ПОБ-ПЭГ как имеющий наименьший угол смачивания с водой и, таким образом, наиболее гидрофильный. Таким образом, мы предположили, что создаваемые на его основе изделия будут обладать улучшенными механическими свойствами из-

за повышения гидрофильности, но при этом сохранять такие необходимые в биоинженерии качества как биосовместимость и биodeградацию [Foster, 2005]

Сополимер ПОБ-ПЭГ

Полиэтиленгликоли представляют собой семейство нейтральных водорастворимых полиэфиров с различной молекулярной массой в пределах от 106Да (маслянистые, вязкие жидкости также известные как диэтиленгликоли) до нескольких тысяч Да (восковые, кристаллические твердые вещества). Они используются в различных промышленных товарах начиная от косметики и смазочных материалов до пластификаторов и антифризов. Также все большее распространение получает применение ПЭГ в области биомедицины, в консервации органов и тканей, а также в фармацевтической промышленности для солюбилизации гидрофобных компонентов и при очистке белков [Harris, 1992; Harris and Chess 2003; Steward 2005].

Первые работы по влиянию ПЭГ на биосинтез ПОА были опубликованы в 1996 году [Shi F.,1996a; Shi F.,1996b]. С тех пор проведено большое количество исследований на различные темы : получение сополимеров ПОБ и ПЭГ различными штаммами [Townsend K. J. et al., 2005; Bonartsev A.P., 2013], изучение химических основ процесса сополимеризации [Foster L. J. R., 2007], изучение физико-химических свойств и биосовместимости полученных полимерных продуктов [Bonartsev A.P., 2013].

Добавление ПЭГ в культуральную среду вызывает изменения в биосинтезе ПОБ, связанные с ферментной системой, что приводит к образованию ди-блок-сополимера ПОБ-ПЭГ, в котором карбоксильный конец (-COOH) цепи ПОБ ковалентно связан сложноэфирной связью с цепью ПЭГ.

Ранее сообщалось о смешиваемости ПЭГ с ПОБ и получении смесей ПОБ/ПЭГ [Avella M.,1988]. Также было показано, что это снижение молекулярной массы ПОБ может быть связано с ограничением ПЭГ длины полимерной цепи [Shi F.,1996b; Ashby R.D.,1999]. Микробиологический синтез *A.chroococcum* сополимера ПОБ-ПЭГ низкой молекулярной массы можно отнести к непосредственному взаимодействию ПЭГ с молекулами ПОА, как это было в случае *A. eutropha* [Shi F.,1996a] и *P. oleovorans* [Ashby R.D.,2002]. Также в литературе встречаются работы по химическому синтезу сполимеров ПОА с ПЭГ, например, поли(3-оксибутират -ПЭГ и поли(3-оксибутират-со-4-оксибутират)-ПЭГ[Li X.,2005; Pan J., 2009].

Таким образом, основными материалами для изготовления матриц были выбраны : гомополимер поли- 3-оксибутират (ПОБ) ММ= 485 000Да, его сополимер с полиэтиленгликолем (ПОБ-ПЭГ) ММ= 217 000, , а также композит ПОБ и ПЭГ (ПОБ/ПЭГ). Композитный материал ПОБ и ПЭГ получали с использованием полимеров ПОБ и ПЭГ (ММ=1500 Да, Химмед, Россия) физическим смешиванием этих двух компонентов в соотношении ПОБ:ПЭГ=70:30 (w/w). Массовая доля сополимера 30% была выбрана исходя из предварительных исследований биосовместимости полимерных композитных пленок с разной массовой долей ПЭГ и литературных данных по использованию композита ПОБ с ПЭГ в медицине [Жаркова И.И., 2012; Севастьянов, В.И, 2011].

3.2. Исследование физико-химических свойств полимерных материалов

Далее в работе шел сравнительный анализ, выбранного на основании его повышенной гидрофильности, сополимера ПОБ-ПЭГ с молярным содержанием полиэтиленгликоля 0,33% с гомополимером ПОБ и с композитным материалом, состоящим из механической смеси гомополимера ПОБ и ПЭГ с молекулярной массой 1500Да в соотношении 70:30 по массе.

3.2.1. Физико-термические свойства полимеров

Для анализа физико-термических свойств используемых полимерных материалов использовались пленочные изделия толщиной 40 ± 5 мкм.

Данные дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) (Таблица 9) показывают термические свойства полимеров: ПОБ, ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ. Все полимеры характеризуются пиком плавления типичным для частично кристаллических полимеров.

Анализ кривых ДСК (Рисунок 6) показал, что при первом нагреве сополимера мы наблюдаем выраженный двойной пик, в случае композита мы видим 3 пика - самый первый с температурой плавления $43,92^{\circ}\text{C}$ соответствует плавлению ПЭГа ($t_{\text{плавл}}(\text{ПЭГ1000})=44^{\circ}\text{C}$ [Pielichowski K., 2002]); у гомополимера двойной пик не наблюдается. Такой характер кривой нагрева является типичным для сополимеров с ПЭГ при первом нагреве [Zhou S., 2003; Liu Q., 2010].

Включение ПЭГ в цепь ПОБ приводит к следующим изменениям:

а) уменьшение площади пика плавления при первом прогреве, что указывает на уменьшение общей степени кристалличности и его увеличение при втором прогреве, что является свидетельством необратимости фазового перехода;

б) снижение температуры плавления на 1°C и на 3°C по сравнению с ПОБ при первом и втором прогреве соответственно;

в) смещение пика плавления в область низких температур.

Таким образом, несмотря на низкий уровень включения ПЭГ в цепи ПОБ, кристалличность и температура плавления полученного сополимера ПОБ-ПЭГ заметно изменились, что указывает на значительное влияние свойства и внутреннюю структуру полимерной матрицы.

Добавление ПЭГ в ПОБ в качестве композитной добавки приводит к:

а) уменьшению площади пика плавления при первом и втором прогреве, что свидетельствует об общем уменьшении кристалличности, но при расчетах кристалличности двухфазных материалов необходимо

использовать формулу [Parra D. F., 2006, Wang S., 2008], в которой учитывается доля связывания ПЭГ и конца цепи полимера ПОБ на физико-термические полимерного материала. Таким образом, при расчетах кристалличность компонента ПГБ оказывается выше.

б) снижение температуры плавления на 11°C и на 17°C по сравнению с ПОБ при первом и втором прогреве соответственно;

в) смещение пика плавления в область низких температур. Таким образом, использование ПЭГ в качестве композитной добавки повышает общую кристалличность и понижает температуру плавления полученного материала по сравнению с оригинальным гомополимером.

Полимеры	Температура начала плавления, (t плав., °C)	Пик плавления, (t пик., °C ^к)	Энтальпия плавления (ΔH, Дж/г)	Кристалличность (X _c , %)	Температура начала плавления, (t плав., °C)	Пик плавления, (t пик., °C ^к)	Энтальпия плавления (ΔH, Дж/г)	Кристалличность (X _c , %)
I прогрев					II прогрев			
ПОБ	170	178,0	92,72	63,25	167,4	175,0	99,6	67,94
ПОБ/ПЭГ	159	172	82,31	80,21*	150,5	173,0	76,12	74,18*
ПОБ-ПЭГ	169,3	176	74,4	50,75	164,4	172,0	102,6	69,99

Таблица 9. Физико-термальные свойства полученных сополимеров: ПОБ, ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ

*- кристалличность компонента ПОБ

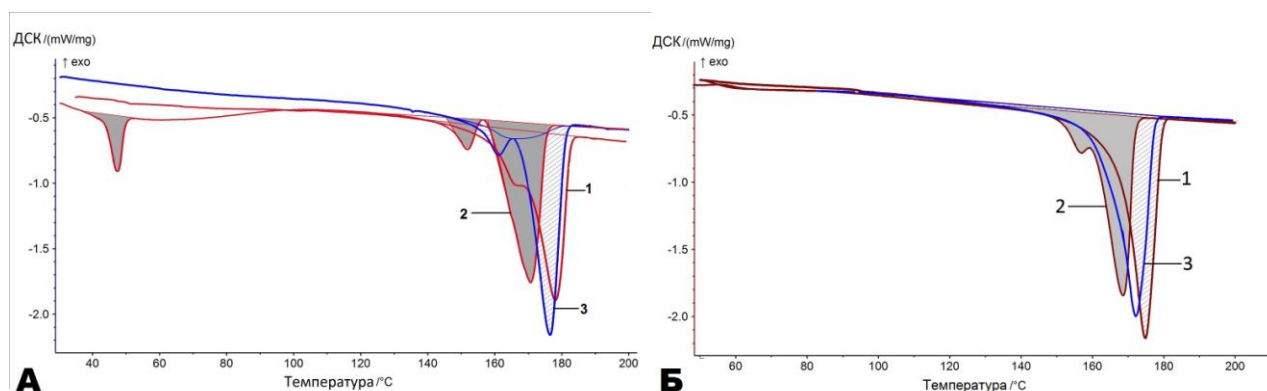


Рисунок 6. ДСК термограммы полученных сополимеров: 1-ПОБ, 2-ПОБ/ПЭГ, 3-ПОБ-ПЭГ: А-первый нагрев, Б-второй нагрев.

Как уже было отмечено, исследуемые полимеры относятся к частично кристаллическим. Такие полимеры характеризуются упорядоченностью расположения макромолекул, и, как следствие, сравнительно высокой плотностью. Они обладают, как правило, высокой прочностью, жесткостью и

плотностью, сравнительно низкой эластичностью и способностью к деформациям. Степень кристалличности показывает, какая доля полимера входит в состав кристаллических областей, что оказывает существенное влияние на его функциональные свойства, в частности, биосовместимость и кинетику биodeградации. Степень кристалличности влияет на скорость ферментативного разложения полимера: скорость ферментативного разложения аморфной компоненты приблизительно в 20 раз быстрее, чем кристаллической [S.Overgaard, et al., 1999]. Кристалличность материала делает его прочным, но хрупким. Аморфные области придают полимерному материалу вязкость, то есть способность гнуться, не ломаясь при этом.

Контроль кристалличности биологических материалов является одним из актуальных вопросов в тканевой инженерии, поэтому получение образцов ПОБ, имеющих низкую кристалличность (и, предположительно, высокую эластичность) является важной задачей.

Мы наблюдаем явно меньшее значение кристалличности у сополимера ПОБ-ПЭГ (данные первого прогрева), чем у гомополимера ПОБ, что является свидетельством того, что нити полимера при их микробиологическом синтезе разную укладку и в конечном итоге имеют разное процентное отношение кристаллических и аморфных областей.

3.2.2. Гидрологические свойства сополимеров

Контактные углы с водой, полученные на пленках из ПОБ, ПОБ-ПЭГ, ПОБ+ПЭГ, и водопоглощение этих полимерных пленок приведены в таблице 10.

Различия в гидрологических характеристиках гомополимера, сополимера и композита с ПЭГом вполне закономерны. Сополимеризация приводит к повышению молярного содержания кислорода и водорода (гидроксо-групп) в полимере, что приводит к следующим модификациям: контактный угол уменьшается на 3,6%, а водопоглощение увеличивается в 2,45 раза по сравнению с гомополимером. Как и следовало ожидать,

добавление полиэтиленгликоля в количестве 30% от массы приводит к значительному уменьшению контактного угла (на 18,3 %) и повышению водопоглощения в 17,6 раз.

Полимеры	Контактный угол с водой ($\theta, ^\circ$)*	Водопоглощение, (вес/вес, %)
ПОБ	$82,4 \pm 3,0$	$1,62 \pm 0,24$
ПОБ+ПЭГ	$68,3 \pm 3,0$	$28,56 \pm 0,82$
ПОБ-ПЭГ	$79,4 \pm 2,4$	$3,97 \pm 0,18$

Таблица 10 Контактные углы и водопоглощение полимерных пленок.

*Значения контактных углов измерялись на шероховатой стороне пленок.

Наличие фрагментов ПЭГ в ПЭГ-содержащем сополимере дало в результате более высокий процент кислорода и водорода в полимере, что повлияло на снижение гидрофобности и более высокое связывание воды. Таким образом, мы можем говорить о повышении гидрофильности материала, которое произошло в результате химической сшивки мономерных звеньев этиленгликоля с поли-3-оксибутиратом.

3.2.3. Исследование ультратонких пленок из сополимеров

Использование в качестве образцов ультратонких пленок, позволяет проследить, как присутствие гидрофильных звеньев влияет на морфологию полимера, а также оказывает ли влияние на морфологию поверхности.

На рисунке 7 видно, что ПОБ и ПЭГ отличаются друг от друга, но незначительно.

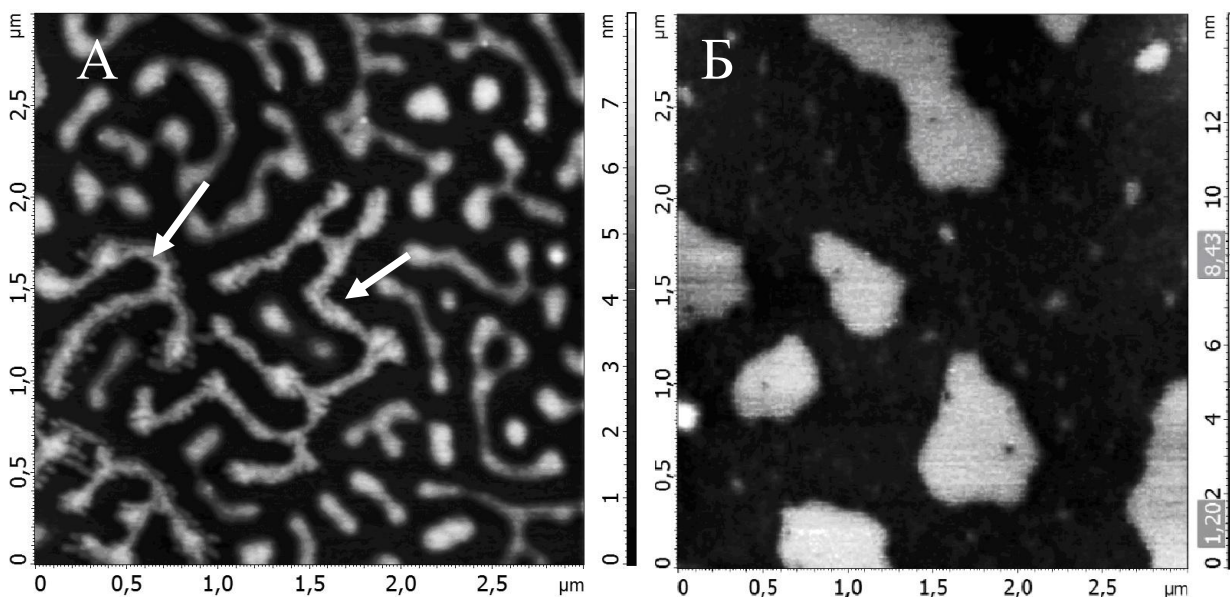


Рисунок 7 Изображение ультратонких пленок ПОБ (А) и ПЭГ (Б). Стрелки указывают на кристаллический ПОБ.

На данных изображения ПОБ и ПЭГ представляют из себя бесформенные аморфные образования со средней высотой $4,1 \pm 0,7$ нм для ПОБ и $4,4 \pm 0,5$ нм для ПЭГ. Также на пленке ПОБ обнаружены кристаллические участки, отмеченные стрелками.

Однако пленки сополимера ПОБ-ПЭГ и композита ПОБ+ПЭГ имеют существенные отличия от гомополимеров. Очень хорошо различаются объекты, имеющие протяженную структуру (рисунок 8). Такие объекты интерпретируются нами, как ламели, так как они имеют общие черты со структурами, которые описаны в литературе (Рисунок 9) [Chan C.-M. et al., 2005].

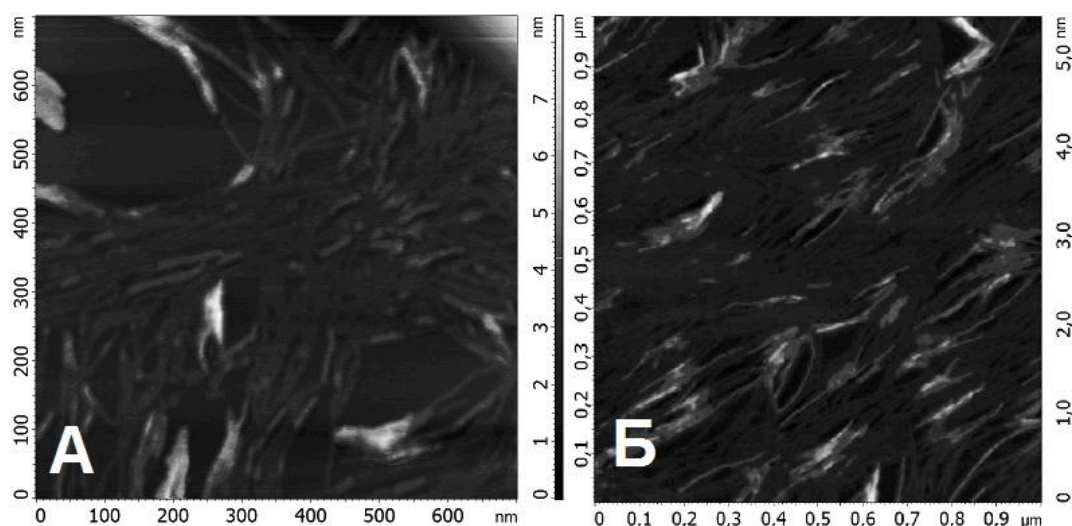


Рисунок 8. Изображение сополимера ПОБ-ПЭГ (А) и композита ПОБ+ПЭГ (Б)

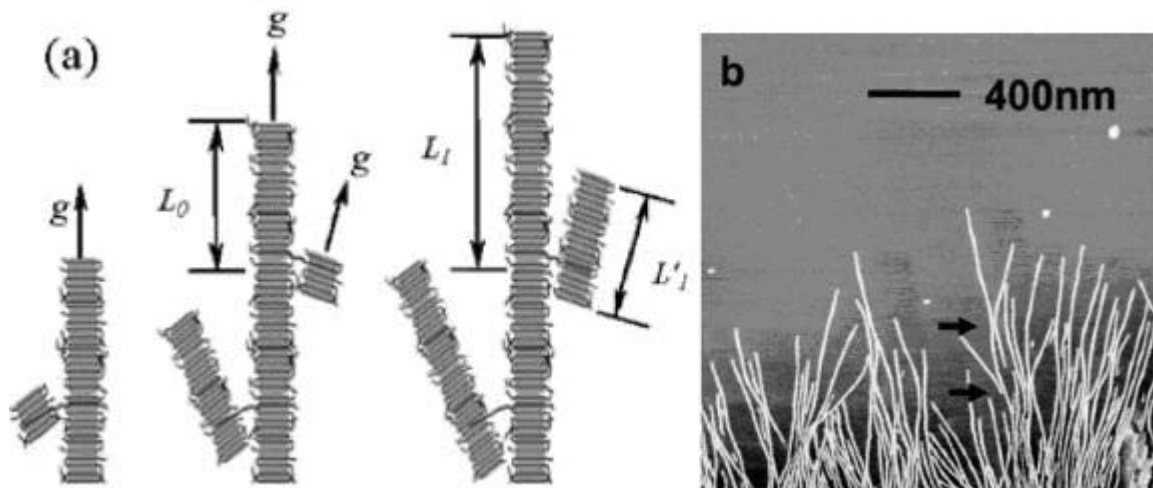


Рисунок 9. Изображение poly(bisphenol A-co-decane) [Chan C.-M. et al., 2005].

Так же можно заметить, что часть ламелей лежит друг на друге, тем самым создавая второй слой. Высоты ламелей у сополимера и композита одинаковые. Высота монослойных ламелей составляет $0,7\pm0,1$ нм, а двухслойных $1,5\pm0,3$ нм.

При исследовании ультратонкой пленки композита ПОБ-ПЭГ, были замечены процессы диффузии и самосборки ламелей, похожие на аналогичные процессы, наблюдаемые у пептидов [Hai Li et al., 2009].

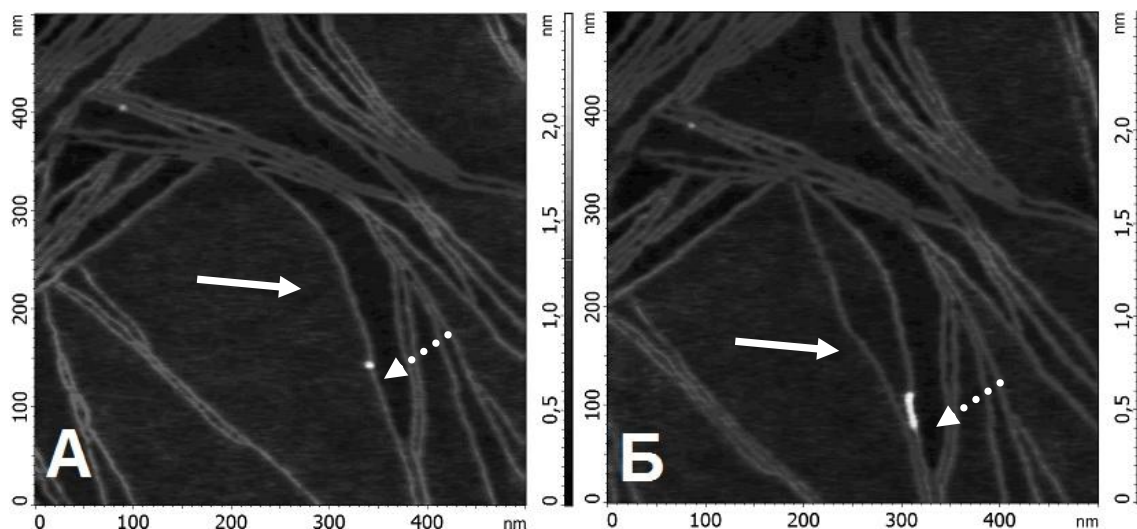


Рисунок 10. Процесс диффузии и самосборки ламели композита на слюде. Фотографии сделаны с интервалом 4 мин. Сплошной стрелкой указано перемещение и сборка ламели. Стрелкой из точек – появление второго слоя ламелей

На рисунке 10 видно, что за 4 минуты происходит перемещение молекул полимера и создание новых ламелей. По аналогии с пептидами, перемещение полимерных молекул и их самосборка возможна в нанопленке воды. Это говорит о том, что композит является достаточно гидрофильным, чтобы иметь такую способность. Кроме того, происходит процесс появления следующего слоя ламелей (показан стрелкой из точек). При этом высота данного участка равна $1,6\pm0,1$ нм означает, что высота последующего слоя составляет $1\pm0,1$ нм.

Средняя высота данных полимерных цепочек равна $0,5\pm0,1$ нм, что соответствует диаметру полимерной цепи. Они не являются артефактом сканирования, так как в литературе описаны полимеры, для которых полимерная цепь имеет такой же диаметр. [Prokhorov V. V, 2006; Bagrov D.V. et al, 2011].

Было показано, что ультратонкие пленки ПОБ и ПЭГ схожи по своей структуре: обоим полимерам присуще наличие большого количества аморфного вещества. Однако на пленках ПОБ были обнаружены также кристаллические участки, что может говорить о том, что ПОБ проявляет большие способности к кристаллизации, чем ПЭГ.

Было обнаружено, что создание композита и сополимера из ПОБ с ПЭГ приводит к изменению морфологии поверхности: появляются монослойные ламели со средней высотой $0,7 \pm 0,1$ нм. Были выявлены участки появления второго и последующих слоев. На пленках композита был показан процесс самосборки ламели, а также процесс появления второго слоя ламелей.

Это отчетливо показывает разницу в укладке полимерных цепей гомополимера ПОБ с одной стороны и сополимера ПОБ-ПЭГ и композита с другой стороны. Можно предположить, что наличие полимерных участков, образованных мономерными звеньями этиленгликоля, приводят к реорганизации молекул поли-3-оксибутирата. Чрезвычайно любопытным является тот факт, что похожее влияние оказывает полиэтиленгликоль в качестве композитной добавки в количестве 30% по массе и он же в качестве мономерного звена в количестве 0,33% по молярному содержанию.

3.2.4. Механические свойства полимерных материалов

Механические свойства являются одними из основных характеристик материалов. В данном исследовании были использованы пленки толщиной 25-60 мкм. Данные представлены в таблице 11. Среднее значение модуля Юнга для гомополимерного материала ПОБ составило около 1,46 ГПа, что согласуется с литературными данными [Godbole S., 2003]. Модуль упругости сополимера ПОБ-ПЭГ составил около 0,76 ГПа, а для композитного

материала значение этого параметра составило 0,42 ГПа.

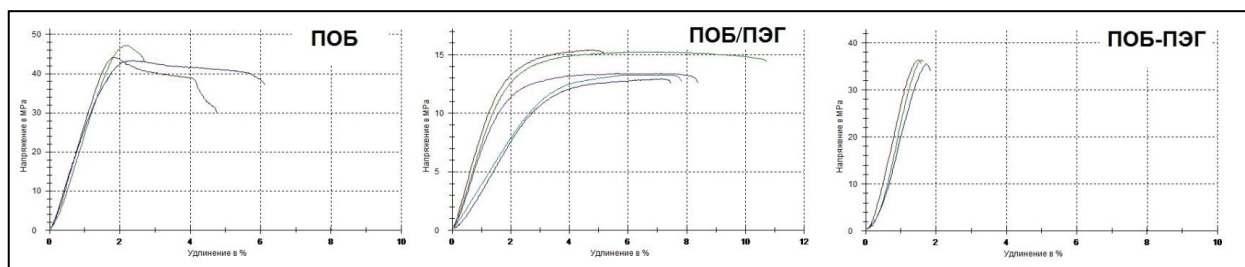


Рисунок 11. Механические свойства полимерных материалов, полученные на приборе Инстрон

	Максимальное напряжение, Н	Относительное удлинение, ε_R , %	Модуль Юнга, $E_{\text{мод}}$, МПа
ПОБ	44,91 $\pm$ 1,98	4,52 $\pm$ 1,71	1458,33 $\pm$ 154,46
ПОБ+ПЭГ	14,07 $\pm$ 1,17	7,91 $\pm$ 1,99	424,36 $\pm$ 152,31
ПОБ-ПЭГ	36,38 $\pm$ 0,06	1,61 $\pm$ 0,05	758,37 $\pm$ 204,52

Таблица 11. Механические свойства полимерных материалов, полученные на приборе Инстрон

Относительное удлинение составило для ПОБ, ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ 4,52, 7,91 и 1,61% соответственно.

Полученные данные свидетельствуют об изменении механических свойств у сополимера ПОБ-ПЭГ по сравнению с гомополимером, что является неопровержимым доказательством различия этих двух материалов, получаемых по сходной технологии из одного и того же бактериального штамма. Причиной отличий механических свойств могут быть изменения структуры полимерных нитей, приводящие к потере эластичности. Причем, как мы можем наблюдать, здесь нет прямой корреляции с параметром кристалличности.

Композитный материал демонстрирует значительное повышение относительного удлинения и значительное снижение модуля Юнга, что говорит об увеличении эластичности и является вполне логичным в присутствии пластификатора ПЭГ, что отмечается и в других работах [Chan R. T. H., 2012; Parra D.F., 2006].

Таким образом, по итогам анализа свойств сополимера ПОБ- ПЭГ, полученного методом биотехнологической сополимеризации, а также гомополимера ПОБ и композитного материала ПОБ/ПЭГ можно сделать вывод о том, что хотя у композитного материала гидрофильные и

пластические свойства выражены сильнее, но интересно то, что сополимер, имеющий всего 0,33% по молярному содержанию включения звеньев этиленгликоля значительно отличается от гомополимера как по физико-химическим свойствам, так и по строению на наноуровне укладки полимерных цепей.

3.2.5. Биосовместимость полученных полимеров *in vitro*

Биосовместимость полимерных материалов, которые предполагается использовать для создания матриксов для имплантации, является одним из основных критериев отбора [Севастьянов В.И., 2011; Williams D. F., 2008]. Для оценки биосовместимости классическим является тест на цитотоксичность МТТ, основное вещество которого (соль тетразолия) под действием ферментов живых клеток способно превращаться в окрашенную соль (формазан) [Mosmann T., 1983]. С его помощью можно выявить наличие каких-либо токсических компонентов, угнетающих рост клеток. Расщепление соли тетразолия до формазана происходит через сукцинат-тетразолиевую систему редуктаз в митохондриях метаболически активных клеток. Реакция осуществляется главным образом при участии НАДФ-Н-зависимых оксидоредуктазных ферментов. ХТТ (2,3- бис- (2- метокси- 4- нитро- 5- сульфофенил)- 2Н- тетразолиум -5-карбоксанилид) был предложен в качестве замены МТТ, давая большую чувствительность и более высокий динамический диапазон, а также окрашенный продукт, растворимый в воде [Sutherland M. W., 1997]. В своей работе для оценки биосовместимости полимерных материалов, а в последствии и пористых матриксов, мы использовали именно метод ХТТ.

Цитотоксичность полимерных материалов мы исследовали на культуре мезенхимальных стоволовых клеток крысы, которая является классической моделью для изучения свойств человеческих стоволовых клеток, но является даже более чувствительной к плотности посева [Javazon E. H.,

2001]. Результаты теста на цитотоксичность пленочных материалов представлены на рисунке 12. По сравнению с контролем, рост клеток в присутствии пленок из различных материалов был ниже. Но при этом во всех случаях мы наблюдаем увеличение количества клеток во времени к 3 суткам и постепенное снижение на 4 сутки, что говорит об отсутствии токсичности. Вполне вероятно, что число клеток было меньше в образцах с полимерным материалом из-за механической преграды к росту в виде пленки. Явно выраженной цитотоксичности материалов не наблюдалось.

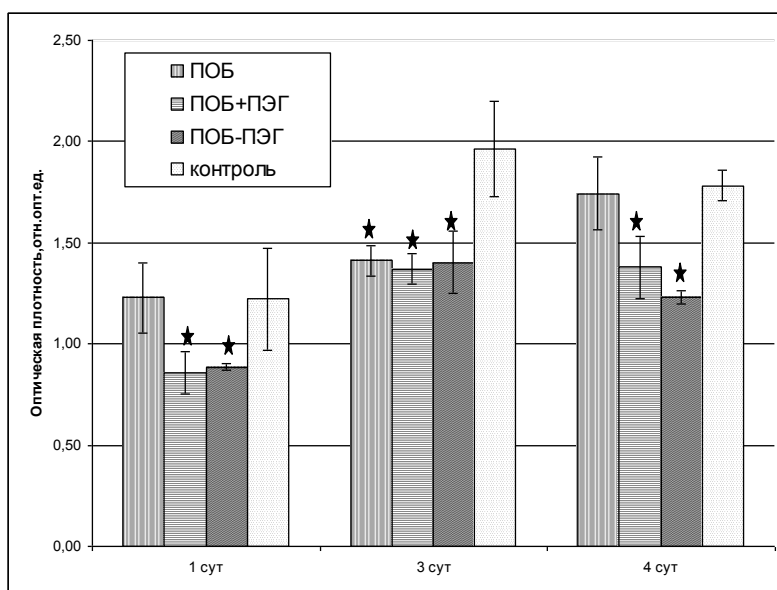


Рисунок 12. Цитотоксичность полимерных материалов ПОВ, ПОВ+ПЭГ и ПОВ-ПЭГ на культуре клеток МСК крысы, метод ХТТ. Данные представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение, $p < 0.05$ ($n = 6$)

Также пленки были исследованы на адгезивную способность и способность поддерживать клеточный рост и пролиферацию, так как эти материалы предполагалось использовать для создания подложек для клеточного роста. На данном этапе работы были использованы фибробласты COS-1 как довольно устойчивая культура, способная к относительно быстрому росту [Gizdavic - Nikolaidis M., 2010].

Как видно из Рисунка 13 количество клеток на каждом типе пленок увеличивается с течением времени, только на материалах с присутствием ПЭГ этот процесс происходит значительно быстрее. Видно, что быстрее и

лучше клетки растут на композитном материале ПОб/ПЭГ- их количество к 3-им суткам возрастает почти вдвое. Причина, вероятно, в гидрофильности и большей шероховатости поверхности [Cheng G., 2003]. Если же сравнивать гомополимер ПОб и сополимер ПОб-ПЭГ, то разница становится значительной уже со вторых суток и сохраняется на 3 и 4 сутки, вероятно, по причине более высокой гидрофильности. Стоит отметить, что изначально адгезия фибробластов ко всем типам пленочных материалов одинаковая - об этом свидетельствуют одинаковые значения оптической плотности на первые сутки.

Результаты исследования биосовместимости показывают, что полученный биотехнологическим путем сополимер ПОб-ПЭГ не обладает цитотоксичностью, и способен поддерживать рост и пролиферацию клеток. Композитный материал ПОб/ПЭГ в свою очередь также обладает достаточными свойствами для поддержания и роста клеток [Жаркова И.И., 2012].

В принципе эти два подхода - сополимеризация и создание композитных материалов и являются основными методами повышения биосовместимости материалов, и важное значение здесь имеет выбор добавки и её доля в конечном продукте [Innocentini-Mei L. H., 2003; Rosa D. S., 2005, Qu X. H., 2006]. Полученные данные дают основания для предположения, что выбранные нами для исследования соотношения ПЭГ и ПОб в композитном материале и сополимере являются показательными для изучения оказываемого ими влияния на исходный материал гомополимер ПОб.

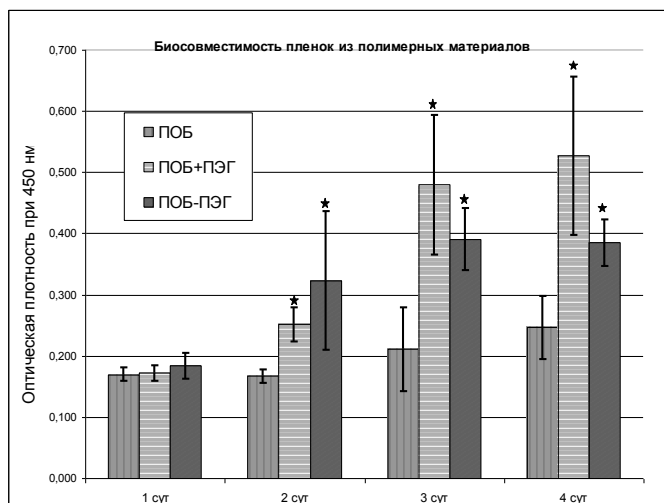


Рисунок 13. Адгезия и пролиферация фибробластов COS-1 на пленках из испытываемых биополимеров, ХТГ-тест: ПОБ, ПОБ+ПЭГ, ПОБ-ПЭГ. Данные были представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение, $p < 0.05$ ($n = 6$) [Жаркова И.И., 2012].

Таким образом, по итогам анализа свойств сополимера ПОБ-ПЭГ, полученного методом биотехнологической сополимеризации, а также гомополимера ПОБ и композитного материала ПОБ/ПЭГ можно сделать вывод о том, что хотя у композитного материала гидрофильные и пластические свойства выражены сильнее, но интересно то, что сополимер, имеющий всего 0,33% по молярному содержанию включения звеньев этиленгликоля значительно отличается от гомополимера как по физико-химическим свойствам, так и по строению на наноуровне укладки полимерных цепей. Подобные результаты описаны в работе [Marçal H., 2008], где сравниваются свойства полиоксигексаноата и сополимера полиоксигексаноата с диэтиленгликолем, полученного микробиологическим путем с использованием штамма-продуцента *P. oleovorans*. Авторы также подчеркивают явное различие в физико-химических свойствах и хорошую биосовместимость обоих материалов. John Foster в своем обзоре [Foster L. J. R., 2010] продуктов сополимеризации полиоксиалканоатов и этиленгликолей также подчеркивает явное различие физико-химических и биологических свойств сополимеров, различных по своему составу и проценту включения EG мономеров.

3.3. Получение и первичные исследования матриц

3.3.1. Полученные изделия и их структура

В результате проведенной работы были получены матрицы различными методами: методом газообразования с использованием бикарбоната аммония $((\text{NH}_4)_2\text{CO}_3)$ (матрикс тип I) - такие матрицы представляют собой плоскую пористую мембрану (Рисунок 14), а также методом выщелачивания на пористом 3D шаблоне с использованием сахарозы $(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11})$ (матрицы тип II). Матрицы, полученные вторым способом, имели различные формы в зависимости от используемого шаблона: одни изготавливались с использованием кубика-рафинада и имели форму куба (матрицы IIa, рис.?), другие - с использованием продолговатой пластиковой формы, заполняемой сахарозой, и они имели соответствующую вытянутую форму (матрицы IIб, рис.?).

Размер частиц карбоната аммония для матриц I составлял 90-250 мкм, размер кристаллов сахара, используемых для изготовления сахара - рафинада (матрикс тип IIa) составляет около 500 мкм, кристаллы сахарозы для матрикса IIб были размером 300-400 мкм.

Пористость матриц рассчитывалась из массы полимера и занимаемого им объема по формуле

$$P = 1 - \left(\frac{m_{\text{мат}}}{V_{\text{мат}} * \rho_{\text{ПОБ}}} \right) \times 100,$$

где $m_{\text{мат}}$ - масса матрикса, $V_{\text{мат}}$ - объём матрикса, $\rho_{\text{ПОБ}}$ - плотность полимера ПОБ = 1,26 мг/мл [Misra S. K., 2006]. Пористость матриц представлена в таблице 12.

Размер пор определялся по фотографиям, полученным методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с помощью программного обеспечения Cool Ruler.

В таблице 12 приведены сравнительные данные по пористости и размеру пор для всех типов матриц из гомополимера ПОБ.

	Тип I	Тип IIa	Тип IIб
Пористость	87%	88%	93%
Размер пор	~190 мкм	~370 мкм	~255 мкм

Таблица 12. Пористость и размер пор матриц из ПОБ различной технологии получения.

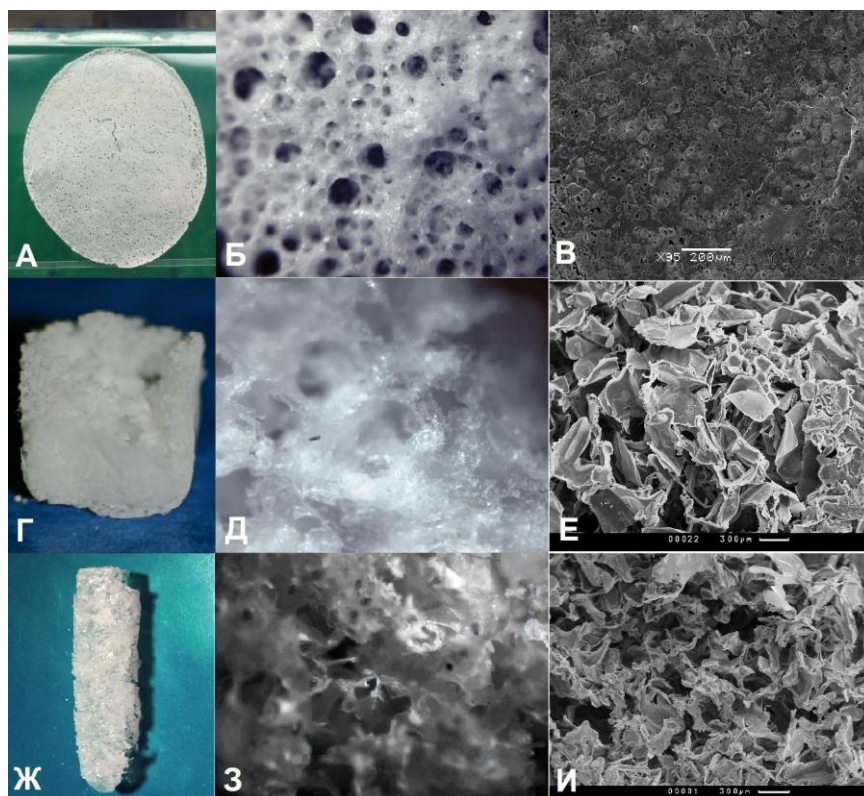


Рисунок 14. Пористые полимерные матрицы: тип I (А,Б,В), тип IIa (Г,Д,Е,), тип IIб (Ж,З,И). Общий вид (А,Г,Ж), световая микроскопия x10-15 (Б,Д,З), СЭМ (В,Е,И)

3.3.2. Проверка на остаточные соли

Проверка отмывочного раствора после отмывки матриц типа I не выявила изменений в кислотности среды, что дает основания говорить об незначительном количестве оставшихся в матрице кристаллов карбоната аммония.

Также пробы трехмерных матриц, полученных путем формования из раствора на основе 3D шаблона(IIa) с использованием рафинированного сахара и методом выщелачивания с использованием сахарозы (IIб), были исследованы на количество остаточных сахаров с помощью антронового метода. Доля остаточных сахаров в матрице типа IIa составила 7%, в матрице IIб - 14%.

3.3.3. Биосовместимость *in vitro*

Для оценки адекватности конструкции для применения в тканевой инженерии, все три типа пористых изделий были исследованы *n vitro*. Целью данного эксперимента было понять насколько полученные конструкции пригодны для использования в качестве подложек для культивирования культур клеток. Оценка проводилась с использованием линии фибробластов 3Т3.

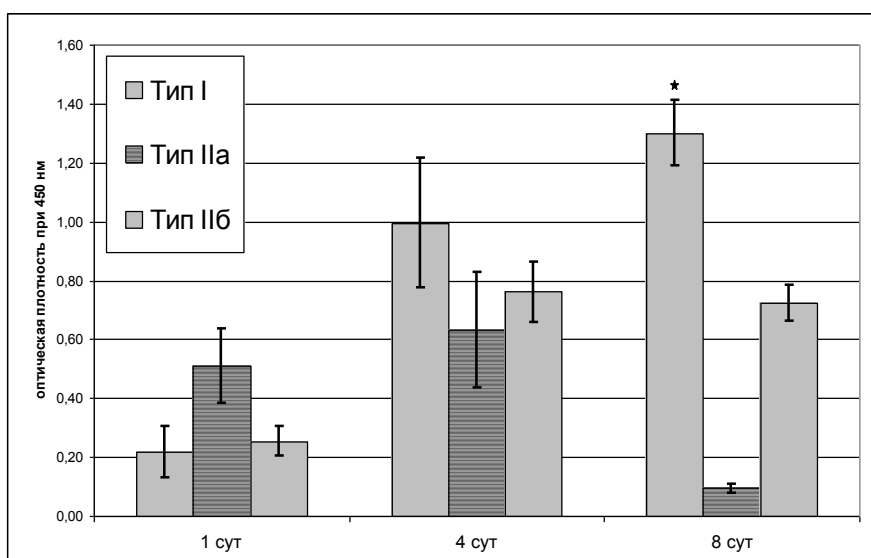


Рисунок 15. Адгезия и пролиферация клеток COS-1 на матриксах различных типов из ПОБ, ХТТ-тест: ПОБ, ПОБ+ПЭГ, ПОБ-ПЭГ. Данные были представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение, $p < 0.05$ ($n = 6$) [Жаркова И.И., 2012].

На рисунке ? видно, что из всех типов матриц, матрицы I типа обладают самыми высокими адгезивными свойствами (1 сут), и способны к поддержанию роста и пролиферации клеток, в то время как матрицы II а и б имеют данные показатели на более низком уровне.

Мы предполагаем, что причиной подобных различий является именно размер пор. Матрицы типа I имеют меньший размер пор, благодаря чему клетки имеют возможность прикрепляться и образовывать тяжи, а при наличии крупных пор такого процесса не происходит.

Murphy et al. [Murphy et al., 2010] изучали соотношение между размером пор биоинженерных конструкций и остеобластной активностью клеток. Они показали, что для первичного прикрепления необходима достаточная

поверхность, поэтому в приоритете маленький размер пор, но при этом, исследуя рост остеобластоподобных клеток, они сделали вывод, что лучший рост наблюдается при размере пор порядка 325 мкм. В работе [O'Brien F. J., 2005] показано, что остеобластоподобные клетки MC3T3-E1 лучше растут на конструкциях с размером пор 90 мкм, чем 150 мкм; Harley B. A. C. et al. [Harley B. A. C., 2008] изучали миграцию мышинных фибробластов NR6 в пористых матриксах и в их работе также наилучшие показатели имеют матриксы с размером пор около 90 мкм (при сравнении с порами 150 мкм). При изучении роста хондроцитов крысы [Lien S. M., 2009] авторы утверждают, что лучшая пролиферация и выработка белков внеклеточного матрикса наблюдалась у клеток, культивируемых на матриксах с размером пор от 250 до 500 мкм (в исследовании участвовали матриксы с размером пор от 50 до 500 мкм), а в работе [Wei J., 2011] Шванновские клетки предпочитали матриксы с размером пор 50-60 мкм. На основании анализа литературных данных нетрудно сделать вывод о том, что разным типам клеток подходят матриксы с разным размером пор. Данный вопрос о корреляции размера пор тканеинженерных конструкций, адгезивных и свойств и скоростью роста клеток не является однозначным и продолжает волновать исследователей. Что касается роста МСК, то в работе [Matsiko A., 2014] лучший рост наблюдается на матриксах с размером пор 300 мкм, чем 90 мкм, а в работе [Byrne E. M., 2008] на матриксах с размером пор 150 мкм, чем 90 мкм.

На основании полученных нами данных мы можем говорить о том, что лучший рост фибробластов COS-1 наблюдается на матриксах со средним размером пор около 100 мкм, что не противоречит литературным данным. Таким образом, результатом экспериментов по конструированию матриксов различной формы и их первичных исследований, стал вывод о нецелесообразности использования методов по изготовлению матриксов типа II по причине их чрезвычайной хрупкости и неудовлетворительных результатов оценки биосовместимости.

В итоге плоские пористые матриксы, изготавливаемые методом выщелачивания с использованием карбоната аммония были выбраны для дальнейшей работы.

3.4. Плоские пористые матриксы , полученные методом выщелачивания с использованием бикарбоната аммония

3.4.1. Структура плоских матриксов из различных материалов

Пористые скаффолды были изготовлены методом выщелачивания с использованием в качестве порога карбоната аммония, который при температуре разлагается на аммиак и углекислый газ и воду ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3 \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$). В горячей воде процесс газообразования происходит довольно активно, поэтому пористость достигается не только удалением соли с помощью растворения , но так же и благодаря деформациям, происходящим в полимере во время газообразования. При более подробном анализе пористости мы введем некоторые дополнительные термины: поры, которые образовывались в результате разрыва поверхности полимера, мы будем называть "разрывные поры", а складки полимера, которые также участвуют в создании шероховатости, мы будем именовать "лакуны". Также из-за особенностей процесса изготовления изделий, мы получаем две не совсем одинаковые поверхности - одну более гладкую, которую мы будем называть внутренней, т.к. технологически она соприкасается со стеклом, а другую более шероховатую, которую мы будем называть внешней.

Можно заметить, что разрывы полимера происходят менее активно в присутствии пластификатора ПЭГ(Таблица 13, Рисунок 16). В данном случае наблюдаются "разрывные" поры меньшего размера. Также при использовании ПЭГ мы наблюдаем уменьшение общей шероховатости , что является абсолютно логичным.

Полимер	Внешняя сторона, мкм		Внутренняя сторона, мкм		Пористость, %
	разрывные поры	лакуны	разрывные поры	лакуны	

ПОБ	102,8±37,3 [#]	215,4±137,0	7,2±3,9	43,1±14,9	87,1±7,1
ПОБ+ПЭГ	33,4±17,5*	100,3±52,7	6,8±5,2	52,5±26,4	75,1±16,0
ПОБ-ПОБ	15,6±5,2* [#]	105,2±73,9	4,7±3,3	37,8±13,5	69,0±12,3*

Таблица 13.Пористость и размер пор пористых плоских матриков из ПОБ и его производных, , n = 6,* p < 0.05 vs. ПОБ, # p < 0.05 vs. ПОБ+ПЭГ.

На рисунке 16 представлены микрофотографии внутренней и внешней сторон матриков в сравнении с бедренной костью крысы породы Wistar возрастом 2 недели. В данном образце кости размер пор внешней стороны трубчатого вещества составил 35,8±11,0 мкм; размер пор внутренней стороны трубчатого вещества 41,8 ±15,2 мкм, губчатого вещества 168,8 ± 54,8 мкм.

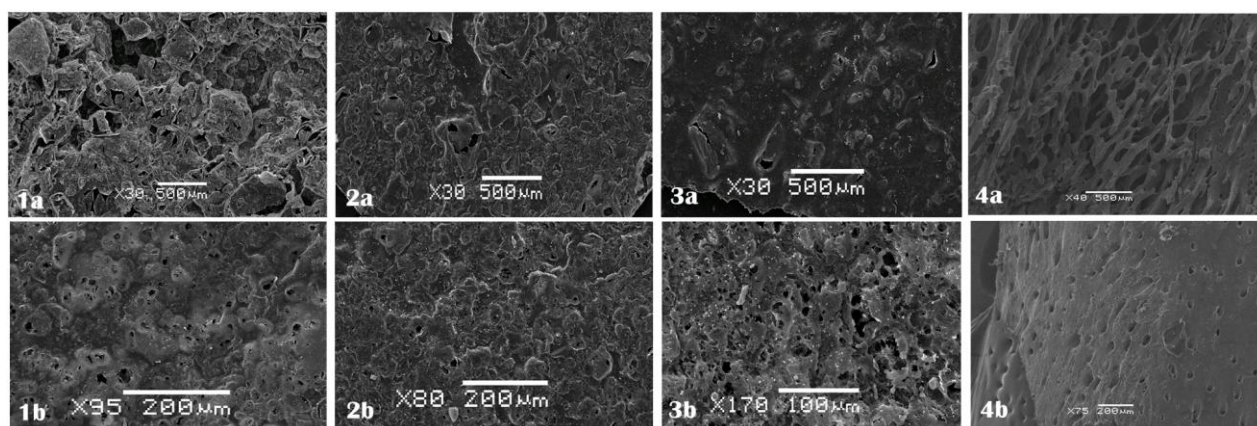


Рисунок 16. Электронные микрофотографии пористых матриков, полученных методом выщелачивания : 1- ПОБ, 2- ПОБ/ПЭГ, 3- ПОБ-ПЭГ, 4 -бедренная кость; а- внешняя сторона, б- внутренняя сторона.

Известно, что матриксы со средним размером пор от 20 до 1500 мкм находят применение в инженерии костной ткани [Pilliar et al., 1986; Williams et al., 2005]. При этом минимальный размер пор для значительного роста костной ткани составляет 75-100 мкм, а оптимальный 100-135 мкм [Klawitter et al., 1976]. В то же время множество исследователей говорят о целесообразности использования инженерных конструкций с размером пор около 300 мкм для создания оптимальных условий для остеогенеза и васкуляризации внутри самих конструкций [Matsiko A., 2014] .

Все полученные пористые плоские матриксы имеют размер пор подходящий для роста клеток (от 10 до 350 мкм), но оптимальный параметр

имеет сополимер ПОБ-ПЭГ со средним размером пор порядка 100 мкм . Средние данные по размерам диаметра пор всех полученных матриков приведены в таблице 13. Распределение пор по размерам двух разных сторон представлена на рисунке 17. Было отмечено, что большинство пор имеют размер от 20 до 150 мкм.

Можно отметить сходство в строении внешней стороны матрикса и губчатой кости , а также внутренней стороны матрикса и трубчатой кости.

Пористость матриков была рассчитана в соответствии с [Masaeli E., 2012] и представлена в таблице 13. Значительной разницы в пористости изделий, изготовленных из композита и сополимера, не наблюдалось, но по сравнению с гомополимером ПОБ, уменьшение пористости матрикса из сополимерного материала ПОБ-ПЭГ является статистически достоверным. Пористость костной ткани составляет около 80% для губчатой и около 10% [Вавилова Т. П., 2008] для трубчатой ткани, поэтому можно говорить о соответствии пористости полученных полимерных матриков и натуральной кости .

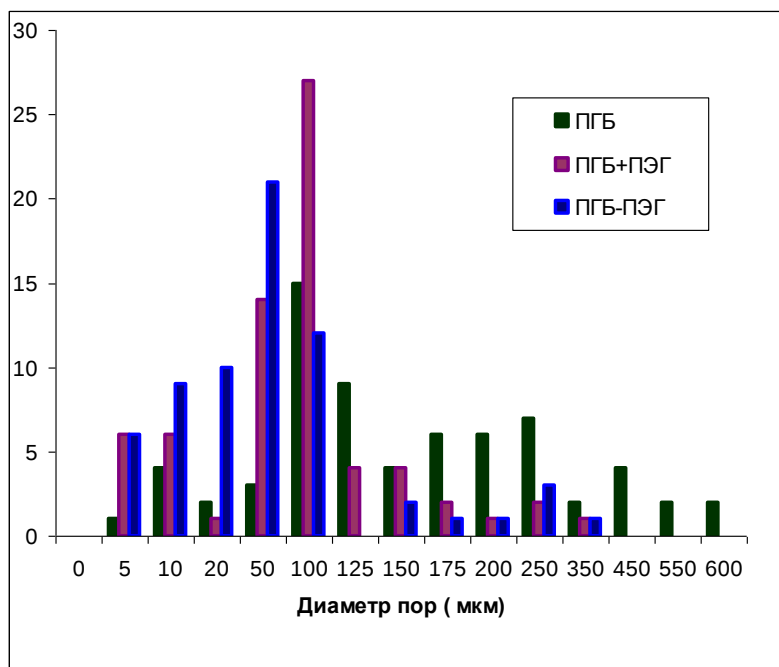


Рисунок 17. Распределение размеров пор трех типов плоских пористых матриков.

Данный метод позволяет получить плоские пористые структуры, одна сторона которых более гладкая, а другая более шероховатая. Добавление ПЭГ к полимеру в качестве композитной добавки уменьшает шероховатость

и размер пор, добавление мономеров этиленгликоля в полимерную цепь ПОБ также способствует уменьшению пористости получаемых каркасов.

3.4.2. Термические свойства плоских матриц

Анализ физико-термических свойств пористых матриц в сравнении с пленочными материалами был проведен для исследования влияния технологии изготовления матриц на данные характеристики.

Термограммы трех типов пористых матриц приведены на Рисунке 18, числовые данные в приведены в таблице 15. При сравнении с пленочными образцами (таблица 9), температура пика плавления практически не изменяется, а снижение температуры начала плавления наблюдается только при первом цикле нагрева - охлаждения. Во случае гомополимера и композита наблюдается увеличение кристалличности матриц, а кристалличность матриц из сополимера не изменяется.

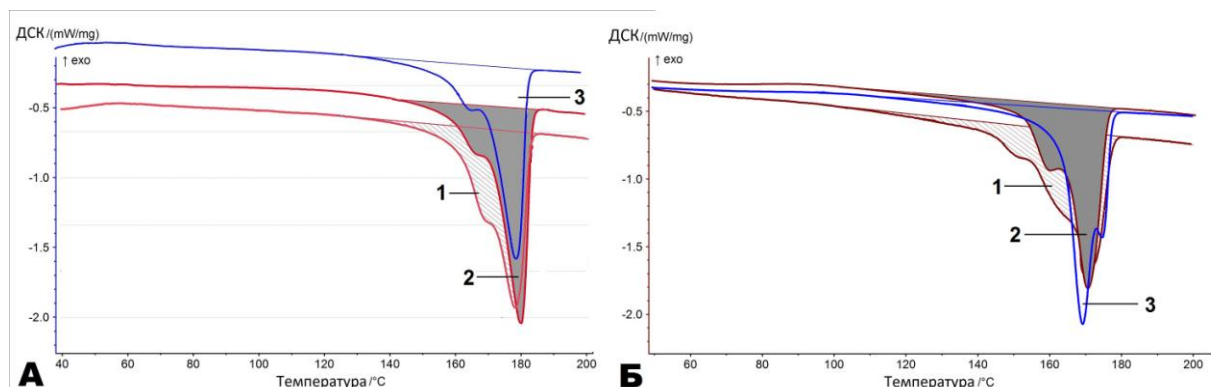


Рисунок 18. ДСК термограммы плоских пористых матриц из сополимеров: 1-ПОБ, 2-ПОБ+ПЭГ, 3-ПОБ-ПЭГ: А-первый нагрев, Б-второй нагрев.

Полимеры	Температура начала плавления, (t плав., °C)	Пик плавления, (t пик., °C ^к)	Энтальпия плавления (ΔH, Дж/г)	Кристалличность (X _c , %)	Температура начала плавления, (t плав., °C)	Пик плавления, (t пик., °C ^к)	Энтальпия плавления (ΔH, Дж/г)	Кристалличность (X _c , %)
I прогрев					II прогрев			
ПОБ	125	178,0	100,9	68,83	144,4	170	105,6	72,03
ПОБ+ПЭГ	140,1	179	101,7	99,10*	151,1	168	99,08	96,55*
ПОБ-ПЭГ	125	179	97,15	66,27	164	169	103,1	70,33

Таблица 14. Физико-термальные свойства пористых полимерных матриксов из ПОБ, ПОБ+ПЭГ и ПОБ-ПЭГ

***- кристалличность компонента ПОБ**

Изменение кристалличности может быть связано с изменением укладки ламелей полимера при воздействии высокой температуры (около 80-90°C) в процессе изготовления матриксов. Из литературы [Тагер А. А., 2007] известно, что одним из основных способов управления свойствами полимерных материалов является их термообработка, так как надмолекулярная структура полимера весьма чувствительна температуре. В связи с этим термическая обработка имеет большое значение, поскольку представляет возможность и условия для получения изделий, надмолекулярные структуры которых обеспечивают наилучшую износостойкость или достигается структурное состояние изделия обладающее оптимальным комплексом прочностных свойств. Кристалличность материала делает его прочным, но хрупким. Аморфные области придают полимерному материалу вязкость, то есть способность гнуться, не ломаясь при этом.

Таким образом, методика изготовления полимерных матриксов оказывает влияние на укладку полимерных нитей матриксов из гомополимера ПОБ и композита ПОБ/ПЭГ- приводит к повышению кристалличности, а значит прочности и хрупкости, что является не целевым, а сопутствующим явлением при использовании метода выщелачивания в представленной модификации. Отсутствие влияния температуры на сополимер ПОБ-ПЭГ может подчеркивать разницу в строении и укладке полимерных нитей сополимера ПОБ-ПЭГ и гомополимера.

3.4.3. Адсорбция белка

Результаты конфокальной микроскопии показали, что после инкубации в 0,1% растворе додецилсульфата натрия большая часть адсорбированного белка перешла в буфер (Рисунок 19). Для того, чтобы оценить относительное количество необратимо адсорбированного белка, было использовано

программное обеспечение ImageG 1.45s (США). Анализ изображений показал, что относительное количество белка, необратимо связывающегося с полимерным материалом, составляет 31,3%, 26,6%, 28,5% для ПОБ, ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ, соответственно (таблица 16), но достоверных различий не наблюдается.

С помощью спектрофотометрических данных и конфокальной микроскопии, мы смогли определить количество белка, адсорбированного на поверхности полимера. Это составило 82,3, 13,0 и 43,0 мкг белка на 1 мг полимера соответственно. Полученные результаты согласуются с литературными данными о том, что гидрофобная поверхность способствует адсорбции белка более эффективно, чем гидрофильная [Norde W., 1991], а также о том, что с увеличением гидрофобности поверхности материалы растут соотношение необратимой и обратимой составляющих адсорбционного слоя [Севастьянов В. И., 2011].

Полимер	Адсорбция белка, мкг/мг полимера	Необратимая адсорбция, %
ПОБ	82.3±9.6	31.3±5.6
ПОБ+ПЭГ	13.0±5.2*	26.0±4.7
ПОБ-ПОБ	43.0±8.7*	28.5±3.0

Таблица 15. Адсорбция БСА на полимерных скаффолдах, n = 6, * p < 0.05 vs. ПОБ.

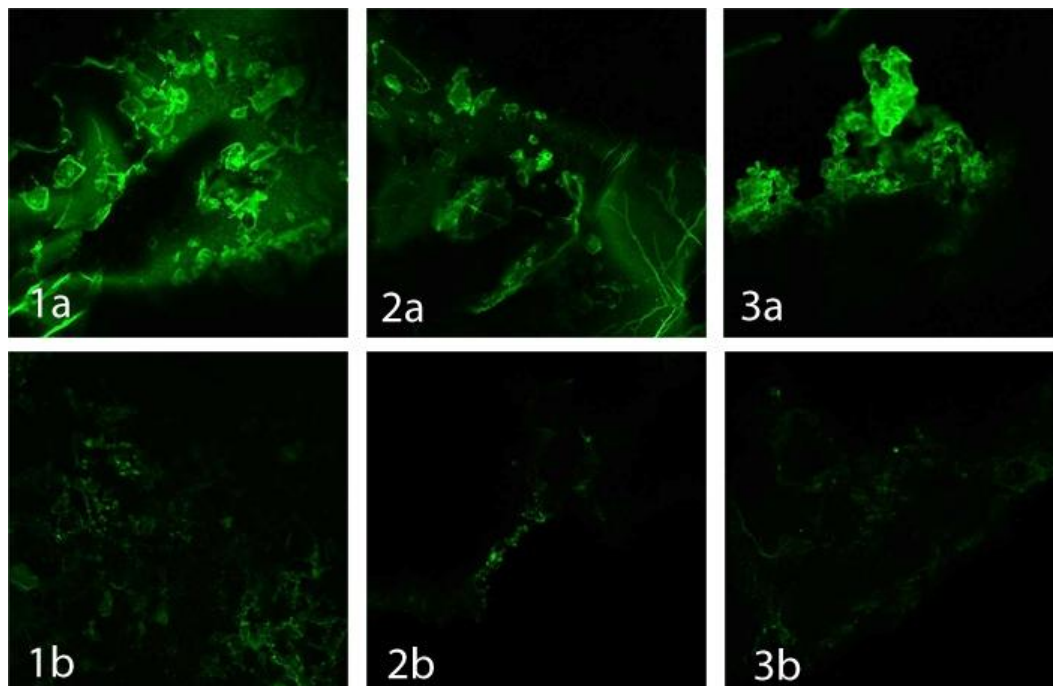


Рисунок 19. Адсорбция белка БСА-FITC на поверхности скаффолдов после 1 ч инкубации в PBS (a) и после 1 ч инкубации в растворе 0,1% SDS (b): 1- ПОБ, 2 - ПОБ+ПЭГ, 3- ПОБ-ПЭГ.

Также с помощью конфокального микроскопа LSM710 (Carl Zeiss, Германия) была построена 3D модель матрикса на основе ПОБ с адсорбированным FITC-меченым БСА (рис. 6). Благодаря этой модели мы можем представить истинную форму матрикса и увидеть, что адсорбция происходит равномерно по всей поверхности полимерной конструкции.

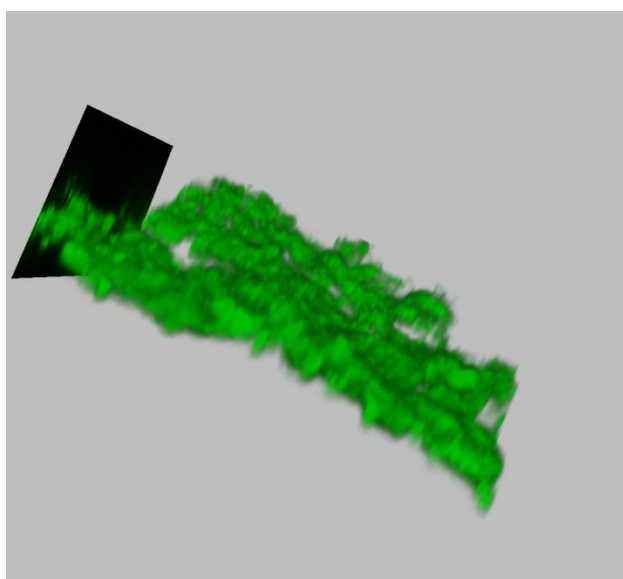


Рисунок 20. 3D модель матрикса на основе ПОБ с адсорбированным FITC-меченым БСА (Выполнено совместно с лабораторией оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН (Руководитель Феофанов А.В.))

3.4.4 Мезенхимальные стволовые клетки

Клетки получали из костного мозга 5-10 дневных крысят породы Wistar методом избирательной адгезии .

На третьем пассаже проводили фенотипирование клеток методом проточной цитометрии с использованием основных маркеров клеточной поверхности для МСК крысы [Harting et al., 2008]. Harting et al. показали, что МСК крысы сразу после выделения имеют фенотип CD 90(+) ~ 30%, CD 45(-) ~ 30 %, CD 11b/c(-) ~ 66%, CD 29(+) ~ 42% и к третьему пассажу приобретают фенотип CD 90(+), CD 45(-), CD 11b/c(-), CD 29(+) ≥ 95%.

По нашим данным, полученным для 3 пассажа используемых клеток, доля жизнеспособных клеток в популяции составила 95,8 % (7AAD), доля клеток CD 90(+)- 95%, CD 45(-) - 97,9 %, CD 11b/c(-) - 74%, CD 29(+) - 50% (рисунок 21). Может быть разница возникла из-за индивидуальных лабораторных условий, возраста крыс, отличного от используемых в вышеназванной работе или других объективных факторов.

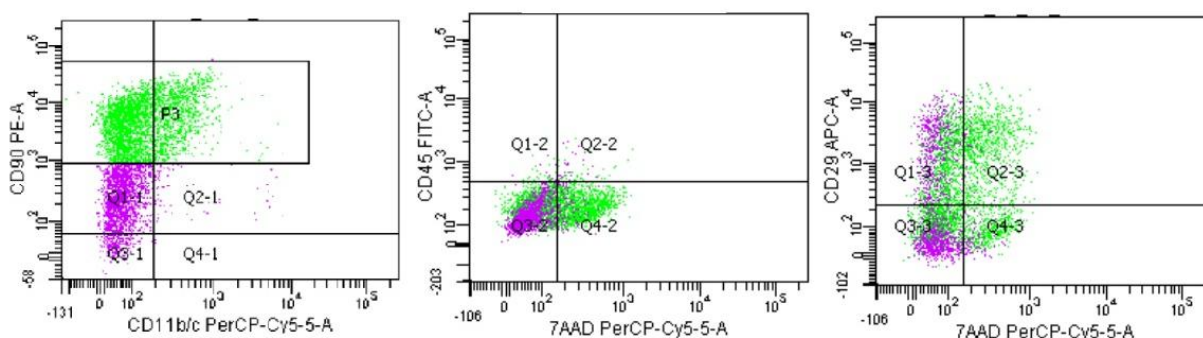


Рисунок 21. Фенотип мезенхимальных стволовых клеток , выделенных из костного мозга 7 -дневных крыс, 3 пассаж. (Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета)

При идентификации МСК любого вида (человек, крыса, мышь), обязательным является наличие поверхностного маркера CD 90, и отсутствие поверхностного маркера CD 45 [Harting M. T., 2008; Goodwin H. S, 2001; Schrepfer S., 2007].

Таким образом, мы можем с большой долей вероятности утверждать, что клетки, используемые в нашей работе, являются мезенхимальными стволовыми.

3.4.5. Биосовместимость пористых матриксов

Оценка полученных полимерных конструкций на биосовместимость, проводилась с помощью биохимического теста ХТТ на активность митохондрий. Мы определяли цитотоксичность матриксов, а также рост клеток на самих полимерных подложках.

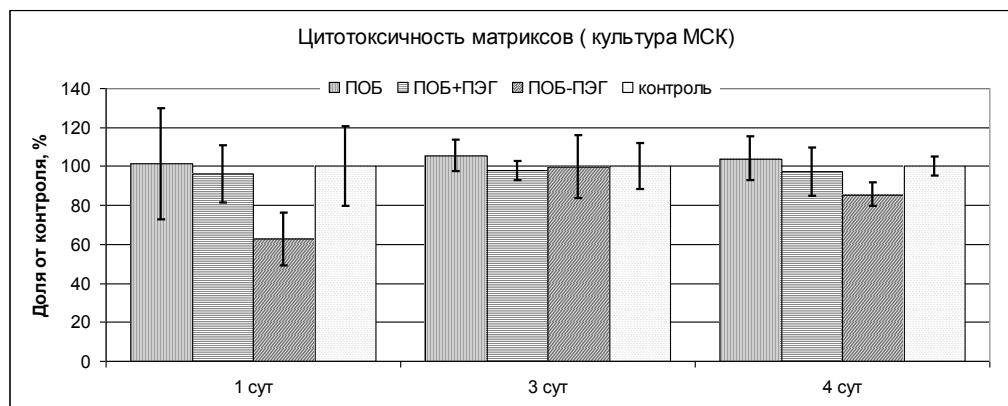


Рисунок 22. Цитотоксичность матриксов из ПОБ, ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ, культура МСК, $n = 6$, $*p < 0.05$ vs. ПОБ.

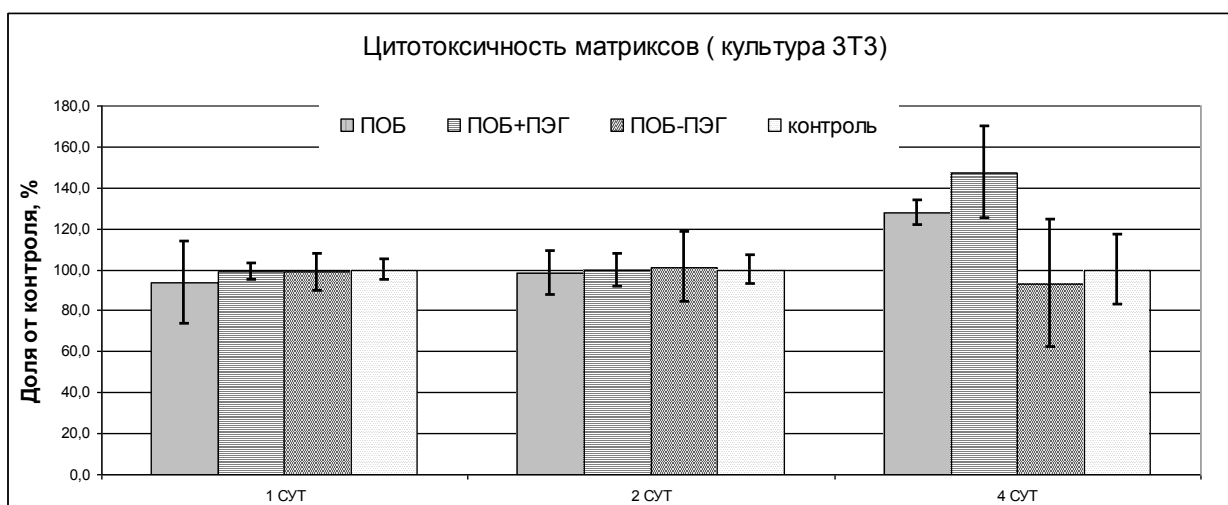


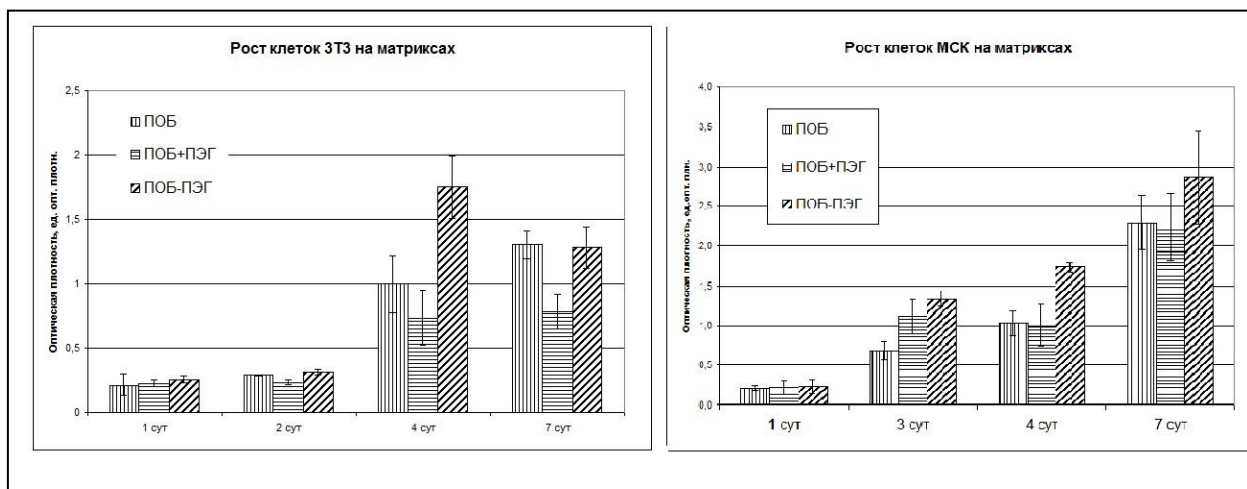
Рисунок 23. Цитотоксичность матриксов из ПОБ, ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ, культура фибробластов 3Т3, $n = 6$, $*p < 0.05$ vs. ПОБ.

На рисунках 22 и 23 представлены результаты исследования на цитотоксичность исследуемых матриксов на культуре фибробластов 3Т3 и на культуре мезенхимальных стволовых клеток.

Во всех случаях не наблюдалось значительных изменений в контрольных группах по сравнению с контролем. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии цитотоксичности исследуемых матриксов

для культуры фибробластов 3Т3 и для мезенхимальных стволовых клеток крысы.

Результаты экспериментов по изучению роста клеток на самих



подложках представлены на рисунке 24.

*

Рисунок 24. Рост клеток 3Т3 (слева) и МСК (справа) на полимерных пористых матриксах из ПОБ, ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ, $n = 6$, * $p < 0.05$ vs. ПОБ.

*

Полученные данные свидетельствуют о том, что матриксы из представленных материалов способны поддерживать рост клеточных культур. В случае с культурой фибробластов заметно медленное повышение количества активных клеток, что говорит об их росте, только на подложке из сополимера ПОБ-ПЭГ мы наблюдаем быстрый рост и затем снижение количества активных клеток скорее всего по причине образования монослоя и связанного с этим контактного ингибирования роста. В случае с МСК мы видим стабильный и более быстрый рост культуры на подложках. В данном случае также можно выделить матрикс из сополимера ПОБ-ПЭГ, показывающий более высокие средние значения активности клеток, но достоверно отличающиеся от остальных подложек лишь на сроке в четверо суток.

Таким образом, можно заключить, что данные виды полимерных пористых матриксов всех трех типов способны поддерживать клеточный рост на своей поверхности и могут быть использованы как подложки для изучения клеточных процессов.

Для визуализации и более конкретного понимания данного процесса были получены изображения клеток с помощью конфокальной и сканирующей электронной микроскопии (Рисунок 25 и 26).

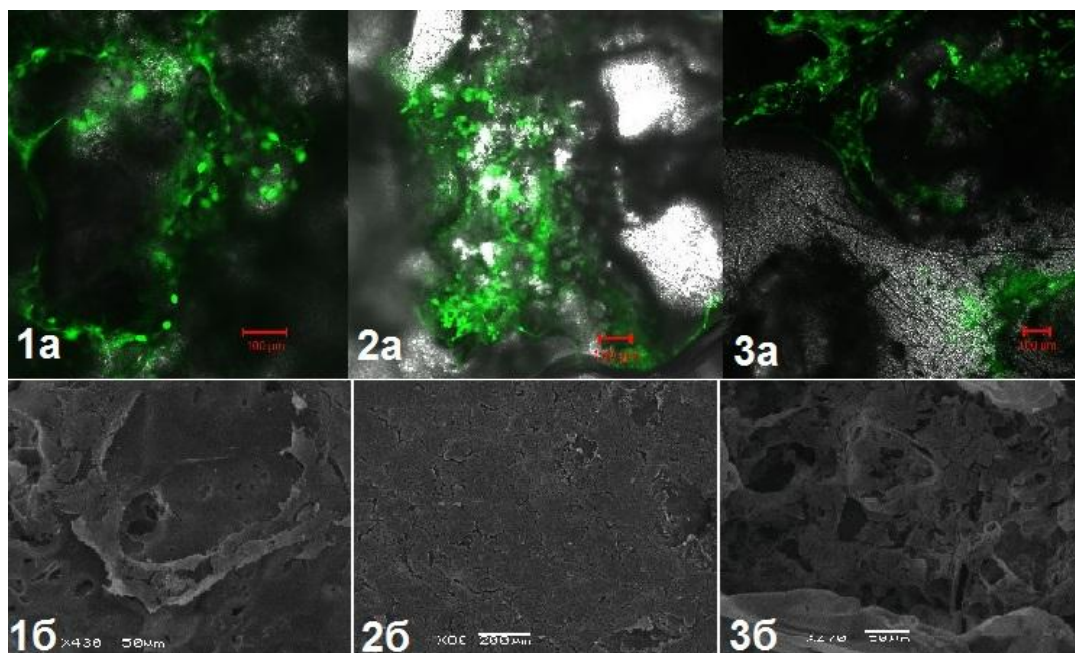


Рисунок 25. Рост клеток 3Т3 на матриксах: 1- ПОБ, 2-ПОБ/ПЭГ и 3- ПОБ-ПЭГ, (а)-конфокальная микроскопия, (б) - СЭМ. Фотографии сделаны на 5 день культивирования

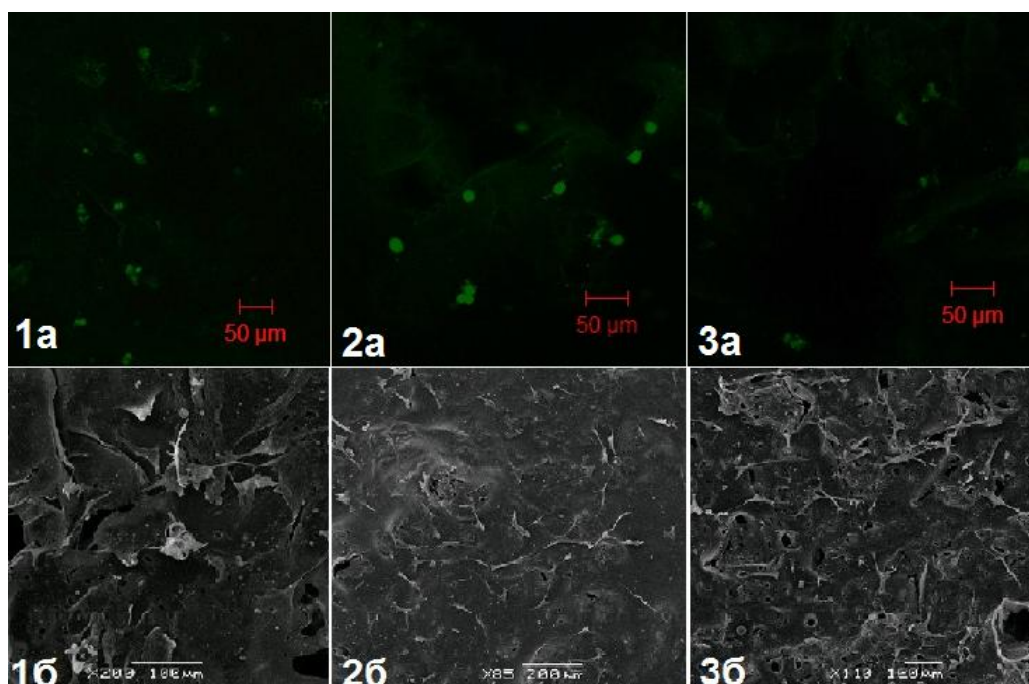


Рисунок 26. Рост МСК на матриксах: : 1- ПОБ, 2-ПОБ/ПЭГ и 3- ПОБ-ПЭГ, (а)-конфокальная микроскопия, (б) - СЭМ. Фотографии сделаны на 3 день культивирования.

На рисунках 25 и 26 видно, что клетки прикрепляются и распластываются по поверхности всех типов матриц. Это говорит о

хорошей адгезивной способности полимерных материалов и о том, что форма матриксов не препятствует, а даже стимулирует рост и пролиферацию клеток, причем как фибробластов, так и мезенхимальных стволовых клеток.

Также с помощью конфокального микроскопа была получена 3D - модель роста клеток в объеме (Рисунок 27), что является наглядным подтверждением роста клеток во всем объеме пористого матрикса.

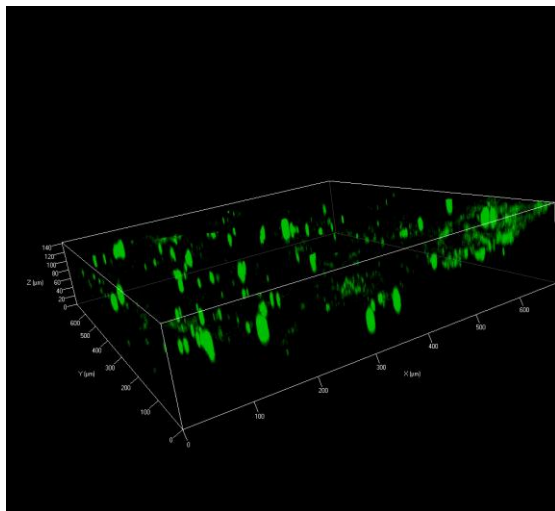


Рисунок 27. 3D- модель роста клеток МСК на пористом плоском полимерном матриксе из ПОБ.

3.4.6. Направленная остеогенная дифференцировка

Для изучения возможности применения данных полимерных структур в инженерии костной ткани, мы проводили исследование направленной дифференцировки МСК в остеогенном направлении при культивировании на наших полимерных конструкциях.

Способность МСК трансформироваться в остеобласты была открыта [Friedenstein et al., 1987]. На сегодняшний момент этот признак МСК является одним из постулатов их определения как мезенхимальных стволовых клеток. Использование МСК как предшественников остеобластов является перспективным направлением исследования при создании тканеинженерных конструкций [Деев Р. В., 2007]. Превращение МСК в остеобласты проходит в несколько этапов: пролиферация остеогенных клеток, выработка внеклеточного матрикса и его минерализация [Stein G. S., 1993]. Классическим способом индукции остеогенеза в условиях *in vitro* является инкубация МСК в среде, содержащей 0,1 мкМ дексаметазона, 10мМ β -глицерофосфата и 50 мМ аскорбиновой кислоты [Shakibaei M. et al., 2012]. Основными признаками происходящей остеодифференцировки является изменение морфологии клеток, выработка щелочной фосфатазы, выработка белков внеклеточного матрикса, минерализация матрикса [Pittenger M. F., 1999; Yoshikawa T., 1996; Caliarì S. R., 2014].

Изменения морфологии, происходящие с клетками при культивировании на культуральном пластике в остеогенной среде хорошо заметны в световой микроскоп (Рисунок 28): увеличивается число вакуолей и включений, ложноножки становятся более тонкими и вытянутыми. При окраске Ализариновым красным наблюдается увеличение солей кальция.

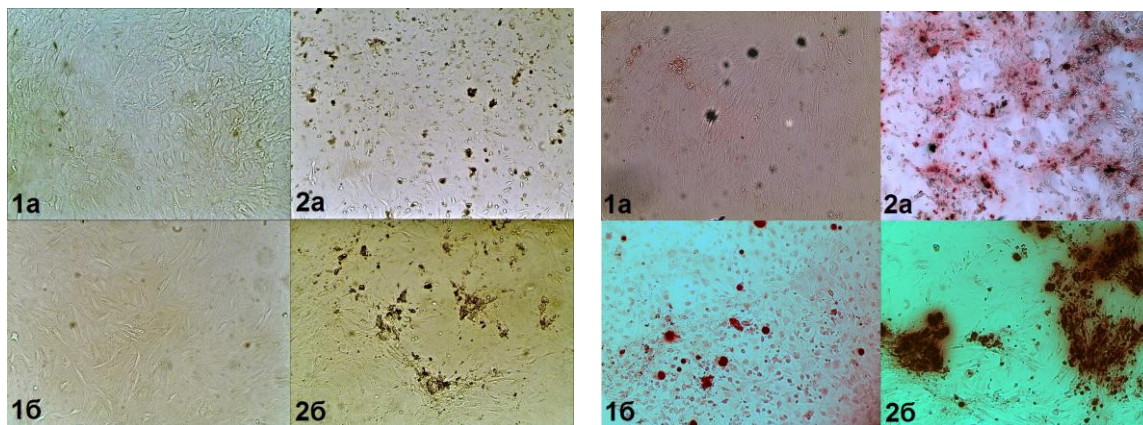


Рисунок 28. Образование солей и включений при культивировании МСК в остеогенной среде (2) по сравнению с обычной ростовой средой (1) . Фотографии сделаны на 14 (а) и на 21(б) день культивации: без окраски (слева) и окраска Ализариновым красным (справа).

3.4.6.1. Окраска ализариновым красным

В качестве визуального подтверждения дифференцировки в остеогенном направлении классическим красителем является Ализариновый красный (Puchtler H. et al., 1969). При окраске матриц мы **можем** наблюдать увеличение солей кальция (окрашиваются красным) при культивации в остеогенной среде (Рисунок 29 б) по сравнению с обычной средой (Рисунок 29 а).

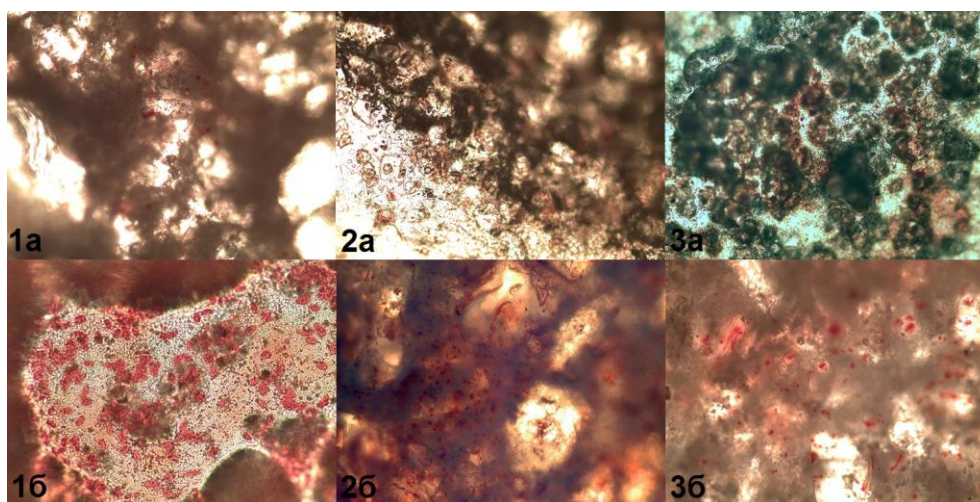


Рисунок 29. Окраска Ализариновым красным матриц из ПОБ(1), ПОБ+ПЭГ(2), ПОБ-ПЭГ(3). Культивация 14 суток в ростовой культуральной среде (а) и остеогенной среде(б).

3.4.6.2. Сканирующая электронная микроскопия

На рисунке 30 (А) представлены фотографии остеобластоподобных клеток из бедренной кости [Annaz B. et al., 2004]. Фотографии сделаны на 14 сутки культивации на различных типах гидроксиапатита. На том же рисунке (Б) представлена фотография МСК после 21 суток культивации на матриксе

из сополимера ПОБ-ПЭГ в остеогенной среде. Морфология данных клеток является сходной - неправильная треугольная форма, сильно вытянутые тонкие псевдоподии.

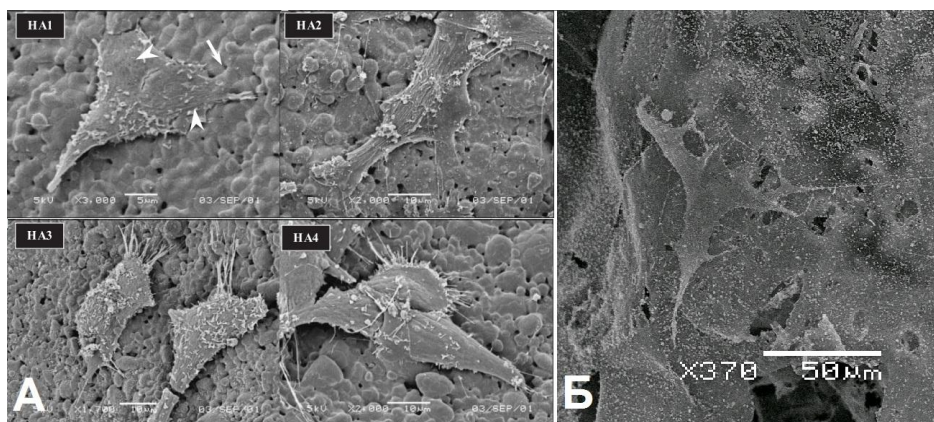


Рисунок 30. А - Остеобластоподобные клетки на 4 видах гидроксиапатита на 14 сутки культивирования [Appaz V. et al., 2004]; Б - мезенхимальная стволовая клетка на матриксе из ПОБ-ПЭГ на 21 сутки культивирования в остеогенной среде.

На рисунке 31 представлены МСК, культивируемые на матриксе из сополимера ПОБ-ПЭГ в обычной ростовой среде и в остеогенной среде.

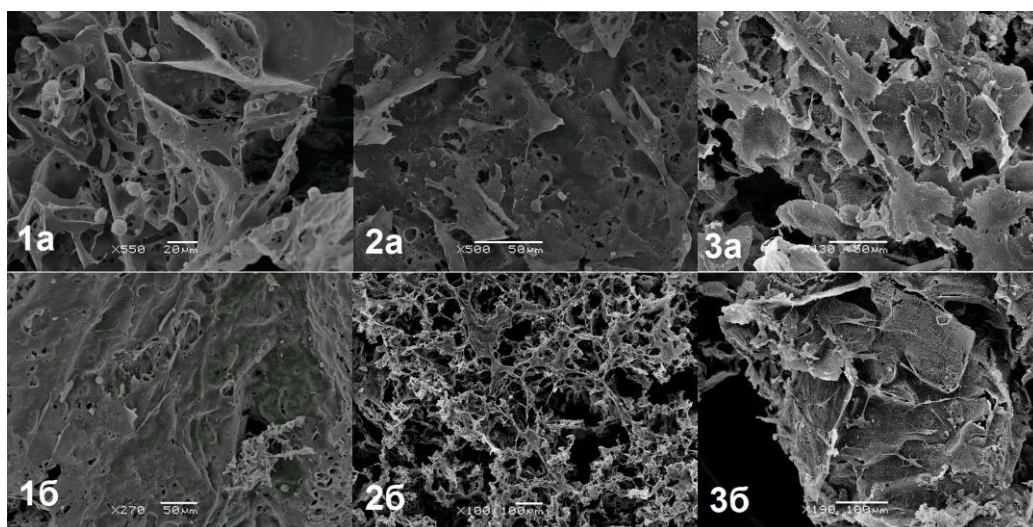


Рисунок 31. МСК, культивируемые на матриксе из сополимера ПОБ-ПЭГ в нормальной ростовой среде (а) и в остеогенной среде (б) на 7 (1), 14 (2) и 21 (3) сутки культивации.

На фотографиях видно, что клетки увеличиваются в количестве со временем и изменяют форму: само тело клетки становится больше, а псевдоподии более тонкими и длинными. Также при использовании данного метода исследования хорошо визуализируются минеральные отложения на

поверхности полимера, количество которых отчетливо увеличивается со временем (Рисунок 32).

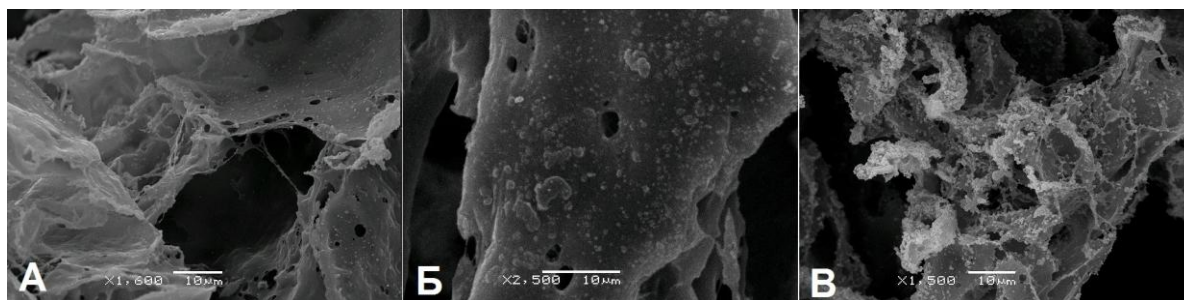


Рисунок 32. Минеральные отложения на матриксе из сополимера ПОБ-ПЭГ при культивировании в остеогенной среде на 7 (А), 14 (Б), 21 (В) сутки.

Из литературных данных [Coelho M. J., 2000] известно, что процесс изменения морфологии клеток является более ранним, а образование внеклеточного матрикса происходит на более поздних этапах дифференцировки. Наши данные (Рисунок 31 и 32) подтверждают это предположение.

3.4.6.3. Щелочная фосфатаза.

Изофермент щелочной фосфатазы присутствует на клеточной поверхности остеобластов. При увеличенном синтезе фермента клетками костной ткани повышается его количество в плазме крови, поэтому определение активности щелочной фосфатазы, является информативным показателем костного ремоделирования, а в нашем случае остеогенеза [Reddi A. H., 1980; Wang Y. W.; 2004].

При проведении дифференцировки МСК по остеогенному пути в условиях *in vitro* щелочная фосфатаза является одним из наиболее ярких маркеров данного процесса [Coelho M. J., 2000; Pittenger M. F., 1999]. Повышение её экспрессии в большинстве случаев наблюдается к 21 суткам инкубации в остеогенной среде [Caliari S. R., 2014].

На рисунке 33 видны изменения уровня щелочной фосфатазы в зависимости от сроков культивирования. У клеток, растущих в остеогенной среде на культуральном пластике, а также у клеток, растущих на

гомополимере и композите происходит повышение выработки щелочной фосфатазы к 21 суткам. Причем наиболее высокие значения наблюдаются у клеток, культивируемых на композитном материале ПОБ/ПЭГ в остеогенной среде.

При сравнении данных, полученных при культивировании в среде без остеогенных компонентов, наблюдается повышение уровня фермента у клеток, растущих на полимерных подложках. Таким образом, можно предположить наличие остеокондуктивных свойств у полимерных матриц. Клетки, растущие на сополимере ПОБ-ПЭГ не показывают никакого изменения экспрессии щелочной фосфатазы с течением времени.

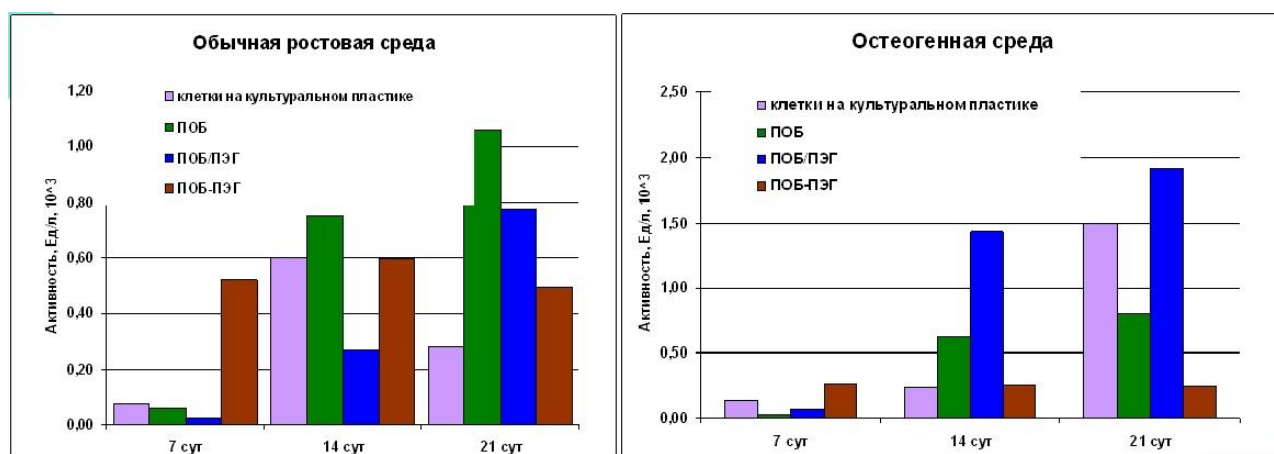


Рисунок 33. Экспрессия щелочной фосфатазы МСК, культивируемых на различных видах полимерных подложек в обычной ростовой(справа), а также в остеогенной среде(слева).

Это может быть связано с увеличением биоинертности полимерной поверхности, связанной с изменениями в расположении полимерных цепей, произошедших в ходе сополимеризации ПОБ с полиэтиленгликолем в процессе микробиологического биосинтеза.

Работы по увеличению биоинертности других природных полимеров, таких как белки и липиды, при их сополимеризации с ПЭГ описаны в литературе [Jevševar S., 2010].

3.4.6.4. Экспрессия поверхностных маркеров МСК

Для фенотипирования полученных из костного мозга крыс мезенхимальных стволовых клеток мы использовали несколько типичных поверхностных маркеров CD 90, CD 45, CD 11b ,CD 29. При исследовании

особенностей направленной дифференцировки МСК в остеогенном направлении при культивировании на полимерных подложках различного состава, мы решили пронаблюдать изменения, происходящие с данными поверхностными маркерами в этих условиях.

На рисунке 34 представлены графики изменения процентного содержания вышеуказанных рецепторов в зависимости от времени, питательной среды и вида подложки.

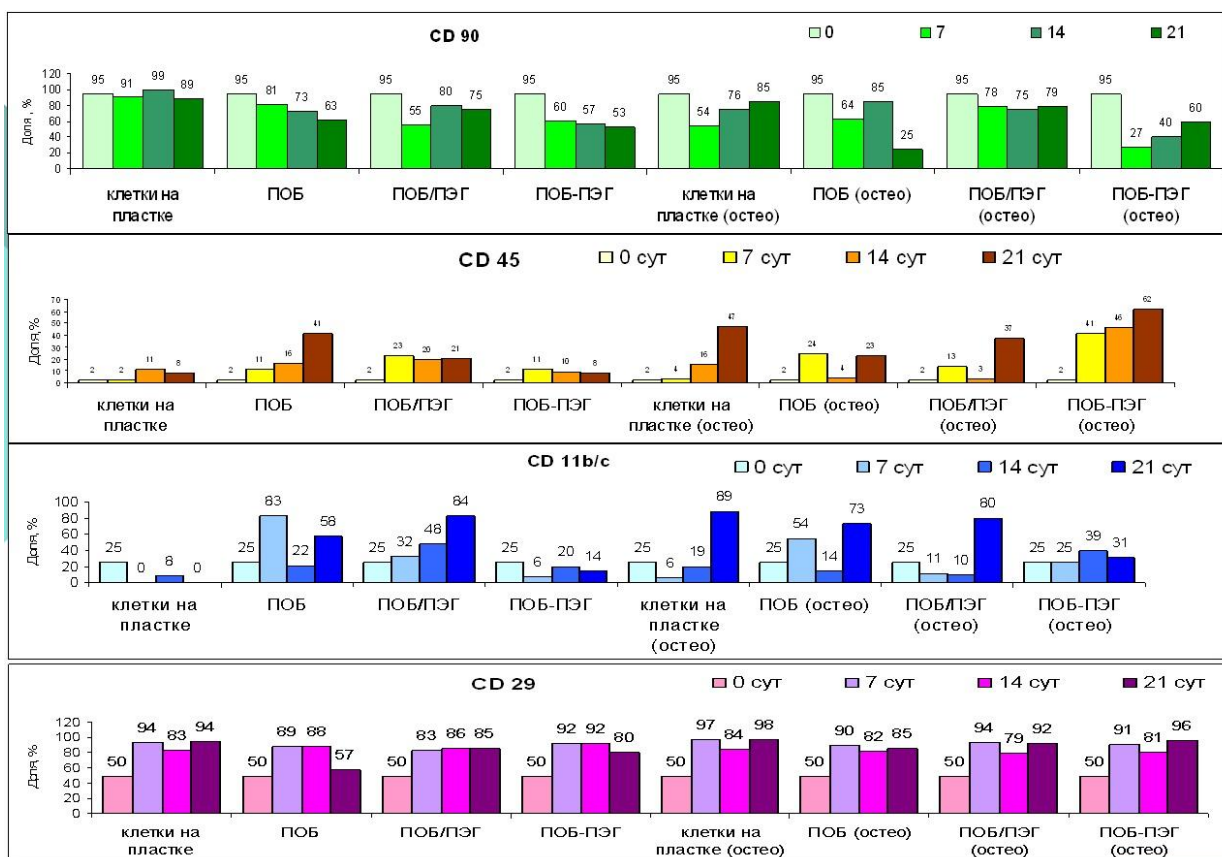


Рисунок 34. Изменение экспрессии поверхностных маркеров МСК при культивировании на пластике (кл), на матриксе из гомополимера (ПОБ), из композита (ПОБ/ПЭГ) и в нормальной ростовой среде (-) и в остеогенной среде (+) в течении 14 и 21 суток.

CD90 является белком клеточной адгезии, который детектируется у мезенхимальных стволовых клеток, а затем исчезает в процессе созревания. Его снижение при дифференцировке его в клетки костной ткани описаны в литературе [Chen X. D. et al., 1999; Wiesmann A. et al., 2006]. Наши результаты позволяют сделать вывод о его снижении со временем не зависимо от состава среды или подложки, причем наиболее резкое его

падение наблюдается у МСК на 21 сутки при культивировании в обычной ростовой среде, а также у клеток, культивируемых на матриксе из ПОБ в среде с остеогенными факторами.

CD45(общий лейкоцитарный антиген, L-CA, B220, T200, Ly-5, КФ3.1.3.48) - это гликопротеин, присутствующий на поверхности всех представителей кроветворных рядов, кроме зрелых эритроцитов. Он выполняет важную функцию в передаче сигнала внутрь клетки с Т-клеточного рецептора. CD 45 широко используется для фенотипирования мезенхимальных стволовых клеток как отрицательный показатель [Goodwin Н. S., 2001, Schrepfer S., 2007]. Наши результаты показывают, что со временем количество CD45 положительных клеток увеличивается во всех случаях кроме клеток, растущих на культуральном пластике в нормальной ростовой среде. Это может быть свидетельством того, что при отсутствии какого-то влияния, МСК не приобретают данный фенотип даже при довольно длительном культивировании.

CD11 относится к семейству белков, называемых интегринами . Они состоят из двух нековалентно ассоциированных субъединиц альфа и бета. Бета-субъединица представлена белками CD18 (интегрин бета-2). Альфа-субъединица - CD11 - может быть трех типов - CD11a , CD11b , CD11c , различающихся по аминокислотной последовательности Гетеродимеры CD11/CD18 участвуют в адгезии клетка-клетка и клетка-внеклеточный матрикс. CD11b участвует различных адгезионных взаимодействиях моноцитов, макрофагов, гранулоцитов, CD11c играет важную роль в межклеточных взаимодействиях во время процесса воспаления. Отмечено, что экспрессия CD11b и CD11c повышается под действием медиаторов воспаления .

Мы детектировали поверхностный маркер 11b/c для фенотипирования МСК, так как его экспрессия у недифференцированных клеток должна быть минимальной. При этом мы видели, что в нашей популяции доля клеток, несущий этот антиген составляла около 25%. Со временем количество

клеток, содержащих этот антиген на поверхности стало увеличиваться. Опять же кроме клеток, растущих на культуральном пластике в нормальной ростовой среде. Скорее всего это является свидетельством изменения фенотипа МСК и усиления контактов клетка-клетка и клетка - матрикс.

CD29 - относится к семейству интегринов, которые экспрессируются как на мезенхимальных стволовых клетках, так и на зрелых лейкоцитах [Ponzoni M., 2000]. Он участвует в адгезии клетка-клетка и клетка-внеклеточный матрикс. По нашим данным, его количество не изменяется со временем.

Основными критериями для идентификации мезенхимальных стволовых клеток являются следующие [Goodwin H. S., 2001; Harting M. T., 2008] :

- 1) избирательная адгезия к пластику,
- 2) возможность дифференцировки по остеогенному, хондрогенному и адипогенному путям,
- 3) экспрессия определенных поверхностных маркеров.

Одной из задач данной работы было исследовать возможность полученных матриксов поддерживать рост МСК, направленных по остеогенному пути дифференцировки. Для этого мы использовали определенные методы для оценки эффективности данного подхода.

Мы продемонстрировали, что морфология клеток, культивируемых на матриксах в остеогенной среде изменяется, что было показано с помощью сканирующей электронной микроскопии, клетки начинают образовывать внеклеточный матрикс, обогащенный солями кальция, что было показано как с помощью микрофотографий СЭМ, так и с помощью окраски классическим красителем на соли кальция Ализариновым красным.

Также клетки со временем начинали экспрессировать щелочную фосфатазу, которая является классическим биохимическим маркером образования новой кости. Причем клетки без остеогенной стимуляции,

растущие на плоской поверхности не демонстрировали такой феномен. Из этого можно сделать вывод, что матриксы сами по себе обладают остеокондуктивным действием. Более того, это предположение подтверждают данные проточной цитометрии. Мы видим, что изменения в экспрессии исследуемых поверхностных маркеров у таких клеток не наблюдаются, за исключением CD 90.

Нужно отметить, что значительной разницы в скорости дифференцировки в остеогенном направлении МСК на различных типах полимерных матриксов отмечено не было. Плоские пористые матриксы из гомополимера ПОБ, композита ПОБ+ПЭГ и сополимера ПОБ-ПЭГ, представленные в данной работе предполагается использовать в инженерии костной ткани.

3.4.7. Имплантация in vivo и тканевая реакция на мелких лабораторных животных.

Для исследования in vitro были выбраны матриксы из сополимера ПОБ-ПЭГ по причине новизны используемого материала, а также после удовлетворительных результатов при исследовании на биосовместимость in vitro.

Подкожная имплантация

Стерильные образцы пористого полимерного матрикса из сополимера ПОБ-ПЭГ имплантировали в 1-2 см от белой линии живота подкожно. Образцы исследовали на 7, 14, 30 и 60 сутки.

Результаты гистологического исследования представлены на рисунке ?. На 7-й день, наблюдалось увеличение притока крови к месту имплантации и начало формирования фиброзной капсулы. На 14 сутки воспалительная реакция сохранялась, видно значительное прорастание имплантата соединительной тканью и продолжение формирования фиброзной капсулы, оформление которой завершилось к 30 суткам. Её толщина составила 100-150

мкм. На 60 сутки видно прорастание матрикса соединительной тканью и еще большее оформление фиброзной капсулы.

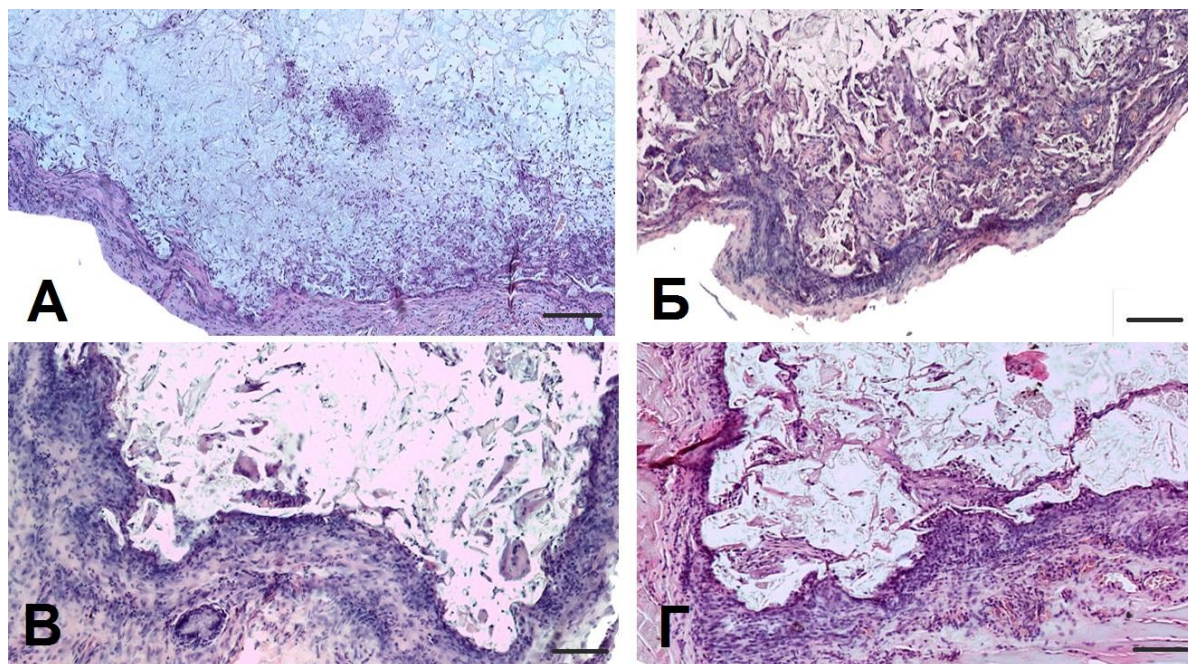


Рисунок 35. Гистологическое исследование матриксов из ПОБ-ПЭГ. Подкожная имплантация в области белой линии: 7 (А), 14(Б), 30 (В), 60(Г) сутки.; единичный отрезок - 100мкм.

Итак, при подкожной имплантации наблюдается наличие воспаления в первые недели имплантации и образование довольно оформленной фиброзной капсулы вокруг имплантата к 30 суткам имплантации. Такие результаты не являются удовлетворительными для рекомендации подкожного использования данного типа матриксов в тканевой инженерии.

Имплантация в костную ткань

Исследование проводилось на полугодовалых крысах линии Вистар.

В бедренной кости формировался несквозной дефект диаметром 1,5 мм и заполнялся пористым полимерным матриксом из сополимера ПОБ-ПЭГ. Основной задачей этого эксперимента было выяснить как макроорганизм будет реагировать на имплантацию в костную ткань пористого матрикса из сополимерного материала, полученного микробиологическим путем.

Образцы исследовали на 3, 7, 14, 40, 90 и 180 сутки. Гистологическая картина представлена на рисунке 36.

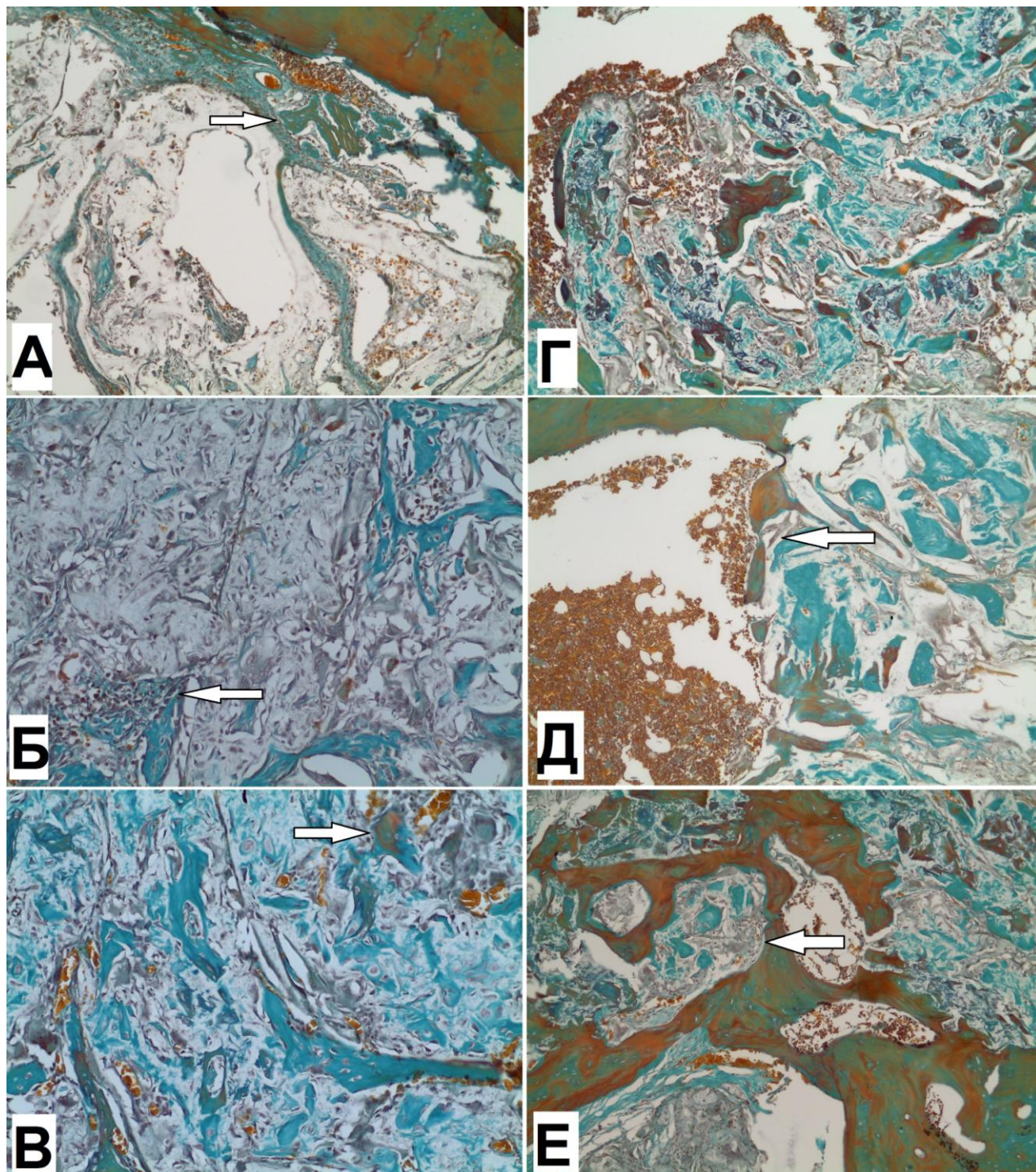


Рисунок 36. Гистологическое исследование матриксов из ПОБ-ПЭГ. Внутрикостная имплантация в бедренную кость : 3 (А), 7(Б), 14(В), 40(Г), 90 (Д) и 180 (Е) суток. Увеличение А,Г,Д,Е -x100; Б,В - x200.

На 3 сутки имплантации (Рисунок ? А) - видно компактную костную ткань(белое пространство это артефакт, который получается при пробоподготовке) и новую костную ткань. Голубая окраска - это коллаген I типа . Сформировавшая костная ткань выглядит островками; красные точки - это сосуды. Стрелкой указан островок костной ткани, который образовался

со стороны эндооста. Также видны другие маленькие островки, следовательно можно сказать, что процесс остеогенеза идет довольно

На 7 сутки видно большое количество гигантских клеток инородных тел(серые клетки), содержащих большое количество ядер (10-20). Эти клетки являются свидетельством гранулематозного воспаления (один из видов хронического воспаления - реакция на инородное тело). Также на этой фотографии можно видеть остеобласты в центре матрикса (обозначены стрелкой).

На 14 сутки можно видеть остециты- клетки внутри голубого коллагена, костные балки (голубые тяжи с оранжевыми разводами). Цвет окраски коллагена зависит от плотности его упаковки - более плотные скопления окрашиваются в оранжевый цвет, менее плотные - в голубой. Также здесь видна компактная костная ткань (обозначена стрелкой) - она тоже выглядит как голубые с оранжевым разводы. Хаотичный рост кости, отрывистые участки - это является особенностью роста кости именно в матриксе.

На 40 сутки мы видим в центре матрикса сформировавшуюся компактную костную ткань. Также наблюдаем большее (по сравнению с 14 сут) количество костных балок.

К 90 суткам количество балок сильно увеличивается. На данной фотографии виден переход от материнской кости к новообразованной (плотной) компактной костной ткани. Хорошо заметно отсутствие фиброзной капсулы на границе матрикс - костный мозг.

На 180 сутки мы наблюдаем замыкание костного дефекта. На фотографии видно, что новая кость выросла посередине матрикса, сместив его часть во внешнюю среду (полость кости обозначена стрелкой). То, что мы видим на данном этапе можно назвать сформированной губчатой тканью.

Основные выводы и подтверждения, которые можно сделать из данного гистологического исследования:

- Кость растет со стороны эндооста и со стороны сосудов, т.е. сосуды приносят с собой стволовые клетки и они дифференцируются в остеобласты и образуют костную ткань вокруг сосуда
- В образцах без матрикса кость образуется только с эндооста и она не растет внутрь
- Обычно иммунная реакция - это гигантские клетки и Т - лимфоциты, но тут нет Т- лимфоцитов, т.к. нет антигенов. Таким образом материал ведет себя как полностью биосовместимый
- Гранулематозное воспаление - вполне нормальная реакция на инородные тела
- В матриксах наблюдается хаотичный рост кости, эпицентры находятся равномерно по всей толще матрикса
- Отсутствует фиброзная капсула
- На 6 месяце заметно наличие полноценной костной ткани на месте матрикса. Замыкание дефекта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основным результатом проведенной работы явилась разработка плоского пористого биodeградируемого матрикса, основой которого является высокоочищенный сополимер поли-3-оксибутират-со-полиэтиленгликоль (ПОБ-ПЭГ), полученный методом микробиологического биосинтеза с включением звеньев этиленгликоля 0,33% по молярному содержанию в полимерной цепи. Данный сополимер обладает повышенными гидрофильными свойствами по сравнению с гомополимером ПОБ.

Исследования ультраплёнок этого материала доказали отличие в укладке полимерных нитей сополимера от гомополимера

Была показана высокая биосовместимость матрикса из ПОБ-ПЭГ, способность к адсорбции белка. По результатам изучения термо-химических свойств было обнаружено отсутствие влияние способа изготовления матрикса на кристалличность данного матрикса.

Положительные результаты культивирования мезенхимальных стволовых клеток костного мозга крыс и фибробластов мышцы линии 3T3 на матриксах из сополимера в условиях *in vitro* показали, что разработанные матриксы способны выполнять роль каркаса и поддерживать прикрепление и пролиферацию клеток.

Результаты исследований влияния матрикса на процесс остеогенной дифференцировки МСК говорят о биоинертности полимерной поверхности матрикса, вероятно связанной с особенностями укладки полимерных нитей в процессе микробиологического синтеза.

Результаты экспериментов *in vivo* на модели механических повреждений бедренной кости с использованием матрикса из биосинтетического сополимера доказали возможность применения матрикса как матрицы для роста остеобластоподобных клеток в объеме.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований (грант офи-м № 15-29-04856) и при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 15-15-10014).

ВЫВОДЫ

На основании проведенных исследований и полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Методом микробиологического биосинтеза с использованием штамма-продуцента *Azotobacter chroococcum* получены сополимеры ПОВ с полиэтиленгликолем и 3-оксивалератом совместно с полиэтиленгликолем, с 3-оксивалератом и с 3-окси-4-метилвалератом.
2. Сополимер ПОВ-ПЭГ является наиболее гидрофильным из полученных сополимеров, но менее гидрофильным, чем композит ПОВ/ПЭГ, имеет более низкое значение модуля Юнга, и относительное удлинение, чем ПОВ и ПОВ/ПЭГ, все матриксы не проявляют цитотоксических свойств.
3. Разработан метод получения пористых плоских матриксов из ПОВ-ПЭГ, ПОВ и ПОВ/ПЭГ с диаметром пор около 150 мкм.
4. Плоские пористые матриксы из сополимера ПОВ-ПЭГ обладают пористостью 69% и средним размером пор 100 мкм, кристалличность составляет порядка 70%, они способны к адсорбции белка на поверхности, причем доля необратимо адсорбированного белка составляет 28%. все матриксы не проявляют цитотоксических свойств.
5. Пористые матриксы из сополимера ПОВ-ПЭГ способны к поддержанию роста и пролиферации мезенхимальных стволовых клеток, а также фибробластов 3Т3.
6. Дифференцировка по остеогенному пути на матриксах из сополимерного материала ПОВ-ПЭГ происходит не так интенсивно, как на матриксах из гомополимера и композита.

7. Показана способность пористого матрикса из сополимера ПОб-ПЭГ поддерживать рост костной ткани в объеме в условиях *in vivo* при имплантации в бедренную кость крыс.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность Багрову Д.В., Жуйкову В.А за помощь в исследовании методом атомно-силовой микроскопии; Поташникову Д.м. за помощь в исследовании с использованием проточного цитометра FACS Aria SORP, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета; Мойсенович М.М. за любезно предоставленную клеточную культуру фибробластов 3T3 ; кафедре электронной микроскопии в лице заведующего Давидовича Н.Д. за помощь в работе с сканирующими электронными микроскопами, приобретенными за счет средств Программы развития Московского университета; Кудряшовой К.С. и Феофанову А.В. за помощь в исследовании с использованием конфокального микроскопа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бонарцев А. П. и др. Поли-3-оксибутират и биополимерные системы на его основе //Биомедицинская химия. – 2011. – Т. 57. – №. 4. – С. 374-391.
2. Бонарцев А. П., Бонарцева Г. А., Мышкина В. Л., Воинова В. В. и др. Биосинтез сополимера поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерат штаммом *azotobacter chroococcum* 7Б / // Acta Naturae (русскаяязычная версия). — 2016. — Т. 8, № 3(30). — С. 193–204.
3. Вавилова Т. П. Биохимия тканей и жидкостей полости рта //Москва. – 2008. – С. 9-40.
4. Волова Т. Г., Севастьянов В. И., Шишацкая Е. И. Полиоксикалканоаты-биоразрушаемые полимеры для медицины. – Красноярск : Группа компаний" Платина", 2006.
5. Деев Р. В., Исаев А. А., Кочиш А. Ю. Клеточные технологии в травматологии и ортопедии: пути развития //Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т. 2. – №. 4. – С. 18-30.
6. Жаркова И.И., Бонарцев А.П., Босхомджиев А.П., Ефремов Ю.М., Багров Д.В., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Иванов Е.А., Воинова В.В., Яковлев С.Г., Зернов А.Л., Филатова Е.В., Андреева Н.В., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В. Влияние модификации поли-3-оксибутирата полиэтиленгликолем на жизнеспособность клеток, культивируемых на полимерных пленках // Биомед. Хим.– 2012.– т. 58.– №5.– с. 579–591.
7. Залепугин Д. Ю. и др. Получение пористых полимерных материалов с использованием диоксида углерода в сверхкритическом состоянии //Сверхкритические флюиды: Теория и практика. – 2006. – Т. 1. – №. 2. – С. 36-48.
8. Мышкина В.Л., Иванов Е.А., Николаева Д.А., Махина Т.К., Бонарцев А.П., Филатова Е.В., Ружицкий А.О., Бонарцева Г.А. Биосинтез

сополимера поли-3-гидроксibuтирата-3-гидроксивалерата штаммом *Azotobacter chroococcum* 7Б. Прикладная биохимия и микробиология, 2010, том 46, № 3, с. 315–323.

9. Мышкина В.Л., Николаева Д.А., Махина Т.К., Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А. Влияние условий культивирования на молекулярную массу поли-3-гидроксibuтирата, синтезируемого *Azotobacter chroococcum* 7 Б. Прикладная биохимия и микробиология, 2008, Т.44, № 5, с. 533 – 538.

10. Рафиков С. Р. и др. Введение в физико-химию растворов полимеров. – 1978.

11. Севастьянов В. И., Кирпичникова М. Т. Биосовместимые материалы //М.:«МИА. – 2011.

12. Тагер А. А. Физико-химия полимеров. – Рипол Классик, 2007.

13. Хенч Л., Джонс Д. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей, Техносфера, Москва, 2007

14. Abe H., Doi Y. Structural effects on enzymatic degradabilities for poly [(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymers //International Journal of Biological Macromolecules. – 1999. – Т. 25. – №. 1. – С. 185-192.

15. Akutsu T., Dreyer B., Kolff W. J. Polyurethane artificial heart valves in animals //Journal of applied physiology. – 1959. – Т. 14. – №. 6. – С. 1045-1048

16. Altman L. K. Who goes first?: the story of self-experimentation in medicine. – Univ of California Press, 1987.

17. Alvarez H. M., Kalscheuer R., Steinbüchel A. Accumulation of storage lipids in species of *Rhodococcus* and *Nocardia* and effect of inhibitors and polyethylene glycol //Lipid/Fett. – 1997. – Т. 99. – №. 7. – С. 239-246.

18. Annaz B. et al. Porosity variation in hydroxyapatite and osteoblast morphology: a scanning electron microscopy study //Journal of Microscopy. – 2004. – Т. 215. – №. 1. – С. 100-110.

19. Atala A L and Lanza R P 2002 *Methods of Tissue Engineering* (San Diego, CA: Academic) [неправильная ссылка](#)

20. Bagrov D. V. et al. Study of lamellae of a recombinant spider-web protein by atomic force microscopy //Biophysics. – 2011. – T. 56. – №. 1. – C. 3-7.
21. Berwig K. H., Baldasso C., Dettmer A. Production and characterization of poly (3-hydroxybutyrate) generated by *Alcaligenes latus* using lactose and whey after acid protein precipitation process //Bioresource Technology. – 2016. – T. 218. – C. 31-37.
22. Bonartsev A. et al. The terpolymer produced by *Azotobacter chroococcum* 7B: effect of surface properties on cell attachment //PloS one. – 2013a. – T. 8. – №. 2. – C. e57200.
23. Bonartsev A. P. et al. Cell attachment on poly (3-hydroxybutyrate)-poly (ethylene glycol) copolymer produced by *Azotobacter chroococcum* 7B //BMC biochemistry. – 2013b. – T. 14. – №. 1. – C. 1.
24. Borden M. et al. Tissue engineered microsphere-based matrices for bone repair:: design and evaluation //Biomaterials. – 2002. – T. 23. – №. 2. – C. 551-559.
25. Byrne E. M. et al. Gene expression by marrow stromal cells in a porous collagen–glycosaminoglycan scaffold is affected by pore size and mechanical stimulation //Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2008. – T. 19. – №. 11. – C. 3455-3463.
26. C. M Murphy, M. G. Haugh and F. J. O'Brien. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 31.3,461-466 (2010)
27. Caliarì S. R., Harley B. A. C. Structural and biochemical modification of a collagen scaffold to selectively enhance MSC tenogenic, chondrogenic, and osteogenic differentiation //Advanced healthcare materials. – 2014. – T. 3. – №. 7. – C. 1086-1096.
28. Caplan A. I. Mesenchymal stem cells //Journal of orthopaedic research. – 1991. – T. 9. – №. 5. – C. 641-650.

29. Carew E. O. et al. Properties of materials //Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. Elsevier Academic Press, Oxford. – 2004. – C. 23-32.
30. Central Venous Catheters, Edited by Helen Hamilton and Andrew R. Bodenham 2009 John Wiley & Sons, Ltd. ISBN: 978-0-470-01994-8
31. Chan C.-M., Li L. Direct Observation of the Growth of Lamellae and Spherulites by AFM // Advances in Polymer Science.–2005.– Vol.188.– p. 1-41
32. Chan R. T. H. et al. Poly (ethylene glycol) - modulated cellular biocompatibility of polyhydroxyalkanoate films //Polymer International. – 2013. – T. 62. – №. 6. – C. 884-892.
33. Chen R. R., Mooney D. J. Polymeric growth factor delivery strategies for tissue engineering //Pharmaceutical research. – 2003. – T. 20. – №. 8. – C. 1103-1112.
34. Chen X. D. et al. Thy-1 Antigen Expression by Cells in the Osteoblast Lineage //Journal of Bone and Mineral Research. – 1999. – T. 14. – №. 3. – C. 362-375.
35. Cheng G., Cai Z., Wang L. Biocompatibility and biodegradation of poly (hydroxybutyrate)/poly (ethylene glycol) blend films //Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2003. – T. 14. – №. 12. – C. 1073-1078.
36. Coelho M. J., Fernandes M. H. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, β -glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation //Biomaterials. – 2000. – T. 21. – №. 11. – C. 1095-1102.
37. Cooke M. N. et al. Use of stereolithography to manufacture critical - sized 3D biodegradable scaffolds for bone ingrowth //Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. – 2003. – T. 64. – №. 2. – C. 65-69.
38. Dawes E. A., Senior P. J. The role and regulation of energy reserve polymers in micro-organisms //Advances in microbial physiology. – 1972. – T. 10. – C. 135-266.

39. Deschamps A. A. et al. Design of segmented poly (ether ester) materials and structures for the tissue engineering of bone //Journal of controlled release. – 2002. – T. 78. – №. 1. – C. 175-186.
40. Dominici M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement //Cytotherapy. – 2006. – T. 8. – №. 4. – C. 315-317.
41. Dunn A. S., Campbell P. G., Marra K. G. The influence of polymer blend composition on the degradation of polymer/hydroxyapatite biomaterials //Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2001. – T. 12. – №. 8. – C. 673-677.
42. Dutta Roy T. et al. Performance of hydroxyapatite bone repair scaffolds created via three - dimensional fabrication techniques //Journal of biomedical materials research Part A. – 2003. – T. 67. – №. 4. – C. 1228-1237.
43. El-Hadi A. et al. Correlation between degree of crystallinity, morphology, glass temperature, mechanical properties and biodegradation of poly (3-hydroxyalkanoate) PHAs and their blends //Polymer testing. – 2002. – T. 21. – №. 6. – C. 665-674.
44. Foong C. P. et al. Whole genome amplification approach reveals novel polyhydroxyalkanoate synthases (PhaCs) from Japan Trench and Nankai Trough seawater //BMC microbiology. – 2014. – T. 14. – №. 1. – C. 1.
45. Foster L. J. R. Biosynthesis, properties and potential of natural-synthetic hybrids of polyhydroxyalkanoates and polyethylene glycols //Applied microbiology and biotechnology. – 2007. – T. 75. – №. 6. – C. 1241-1247.
46. Foster L. J. R. Biosynthesis, properties and potential of natural-synthetic hybrids of polyhydroxyalkanoates and polyethylene glycols //Applied microbiology and biotechnology. – 2007. – T. 75. – №. 6. – C. 1241-1247.
47. Foster L. J. R. et al. A natural-synthetic hybrid copolymer of polyhydroxyoctanoate-diethylene glycol: biosynthesis and properties //Polymer. – 2005. – T. 46. – №. 17. – C. 6587-6594.

48. Foster L. J. R. PEGylation and bioPEGylation of polyhydroxyalkanoates: synthesis, characterisation and applications. – INTECH Open Access Publisher, 2010.
49. Freier T. et al. In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patch based on poly (3-hydroxybutyrate) //Biomaterials. – 2002. – T. 23. – №. 13. – C. 2649-2657.
50. Friedenstein A. J., Chailakhjan R. K., Lalykina K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea - pig bone marrow and spleen cells //Cell Proliferation. – 1970. – T. 3. – №. 4. – C. 393-403.
51. Friedenstein A. J., Chailakhyan R. K., Gerasimov U. V. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers //Cell proliferation. – 1987. – T. 20. – №. 3. – C. 263-272.
52. Gantenbein-Ritter B. et al. Confocal imaging protocols for live/dead staining in three-dimensional carriers //Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols. – 2011. – C. 127-140.
53. Ge Z. et al. Hydroxyapatite–chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes //Biomaterials. – 2004. – T. 25. – №. 6. – C. 1049-1058. нет цитаты в тексте
54. Ge Z., Jin Z., Cao T. Manufacture of degradable polymeric scaffolds for bone regeneration //Biomedical Materials. – 2008. – T. 3. – №. 2. – C. 022001.
55. Gizdavic - Nikolaidis M. et al. Electrospun functionalized polyaniline copolymer - based nanofibers with potential application in tissue engineering //Macromolecular bioscience. – 2010. – T. 10. – №. 12. – C. 1424-1431.
56. Godbole S. et al. Preparation and characterization of biodegradable poly-3-hydroxybutyrate–starch blend films //Bioresource technology. – 2003. – T. 86. – №. 1. – C. 33-37.
57. Goodwin H. S. et al. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers //Biology of Blood and Marrow Transplantation. – 2001. – T. 7. – №. 11. – C. 581-588.

58. Goodwin H. S. et al. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers //Biology of Blood and Marrow Transplantation. – 2001. – T. 7. – №. 11. – C. 581-588.
59. Gross R. A. et al. The biosynthesis and characterization of poly (β -hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas oleovorans* //Macromolecules. – 1989. – T. 22. – №. 3. – C. 1106-1115.
60. Habibovic P. et al. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials //Biomaterials. – 2005. – T. 26. – №. 17. – C. 3565-3575.
61. Hai Li, Feng Zhang, Yi Zhang, et al. Peptide Diffusion and Self-Assembly in Ambient Water Nanofilm on Mica Surface J. Phys. Chem. B, Vol. 113, No. 26, 2009 doi: 10.1021/jp903446g
62. Handrick R. et al. The “intracellular” poly (3-hydroxybutyrate)(PHB) depolymerase of *Rhodospirillum rubrum* is a periplasm-located protein with specificity for native PHB and with structural similarity to extracellular PHB depolymerases //Journal of bacteriology. – 2004. – T. 186. – №. 21. – C. 7243-7253.
63. Harley B. A. C. et al. Microarchitecture of three-dimensional scaffolds influences cell migration behavior via junction interactions //Biophysical journal. – 2008. – T. 95. – №. 8. – C. 4013-4024.
64. Harris J. M., Chess R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals //Nature reviews Drug discovery. – 2003. – T. 2. – №. 3. – C. 214-221.
65. Harris Milton J. Introduction to biotechnical and biomedical applications of poly (ethylene glycol) //Poly (ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications. New York: Plenum. – 1992. – C. 1-14.
66. Harting M. T. et al. Immunophenotype characterization of rat mesenchymal stromal cells //Cytotherapy. – 2008. – T. 10. – №. 3. – C. 243-253.

67. Heidemann W. et al. Degradation of poly (D, L) lactide implants with or without addition of calciumphosphates in vivo //Biomaterials. – 2001. – T. 22. – №. 17. – C. 2371-2381.
68. Hollinger J. O. et al. (ed.). Bone tissue engineering. – CRC press, 2004.
69. Hollister S. J., Maddox R. D., Taboas J. M. Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints //Biomaterials. – 2002. – T. 23. – №. 20. – C. 4095-4103.
70. Holmes P. A. Applications of PHB-a microbially produced biodegradable thermoplastic //Physics in technology. – 1985. – T. 16. – №. 1. – C. 32.
71. <http://circulatenews.org/2015/09/a-new-way-to-make-plastic/>
72. <http://www.cnet.com/news/micromidas-to-test-sludge-to-plastic-tech/>
73. Huang M. H. et al. Degradation and cell culture studies on block copolymers prepared by ring opening polymerization of ϵ - caprolactone in the presence of poly (ethylene glycol) //Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2004. – T. 69. – №. 3. – C. 417-427.
74. Huang Y. C. et al. Fabrication and in vitro testing of polymeric delivery system for condensed DNA //Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2003. – T. 67. – №. 4. – C. 1384-1392.
75. Hughes L., Richardson K.R. Fermentation process. 1981. European Patent N 46,344.
76. Hutmacher D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage //Biomaterials. – 2000. – T. 21. – №. 24. – C. 2529-2543.
77. Hutmacher D. W., Schantz T. Iwan Zein, Kee Woei Ng, Swee Hin Teoh, and Kim Cheng Tan. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling //Journal of Biomedical Materials Research. – 2001. – T. 55. – №. 2. – C. 203-216.

78. Hutmacher D. W., Sittering M., Risbud M. V. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems //TRENDS in Biotechnology. – 2004. – T. 22. – №. 7. – C. 354-362.
79. Innocentini - Mei L. H., Bartoli J. R., Baltieri R. C. Mechanical and thermal properties of poly (3 - hydroxybutyrate) blends with starch and starch derivatives //Macromolecular Symposia. – WILEY - VCH Verlag, 2003. – T. 197. – №. 1. – C. 77-88.
80. ISO U. 62: 2008, Plastics //Determination of water absorption. – 2008.
81. Jagur-Grodzinski J. Biomedical application of functional polymers //Reactive and Functional Polymers. – 1999. – T. 39. – №. 2. – C. 99-138.
82. Javazon E. H. et al. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single - cell - derived colonies than human marrow stromal cells //Stem cells. – 2001. – T. 19. – №. 3. – C. 219-225.
83. Jendrossek D. Microbial degradation of polyesters: a review on extracellular poly (hydroxyalkanoic acid) depolymerases //Polymer degradation and stability. – 1998. – T. 59. – №. 1. – C. 317-325.
84. Jevševar S., Kunstelj M., Porekar V. G. PEGylation of therapeutic proteins //Biotechnology journal. – 2010. – T. 5. – №. 1. – C. 113-128.
85. Jung H. D. et al. Novel strategy for mechanically tunable and bioactive metal implants //Biomaterials. – 2015. – T. 37. – C. 49-61.
86. Khanna S., Srivastava A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates //Process Biochemistry. – 2005. – T. 40. – №. 2. – C. 607-619.
87. Kim O. Biological effects of poly (ethylene glycol) on the microbial poly (β -hydroxyalkanoates) produced by pseudomonads microorganisms //Journal of Polymer Research. – 2000. – T. 7. – №. 2. – C. 91-96.
88. Klawitter J. J. et al. An evaluation of bone growth into porous high density polyethylene //Journal of biomedical materials research. – 1976. – T. 10. – №. 2. – C. 311-323.

89. Kode J. A. et al. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration //Cytotherapy. – 2009. – T. 11. – №. 4. – C. 377-391.
90. Kokubo T., Kim H. M., Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties //Biomaterials. – 2003. – T. 24. – №. 13. – C. 2161-2175.
91. Kopen G. C., Prockop D. J., Phinney D. G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1999. – T. 96. – №. 19. – C. 10711-10716.
92. Lau N. S., Tsuge T., Sudesh K. Formation of new polyhydroxyalkanoate containing 3-hydroxy-4-methylvalerate monomer in Burkholderia sp //Applied microbiology and biotechnology. – 2011. – T. 89. – №. 5. – C. 1599-1609.
93. Lemoigne M. Produit de déshydratation et de polymérisation de l'acide β -oxybutyrique //Bull Soc Chim Biol. – 1926. – T. 8. – C. 770-782.
94. Leong Y. K. et al. Current trends in polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis: insights from the recombinant Escherichia coli //Journal of biotechnology. – 2014. – T. 180. – C. 52-65.
95. Liebschner M. A. K. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone //Biomaterials. – 2004. – T. 25. – №. 9. – C. 1697-1714.
96. Lien S. M., Ko L. Y., Huang T. J. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering //Acta Biomaterialia. – 2009. – T. 5. – №. 2. – C. 670-679.
97. Liu Q., Zhu M., Chen Y. Synthesis and characterization of multi - block copolymers containing poly[(3-hydroxybutyrate) - co - (3 - hydroxyvalerate)] and poly (ethylene glycol) //Polymer International. – 2010. – T. 59. – №. 6. – C. 842-850.

98. López J. A. et al. Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: outlook on future developments with endospore forming bacteria //Biotechnology and bioprocess engineering. – 2012. – T. 17. – №. 2. – C. 250-258.
99. Ma P. X., Zhang R. Microtubular architecture of biodegradable polymer scaffolds //Journal of biomedical materials research. – 2001. – T. 56. – №. 4. – C. 469-477.
100. Macrae R. M., Wilkinson J. F. Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium* //Microbiology. – 1958. – T. 19. – №. 1. – C. 210-222.
101. Madden L. A. et al. Chain termination in polyhydroxyalkanoate synthesis: involvement of exogenous hydroxy-compounds as chain transfer agents //International journal of biological macromolecules. – 1999. – T. 25. – №. 1. – C. 43-53.
102. Madison L. L., Huisman G. W. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic //Microbiology and molecular biology reviews. – 1999. – T. 63. – №. 1. – C. 21-53.
103. Marçal H. et al. BioPEGylation of polyhydroxyalkanoates: Influence on properties and satellite-stem cell cycle //Biomacromolecules. – 2008. – T. 9. – №. 10. – C. 2719-2726.
104. Martin C., Winet H., Bao J. Y. Acidity near eroding polylactide-polyglycolide in vitro and in vivo in rabbit tibial bone chambers //Biomaterials. – 1996. – T. 17. – №. 24. – C. 2373-2380.
105. Masaeli E. et al. Does the tissue engineering architecture of poly (3 - hydroxybutyrate) scaffold affects cell-material interactions? //Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2012. – T. 100. – №. 7. – C. 1907-1918.
106. Matsiko A., Gleeson J. P., O'Brien F. J. Scaffold mean pore size influences mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation and matrix deposition //Tissue Engineering Part A. – 2014. – T. 21. – №. 3-4. – C. 486-497.

107. Meyer A. Practicum der botanischen Bakterienkunde. – Gustav-Fischer, 1903. – T. 2.
108. Mironov V. et al. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering //TRENDS in Biotechnology. – 2003. – T. 21. – №. 4. – C. 157-161.
109. Misra S. K. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA)/inorganic phase composites for tissue engineering applications //Biomacromolecules. – 2006. – T. 7. – №. 8. – C. 2249-2258.
110. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays //Journal of immunological methods. – 1983. – T. 65. – №. 1-2. – C. 55-63.
111. Nam Y. S., Yoon J. J., Park T. G. A novel fabrication method of macroporous biodegradable polymer scaffolds using gas foaming salt as a porogen additive //Journal of biomedical materials research. – 2000. – T. 53. – №. 1. – C. 1-7.
112. Nam Y. S., Yoon J. J., Park T. G. A novel fabrication method of macroporous biodegradable polymer scaffolds using gas foaming salt as a porogen additive //Journal of biomedical materials research. – 2000. – T. 53. – №. 1. – C. 1-7.
113. Nerlich FA. G. et al. Ancient Egyptian prosthesis of the big toe //The Lancet. – 2000. – T. 356. – №. 9248. – C. 2176-2179.
114. Noel B. J. Process for preparing poly-beta-hydroxybutyric acid : пат. 3044942 CIIA. – 1962.
115. Nombela-Arrieta C., Ritz J., Silberstein L. E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells //Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2011. – T. 12. – №. 2. – C. 126-131.
116. Norde W., Lyklema J. Why proteins prefer interfaces //Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. – 1991. – T. 2. – №. 3. – C. 183-202.
117. Nublat C. et al. Ammonium bicarbonate as porogen to make tetracycline-loaded porous bioresorbable membranes for dental guided tissue

regeneration: failure due to tetracycline instability //Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. – 2006. – T. 17. – №. 12. – C. 1333-1346.

118. O'Brien F. J. et al. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds //Biomaterials. – 2005. – T. 26. – №. 4. – C. 433-441.

119. Overgaard S. et al. The influence of crystallinity of the hydroxyapatite coating on the fixation of implants //Bone & Joint Journal. – 1999. – T. 81. – №. 4. – C. 725-731.

120. Park J. K., Kim T. H. Biochip and method for patterning and measuring biomaterial of the same : пат. 6391625 США. – 2002.

121. Parra D. F. et al. Influence of poly (ethylene glycol) on the thermal, mechanical, morphological, physical–chemical and biodegradation properties of poly (3-hydroxybutyrate) //Polymer degradation and stability. – 2006. – T. 91. – №. 9. – C. 1954-1959.

122. Peister A. et al. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential //Blood. – 2004. – T. 103. – №. 5. – C. 1662-1668.

123. Peoples O. P., Sinskey A. J. Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (phbC) //Journal of Biological Chemistry. – 1989. – T. 264. – №. 26. – C. 15298-15303.

124. Pettinari M. J. et al. Poly (3-Hydroxybutyrate) Synthesis Genes in *Azotobacter* sp. Strain FA8 //Applied and environmental microbiology. – 2001. – T. 67. – №. 11. – C. 5331-5334.

125. Pielichowski K., Flejtuch K. Differential scanning calorimetry studies on poly (ethylene glycol) with different molecular weights for thermal energy storage materials //Polymers for Advanced Technologies. – 2002. – T. 13. – №. 10- 12. – C. 690-696.

126. Piersma A. H. et al. Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow //Experimental hematology. – 1985. – T. 13. – №. 4. – C. 237-243.

127. Pilliar R. M., Lee J. M., Maniopoulos C. Observations on the effect of movement on bone ingrowth into porous-surfaced implants //Clinical orthopaedics and related research. – 1986. – T. 208. – C. 108-113.
128. Pittenger M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells //science. – 1999. – T. 284. – №. 5411. – C. 143-147.
129. Ponzoni M. et al. Lack of CD 29 ($\beta 1$ integrin) and CD 54 (ICAM-1) adhesion molecules in intravascular lymphomatosis //Human pathology. – 2000. – T. 31. – №. 2. – C. 220-226.
130. Puchtler H., Meloan S. N., Terry M. S. On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium //Journal of Histochemistry & Cytochemistry. – 1969. – T. 17. – №. 2. – C. 110-124.
131. Qu X. H. et al. Effect of 3-hydroxyhexanoate content in poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) on in vitro growth and differentiation of smooth muscle cells //Biomaterials. – 2006. – T. 27. – №. 15. – C. 2944-2950.
132. Qu X. H. et al. Enhanced vascular-related cellular affinity on surface modified copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyhexanoate (PHBHHx) //Biomaterials. – 2005. – T. 26. – №. 34. – C. 6991-7001.
133. Rathbone M. J. et al. Fertility regulation in cattle //Journal of controlled release. – 1998. – T. 54. – №. 2. – C. 117-148.
134. Ratledge C. Biochemistry and physiology of growth and metabolism //Basic Biotechnology, C Ratledge, B Kristiansen, Editors. – 2001.
135. Reddi A. H., SULLIVAN N. E. Matrix-induced endochondral bone differentiation: influence of hypophysectomy, growth hormone, and thyroid-stimulating hormone //Endocrinology. – 1980. – T. 107. – №. 5. – C. 1291-1299.
136. Rezwan K. et al. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering //Biomaterials. – 2006. – T. 27. – №. 18. – C. 3413-3431.
137. Richardson K.R. Production of beta-hydroxybutyrate polymers. 1984. European Patent N 114,086.

138. Rosa D. S. et al. The effect of the M_w of PEG in PCL/CA blends //Polymer testing. – 2005. – T. 24. – №. 5. – C. 542-548.
139. Sachs E. M. et al. Three-dimensional printing techniques : пат. 5204055 CIIA. – 1993.
140. Saha S. P., Patra A., Paul A. K. Incorporation of polyethylene glycol in polyhydroxyalkanoic acids accumulated by *Azotobacter chroococcum* MAL-201 //Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2006. – T. 33. – №. 5. – C. 377-383.
141. Saika A. et al. Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-4-methylvalerate) by recombinant *Escherichia coli* expressing leucine metabolism-related enzymes derived from *Clostridium difficile* //Journal of bioscience and bioengineering. – 2014. – T. 117. – №. 6. – C. 670-675.
142. Sanguanchaipaiwong V. et al. Biosynthesis of natural-synthetic hybrid copolymers: polyhydroxyoctanoate-diethylene glycol //Biomacromolecules. – 2004. – T. 5. – №. 2. – C. 643-649.
143. Saska S. et al. Bone substitute materials in implant dentistry //Implant Dent. – 2015. – T. 2. – C. 158-167.
144. Sato Y. et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion //Blood. – 2005. – T. 106. – №. 2. – C. 756-763.
145. Schrepfer S. et al. Simplified protocol to isolate, purify, and culture expand mesenchymal stem cells //Stem cells and development. – 2007. – T. 16. – №. 1. – C. 105-108.
146. Schrepfer S. et al. Simplified protocol to isolate, purify, and culture expand mesenchymal stem cells //Stem cells and development. – 2007. – T. 16. – №. 1. – C. 105-108.
147. Seitz H. et al. Three - dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering //Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. – 2005. – T. 74. – №. 2. – C. 782-788.

148. Shakibaei M. et al. Resveratrol mediated modulation of Sirt-1/Runx2 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: potential role of Runx2 deacetylation //PLoS One. – 2012. – T. 7. – №. 4. – C. e35712.
149. Sheridan M. H. et al. Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery //Journal of Controlled Release. – 2000. – T. 64. – №. 1. – C. 91-102.
150. Shi F., Gross R. A., Rutherford D. R. Microbial polyester synthesis: effects of poly (ethylene glycol) on product composition, repeat unit sequence, and end group structure //Macromolecules. – 1996. – T. 29. – №. 1. – C. 10-17.
151. Shishatskaya E. I., Volova T. G. A comparative investigation of biodegradable polyhydroxyalkanoate films as matrices for in vitro cell cultures //Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2004. – T. 15. – №. 8. – C. 915-923.
152. Shtilman M.I. Polymeric biomaterials. Part 1. Polymer implants. VSP: Leiden, Netherlands, 2003. 294 p.
153. Stein G. S., Lian J. B. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype //Endocrine reviews. – 1993. – T. 14. – №. 4. – C. 424-442.
154. Steward A (2005) Polymers under one umbrella. Chem Ind 18/04/05 18–20
155. Sutherland M. W., Learmonth B. A. The tetrazolium dyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxide dismutase //Free radical research. – 1997. – T. 27. – №. 3. – C. 283-289.
156. Sutherland M. W., Learmonth B. A. The tetrazolium dyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxide dismutase //Free radical research. – 1997. – T. 27. – №. 3. – C. 283-289.
157. Toma C. et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart //Circulation. – 2002. – T. 105. – №. 1. – C. 93-98.

158. Townsend K. J. et al. Contact Angle, WAXS, and SAXS Analysis of Poly (β -hydroxybutyrate) and Poly (ethylene glycol) Block Copolymers Obtained via *Azotobacter vinelandii* UWD //Biotechnology progress. – 2005. – T. 21. – №. 3. – C. 959-964.
159. Tsuge T. Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates //Journal of bioscience and bioengineering. – 2002. – T. 94. – №. 6. – C. 579-584.
160. Uccelli A., Moretta L., Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease //Nature Reviews Immunology. – 2008. – T. 8. – №. 9. – C. 726-736.
161. Uchino K. et al. Isolated poly (3-hydroxybutyrate)(PHB) granules are complex bacterial organelles catalyzing formation of PHB from acetyl coenzyme A (CoA) and degradation of PHB to acetyl-CoA //Journal of bacteriology. – 2007. – T. 189. – №. 22. – C. 8250-8256.
162. V. V. Prokhorov, High resolution atomic force micro copy imaging of crystalline polymers nanostructures on mica: from spherulites to single molecules, <http://www.ntmdt.com/> 2006
163. Van Natta F.I., Hill J.W., Carothers W.H.. J. Am. Chem. Soc., 54,761 (1932)
164. Volova T., Shishatskaya E., Mogilnaya O., Sevastianov V.Efremov S. // Biochem. Engin. J. 2003. V. 16. № 2. P. 125–133.
165. Wakitani S., Saito T., Caplan A. I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5 - azacytidine //Muscle & nerve. – 1995. – T. 18. – №. 12. – C. 1417-1426.
166. Wang S. et al. Mechanical, thermal and degradation properties of poly (d, l-lactide)/poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)/poly (ethylene glycol) blend //Polymer degradation and stability. – 2008. – T. 93. – №. 7. – C. 1364-1369.
167. Wang Y. W., Wu Q., Chen G. Q. Attachment, proliferation and differentiation of osteoblasts on random biopolyester poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds //Biomaterials. – 2004. – T. 25. – №. 4. – C. 669-675.

168. Wei J. et al. Growth of Schwann cells in silk fibroin scaffolds with different pore sizes //J Clin Rehabil Tissue Eng Res. – 2011. – T. 15. – C. 4607-4610.
169. Wiesmann A. et al. Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation //Head & face medicine. – 2006. – T. 2. – №. 1. – C. 1.
170. Wildemann B. et al. Quantification of various growth factors in different demineralized bone matrix preparations //Journal of biomedical materials research Part A. – 2007. – T. 81. – №. 2. – C. 437-442.
171. Williams D. F. On the mechanisms of biocompatibility //Biomaterials. – 2008. – T. 29. – №. 20. – C. 2941-2953.
172. Williams D. F. The Williams dictionary of biomaterials. – Liverpool University Press, 1999.
173. Williams J. M. et al. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering //Biomaterials. – 2005. – T. 26. – №. 23. – C. 4817-4827.
174. Williams J. M. et al. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering //Biomaterials. – 2005. – T. 26. – №. 23. – C. 4817-4827.
175. Wu L. et al. Fabrication of three-dimensional porous scaffolds of complicated shape for tissue engineering. I. Compression molding based on flexible-rigid combined mold //Tissue engineering. – 2005. – T. 11. – №. 7-8. – C. 1105-1114.
176. Yin J. et al. Effects of chromosomal gene copy number and locations on polyhydroxyalkanoate synthesis by Escherichia coli and Halomonas sp //Applied microbiology and biotechnology. – 2015. – T. 99. – №. 13. – C. 5523-5534.
177. Yoshikawa T., Ohgushi H., Tamai S. Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite //Journal of biomedical materials research. – 1996. – T. 32. – №. 3. – C. 481-492.

178. Zhang S. et al. Poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate containing scaffolds and their integration with osteoblasts as a model for bone tissue engineering //Journal of biomaterials applications. – 2015. – T. 29. – №. 10. – C. 1394-1406.

179. Zhou S., Deng X., Yang H. Biodegradable poly (ϵ -caprolactone)-poly (ethylene glycol) block copolymers: characterization and their use as drug carriers for a controlled delivery system //Biomaterials. – 2003. – T. 24. – №. 20. – C. 3563-3570.