МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ, КАФЕДРА БИОИНЖЕНЕРИИ

На правах рукописи



Бонарцев Антон Павлович

БИОИНЖЕНЕРИЯ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА, ПОЛУЧАЕМОГО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМ ПУТЕМ: КОНТРОЛИРУЕМЫЙ БИОСИНТЕЗ ЕГО СОПОЛИМЕРОВ, СВОЙСТВА *IN VITRO* И ПРИМЕНЕНИЕ НА МОДЕЛЯХ ЗАБОЛЕВАНИЙ *IN VIVO*

Специальность: 1.5.6. Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
доктор физико-математических наук, профессор
К.В.Шайтан

Москва 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ... 8
ВВЕДЕНИЕ ... 10
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ... 24
1.1. Биоинженерия и биотехнология ... 42
1.2. Биоматериалы, современное состояние исследований и разработок ... 24
1.3. Химическая структура и физико-химические свойства полиоксиалканоатов ... **63**
1.3.1. Химическая структура полиоксиалканоатов ... 63
1.3.2. ПОА как частично кристаллические биополимеры ... 68
1.3.3. Физико-химические свойства ПОА ... 70
1.4. Биодеградация ПОА как природных биосинтетических полимеров ... 72
1.4.1. Гидролитическая деградация ПОА ... 72
1.4.2. Ферментативная биодеградация ПОА ... 78
1.4.3. Биодеградация поли-3-оксиалканоатов микроорганизмами почвы ... 83
1.4.4. Биодеградация ПОА в тканях животных *in vivo* ... 86
1.5. Биосинтетическая природа ПОА как резервного биоразлагаемого полимера у бактерий ... 90
1.6. Биосовместимость ПОА ... 97
1.7. Матриксы для тканевой инженерии ... 109
1.8. Материалы для изготовления матриксов ... 118
1.9. Инженерия костной ткани ... 124
1.10. Мезенхимальные стволовые клетки ... 129
1.11. Использование поли-3-оксиалканоатов для разработки лекарственных систем на их основе ... 134
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ... 144
2.1. Биосинтез, выделение, очистка и определение химического состава полимеров ... 144
2.1.1. Материалы для микробиологического биосинтеза ... 144
2.1.2. Культивирование штамма *Azotobacter chroococcum* 7Б ... 146

2.1.3. Анализ 16S рРНК 146
2.1.4. Условия синтеза ПОБ и его сополимеров 146
2.1.5. Определение содержания полимеров в клетках 148
2.1.6. Выделение ПОБ и его сополимеров из бактериальной биомассы, анализ эффективности очистки полимеров 148
2.1.7. Определение молекулярной массы полимеров 149
2.1.8. Снижение молекулярной массы ПОБ химическим путем 150
2.1.9. Исследование состава полимеров методом газовой хроматографии 150
2.1.10. Исследование химического состава полимера методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) 151
2.2. Методы изготовления различных изделий из полученных полимеров 151
2.2.1. Материалы для изготовления полимерных изделий 151
2.2.2. Изготовление экспериментальных образцов полимерных пленок для исследования физико-химических и биологических свойств полимеров 152
2.2.3. Изготовление ультратонких полимерных пленок для исследования наноструктуры полимеров 152
2.2.4. Изготовление полимерных матриксов 153
2.2.5. Получение полимерных микро- и наночастиц с низкомолекулярными лекарственными веществами 158
2.2.6. Получение полимерных микрочастиц с белками 160
2.3. Методы микроскопии 162
2.3.1. Атомно-силовая микроскопия 162
2.3.2. Световая микроскопия 163
2.3.3. Просвечивающая электронная микроскопия бактериальных клеток 164
2.3.4. Сканирующая электронная микроскопия 164
2.3.5. Флуоресцентная и конфокальная микроскопия 165
2.3.6. Определение размера пор матриксов 166

2.3.7. Определение размера микро- и наночастиц 166

2.4. Методы исследования физико-химических свойств полимеров и изделий на их основе 166

2.4.1. Определение пористости матриксов 166

2.4.2. Измерение степени кристалличности биополимеров и изделий на их основе дифференциальной сканирующей калориметрией (ДСК) 167

2.4.3. Рентгеноструктурный анализ 167

2.4.4. ИК-спектроскопия 168

2.4.5. Измерение контактных углов 168

2.4.6. Механические испытания образцов пленок полимеров 169

2.4.7. Водопоглощение 170

2.4.8. Адсорбция белков 171

2.4.9. Исследование биодеградации изделий из ПОА *in vitro* 171

2.4.10. Изучение кинетики высвобождения ЛВ и белка из микрочастиц на основе ПОБ .. 172

2.5. Методы исследования цитотоксичности, биосовместимости и остеогенной активности полимеров и изделий на их основе in vitro 175

2.5.1. Культуры клеток 175

2.5.2. Исследование биосовместимости *in vitro* 176

2.5.3. Исследование цитотоксичности полимерных нано- и микрочастиц 178

2.5.4. Фенотипирование МСК крыс методом проточной цитометрии 179

2.5.5. Остеонаправленная дифференцировка МСК 179

2.5.6. Помещение МСК в 3D-матриксы и изготовление тканеинженерных конструкций . 180

2.6. Исследование биосовместимости конструкций на основе поли-3-оксибутирата и их биоактивности на моделях заболеваний in vivo 181

2.6.1. Исследование тканевой реакции на имплантацию пленок на основе поли-3-оксибутирата и его сополимеров 181

2.6.2. Изучение острой токсичности биополимерных частиц *in vivo* 182

2.6.3. Исследование противоопухолевой эффективности биополимерных частиц *in vivo* на моделях эпителиальных опухолей 184
2.6.4. Модель некритического костного дефекта 186
2.6.5. Модель критического костного дефекта 187
2.6.6. Изучение скорости регенерации костного дефекта 187
2.6.7. Компьютерная томография 188
2.6.8. Гистологическое исследование 188
2.7. Статистический анализ 189
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ[3] 190
Раздел 3.1. Биосинтез поли-3-оксибутирата и его сополимеров 190
Раздел 3.2. Исследование микро- и ультраструктуры поли-3-оксибутирата и его сополимеров 230
3.2.1. Исследование морфологии поверхности макроскопических пленок 230
2.2. Исследование ультратонких пленок из ПОБ и его сополимеров 235
Раздел 3.3. Исследование физико-химических свойств поли-3-оксибутирата и его сополимеров 250
Раздел 3.4. Исследование биодеградации ПОБ и его сополимеров in vitro 280
3.4.1. Изменение массы пленок ПОБ и его сополимеров в процессе их биодеградации *in vitro* 280
3.4.2. Изменение молекулярной массы пленок ПОБ и его сополимеров в процессе их биодеградации *in vitro* 286
3.4.3. Изменение морфологии поверхности пленок ПОБ при деградации 299
4.4. Изменение степени кристалличности пленок ПОБ и его сополимеров в процессе их биодеградации *in vitro* 302
Раздел 3.5. Биосовместимость in vitro поли-3-оксибутирата и его сополимеров 313
3.5.1. Цитотоксичность и пролиферация клеток на пленках из ПОБ и его сополимеров 313
3.5.2. Пролиферация клеток на пленках из ПОБ после их биодеградации *in vitro* 319

Раздел 3.6. Системы пролонгированного высвобождения низкомолекулярных веществ на основе поли-3-оксибутирата и его сополимеров 323

3.6.1 Высвобождение *in vitro* лекарственных веществ различного химического строения из микросфер на основе поли-3-оксибутирата 323

3.6.2. Получение и исследование полимерных микрочастиц, загруженных Паклитакселом 340

3.6.3. Физико-термические характеристики полученных микро- и наночастиц 344

3.6.4. Исследование взаимодействия ЛВ с полимерной матрицей микрочастиц 345

3.6.5. Кинетика высвобождения лекарственного вещества из полимерных микрочастиц . 347

6.6. Цитотоксичность микрочастиц с ПТЛ 351

3.6.7. Получение биополимерных микрочастиц методом мембранного распылительного высушивания 355

3.6.8. Исследование острой токсичности БЛФП in vivo 361

3.6.9. Исследование противоопухолевых свойств БЛФП на моделях опухолевых заболеваний 362

3.6.10. Пористые микросферы большого диаметра, загруженные симвастатином для тканевой инженерии 368

Раздел 3.7. Микрочастицы из поли-3-оксибутирата и его сополимеров для пролонгированного высвобождения белков 371

7.1. Получение полимерных микрочастиц, содержащих лизоцим 371

7.2. Исследование высвобождения лизоцима из полученных полимерных микрочастиц . 375

7.3. Исследование цитотоксичности полимерных микрочастиц, загруженных лизоцимом in vitro 387

Раздел 3.8. Остеогенные свойства 2D-матриксов на основе поли-3-оксибутирата и его сополимеров 391

3.8.1. Структура плоских матриксов из различных материалов 391

3.8.2. Теплофизические свойства матриксов 393

3.8.3. Адсорбция белка 394
3.8.4. Подтверждение фенотипа мезенхимальных стволовых клеток 396
3.8.5. Биосовместимость пористых матриксов *in vitro* 398
3.8.6. Направленная остеогенная дифференцировка 404
Раздел 3.9. Остеогенные свойства 3D-матриксов на основе ПОБ 420
3.9.1. Структура и морфология 3D-матриксов 420
3.9.2. Физико-химические свойства 3D-матриксов 421
3.9.3. Ферментативная деградация 3D-матриксов *in vitro* 425
3.9.4. Рост клеток в 3D-матриксах 426
3.9.5. Активность щелочной фосфатазы и экспрессия CD45 427
3.9.6. Исследование биосовместимости *in vivo* 3D-матриксов при их подкожной имплантации 430
3.9.7. Восстановление критического костного дефекта при использовании 3D-матриксов и тканеинженерной конструкции 431
Раздел 3.10. Остеогенные свойства 3D-матриксов из пористых микросфер на основе ПОБ 443
ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ 451
ВЫВОДЫ 467
БЛАГОДАРНОСТИ 469
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 471

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ММ	молекулярная масса
НАД	никотинамидадениндинуклеотид
НАДФ	никотинамидадениндинуклеотидфосфат
КоА	кофермент А
ПОА	полиоксиалканоаты
П3ОА	поли-3-оксиалканоаты
П2ОА	поли-2-оксиалканоаты
ПОБ, П3ОБ	поли-3-оксибутират
3ОБ	3-оксибутират
3-ГБ	3-гидроксибутират
аПОБ	атактический ПОБ
зПОБ	запасной поли-3-оксибутират
оПОБ	олиго-поли-3-оксибутират
кПОБ	комплексообразующий поли-3-оксибутират
ПОБВ, ПОБ-ОВ	поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат
ОВ, 3ОВ	3-оксивалерат
ПОБ-ОГ, П3ОБ-3ОГ	поли-3-оксибутират-со-3-оксигексаноат
ПМК, ПЛМК, ПЛА	поли(L-молочная кислота), полилактид
ПДЛМК	поли(D,L-молочная кислота)
ПГК	поли(гликолиевая кислота)
ПКЛ	поли(ε-капролактон), поли-6-капролактон
ПМГК	сополимер полимолочной и полигликолевой кислот
АН	ацетат натрия, натриевая соль уксусной кислоты
ПК	пропионовая кислота
ВК	валериановая кислота
4МВК	4-метилвалериановая кислота
ГкК	гексановая кислота
ГпК	гептановая кислота
ОК	октановая кислота
НК	нонановая кислота
ДК	додекановая кислота
ЭГ	этиленгликоль
ДЭГ	диэтиленгликоль

ТЭГ	триэтиленгликоль
ПЭГ	полиэтиленгликоль
ППГ	полипропиленгликоль
ЛВ	лекарственное вещество
ПСКВ (СКВ)	полимерная система контролируемого высвобождения
В/М/В (О/W)	метод эмульгирования «масляная фаза/водная фаза»
В/М/В (W/O/W)	метод эмульгирования «водная фаза/масляная фаза/водная фаза»
Т/М/В (S/O/W)	метод эмульгирования «твердая фаза/масляная фаза/водная фаза»
ЭИ	эффективность инкапсулирования
СЗ	степень загруженности
ВЭ	«взрывной» эффект
СПЖ	средняя продолжительность жизни
ДП	дипиридамол
ИВ	ивермектин
ПАВ	поверхностно-активное вещество
ЛЦТ	лецитин
ПТК	паклитаксел
СО	стандартное отклонение
ЭТП	этопозид
ФИТЦ	флуоресцеин-изотиоцианат;
ГА	гидроксиапатит;
БСА	бычий сывороточный альбумин
МСК	мезенхимальные стволовые клетки
BMP	костный морфогенетичсекий фактор
FGF	фактор роста фибробластов
VEGF	фактор роста эпителия сосудов
TGF	тромбоцитарный фактор роста

ВВЕДЕНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящее время происходит бурный рост междисциплинарных инженерно-технологических направлений на стыке естественных наук: биотехнологии, биоинженерии, нанотехнологии, нейронаук (Stock and Burton, 2011; Лысак, 2016). Биоинженерия и биотехнология биосовместимых и биодеградируемых материалов являются одними из таких ярко-выраженных примеров междисциплинарного подхода. Комплексные исследования различных биоматериалов на основе синтетических и природных полимеров, алло- и ксенобиоматериалов, а также их композитов и их дальнейшее использование демонстрируют очень быстрый рост во всем мире и находят широкое применение в медицине. Биоматериал в таких исследованиях выступает в качестве объединяющего элемента междисциплинарного биоинженерного исследования, которое, как правило, проводится на нескольких уровнях: получение биоматериала, получение изделий и препаратов из этого биоматериала, исследование их морфологии, физико-химических свойств, исследование их биосовместимости и биоактивности на биохимическом уровне, на культурах клеток, и с использованием моделей заболеваний на лабораторных животных. На каждом из этих уровней используется широкий набор методов. Совокупность полученных данных анализируется для поиска новых свойств биоматериала и изделий на его основе и/или конструирования биоматериала и изделий из него, обладающего новыми свойствами (Севастьянов и Кирпичников, 2011; Hasirci and Hasirci, 2018). Природные биополимеры – наиболее интересный объект для таких исследований. Очень большой спектр функциональности этих биополимеров достигается не только за счет первичной структуры (последовательности различных мономеров в полимерной цепи), но и за счет более высоких уровней организации биомакромолекул. Так, например, поли-3-оксибутират (ПОБ) и его сополимеры, выполняющие запасающую функцию у многих видов бактерий также обладают сложной надмолекулярной структурой и рядом уникальных свойств: специфическим сочетанием физико-химических свойств (механической прочностью, термопластичностью, относительной гидрофобностью, диффузионными свойствами), биосовместимостью, способностью к биодеградации и биологической активностью (Nelson and Cox, 2008; Mokhtarzadeh et al., 2016). Синтетические аналоги этих биополимеров, такие как полилактиды, полигликолиды, поликапролактон, полидиоксанон и другие, обладающие в целом похожими свойствами, широко используются в медицине и фармацевтике (Farah et al., 2016; Sikhosana et al., 2021). Но в отличие от синтетических полимеров поли-3-оксибутират и некоторые из его сополимеров прошли естественный отбор в течение сотен миллионов лет эволюции как биополимеры бактериальной клетки со специфическими функциями (не только запасающей).

Поэтому конструирование различных типов изделий из ПОБ, таких как пленки, пористые матриксы для тканевой инженерии и микрочастицы для пролонгированного высвобождения низкомолекулярных лекарственных веществ и биоактивных белков, предназначенных для применения в медицине и фармацевтике, служит не только сугубо прикладным целям, но и позволяет раскрыть некоторые неизвестные ранее аспекты биофункциональности природного поли-3-оксибутирата (Voinova et al., 2019; Бонарцев и др., 2019; Бонарцев и др., 2018).

В связи с этим особую актуальность приобретает создание системы экспериментальных моделей для комплексного междисциплинарного исследования поли-3-оксибутирата. Для комплексного исследования биополимеров необходима интеграция целого ряда экспериментальных моделей и методик, принадлежащих к различным уровням организации живой материи и различным естественным наукам, например, на надмолекулярном уровне это может быть экспериментальная модель исследования взаимосвязи надмолекулярной структуры полимера с его физико-химическими свойствами, на клеточном - экспериментальная модель исследования биосовместимости in vitro полимеров и изделий из них, на тканевом - экспериментальная модель исследования биосовместимости полимеров in vivo и т.д.

Особую роль в таком комплексном исследовании играет метод контролируемого биосинтеза этого биополимера, который позволяет получать полимер с заданными свойствами и химически модифицировать его. Использование этой технологии как уникального инструмента собственно и позволяет провести комплексное многоуровневое биоинженерное исследование, а именно использовать биоинженерные методы (а не химические методы, например) как для получения и химической модификации биополимера в ходе его биосинтеза, так и для исследования и выявления особенностей его биологических свойств на каждом из уровней исследования: молекулярном, клеточном, организменном. При этом в таком исследовании происходит сочетание и пересечение различных направлений биотехнологии и биоинженерии: молекулярной (контролируемый биосинтез полимеров), надмолекулярной (взаимосвязь наноструктуры полимера с его физико-химическими и биологическими свойствами), клеточной (биоинженерия стволовых клеток) и тканевой (биоинженерия костной ткани) в тесной связи с биомедициной и биофармакологией (Бонарцев и др., 2019; Voinova et al., 2019).

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель работы – создание широкой научной и методической базы для биотехнологического и биоинженерного исследования свойств биосинтетического поли-3-оксибутирата и его сополимеров на различных уровнях: молекулярном, надмолекулярном, клеточном и тканевом.

Для достижения поставленной цели решали следующие **задачи:**

1. Разработать метод контролируемого биосинтеза поли-3-оксибутирата и его сополимеров различной молекулярной массы и мономерного состава, в т.ч. биотехнологический метод сополимеризации поли-3-оксибутирата с синтетическим полимером, полиэтиленгликолем - биоПЭГилирование, а также метод выделения и очистки биополимеров.
2. Исследовать надмолекулярную структуру и физико-химические свойства полученных поли-3-оксибутирата и его сополимеров.
3. Исследовать биодеградацию полученных поли-3-оксибутирата и его сополимеров в модельных условиях in vitro.
4. Получить микрочастицы из поли-3-оксибутирата и его сополимеров, в т.ч. биоПЭГилированного ПОБ, загруженные различными лекарственными веществами, в частности, противоопухолевым цитостатиком паклитакселом и модельным белком, лизоцимом, и исследовать кинетику их высвобождения.
5. Исследовать токсичность и противоопухолевую активность микрочастиц из поли-3-оксибутирата, загруженных паклитакселом, на культурах опухолевых клеток и на лабораторных мышах с моделью опухолевого заболевания.
6. Получить пористые матриксы различной формы и строения из поли-3-оксибутирата и его биоПЭГилированного сополимера и исследовать их остеогенные свойства на мезенхимальных стволовых клетках *in vitro* и на модели некритического костного дефекта на крысах *in vivo*.
7. Получить тканеинженерные конструкции с использованием матриксов на основе поли-3-оксибутирата и мезенхимальных стволовых клеток и исследовать их остеогенные свойства на модели критического костного дефекта на крысах.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Впервые создана фундаментальная научно-методическая база для экспериментального исследования поли-3-оксибутирата и его сополимеров, позволяющая комплексно исследовать взаимосвязь физико-химических и биомедицинских свойств этих биополимеров на различном уровне: атомно-молекулярном, надмолекулярном, клеточном и тканевом. Проведенные экспериментальные исследования полимерных материалов позволили установить целый ряд новых данных об этих биополимерах.

Впервые создана экспериментальная биотехнологическая модель контролируемого биосинтеза ПОБ и его сополимеров с использованием бактерии-продуцента вида *Azotobacter chroococcum* и были синтезированы сополимеры поли-3-оксибутирата с полиэтиленгликолем

(ПОБ-ПЭГ), терполимер поли-3-оксибутирата с 3-оксивалератом и полиэтиленгликолем (ПОБВ-ПЭГ) и сополимер с 4-метилвалериановой кислотой (ПОБ4МВ). Установлены закономерности для контролируемого биосинтеза ПОБ и его сополимеров с заданным мономерным составом и молекулярной массой.

Была создана экспериментальная модель исследования взаимосвязи надмолекулярной структуры полимера с его физико-химическими свойствами и проведено комплексное сравнительное исследование морфологии и физико-химических свойств различных полимеров, полученных биотехнологическим путем (ПОБ различной молекулярной массы, ПОБВ с различным содержанием 3-оксивалерата, ПОБ-ПЭГ, ПОБВ-ПЭГ и ПОБ4МВ и композита ПОБ с ПЭГ). Установлены закономерности взаимосвязи надмолекулярной структуры биополимера ПОБ и его сополимеров (ПОБВ, ПОБ-ПЭГ, ПОБВ-ПЭГ и ПОБ4МВ) и различных его физико-химических свойств. Впервые показано, каким образом влияет биоПЭГилирование ПОБ на морфологию и физико-химические свойства этого биополимера.

Создана экспериментальная модель исследования гидролитической и ферментативной деградации полимеров in vitro, которая позволила исследовать, каким образом происходит изменение физико-химических свойств ПОБ и его сополимеров различной молекулярной массы и мономерного состава, в процессе их биодеградации *in vitro*, описать математически изменение этих свойств, и раскрыть механизм биодеградации ПОА *in vitro*, позволяющий прогнозировать кинетику биодеградации ПОА в зависимости от их молекулярной структуры. Для сополимеров ПОБВ найдена граница фазового перехода (при содержании 3-оксивалерата у ПОБВ в 5,7-5,9%) структурно-физических свойств полимера, при пересечении которой меняется закономерность кинетики изменения физико-химических свойств ПОБВ в процессе его биодеградации. Впервые показано, что биоПЭГилирование ПОБ приводит к краткосрочному (до 1 мес.) изменению кинетики изменения молекулярной массы и степени кристалличности биополимера.

Создана экспериментальная модель изучения кинетики высвобождения низкомолекулярных лекарственных веществ и белков из микрочастиц, которая позволила исследовать высвобождение целого ряда лекарственных веществ из микрочастиц на основе ПОБ, дать математическое описание кинетики их высвобождения, раскрыть механизм их высвобождения как преимущественно диффузию по закону Фика, а также впервые исследовать каким образом биотехнологическая сополимеризация ПОБ с ПЭГ влияет на кинетику высвобождения паклитаксела из полимерных микрочастиц. Впервые продемонстрирована более высокая противоопухолевая эффективность *in vitro* (на опухолевых клетках линий MCF-7 и МН-22а) микрочастиц на основе ПОБ-ПЭГ при пролонгированном высвобождении из них паклитаксела и этопозида. Впервые методом электродинамического распылительного

высушивания были получены загруженные паклитакселом микрочастицы из ПОБ, которые обладают пролонгированной противоопухолевой активностью. Было показано, что полученная нами новая лекарственная форма паклитаксела на основе микрочастиц из ПОБ обладает сниженной острой токсичностью и более высокой противоопухолевой эффективностью на моделях внутрибрюшинно трансплантированной эпидермоидной карциномы легкого Льюис и рака молочной железы человека РМЖ-1 при локальном торможении роста опухолей по сравнению с препаратом Таксол в традиционной лекарственной форме. Впервые исследовано влияние биоПЭГилирования ПОБ на кинетику пролонгированного высвобождения модельного белка, фермента лизоцима, из микрочастиц, полученных по оригинальной методике инкапсулирования белка с использованием в качестве носителя белка наноразмерного гидроксиапатита. Продемонстрировано возрастание вклада диффузии белка по закону Фика в его высвобождение из микрочастиц на основе ПОБ-ПЭГ, увеличение стабильности белка (по сохранению его ферментативной активности) и отсутствие цитотоксичности микрочастиц, загруженных лизоцимом, по отношению к мезенхимальным стволовым клеткам.

Создана экспериментальная модель исследования влияния ПОБ и его сополимеров на остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток с использованием пористых матриксов на основе ПОБ и его сополимера с ПЭГ с заданной формой и микроструктурой. Впервые показано, что биоПЭГилирование ПОБ приводит к частичному подавлению способности ПОБ к спонтанной остеогенной дифференцировке МСК при их росте в плоском пористом матриксе из этого полимера.

Использование моделей некритического и критического костных дефектов позволило выявить остеиндуктивные свойства пористых матриксов и микросфер на основе ПОБ и ПОБ-ПЭГ, их способность стимулировать образование новой костной ткани в области дефекта, заполненного полимерным материалом. Наблюдается превосходная интеграция полимерного материала на основе ПОБ и ПОБ-ПЭГ с костной тканью, о чем свидетельствует то, что фиброзная капсула вокруг биоматериала не формируется.

Показана возможность создания тканеинженерной конструкции на основе пористых матриксов из композита ПОБ, изготовленных методом непрямой 3D-печати с использованием мезенхимальных стволовых клеток, и их остеоиндуктивная функциональность, которая обеспечила >90% восстановление критического костного дефекта за 1 месяц.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ

Диссертационная работа представляет собой комплексное междисциплинарное исследование, в основе которого – биотехнологический способ контролируемого биосинтеза бактериальных полимеров, поли-3-оксибутирата и его сополимеров, в котором происходит

тесная интеграция биотехнологии, классических естественных наук: физики, химии, биологии и медицины, а также развитие биоинженерных направлений исследования полимерных материалов. Так, в работе продемонстрировано влияние биотехнологической сополимеризации поли-3-оксибутирата с полиэтиленгликолем на различных уровнях экспериментального исследования полимерных материалов: атомно-молекулярном, надмолекулярном, клеточном и тканевом. Созданная система экспериментального исследования полимерных материалов, ПОБ и его сополимеров, позволила выявить закономерности взаимосвязи структуры полимеров с их физико-химическими и биологическими свойствами, закономерности динамики биодеградации in vitro и высвобождения низкомолекулярных лекарственных веществ и белков из полимерных изделий, биологическую активность ПОБ и изделий на его основе.

Нами обнаружены закономерности взаимосвязи надмолекулярной кристаллической структуры ПОА и их физико-химических свойств, такие как линейная зависимость жесткости (по модулю Юнга) и гидрофильности поверхности полимера (по контактному углу смачивания водой), от степени кристалличности, которая складывается благодаря организации полимерных цепей в кристаллические, преимущественно ламеллярные структуры, и отсутствие такой зависимости от молекулярной массы гомополимера; а также закономерности изменения надмолекулярной структуры полимеров и их физико-химических свойств в процессе биодеградации in vitro, такие как наличие граничного значения содержания 3-оксивалерата в цепи сополимера ПОБВ (5,7-5,9 мол.%), определяющей закономерность кинетики изменения степени кристалличности ПОБВ в процессе их биодеградации in vitro. Обнаруженные закономерности имеют как большую теоретическую значимость в области физической химии частично-кристаллических полимеров, обладающих способностью к биодеградации, так и практическую значимость при конструировании имплантируемых медицинских изделий на основе таких полимеров с прогнозируемым изменением их свойств в процессе эксплуатации.

Обнаруженные закономерности пролонгированного высвобождения лекарственных низкомолекулярных веществ и белков из полимерных микрочастиц имеют важную теоретическую значимость в области физической химии полимерных систем контролируемого высвобождения веществ. Проведенный цикл доклинических исследований разработанной новой лекарственной формы паклитаксела продемонстрировал снижение острой токсичности и повышение эффективности при сравнении с традиционной лекарственной формой этого препарата; разработанная лекарственная форма пролонгированного высвобождения лизоцима обеспечивает высвобождение этого белка в течение 14 суток без потери его активности. Таким образом, имеется и большая практическую значимость полученных результатов при создании новых лекарственных форм химиотерапевтических препаратов пролонгированного действия, а также систем доставки ростовых факторов и цитокинов в тканевой инженерии.

Была показана высокая биосовместимость ПОБ и его сополимеров (ПОБВ, ПОБ-ПЭГ, ПОБВ-ПЭГ и ПОБ4МВ) *in vitro* и *in vivo*, а также разработанных на основе ПОБ и ПОБ-ПЭГ пористых матриксов различной формы и пористых микросфер, которые хорошо подходят для культивирования в них как нативных, так и дифференцированных по остеогенному пути МСК, что позволяет их использовать в регенеративной медицине и тканевой инженерии. Продемонстрированы выраженные остеоиндуктивные свойства матриксов и микросфер на основе ПОБ и его сополимера и их отличная интеграция с костной тканью, что имеет важное теоретическое значение, т.к. тесно связано с природными свойствами ПОБ, а также позволяет их использовать в пластической хирургии в качестве наполнителей и в челюстно-лицевой хирургии и ортопедии в качестве барьерных мембран и остеопластического материала. Показана перспективность разработки тканеинженерных конструкций с использованием МСК для регенерации костных дефектов критического размера, что открывает возможность внедрения инженерии костной ткани в клиническую практику в челюстно-лицевой хирургии и ортопедии.

СОПОСТАВЛЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ С МИРОВЫМ УРОВНЕМ

Долгое время ПОА и их природный предшественник, поли-3-оксибутират, рассматривали и применяли в биомедицинских исследованиях исключительно как конструкционные материалы с удовлетворительными механическими свойствами, относительно хорошей биосовместимостью и, главное, способностью к биодеградации. Поэтому на основе ПОА преимущественно были разработаны медицинские изделия, предназначенные для механического скрепления тканей и восполнения механических свойств тканей при их повреждении: биоразлагаемые скобы, винты, пластины, штифты и шпагаты, шовные нити и скобы, пародонтологические мембраны, хирургические сетчатые эндопротезы, хирургические заплаты, плаги-эндопротезы, протезы сосудов, кардиоваскулярные стенты-эндопротезы, каркасные проводники для регенерации нервов, искусственные клапаны сердца и другие имплантируемые эндопротезы (Lim et al., 2017; Mokhtarzadeh et al., 2016; Hasirci and Hasirci, 2018; Voinova et al., 2019; Бонарцев и др., 2019). При этом предпочтение было отдано химически синтезируемым полимолочной, полигликолевой кислоте и их сополимерам, соответственно, и природные поли-3-оксиалканоаты рассматривались также как аналоги синтетическим термопластикам с соответствующей биомедицинской функциональностью (Farah et al., 2016; Hasirci and Hasirci, 2018; Voinova et al., 2019; Бонарцев и др., 2019; Sikhosana et al., 2021). Внимание к биологической активности материалов на основе ПОА в современной науке обращено в основном через разработку и применение нано- и микрочастиц, а также

медицинских изделий, загруженных лекарственными веществами, и с инкапсулированными терапевтическими белками для их пролонгированного, контролируемого высвобождения и направленной доставки. В этих работах, как правило, используют лекарственные вещества с давно доказанной и известной лекарственной активностью, а ПОА также рассматривается лишь как биоинертное средство доставки этого лекарственного агента (Qi et al., 2019; Abu Hajleh et al., 2020). Такой однобокий взгляд на природные поли-3-оксиалканоаты был и остается обусловлен традиционной системой исследования материалов медицинского назначения, где силами одной исследовательской лаборатории (научной группы, института, научного центра, R&D подразделения компании) или в рамках одного комплексного исследовательского проекта изучается то или иное свойство или группа свойств полимера, непосредственно необходимых для разработки уже спроектированного медицинского изделия с предварительно запланированной функциональностью (Castellano et al., 2014; Fan et al., 2014; Karahaliloğlu et al., 2015; Lim et al., 2017). К сожалению, такой узкоспециальный подход иногда приводит к серьезным просчетам в функциональности и биобезопасности разрабатываемых на основе ПОА медицинских изделий и лекарственных препаратов, что вынуждает смиряться с рядом нежелательных побочных эффектов при применении уже давно разработанных и внедренных в клиническую практику медицинских изделий, как, например, недостаточно высокая механическая прочность полимеров (например, полимолочной кислоты) для фиксации костей (Farah et al., 2016), несоответствие скорости биодеградации процессу регенерации костной ткани (Pereira et al., 2013) или локальное закисление тканей при их биодеградации из-за выделения продуктов деструкции полимера (Майбородин и др., 2013; Vacanti et al., 2012; Lickorish et al., 2004; Kim et al., 2007; Pereira et al., 2013). Тогда как фундаментальных исследований биоматериалов в области столь ориентированной на прикладные разработки биоинженерии гораздо меньше (Löbler et al., 2002; Paula et al., 2020; Peñaloza et al., 2017).

Тем не менее, есть целая серия мультидисциплинарных исследований природных поли-3-оксиалканоатов (в т.ч. поли-3-оксибутирата) с грамотным и последовательным использованием биоинженерных подходов, выполненные, как правило, большими научными группами и институтами, которые совершенно на другом уровне ведут исследование этих замечательных полимеров, что позволяет раскрывать те стороны их биофункциональности, которые ранее были совершенно скрыты от нас (Löbler et al., 2002; Paula et al., 2020; Peñaloza et al., 2017). Но даже самые комплексные из этих исследований не охватывают все уровни междисциплинарного биоинженерного исследования биополимеров, как правило, отсутствует начальный уровень - биотехнологического получения полимеров с помощью бактериальных штаммов-продуцентов или конечный уровень – исследования биофункциональности полимеров на экспериментальных моделях *in vivo* на лабораторных животных в тесном контакте со

специалистами-медиками. Работы такого уровня охвата научных компетенций крайне редки, однако, именно такой комплексный биоинженерный подход и дает надежду составить максимально полную картину биофункциональности того или иного биоматериала, в данном случае - поли-3-оксибутирата.

Использование в этой работе междисциплинарной биоинженерной системы исследования ПОА позволило раскрыть различные стороны функциональности поли-3-оксибутирата как полимера для разработки биоразлагаемых эндопротезов, лекарственных форм, костезамещающих материалов, тканеинженерных конструкций. Этот подход также позволил найти собственную присущую поли-3-оксибутирату биологическую активность – способность к остеоиндукции. Уникальные остеоиндукцивные свойства поли-3-оксибутирата обуславливают и основную функциональность этого биополимера как остеоиндуктивного (а не кострукционного) костезамещающего биоматериала и как биоматериала для инженерии костной ткани. Разработка технологии биоПЭГилирования поли-3-оксибутирата и ее использование как биоинженерного инструмента при многоуровневом междисциплинарном исследовании выявило то, что даже минимальная химическая модификация природного поли-3-оксибутирата с помощью синтетического полимера, полиэтиленгликоля, к тому же осуществленная биотехнологическим путем, вызывает значительное изменение свойств биополимера на разных уровнях (наноструктуры, физико-химических свойств, кинетики высвобождения белка и взаимодействия с клетками) вплоть до потери им биологической активности. С другой стороны, такой биоинженерный подход к исследованию полимеров, в частности, поли-3-оксибутирата, помимо раскрытия его собственной биомедицинской функциональности открывает возможность для создания многофункциональных медицинских изделий нового поколения, содержащих низкомолекулярные лекарственные вещества, терапевтические белки и стволовые клетки, но уже с полноценным учетом биоактивности самого полимера.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Представленная нами работа является междисциплинарным исследованием, в котором применяются методы из весьма различных естественно-научных дисциплин: полимерной химии (выделение и очистка полимеров, гельпроникающая хроматография, вискозиметрия, газовая хроматография, спектроскопия ядерного магнитного резонанса, изготовление обычных и ультратонких пленок), биотехнологии и микробиологии (культивирование бактериального штамма-продуцента *Azotobacter chroococcum* 7Б, биосинтез полимеров), молекулярной биологии (анализ 16S рРНК бактериального штамма-продуцента), физической химии (определение пористости, дифференциальная сканирующая калориметрия,

рентгеноструктурный анализ, ИК-спектроскопия, измерение контактных углов смачивания и водопоглощения, измерение механических свойств полимерных изделий на разрывной машине, с помощью наноиндентирования и реометрии), микроскопии (световой, флуоресцентной, конфокальной, просвечивающей и сканирующей электронной), клеточной биологии (выделение и культивирование стволовых клеток, тестирование цитотоксичности, исследование пролиферации клеток, анализ фенотипа стволовых клеток, исследование дифференцировки стволовых клеток), биохимии (измерение концентрации лекарственных веществ и белков, активности ферментов, измерение адсорбции белков на полимерной поверхности, электрофорез белков, круговой дихроизм), тканевой инженерии (непрямая 3D-печать, изготовление 2D- и 3D-матриксов, пористых микросфер, тканеинженерных конструкций на их основе), биофармакологии (получение микрочастиц, загруженных низкомолекулярными лекарственными веществами и белками, в т.ч. методом пьезоэлектрического распылительного высушивания), физиологии и экспериментальной медицины (исследование острой токсичности, исследование тканевой реакции при подкожной имплантации, модели некритического и критического костных дефектов, компьютерная томография, гистологическое исследование), а также методы математического моделирования при анализе кинетики высвобождения лекарственных веществ и биодеградации полимеров, визуализации данных микроскопии (программы Image J, Zeiss LSM Browser, Image Pro Plus, Photoshop CC) и статистического анализа данных (программный пакет SPSS/PC+ Statistics™ 12.1).

В работе были использованы экспериментальные модели на различных уровнях: молекулярном, надмолекулярном, клеточном и тканевом: модель контролируемого биосинтеза полимеров, модели гидролитической и ферментативной деградации полимеров in vitro, модели высвобождения низкомолекулярных веществ и белков из полимерных пленок и микрочастиц, модель дифференцировки мезенхимальных клеток в остеогенном направлении, модели эпителиальных опухолей, модели некритического и критического костных дефектов.

В работе широко применяются биоинженерные технологии конструирования новых биообъектов: биополимеров нового химического строения и надмолекулярной структуры с новыми физико-химическими и биологическими свойствами, новых конструкций на основе этих биополимеров (нано- и микрочастиц, пористых 2D- и 3D-матриксов), комбинированных систем (микрочастиц с инкапсулированными лекарственными веществами и белками, способных к их пролонгированному высвобождению с заданной кинетикой) и гибридных конструкций (композитных 3D-матриксов с мезенхимальными стволовыми клетками).

Все эксперименты и полученные результаты высоко воспроизводимы и выявленные различия статистически значимы.

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ И АПРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Личный вклад автора. Диссертационная работа является самостоятельным научным исследованием соискателя, выполнявшимся в течение 15-ти лет. Личный вклад Бонарцева А.П. присутствует на всех этапах выполнения работы: бóльшая часть идей, исследований, результатов и текстов, изложенных в диссертации, либо получены автором лично, либо автор играл существенную роль в планировании и организации исследований, постановке задач, их решении, в анализе данных литературы, методических разработках экспериментов и их проведении, в обработке, анализе и интерпретации полученных данных, написании статей и обзоров по полученным результатам. Данный факт подтверждается тем, что автор является первым, вторым или последним соавтором (в том числе с указанием равноценности вклада авторов) в большом числе публикаций по теме диссертации. Вклад автора в совместных экспериментально-теоретических работах заключается в применении разработанных методов, моделировании и интерпретации экспериментальных результатов, полученных коллегами. Работа выполнена на базе биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; некоторые исследования были проведены на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». Совместное участие отражено в публикациях по теме диссертации.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на международном семинаре KIST-МГУ по нанотехнологиям (Сеул, Корея, 2007), на 2-ом русско-корейском совместном семинаре по нанотехнологиям (Москва, 2008), на 11-ой MipTec конференции – ведущей европейской конференции по исследованию лекарственных средств (Базель, Швейцария, 2008), международной конференции MipTec 2010 (Базель, Швейцария, 2010), на 8-ой международной встрече по фармацевтике, биофармацевтике и фармацевтическим технологиям (Турция, Стамбул, 2012), на международной конференции TechConnect World (США, Санта-Клара, 2012), на международной конференции EuroNanoForum 2013 (Ирландия, Дублин, 2013), на международной научной школе «Полимеры в медицине и здравоохранении» (Казань, 2013), на 38-ом конгрессе европейского биохимического общества (FEBS) (Санкт-Петербург, 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 конференции "Клеточные технологии на рубеже: Исследования и практика" (CTERP) (Санкт-Петербург, 2016), на Сеченовском международном биомедицинском саммите 2017 (СМБС-2017), (Москва, 2017), на Юбилейной конференции, посвященной 25-летию кафедры травматологи и ортопедии РУДН (Москва, 2017), на 6-ом Китайско-

Европейском симпозиуме по биоматериалам в регенеративной медицине (Порту, Португалия, 2017), на 26-ой конференции по биоматериалам в медицине и ветеринарной медицине (Рытро, Польша), на 2-ой Международной конференции "Клеточные технологии на рубеже: Исследования и практика" (CTERP) (Москва, 2018), на X Международном форуме: Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни (Москва, 2018), на 4-ой международной конференции по биомедицинским полимерам и полимерным биоматериалам (ISBPPB) (Краков, Польша, 2018), на Семинаре по научным связям Британского совета «Предотвращение контаминации биоматериалов для регенерации тканей и заживлению ран» (Ланкастер, Великобритания, 2018), на 12-ой Ежегодной научно-практической конференции «Философские проблемы биологии и медицины: между биофилософией и биоэтикой» (Москва, октябрь 2018), на 4-ом международном конгрессе биоматериалов и биосенсоров (Олюдениз, Мугла, Турция, 2019) (приглашенный доклад), на 30-ой ежегодной конференции Европейского общества биоматериалов (Дрезден, Германия, 2019), на XXIII Российском онкологическом конгрессе (Москва, Россия, 2019), на I Международном конгрессе по ортобиологии «Технологии регенеративной медицины в травматологии и ортопедии» (Москва, Россия, 2020), на совместной Зимней школе Европейского общества искуственных органов и Международного общества тканевой инженерии и регенеративной медицины (Зарагоза, Испания, 2021), на IX Приоровских чтениях совместно с II Конгрессом Ортобиология 2021 «Регенеративные технологии в травматологии и ортопедии с позиции доказательной медицины» (Москва, Россия, 2021), на заседании кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (17.02.2022).

Достоверность полученных результатов подтверждается публикациями в отечественных и зарубежных рецензируемых научных изданиях, в том числе, входящих в первый квартиль.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 61 работа: из них 51 – статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых базами данных (Web of Science, Scopus и RSCI), рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова (из них 6 – в журналах первого квартиля Q1); 2 – статьи в Российских научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки РФ; 6 патентов и 2 обзорные главы в книгах.

Объем, структура и логика работы. Диссертационная работа состоит из 7 глав: введения, обзора литературы, материалов и методов, раздела результатов и их обсуждения, состоящего из 10-ти разделов, заключения, выводов и списка литературы. В главе «Обзор литературы» обсуждается различие и сходство научно-технологических дисциплин биотехнология и биоинженерия, приводится описание современного состояния исследования и медицинского применения биоматериалов в России и мире, прежде всего, биоразлагаемых и

биосовместимых полимеров, полиоксиалканоатов и их природного предшественника, поли-3-оксибутирата, дается обзор основных проблем исследования полиоксиалканоатов: биодеградации, биосовместимости, применения этих полимеров для тканевой инженерии и систем пролонгированного высвобождения лекарств. В главе «Материалы и Методы» дано описание используемых в работе экспериментальных методов исследования. Первый раздел главы «Результаты» посвящена разработке контролируемого биосинтеза ПОБ и его сополимеров различной молекулярной массы и мономерного состава. Второй раздел - исследованию микро- и наноструктуры ПОБ и его сополимеров. Третий раздел - исследованию физико-химических свойств ПОБ и его сополимеров. Четвертый раздел - исследованию биодеградации ПОБ и его сополимеров in vitro. Пятый раздел – изучению биосовместимости in vitro поли-3-оксибутирата и его сополимеров. Шестой раздел – разработке и исследованию систем пролонгированного высвобождения низкомолекулярных веществ на основе ПОБ и его сополимеров. Седьмой раздел - разработке и исследованию систем пролонгированного высвобождения белков на основе микрочастиц из ПОБ и его сополимеров. Восьмой раздел – разработке 2D-матриксов на основе ПОБ и его сополимеров и исследованию их остеогенных свойств. Девятый и десятый разделы - разработке 3D-матриксов на основе ПОБ и его сополимеров, а также исследованию и разработке тканеинженерной конструкции на их основе и исследованию их остеогенных свойств.

Полный объём диссертации составляет 543 страниц, включая 195 рисунков и 36 таблиц. Список литературы содержит 791 наименований источников, из них 82 на русском и 709 на иностранных языках.

В результате выполнения диссертационной работы были сформулированы следующие

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:

1. Контролируемый биосинтез поли-3-оксибутирата и его сополимеров позволяет синтезировать поли-3-оксибутират и его сополимеры с 3-оксивалератом, с 3-окси-4-метилвалератом, с ди-, три- и полиэтиленгликолем с заданной молекулярной массой и мономерным составом.
2. Комплексное исследование надмолекулярной структуры и физико-химических свойств поли-3-оксибутирата и его сополимеров позволяет выявить закономерности во взаимосвязи химической структуры полимеров с их надмолекулярной структурой и основными физико-химическими параметрами (степень кристалличности, модуль Юнга и гидрофильность поверхности).

3. Комплексное исследование биодеградации *in vitro* поли-3-оксибутирата и его сополимеров позволяет установить содержание 3-оксивалерата в цепи сополимера (5,7-5,9 моль%), при пересечении которой меняется закономерность кинетики изменения физико-химических свойств в процессе его биодеградации *in vitro*, а также выявить изменение кинетики ранней стадии биодеградации биополимера *in vitro* у биоПЭГилированного поли-3-оксибутирата.
4. Комплексное исследование кинетики высвобождения низкомолекулярных лекарственных веществ и белка лизоцима из микрочастиц на основе поли-3-оксибутирата позволяет установить, что кинетика высвобождения паклитаксела из микрочастиц на основе поли-3-оксибутирата наилучшим образом соответствует кинетики биодеградации этого биополимера, а наилучшими параметрами высвобождения лизоцима обладают микрочастицы на основе биоПЭГилированного поли-3-оксибутирата.
5. Микрочастицы из поли-3-оксибутирата, загруженные паклитакселом, полученные методом электродинамического распылительного высушивания, обладают повышенной пролонгированной противоопухолевой эффективностью *in vitro* на опухолевых клетках и *in vivo* на моделях эпителиальных опухолей мышей по критерию локального торможения роста опухоли при сниженной острой токсичности в сравнении с традиционной противоопухолевой лекарственной формой (Таксолом).
6. Поли-3-оксибутират и его сополимеры не обладают цитотоксичностью по отношению к фибробластам и мезенхимальным стволовым клеткам, пористые матриксы из поли-3-оксибутирата вызывают спонтанную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток по остеогенному пути, а биоПЭГилирование этого полимера приводит к частичному подавлению этого эффекта. Пористые матриксы на основе поли-3-оксибутирата и его биоПЭГилированного сополимера поддерживают рост костной ткани на модели некритического костного дефекта на крысах *in vivo*.
7. Тканеинженерная конструкция на основе композитных 3D-матриксов на основе поли-3-оксибутирата и мезенхимальных стволовых клеток способствует почти полной регенерации критического костного дефекта у крыс *in vivo* за 1 месяц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ[1]

1.1. Биоматериалы, современное состояние исследований и разработок

Во многих случаях ткани и органы человека теряют способность функционировать должным образом из-за генетических нарушений, возраста, различных заболеваний или повреждений, полученных из-за несчастных случаев. В мире проводят более 300 миллионов сложных хирургических процедур по восстановлению органов и тканей. Учитывая постоянный рост населения и увеличение распространенности хронических заболеваний, это число, вероятно, будет продолжать быстро расти. Ряд этих нарушений можно вылечить при помощи лекарственной терапии. Однако многие другие повреждения органов и тканей различной этиологии не могут быть эффективно вылечены при помощи использования лекарственных средств – их лечение требует использования специальных медицинских изделий и материалов.

---

[1] В главе изложены данные, опубликованные в следующих научных статьях автора:

1. **Бонарцев А.П.**, Иорданский А.Л., Бонарцева Г.А., Босхомджиев А.П., Заиков Г.Е. Биодеградация и биомедицинское применение бактериального поли(3-оксибутирата) // Новое в полимерах и полимерных композитах. – 2010. – №1. – С. 17–42.
2. **Бонарцев А.П.**, Бонарцева Г.А., Шайтан К.В., Кирпичников М.П. Поли-3-оксибутират и биополимерные системы на его основе // Биомедицинская химия. – 2011. – Т. 57. – № 4. – С. 374-391.
3. **Бонарцев А.П.**, Яковлев С.Г., Филатова Е.В., Соболева Г.М., Махина Т.К., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В., Попов В.О., Кирпичников М.П. Пролонгированное высвобождение противоопухолевого лекарственного вещества, паклитаксела, из микросфер на основе поли-3-оксибутирата // Биомедицинская химия. – 2011. – Т. 57. – № 2. – С. 232–240.
4. **Бонарцев А.П.**, Бонарцева Г.А., Решетов И.В., Шайтан К.В., Кирпичников М.П. Применение полиоксиалканоатов в медицине и природные функции поли-3-оксибутирата // Acta Naturae. – 2019. – Т. 11. – №. 41. – С. 4–16.
5. **Бонарцев А.П.**, Воинова В.В., Бонарцева Г.А. Поли-3-оксибутират и микробиота человека (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54. – №. 6. – С. 561–584.
6. **Бонарцев А.П.**, Бонарцева Г.А., Воинова В.В., Кирпичников М.П., Шайтан К.В. Лекарственные системы на основе поли-3-оксиалканоатов: их микро- и наноструктура // Вестник Российского государственного медицинского университета (рубрика «Мнения», тематический номер «Наномедицина»). – 2018. – №. 6. – С. 130–134.
7. **Bonartsev A.P.**, Myshkina V.L., Nikolaeva D.A., Furina E.K., Makhina T.A., Livshits V.A., Boskhomdzhiev A.P., Ivanov E.A., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A. Biosynthesis, biodegradation, and application of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers - natural polyesters produced by diazotrophic bacteria. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, Ed: A. Méndez-Vilas, Formatex, Spain. – 2007. – V. 1. – P. 295– 307.
8. **Bonartsev A.P.,** Iordanskii A.L., Bonartseva G.A., Zaikov G.E. Biodegradation and medical application of microbial poly(3-hydroxybutyrate) // Journal of the Balkan tribological association. – 2008. – V. 14. – N. 3. – P. 359-395.
9. Voinova V., Bonartseva G., **Bonartsev A.** Effect of poly (3-hydroxyalkanoates) as natural polymers on mesenchymal stem cells // World Journal of Stem Cells. – 2019. – V. 11. – N. 10. – P. 764–786.
10. **Bonartsev A.P.** Poly(3-hydroxybutyrate): applications. // In: Encyclopedia of Polymer Applications. Mishra, M. (Ed.). CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton. – 2019. – P. 2061-2076.

Например, иногда сужение коронарной артерии, вызванное развитием атеросклероза и ее тромбоз нельзя вылечить при помощи курса гиполипидемических, антитромбогенных и/или сосудорасширяющих препаратов, и требуется проведение хирургической операции – баллонной ангиопластики с использованием медицинского изделия, металлического стента, который будет механически поддерживать просвет артерии необходимого диаметра для обеспечения нормального тока крови.

Живой организм состоит из миллиардов клеток, взаимодействующих друг с другом и объединенных в единую систему. Функции организма осуществляются за счет возникновения миллиардов сигнальных реакций, протекающих одновременно или последовательно, связанных друг с другом и со всеми органами и системами. Эти процессы протекают настолько согласованно и гармонично, что человек не обращает внимания на то, что происходит в нашем организме в норме. Он не знает, когда завершается процесс пищеварения в желудке, не заботится контролированием ритма сокращений сердца, и не вдается в подробности восприятия зрительных и слуховых сигналов. Между тем, органы и ткани, столь сложно и напряженно работающие, зачастую очень чувствительны, нежны и хрупки. Их несложно повредить, особенно, если не следить за ними должным образом – в этом случае возникают их заболевания. Замена или восстановление тканей с помощью хирургических методов может потребоваться при таких тяжелых заболеваниях, как органная недостаточность, опухолевые новообразования второй и третьей степени, ожоги и некротические процессы при инфекциях и воспалении. Для их лечения в настоящее время используют самые разнообразные биоматериалы и изделия на основе этих биоматериалов. Поврежденный орган или ткань можно вылечить с помощью введения в место повреждения или с целью компенсации потерянной функции различных материалов и изделий медицинского назначения, порою, изготовленных с помощью высоких технологий, такие как протезы тазобедренного сустава, искусственные сердечные клапаны и кардиоваскулярные стенты. В настоящее время диагностировать заболевания органов и тканей стало намного проще с усовершенствованием технологий диагностики, теперь можно добиться более быстрого и эффективного лечения с использованием новых лекарственных препаратов, поврежденные ткани могут быть восстановлены с помощью новых материалов и технологий, что увеличивает срок и качество жизни человека (Hasirci and Hasirci, 2018).

Однако, сначала надо разобраться с определениями и терминами, прежде всего, что собственно понимается под материалами медицинского назначения и биоматериалами. На Западе довольно серьезно занимались проблемами определений этих терминов. Это связано с тем, что в западной науке имеется целая отдельная дисциплина: Biomaterial Sciences, несколько научных обществ, из которых наиболее известными и большими являются Society for

Biomaterials (https://biomaterials.org) и European Society for Biomaterials (https://www.esbiomaterials.eu), а также целый ряд высокорейтинговых (входящих в Q1, с импакт-фактором более 5,0) журналов, таких как Biomaterials, Acta Biomaterialia, Advanced Healthcare Materials и др. Один из ведущих ученых в этой области Дэвид Виллиамс (David Williams) является автором классического определения биоматериалов как материалов, предназначенных для взаимодействия с биологическими системами для оценки, лечения, дополнения или замены любой ткани, органа или функции организма. Это определение было поддержано всем научным сообществом Америки и Европы. А также было принято, что термины Биоматериалы и Биомедицинские материалы являются полностью тождественными. В Китае, Индии, Бразилии и в большинстве других стран мира были приняты западные определения этих терминов. Однако, в 2018 г. этими научными обществами было принято новое определение, которое довольно существенно отличается от старого. Согласно ему Биоматериал (биомедицинский материал) - это материал, который сконструирован таким образом, чтобы он мог обеспечивать должным образом ту или иную терапевтическую или диагностическую функциональность посредством взаимодействия с живыми системами. Обычно терминологическая путаница в определении биоматериалов как на Западе, так и у нас возникает вокруг следующих вопросов: 1) под биоматериалами часто понимают материалы природного происхождения 2) не всегда понятно, можно ли относить к биоматериалам и их составным частям живые организмы и ткани.

Однако, в отечественной традиции общепринято определение, приведенное в стандарте ГОСТ ISO 10993-2011 (ГОСТ ISO 10993-1-2011) по доклиническим исследованиям медицинских изделий. Согласно ему материал медицинского назначения – это любой синтетический или природный полимер, металл, сплав, керамика или другой нежизнеспособный материал, включая нежизнеспособную биологическую ткань, применяемый в качестве медицинского изделия или его части. Кроме того, можно ориентироваться и на определение, данное в учебном пособии Биосовместимые материалы, в составлении которого приняли участие наши ведущие ученые. Материалы называются медицинскими материалами (син. биоматериалы, материалы медицинского назначения, биомедицинские материалы) при условии их биосовместимости. А Биосовместимость – это способность материала, изделий или устройств выполнять свои функции без отрицательных реакций организма «хозяина». Таким образом, понятие материалов медицинского назначения согласно российской научной традиции более узкое (Севастьянов и Кирпичников, 2011).

Необходимо также привести определение Биоматериалам, которое приведено в Большой Российской Энциклопедии в статье с соответствующим названием под авторством академика М.И. Штильмана: «Биоматериалы (материалы медико-биологического назначения), природные

и синтетические материалы, предназначенные для создания изделий, устройств и препаратов, применяемых в медицине, биотехнологии, сельском хозяйстве, косметологии и пр., и используемые для обеспечения и оптимизации жизнедеятельности человека, животных, растений, микроорганизмов. Биоматериалы функционируют в непосредственном контакте с живыми тканями и клеточными объектами.

Наиболее крупные области применения Биоматериалов – производство медицинских имплантатов, в т. ч. предназначенных для введения в сердечно-сосудистую (эндопротезы сосудов, клапанов и целого сердца и др.) и костную (эндопротезы суставов и фрагментов костей, крепёжные детали, клеи и цементы) системы, офтальмологических имплантатов, шовных материалов и др.; препаратов, обладающих различными типами биологической активности; материалов для разделения и очистки биологических жидких тканей и сред; полимерных систем для культивирования и выращивания культур клеток и тканей. В зависимости от области применения Биоматериалов могут быть использованы для создания высокопрочных изделий, эластичных и гелевых систем, а также водорастворимых препаратов.

Одно из главных требований, предъявляемых к Биоматериалам, – биосовместимость – способность выполнять определённую функцию в течение требуемого времени без вреда для окружающих тканей и организма в целом; такие материалы называют биологически совместимыми или биосовместимыми. Исключение составляют Биоматериалы, являющиеся компонентами препаратов с биоцидной или ингибирующей активностью. Важное свойство Биоматериалов, контактирующих с кровью, – гемосовместимость, т. е. способность не оказывать отрицательного действия на кровь. В ряде случаев изделия из Биоматериалов должны легко подвергаться биодеградации, сопровождающейся уменьшением размера и массы в процессе функционирования под действием компонентов окружающей биологической среды, в частности в результате биодеструкции, приводящей в данных условиях к разрыву химических связей в молекуле Биоматериалов». Как можно видеть, в этом определении также ключевым свойством биоматериалов обозначается их биосовместимость, в качестве одного из основных свойств упоминается также и способность к биодеградации.

Из этих определений следует разделение биоматериалов на несколько больших групп по своему химическому строению. Это металлы, керамика, синтетические, природные полимеры, ксено- и аллогенные биоматериалы, т.е. обработанные ткани животных, и композиционные материалы.

Биоматериалы каждой из этих групп по причине сильного различия в химическом строении довольно сильно различаются и по методикам получения и обработки, основным физико-химическим и биологическим свойствам, а также применению в медицине. В соответствии со своими свойствами биоматериалы обладают своими преимуществами и

недостатками, а также в разной степени соответствуют, а точнее, не соответствуют свойствам живых тканей, для лечения которых предназначены.

Наиболее оптимальный способ классификации медицинских изделий основан на 3-х ступенчатой классификации по трем основным категориям:

1) терапевтическому назначению (например, для регенерации костной ткани),
2) функциональному типу изделия (например, изделие для фиксации костей - шурупы),
3) материалу или материалам, из которых оно изготовлено.

Биоматериалы, используемые в медицине, можно разделить на следующие типы:

1) аллогенные и ксеногенные децеллюляризированные биоматериалы,
2) природные биополимеры,
3) синтетические полимеры,
4) металлы,
5) керамика,
6) композиционные материалы (Штильман, 2005 – 2019).

Аллогенные (децеллюляризированные ткани человека) и ксеногенные (децеллюляризированные ткани животных) биоматериалы отличаются от природных биополимеров тем, что обладают определенным композиционным составом и микроструктурой. Эти биоматериалы широко используются для замещения и стимуляции регенерации костной, хрящевой и мягкой соединительной тканей, а также в косметологии. Однако, использование этих биоматериалов несет потенциальные риски вирусного инфицирования и высокой иммуногенности.

Биополимеры представляют собой твердые вещества, которые необходимо переработать в изделия нужной формы и микроструктуры. Эти биополимеры имеют различное происхождение, их получают из тканей различных организмов: млекопитающих (коллаген, гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат), насекомых (шелк), ракообразных (хитозан), высших растений (целлюлоза), водорослей (альгинат), микроорганизмов (полиэфиры). Поскольку все они созданы организмами при помощи биосинтеза различными регулируемыми ферментными системами, то их свойства обычно строго контролируются. Кроме того, имеются ферменты для их расщепления и, соответственно, эти биополимеры, как правило, способны к биодеградации в биологических средах. Источники этих биоматериалов многочисленны и, в большинстве случаев, выделить их довольно просто и недорого. Одно из основных их преимуществ является то, что их физико-химические свойства очень похожи на свойства живых тканей, а сами эти биоматериалы обладают хорошей биосовместимостью. Однако, они не всегда обладают достаточной прочностью для ряда биомедицинских применений.

Синтетические полимеры тоже обычно не обладают хорошим сочетанием физико-химических свойств. Некоторые их типы, например, полиэтилен сверхвысокой молекулярной массы обладает значительной прочностью. Однако, большинство из этих полимеров - гидрофобные (например, полиметилметакрилат, поливиниловый спирт, Teflon, Dacron, полиэтилен), и, следовательно, их свойства не вполне соответствуют свойствам биологических тканей, хотя есть и гидрофильные синтетические полимеры. В результате их биосовместимость с клетками и тканями в ряде случаев оставляет желать лучшего. Кроме того, большинство синтетических полимеров в силу их химического строения не биоразлагаемы.

Большим преимуществом полимерных материалов, как природных, так и синтетических является то, что из них можно формовать изделия самой различной формы и внутренней структуры при использовании целого ряда относительно простых технологических процедур, например, экструзии или микролитья.

Керамика - это совершенно другая категория биоматериалов. Керамика не подвергается химическому и ферментативному разложению, не проводит тепло или электричество. Как правило, керамические материалы инертны, тверды и хрупки, обладают высокой прочностью под действием сжатия и имеют высокую плотность. Благодаря этим свойствам они больше похожи на твердые ткани, такие как кости и зубы в организме. Условия их обработка не являются мягкими, а технологии крупномасштабного производства или изготовления изделий сложной формы – довольно сложные. Зубные коронки - идеальное место использования керамических материалов, потому что они подвергается сжимающим нагрузкам во время жевания и резким перепадам температуры.

Металлы, в отличие от полимеров и керамики, не имеют прямого аналога биоматериала в организме. Однако в них как материалах медицинского назначения есть большая потребность, так как они способны выдерживать большие несущие нагрузки. Металлы выдерживают большое растяжение, сжатие, напряжения сдвига и удар. Никакой другой тип биоматериала не обладает такими свойствами. Однако они обладают высокой реакционной способностью и склонны к окислению, например, коррозии. Они также высвобождают ионы, что может иметь нежелательные последствия, например, токсичность. Однако, окисление может приводить к образованию очень прочной оксидной пленки, например, в случае формирования слоя оксида титана на титане, который останавливает коррозию и выброс ионов. Вот почему титан предпочтительнее в качестве материала для изготовления имплантатов. Металлы имеют кристаллическую структуру и обладают металлическими связями между атомами - это делает их хорошими проводниками тепла и электричества. Поэтому металлы используют в качестве материалов, проводящих электрические сигналы, в имплантированных датчиках и кардиостимуляторах, но они не подходят в качестве материалов в зубных имплантатах, где

материал подвержен колебаниям температуры. Из-за гибкости металлов, их часто используют в качестве проволоки или скоб для закрытия ран и фиксации переломов костей.

Композиты - это комбинации двух или более материалов, которые образуют единое целое; эти материалы обладают структурой, сочетающей свойства своих компонентов для получения значительно более улучшенного продукта. Свойства композитов трудно обобщить, потому что имеется множество различных комбинаций материалов для их создания. Сердечные клапаны из графита с углеродным покрытием, армированные углеродным волокном и костные имплантаты из нержавеющей стали, покрытые гидроксиапатитом, являются некоторыми из таких примеров. В случае сердечного клапана графитовый сердечник имеет низкую плотность, чтобы сделать клапан легким, а пиролитический углерод стекловидный, твердый и инертный. Таким образом, композитный клапан становится инертным в очень сложных средах сердечно-сосудистой системы, где основной проблемой является свертывание крови и адсорбция элементов крови на клапане, но при этом эти клапаны достаточно легкие, чтобы колебаться с довольно высокой периодичностью и амплитудой под воздействием физиологического давления, приложенного к клапану. Имплантаты из нержавеющей стали, титана или хром-кобальтового сплава с гидроксиапатитным покрытием обладают высокой прочностью благодаря наличию металла, но адгезия костного цемента на имплантате значительно улучшается, когда поверхность покрыта материалом, по составу аналогичным минералу компонента кости, фосфата кальция. С развитием химии (особенно химии полимеров и органической химии), материаловедения, клеточной и молекулярной биологии, медицины, использование биоматериалов стремительно росло с годами, и сегодня оно составляет многомиллиардный бизнес. Наиболее частым применением является использование медицинских изделий и устройств для офтальмологии. Контактные линзы не имплантируют, а используются пациентом ежедневно, тогда как интраокулярные линзы, которые в основном применяются для лечения катаракты, имплантируют для замены собственного хрусталика глаза. При старении населения потребность в протезах бедра и колена продолжает расти среди пожилых людей из-за артрита и по другим причинам, и эти изделия имплантируют в объеме до 200 000 в год. Эти имплантаты необходимы и молодому населению из-за травм, полученных при дорожных происшествиях и при занятиях спортом. Сердечно-сосудистые заболевания имеются у значительной части населения, и среди используемых медицинских изделий на основе биоматериалов значительную долю составляют протезы сосудов и сердечных клапанов. Хотя есть возможность использования аутотрансплантатов и ксенотрансплантатов (в основном полученных из свиных тканей) для замены сердечных клапанов, изделия на основе различных биоматериалов также успешно применяют. Самыми используемыми изделиями являются катетеры для кратковременного применения, объем их использования составляет миллионами

штук в год, а объем рынка составил в 2019 г. более 40 млрд.долл. в год (Hasirci and Hasirci, 2018).

Современное состояние развития наук о биоматериалах можно увидеть с помощью анализа специализированных баз научной литературы, такой как PubMed (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov). Особенностью этой базы данных является наличие хорошо разработанных и отлаженных инструментов для обработки данных. Так, помимо стандартных инструментов поиска статей и подсчета их числа по ключевым словам, и времени публикации, можно использовать более сложные инструменты анализа количества статей по различным категориям: стране авторов публикации, виду исследуемого или используемого в научной работе биоматериала, используемых лабораторных животных и клеточных культур, типов медицинских изделий, исследуемых органов и тканей и многих других. Причем, это не просто ключевые слова, по которым не всегда можно точно выявить специфику статьи, а именно категория, которая присваивается специалистами этой базы данных и научных журналов.

Нами был проведен анализ базы биомедицинских научных публикаций PubMed по категории биоматериалы (“biomaterials(mh)”). При этом исследовалось два 10-летних периода этих научных статей: с 2000 по 2009 г. и с 2010 по 2019 г.

Сначала мы провели анализ публикаций по странам аффиляций научных статей. Результаты этого анализа приведены на Рисунке 1.

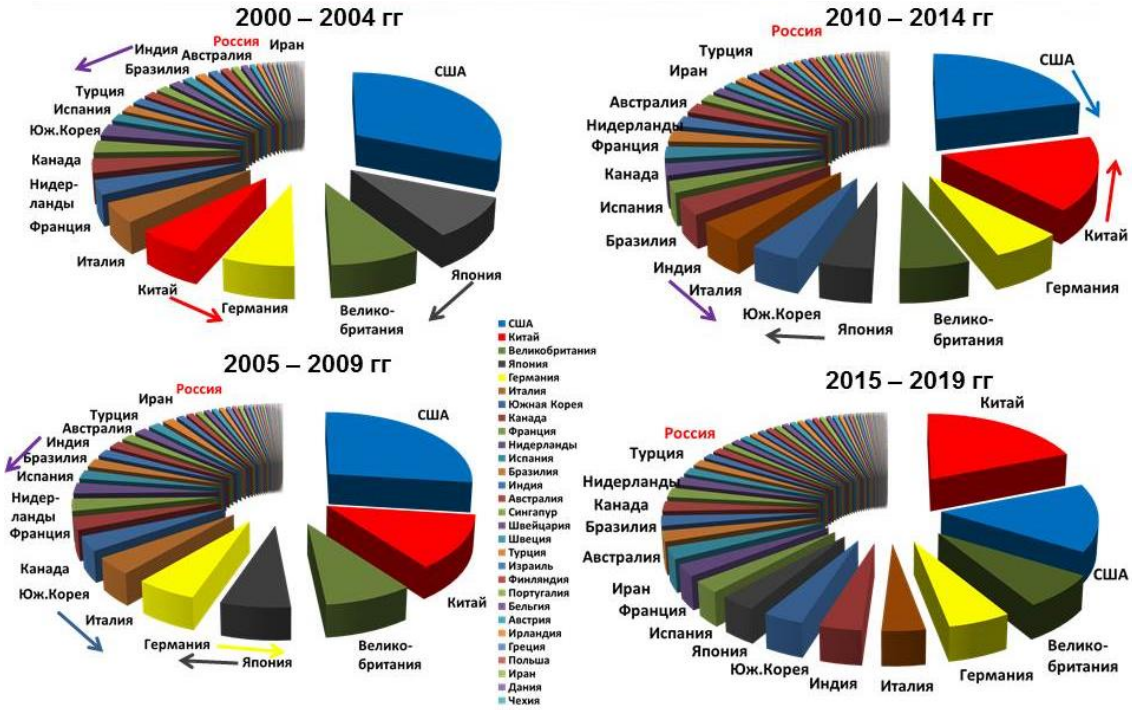
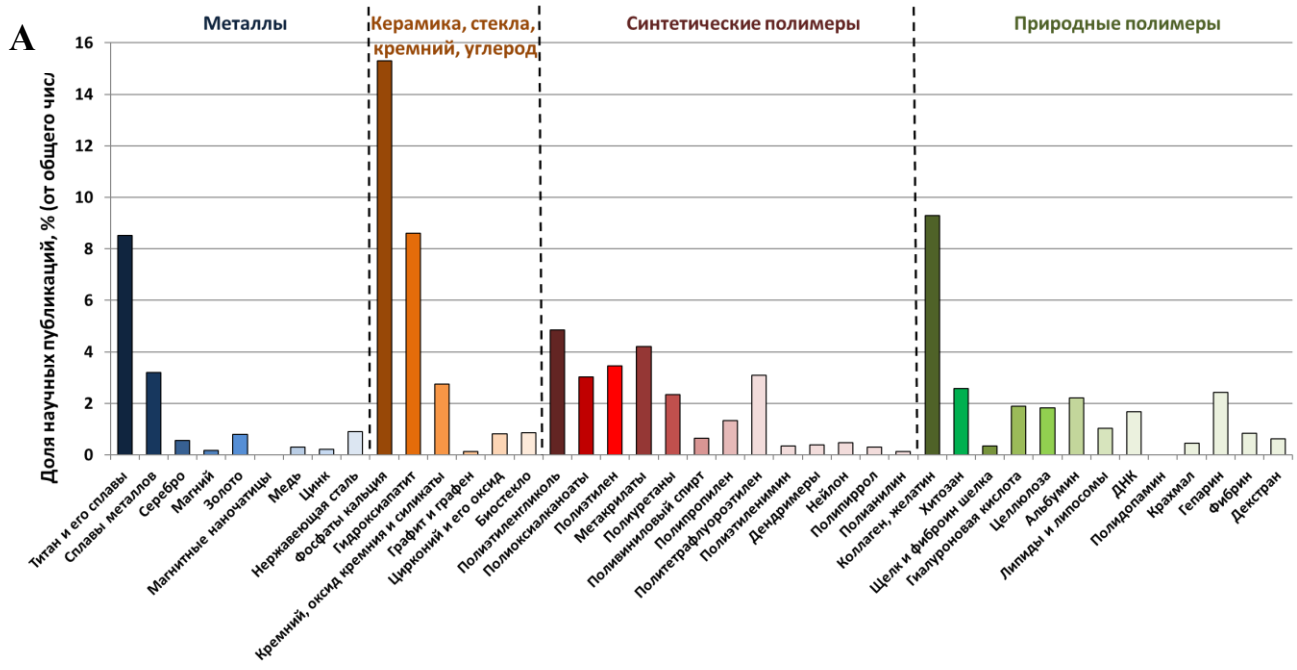


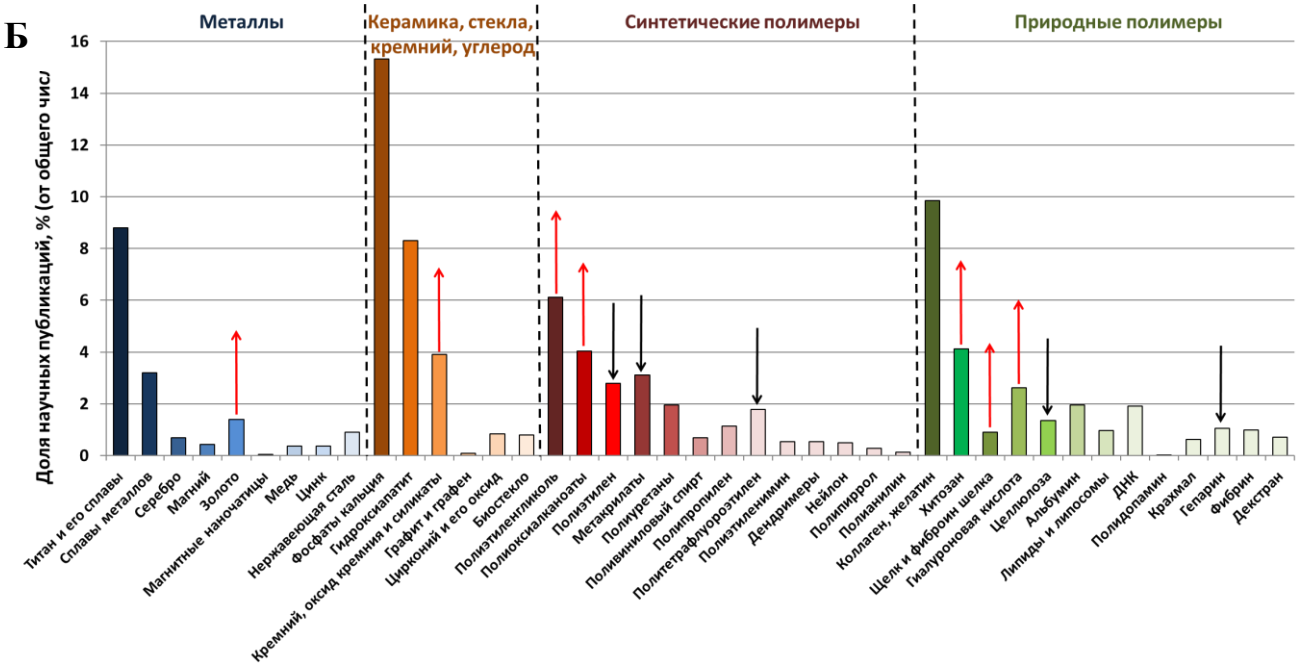
Рисунок 1. *Распределение научных публикаций в базе PubMed (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov) в категории «Биоматериалы» (“biomaterials(mh)”) по их количеству во временных периодах: 2000-2004 гг., 2005-2009 гг., 2010-2014 гг. и 2014-2019 гг. по категориям стран.*

При рассмотрении круговых диаграмм на Рисунке 4 видно, что, к сожалению, Россия представлена в исследованиях биоматериалов на одном из последних мест, далеко позади Китая, США, стран ЕС и даже таких стран, как Турция, Иран и Южная Корея. Однако, все-таки за последние 20 лет наша страна немного продвинулась в этой научной области. Это подчеркивает особую важность развития направления по исследованию биоматериалов, в частности, полимерной биоинженерии. Из диаграмм виден также активный рост в выбранной категории публикационной активности Китая, который к последней пятилетке обогнал в этом отношении даже США, а также неуклонное падение числа публикаций у Японии. Видно значительное возрастание числа публикаций у таких стран, как Индия, Южная Корея, Австралия и Иран.

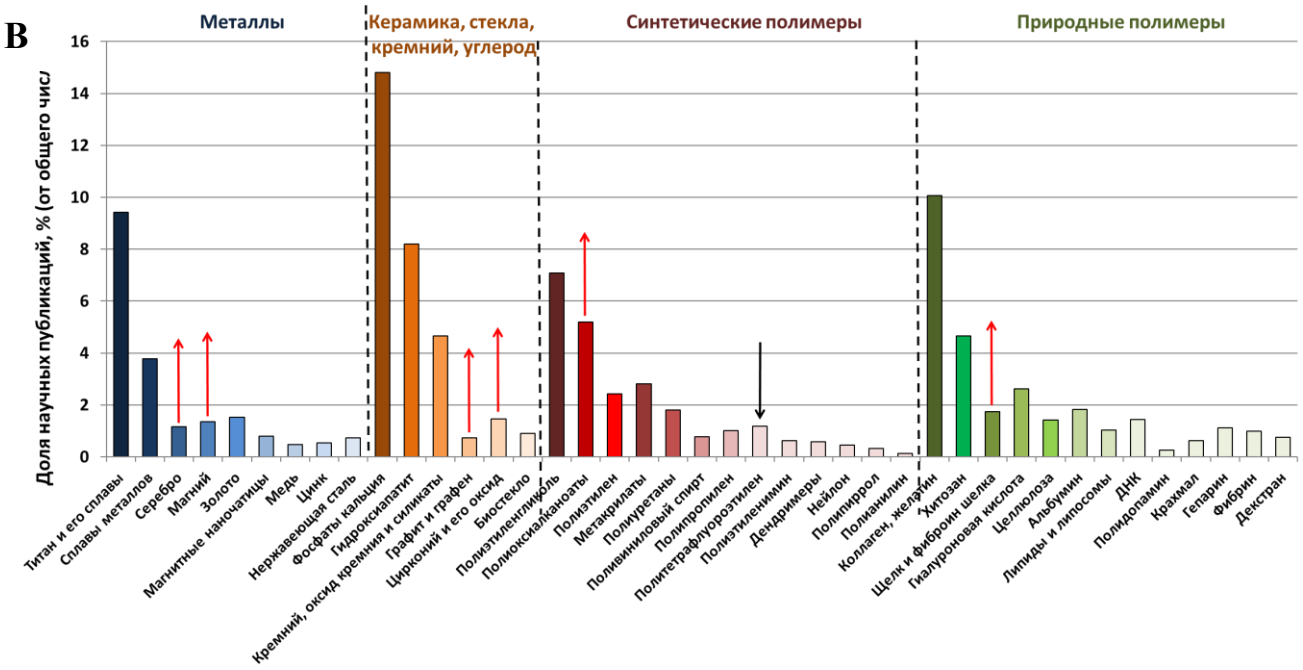
Далее нами было проанализировано относительное (процентное по отношению к общему числу в выбранной категории) количество статей по категориям различных типов биоматериалов. Результаты этого исследования показаны на диаграммах Рисунка 2.



Б


Металлы
Керамика, стекла, кремний, углерод
Синтетические полимеры
Природные полимеры
Доля научных публикаций, % (от общего чис
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Титан и его сплавы
Сплавы металлов
Серебро
Магний
Золото
Магнитные наночатицы
Медь
Цинк
Нержавеющая сталь
Фосфаты кальция
Гидроксиапатит
Кремний, оксид кремния и силикаты
Графит и графен
Цирконий и его оксид
Биостекло
Полиэтиленгликоль
Полиоксиалканоаты
Полиэтилен
Метакрилаты
Полиуретаны
Поливиниловый спирт
Полипропилен
Политетрафлуороэтилен
Полиэтиленимин
Дендримеры
Нейлон
Полипиррол
Полианилин
Коллаген, желатин
Хитозан
Щелк и фиброин шелка
Гиалуроновая кислота
Целлюлоза
Альбумин
Липиды и липосомы
ДНК
Полидопамин
Крахмал
Гепарин
Фибрин
Декстран

В


Металлы
Керамика, стекла, кремний, углерод
Синтетические полимеры
Природные полимеры
Доля научных публикаций, % (от общего чис
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Титан и его сплавы
Сплавы металлов
Серебро
Магний
Золото
Магнитные наночатицы
Медь
Цинк
Нержавеющая сталь
Фосфаты кальция
Гидроксиапатит
Кремний, оксид кремния и силикаты
Графит и графен
Цирконий и его оксид
Биостекло
Полиэтиленгликоль
Полиоксиалканоаты
Полиэтилен
Метакрилаты
Полиуретаны
Поливиниловый спирт
Полипропилен
Политетрафлуороэтилен
Полиэтиленимин
Дендримеры
Нейлон
Полипиррол
Полианилин
Коллаген, желатин
Хитозан
Щелк и фиброин шелка
Гиалуроновая кислота
Целлюлоза
Альбумин
Липиды и липосомы
ДНК
Полидопамин
Крахмал
Гепарин
Фибрин
Декстран

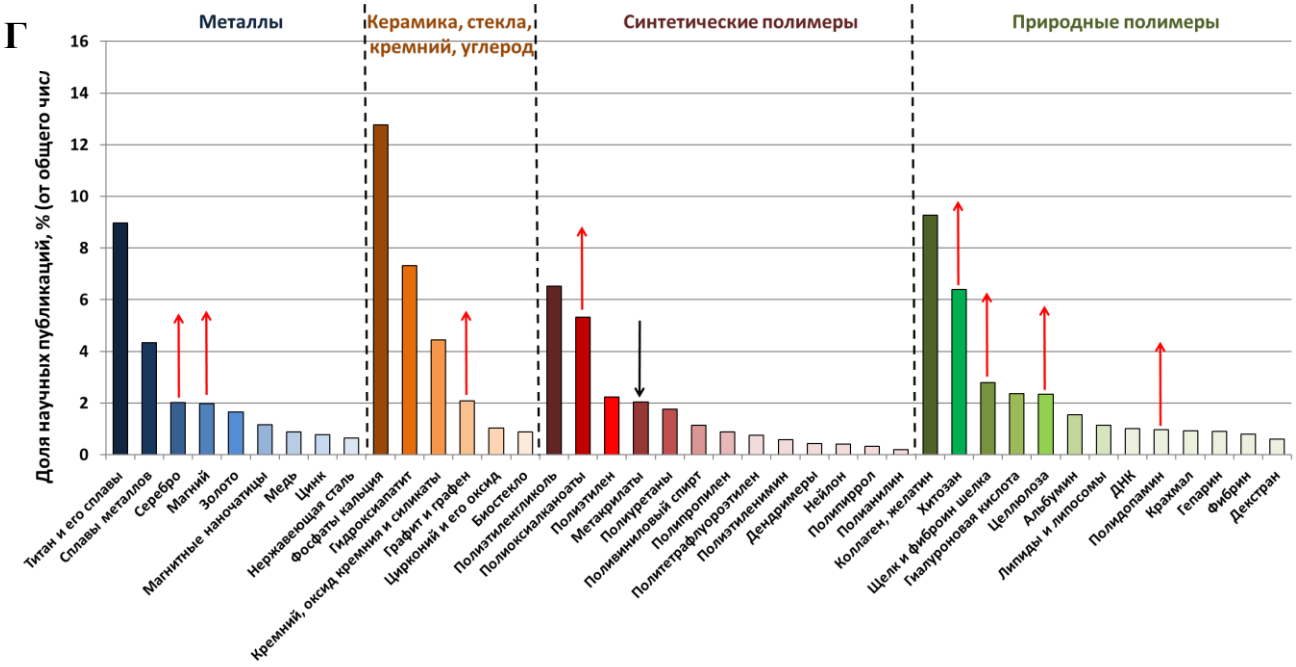


Рисунок 2. *Распределение научных публикаций в базе PubMed (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov) в категории «Биоматериалы» (“biomaterials(mh)”) по их количеству во временных периодах: 2000-2004 гг. (А), 2005-2009 гг. (Б), 2010-2014 гг. (В) и 2014-2019 гг. (Г) по категориям различных типов биоматериалов.*

Из анализа диаграмм на Рисунке 2 следует, что соотношение научных статей (круговые диаграммы в правом верхнем углу основных диаграмм) по основным типам биоматериалов: природным полимерам, синтетическим полимерам, керамике и металлам за 20 лет практически не изменялось. Однако, наблюдался значительный рост относительного числа статей по некоторым биоматериалам: серебро, магний, графену, хитозан, фиброин шелка и полиоксиалканоаты. Наблюдалось также падение популярности таких биоматериалов, как полиэтилен и метакрилаты.

Очень познавательно было проанализировать число статей по категориям используемых в исследованиях клеточных культур и лабораторных животных, для терапии которых предназначены изучаемые биоматериалы и изделия на их основе. На Рисунке 3 показано распределение относительного числа статей по категории различных клеточных культур.

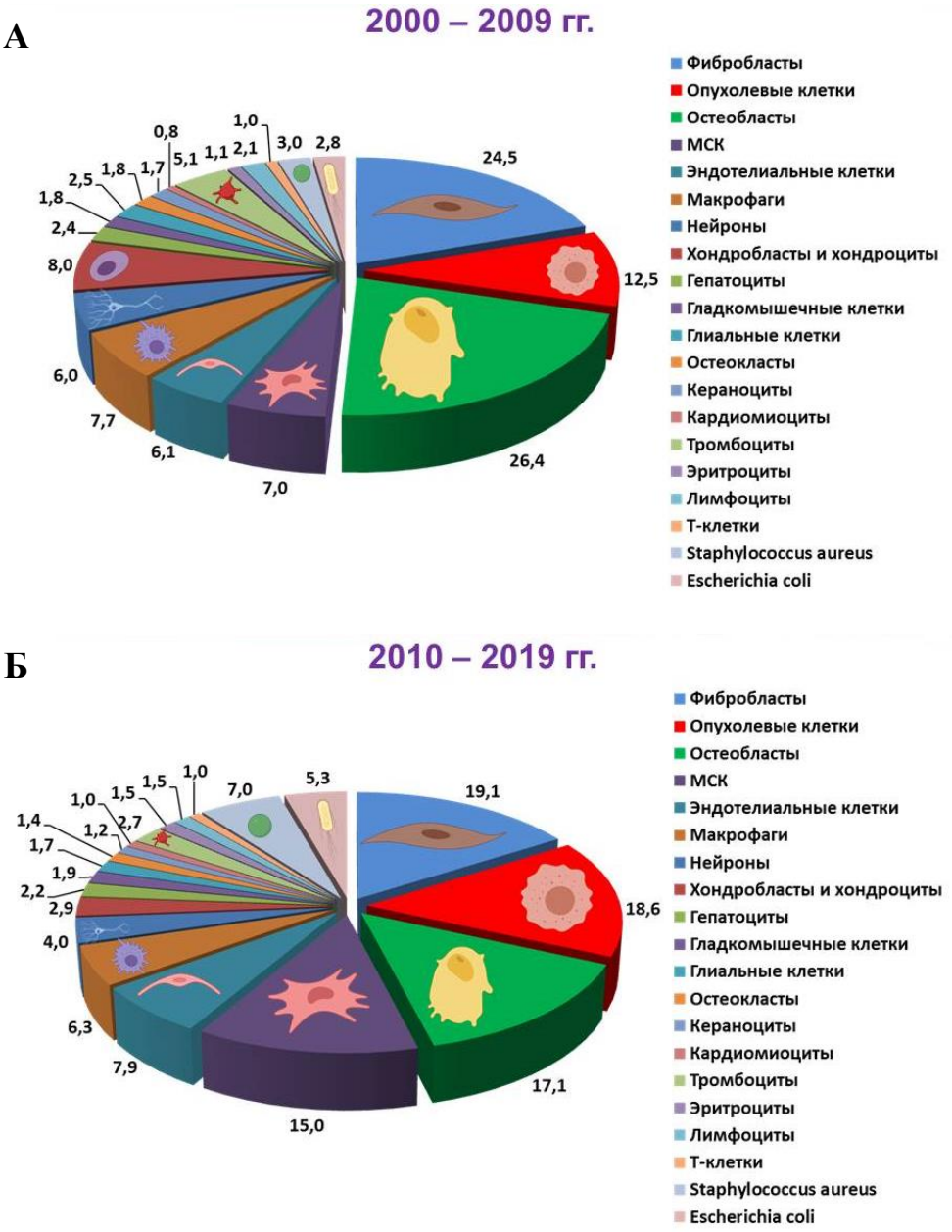


Рисунок 3. *Распределение научных публикаций в базе PubMed (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov) в категории «Биоматериалы» ("biomaterials(mh)") по их относительному количеству (процентному соотношению от общего количества) во временных периодах: 2000-2009 гг. (А) и 2010-2019 гг. (Б) по категориям различных культур клеток, используемых в этих исследованиях.*

Видно, что во втором десятилетии века по сравнению с началом века значительно выросло относительное число работ с использованием культур мезенхимальных/стромальных стволовых клеток и опухолевых клеток. При этом значительно упало число научных исследований с использованием хондробластов/хондроцитов и тромбоцитов. Следует также обратить внимание на примерно 2-кратное увеличение процентной доли научных работ с

использованием бактерий в исследуемой категории «Биоматериалы», что, вероятно, связано с резким обострением проблемы резистентности микроорганизмов к антибиотикам.

Такая же любопытная картина наблюдается при анализе доли статей по категориям видов лабораторных животных, используемых в исследованиях *in vivo* (Рисунок 4).

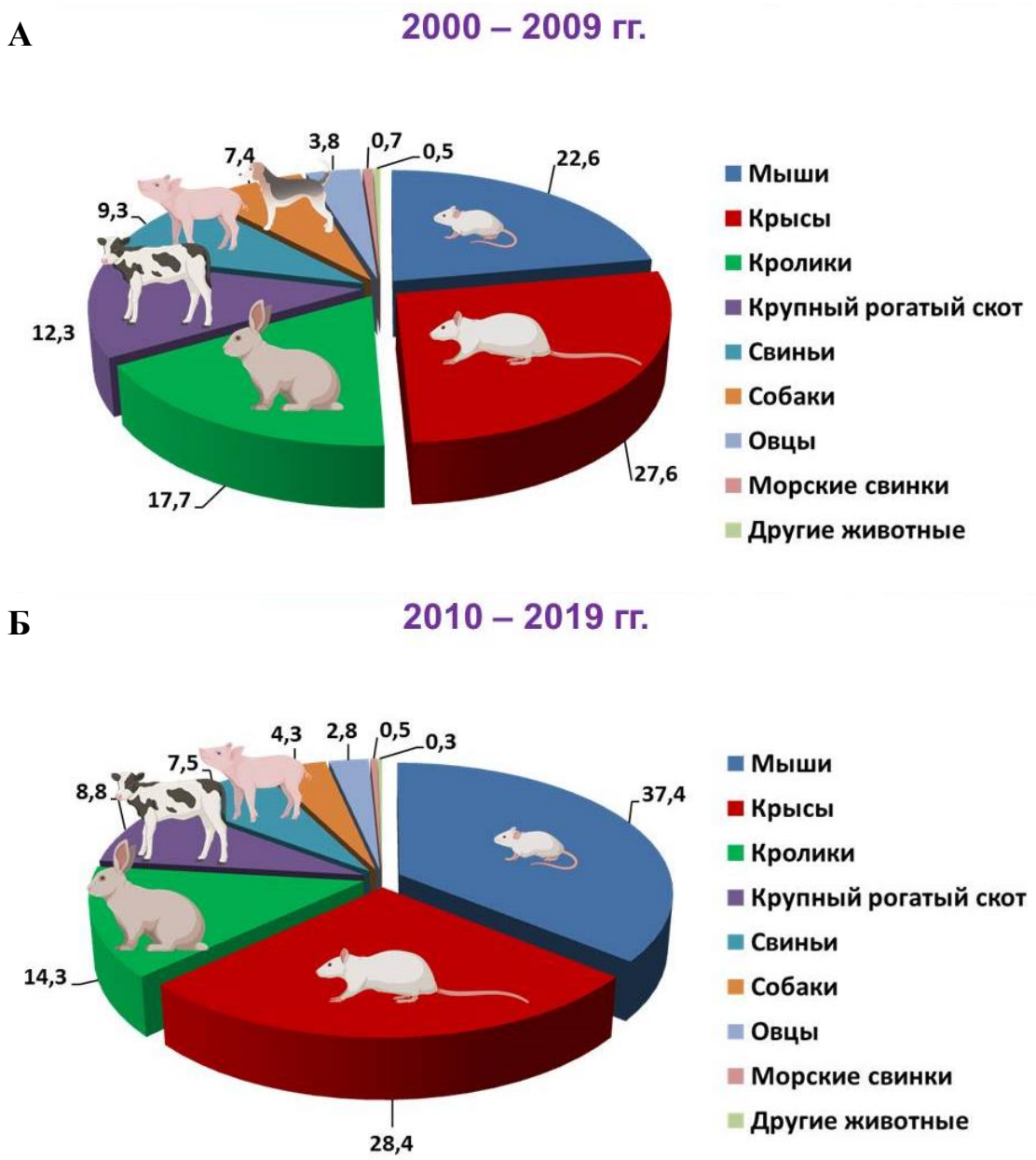


Рисунок 4. *Распределение научных публикаций в базе PubMed (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov) в категории «Биоматериалы» ("biomaterials(mh)") по их относительному количеству (процентному соотношению от общего количества) во временных периодах: 2000-2009 гг. (А) и 2010-2019 гг. (Б) по категориям различных лабораторных животных, используемых в этих исследованиях.*

На диаграммах видно, что исследования животных во втором десятилетии века проводилось гораздо чаще на лабораторных мышах, примерно так же часто – на крысах, и

значительно реже на крупных животных: кроликах, крупном рогатом скоте, свиньях, собаках и овцах по сравнению с первым десятилетием 21-ого века. Эти данные отражают общую тенденцию отхода от исследований на крупных животных *in vivo* и ужесточение во всем мире этических правил обращения с животными.

По некоторым оценкам мировой рынок биосовместимых материалов (биоматериалов) в мире составлял в 2019 г. 108,6 млрд. долл., тогда как в 2016 г. он был почти на треть меньше – 70 млрд. долл. Рост рынка в 10-е гг. составил около 15% в год. Из них рынок металлов составил 32,5 млрд. долл., а рынок ксено- и аллогенных биоматериалов и природных полимеров – 18,7 млрд. долл. (Рисунок 5).

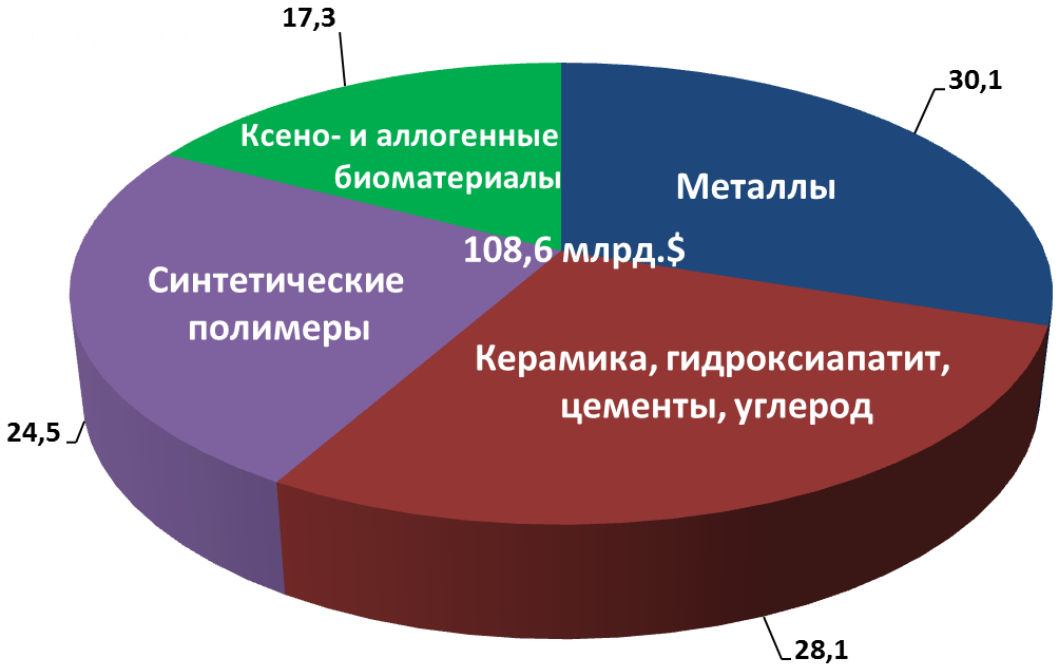


Рисунок 5. *Доли мирового рынка биоматериалов и медицинских изделий на их основе по типу материалов.*

Мировой рынок медицинских изделий на основе биоматериалов составил в 2019 г. 413 млн. долл., из которых 198 млн. долл. пришлись на рынок США и Канады, 83 млн. долл. – на рынок Китая и других стран Дальнего Востока, 101 млн. долл. – Западной Европы, 18 млн. долл. – России и Восточной Европы, 13 млн. долл. – Ближнего Востока и Африки. Продажи медицинских изделий и материалов для ортопедии и челюстно-лицевой хирургии составляли в 2019 г. наибольшую часть – около 30,2 млрд. долл., а медицинские изделия для стоматологии – лишь 7,3 млрд. долл. (https://www.reportsanddata.com/report-detail/biomaterials-market) (Рисунок 6).

В 2011 г. среди 11-ти наиболее часто имплантируемых медицинских устройств в США на первом месте были искусственные глазные линзы - 2,6 млн. процедур в год, на 2-ом месте тимпаностомические трубки - 715 тыс. процедур, затем коронарные стенты - 560 тыс., протезы

коленного сустава - 543 тыс., винты, штифты и пластины для лечения травматических переломов - 453 тыс., внутриматочные спирали - 425 тыс., винты, стержни и диски для хирургии позвоночника – 413 тыс., имплантаты груди - 366 тыс., кардиостимуляторы - 235 тыс., протезы бедренного сустава - 230 тыс. По уровню годовых расходов протезы коленного сустава были на 1-ом месте с 12 млрд. долл. в год, на 2-ом устройства для хирургии позвоночника – 10 млрд. долл. в год и на 3-ем искусственные глазные линзы – 8-10 млрд. долл. в год. Всего расходы на перечисленные процедуры составили 61,3 млрд. долл. в 2011 году (Hasirci and Hasirci, 2018).



***Рисунок 6**. Доли мирового рынка биоматериалов и медицинских изделий на их основе по терапевтическому их назначению.*

Распределение мирового рынка имплантируемых и контактирующих с кожей и слизистыми изделий на основе биоматериалов по типу изделий представлен на диаграмме Рисунка 7. Видно, что наибольший объем продаж приходится на такие медицинские изделия, как инъекционные гели и филлеры, кардиоваскулярные стенты, сосудистые катетеры, изделия для костной фиксации (пластины, винты, штифты), протезы коленного сустава, ксено- и аллогенные биоматериалы для ортопедии, контактные и интраокулярные линзы.

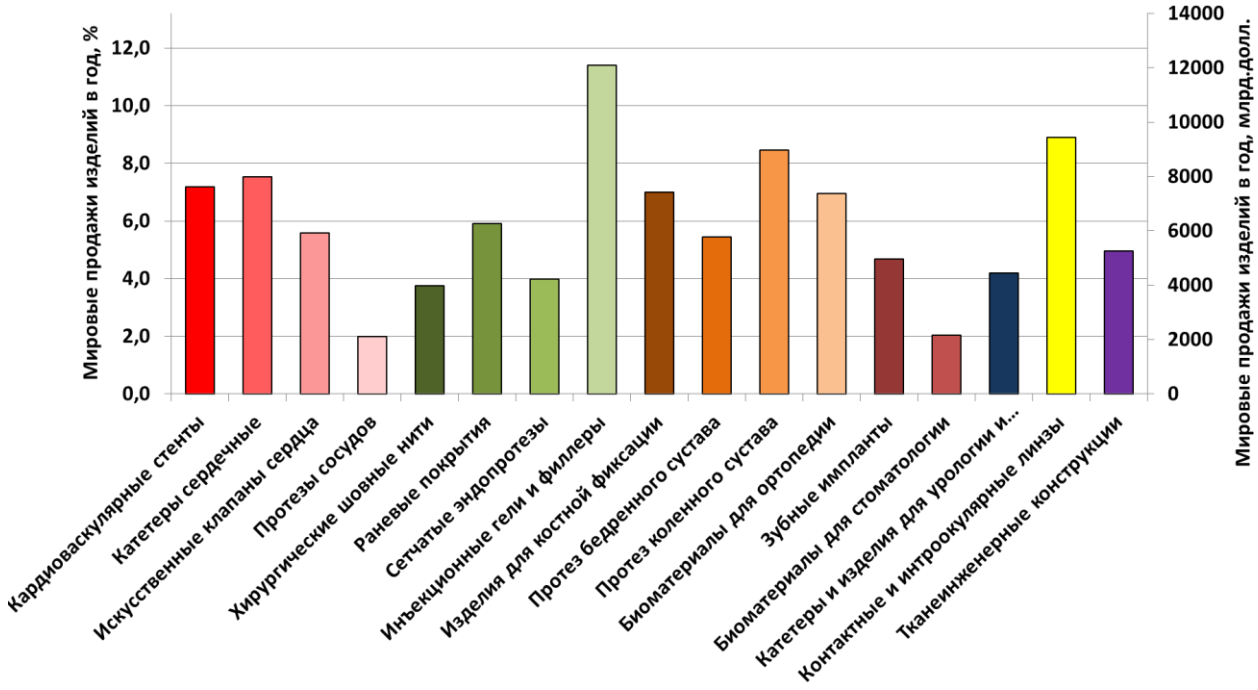


***Рисунок** 7. Мировые продажи биоматериалов и медицинских изделий на их основе различных типов.*

В России как рынок, так и производство биоматериалов и медицинских изделий на их основе, особенно биоматериалов и изделий, предназначенных для контакта или имплантации в ткани и органы человека развиты крайне недостаточно. Относительно хорошо развит и в настоящее время активно развивается лишь рынок одноразовых гигиенических изделий (масок, салфеток), пластиковой посуды, пластырей, шприцов, медицинской одежды, а также хирургических инструментов и некоторых видов медицинских аппаратов и приборов, т.е. изделия из материалов, не имплантируемые в организм и не контактирующие с кровью и раневыми поверхностями кожи и слизистых.

В России имеется более 50-ти предприятий, осуществляющих производство медицинских изделий из биосовместимых материалов, как еще с советских времен, модернизированных в 90-е и 00-е годы, так и основанных и начавших производство в 00-е и 10-е гг., а также являющихся подразделениями крупных западных корпораций, локализовавшим производство своих изделий. Основные типы медицинских изделий, производимых этими предприятиями, это винты, пластины и стержни для фиксации костей в челюстно-лицевой хирургии и ортопедии (биоматериалы – титан и его сплавы, никелид титана, нержавеющая сталь), зубные импланты (циркониевая керамика коронарные стенты (сплавы кобальт-хром, никелид титана), шовные нити (биодеградируемые и небиодеградируемые полимеры: ПГК, ПМГК, ПКЛ, полидиоксанон, полиамид, полиэтилентерефталат, поливинилиденфторид, политетрафторэтилен, щелк, коллаген, полипропилен), раневые повязки (природные и

синтетические полимеры: коллаген, альгинат, хитозан, полиметилметакрилат, полиуретан, обработанные ксеногенные ткани животных), остеопластические материалы (коллаген, гидроксиапатит, β-трикальцийфосфат, полиметилметакрилат), стоматологические гипсы, катетеры (поливинилхлорид, силикон, резина), протезы сосудов (полиэтилентерефталат), клапаны сердца (пиролитический углерод) и др. Продажи этих изделий в России приведены на Рисунке 8.

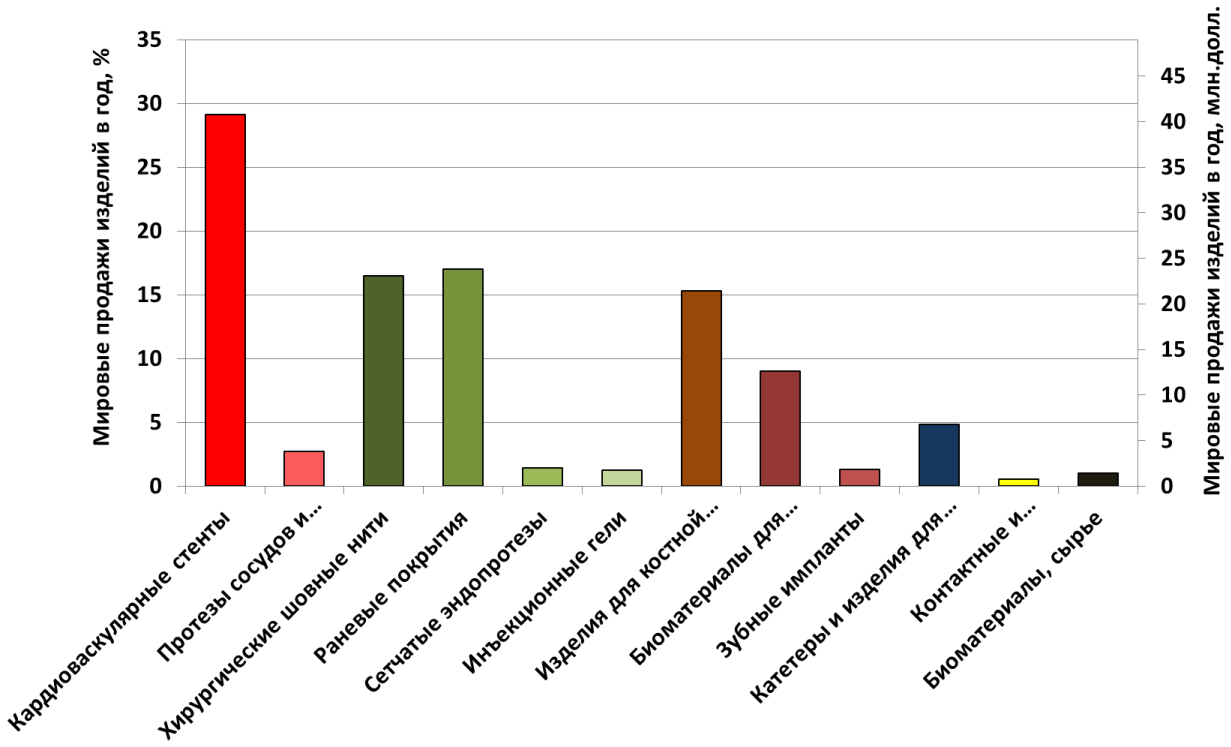


Рисунок 8. *Российские продажи биоматериалов и медицинских изделий на их основе различных типов.*

Так, ООО «Стентекс», которое является подразделением американо-ирландской корпорации Medtronic, которая и построила завод в НИЦ Сколково для локализации производства стентов этой корпорации. Другим примером является компания ООО «Фирма Конкор», которая начала производство отечественных контактных линз на основе сополимера метилметакрилата и N-винил-пирролидона в 1995 г. после приобретения линии оборудования фирмы "Chase" (Великобритания), а затем в 2013 г. расширила и модернизировала производство после закупки высокотехнологичного автоматического оборудования DAC ALM Prime (США) (http://www.concor.ru/kompaniya/history.php).

Однако имеются следующие особенности и проблемы производства медицинских изделий на основе биосовместимых материалов в нашей стране:

1) устаревшее оборудование и материалы, например, если производство осуществляется еще с 60-70-х гг. и не прошло модернизацию;

2) использование импортных материалов и станков для производства изделий или же просто сборка изделий из импортных комплектующих;
3) отсутствие в достаточном ассортименте отечественных биоматериалов необходимого качества для использования в фармацевтике и медицине;
4) малый опыт производства и клинического использования новых предприятий, наладивших производство оригинальных медицинских изделий в последние 10 лет;
5) некоторые российские компании локализуют производство не в России, а в других странах;
6) недостаточное развитие системы контроля качества производства медицинских изделий, малое число контролируемых параметров;
7) недостаточная заинтересованность производственных предприятий и компаний в сфере торговли медицинскими изделиями в инновациях;
8) недостаточный уровень взаимодействия производственных предприятий с отечественными медицинскими и научными учреждениями.

Производство самих биоматериалов, т.е. материалов с такими свойствами и такой степени очистки, которые можно использовать для производства имплантируемых и контактирующих с раневыми поверхностями медицинских изделий практически не развито – в достаточном объеме имеется производство лишь этих материалов для технических нужд. Например, конечно, в России хорошо развито производство титана, но это марки титана для тяжелой промышленности, специализированные медицинские марки титана приходится закупать за рубежом, причем, зачастую это переработанный титан российского производства. Промышленное производство биоразлагаемых полимеров также практически отсутствует. Так, было налажено мелкосерийное опытное производство биоразлагаемых ПМК, ПГК и ПЛГК ограниченного ассортимента налажено на базе производственного предприятия ООО «Медин-Н» (г.Екатеринбург) (http://www.medin-n.ru/o-kompanii/razrabotki), АО "Научно - исследовательский институт синтетического волокна с экспериментальным заводом" (г. Тверь) и Национального исследовательского центра "Курчатовский институт" (лаборатория член-корра РАН Чвалуна С.Н.); имеются планы на многотоннажное производство ПМК ПК «Натуральные материалы» (г. Дубна, Московская обл.) совместно со швейцарской компанией Sulzer к 2023 г. Еще с советский времен (с 1918 г.) имеются производства альгината из морских водорослей на ООО «Архангельский водорослевый комбинат», г. Архангельск, однако предлагается только один вид альгината для фармацевтического и медицинского использования.

Основной проблемой использования биоматериалов и медицинских изделий на их основе в России, является недостаточная их охарактеризованность, контроль качества физико-

химических и биологических свойств. Большим преимуществом крупных международных корпораций – производителей подавляющего большинства медицинских изделий, является наличие у них развитого инструментария не столько производства, сколько контроля качества и свойств биоматериалов, а также наличие обширных баз данных, которые старательно накапливались многие годы и десятилетия. Конечно же, любой производитель из какой-нибудь развивающейся страны, который решил организовать производство нового медицинского изделия или подобия существующего уже на рынке – вынужден будет пройти весь путь проб и ошибок, репутационные издержки которого могут намного превысить преимущества этого амбициозного новичка на рынке по работоспособности, себестоимости и даже наличию собственных прорывных ноу-хау. В связи с этим появляется потребность в централизованном стимулировании создания исследовательских центров и испытательных институтов, обладающих всем комплексом оборудования и технологий для осуществления контроля качества и испытания свойств максимально широкого спектра различных биоматериалов и медицинских изделий. Конечно же, такие центры должны быть тесно связаны с компаниями – производителями изделий, которые самостоятельно часто не могут нести столь большие издержки, да и не заинтересованы в таком строгом контроле. Отечественные компании – производители медицинских изделий и материалов не обладают такой величиной и такими громадными возможностями, как их зарубежные конкуренты – огромные интернациональные корпорации, что часто приводит не то что к сложности экспорта отечественных изделий, но и проигрышу конкуренции внутри страны.

Создание системы характеризации различных биоматериалов по широкому спектру параметров позволит производить линейки того или иного биоматериала с разными заданными физико-химическими и биологическими свойствами и, соответственно, строго определенным предназначением для медицинского применения.

1.2. Роль биоинженерии и биотехнологии в исследовании биоматериалов

В настоящее время происходит бурный рост междисциплинарных инженерно-технологических направлений на стыке естественных наук: биотехнологии, биоинженерии, нанотехнологии, нейронаук (Stock and Burton, 2011; Лысак, 2016). Биоинженерия и биотехнология биосовместимых материалов являются одними из таких ярко-выраженных примеров междисциплинарного подхода. Комплексные биотехнологические и биоинженерные исследования различных биоматериалов на основе синтетических и природных полимеров, алло- и ксенобиоматериалов, а также их композитов и их дальнейшее использование демонстрируют очень быстрый рост во всем мире и находят широкое применение в медицине. Биоматериал в таких исследованиях выступает в качестве объединяющего элемента

междисциплинарного исследования, которое, как правило, проводится на нескольких уровнях: получение биоматериала, получение изделий и препаратов из этого биоматериала, исследование их морфологии, физико-химических свойств, исследование их биосовместимости и биоактивности на биохимическом уровне, на культурах клеток, и с использованием моделей заболеваний на лабораторных животных. На каждом из этих уровней используется широкий набор методов. Совокупность полученных данных анализируется для поиска новых свойств биоматериала и изделий на его основе и/или конструирования биоматериала и изделий из него, обладающего новыми свойствами (Севастьянов и Кирпичников, 2011; Hasirci and Hasirci, 2018).

Главной причиной проблем, возникающих при применении традиционных изделий и методик, используемых для восстановления органов и тканей является то, что имплантируемое медицинское изделие не соответствует в достаточной степени живой ткани. Например, костная ткань обладает многоуровневой сложной структурой (Рисунок 9), которая к тому же является динамической системой. Тогда как медицинское изделие, даже способное к биодеструкции, является лишь односоставной нединамической системой (Chahal et al., 2019).

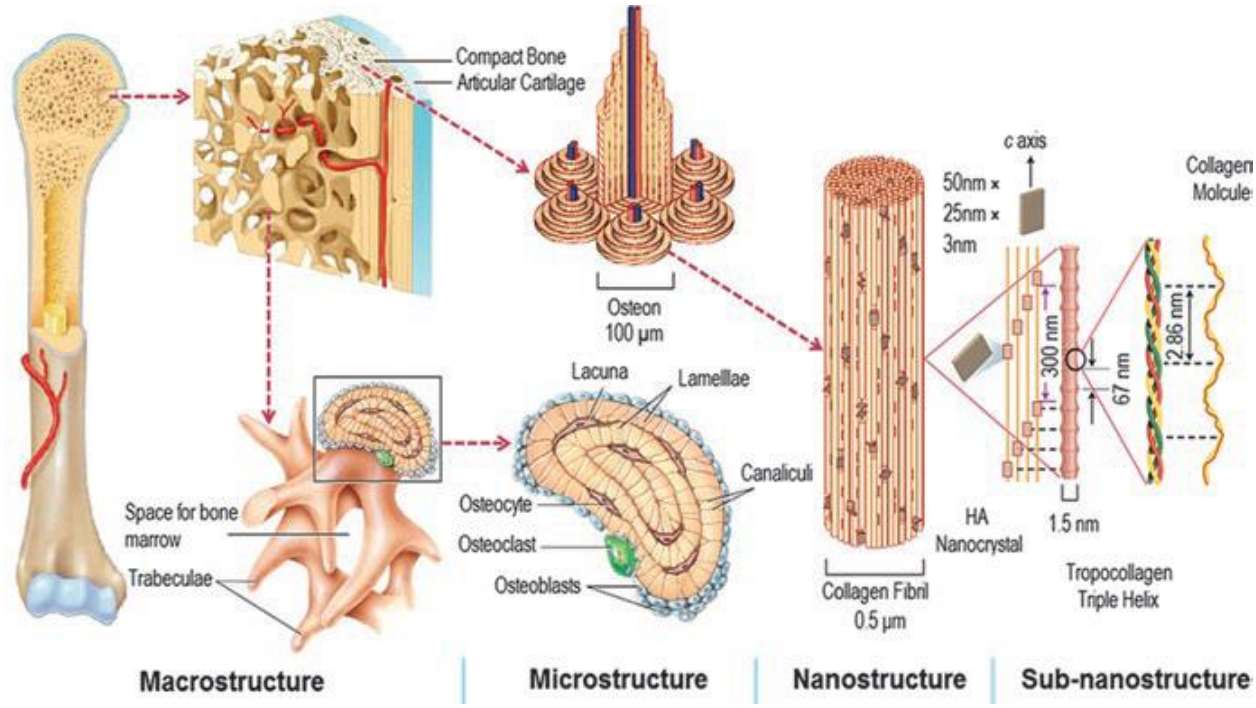


Рисунок 9. *Многоуровневая структура костной ткани (Chahal et al., 2019).*

В наиболее простых случаях, хотя и довольно частых для восстановления поврежденных тканей требуется просто механическая поддержка, которую может осуществить хирургический сетчатый эндопротез. Такой эндопротез должен быть достаточно прочным и гибким и при этом не обладать иммуногенностью и токсичностью. В других более сложных случаях такой эндопротез должен не только осуществлять механическую функцию, но и способствовать заживлению ран. Очень часто, механическая функция в этом случае успешно осуществляется, а

вот заживления раны не происходит вовсе, либо происходит неудовлетворительно. Недостаток таких биоактивных изделий и материалов стимулировал развитие биоматериалов и такого направления биоинженерии, как тканевой инженерии. За последние несколько десятилетий были приложены большие усилия для понимания взаимодействия между клетками и биоматериалами. Теперь становится все более очевидным, что внеклеточная окружающая среда имеет важное влияние на клеточную функцию и дифференцировку клеток. Создание искусственных или природного происхождения матриксов (или скаффолдов), обладающих способностью к направленной регенерации тканей и органов играет решающую роль для создания биоинженерных тканей. Тем не менее, любое новое изделие или материал должен пройти длительный период исследований и испытаний для обеспечения безопасности перед его использованием в клинической медицине (Hasirci and Hasirci, 2018).

Однако и физико-химические свойства различных биоматериалов, в частности, механические далеко не всегда соответствуют свойствам живой ткани, для лечения которой они предназначены. На Рисунке 10 приведены механические характеристики различных биоматериалов, используемых для изготовления костных имплантатов в сравнении с механическими свойствами самой костной ткани. Как видно, механические свойства большинства биоматериалов сильно далеки от свойств костной ткани, как правило, в сторону просто большей прочности.

Научно-исследовательская работа в области изучения биоматериалов имеет свои характерные особенности. Это, прежде всего, ярко выраженное инженерное и междисциплинарное направление в естественных науках. Биоматериалы и изделия на их основе необходимо исследовать в различных направлениях и на различных уровнях. Можно сказать, что биоматериал и изделие на его основе обладает различными характеристиками, которые могут влиять на живые клетки и ткани: технология получения биоматериала и технология изготовления изделия из него, химический состав биоматериала и состав изделия, если оно изготовлено из нескольких материалов, нано-, микро- и макроструктура биоматериала и изделия, физико-химические свойства и функциализация биоматериала и изделия, имеется в виду введение биоактивных веществ в изделие для контролируемого их высвобождения, модификация поверхности изделий биоактивными веществами, придание биоматериалу способности реагировать на внешние стимулы, например, излучение или магнитное поле. При этом биоматериал взаимодействует с живыми системами на разных уровнях: атомно-молекулярном, макромолекулярном, клеточном, тканевом и на уровне всего организма. Таким образом, исследование биоматериалов предполагает инженерный подход, при котором новые знания рождаются при синтезе и конструировании новых объектов, и междисциплинарное исследование.

Большой проблемой, однако, является и то, что человек не обладает достаточным уровнем технологического развития для работы с биоматериалами. Все характеристики биоматериалов взаимосвязаны и зависят друг от друга. Поэтому если мы пытаемся улучшить биосовместимость биоматериала, то одновременно происходит изменение профиля, например, терапевтической функциональности. Не обязательно в нужную сторону. Как правило, для каждой медицинской задачи используется свой биоматериал, от которого зависит и структура изделия из него и все основные свойства изделия. Тогда как в живой природе, одни и те же биоматериалы используются для создания конструкций самой различной функциональности, как, например, белки являются основными материалами плазмы крови, конструкционной основой костной ткани и движущими механизмами мышц. Мы пока не способны таким образом конструировать материалы в нанометровых и даже микрометровых масштабах. Более того, зачастую при использовании природных биоматериалов с исходно сложной структурной организацией, эта структура намеренно разрушается для удобства применения биоматериала, как в случае получения желатина из коллагена.

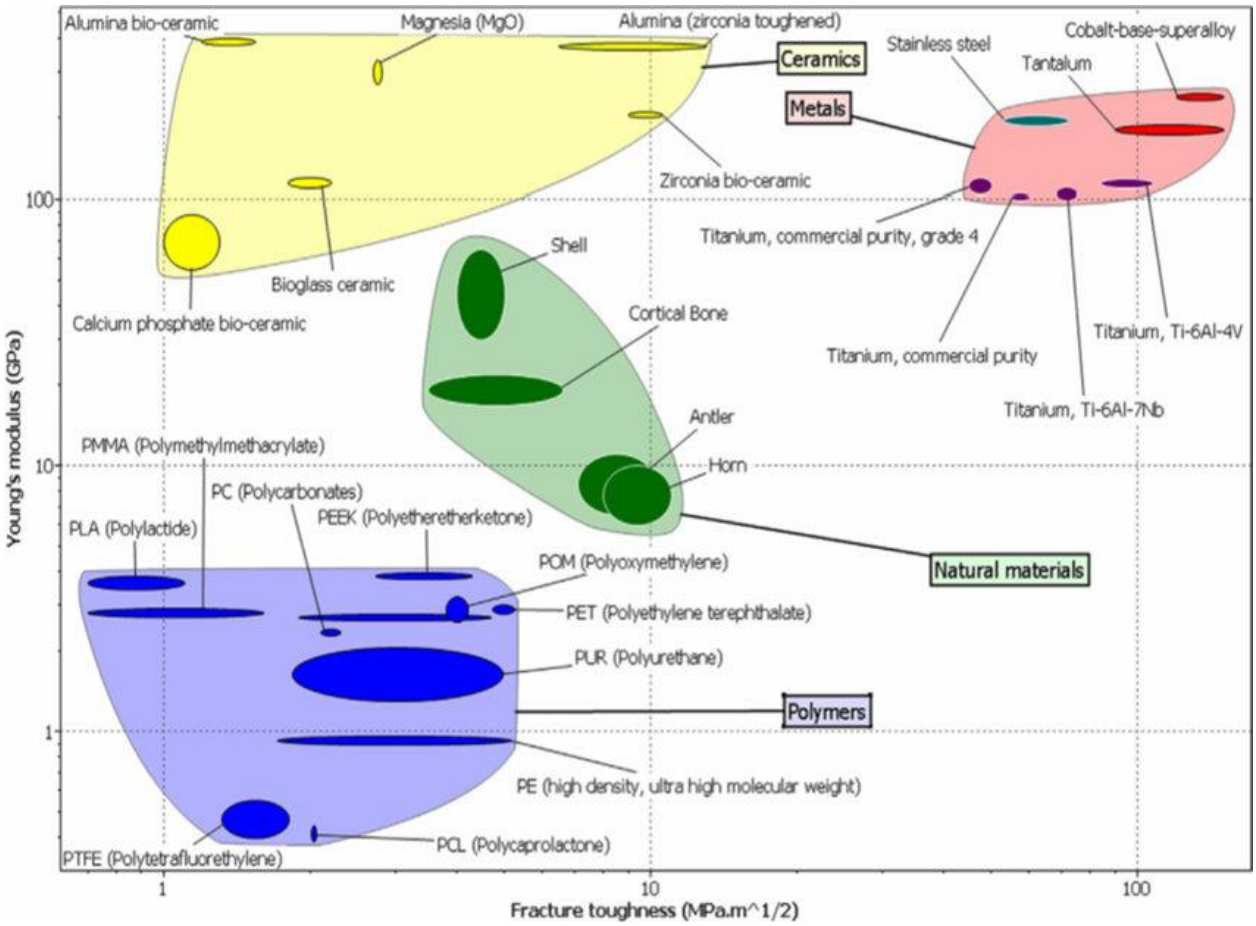


Рисунок 10. *Зависимость модуля упругости материалов, используемых для изготовления костных имплантатов, от их трещиностойкости в сравнении с самой костной тканью (Bagde et al., 2019).*

В связи с этим активно развиваются направления по созданию новых типов биоматериалов: биоактивных, регулируемых стимул-чувствительных и автономно функционирующих. Биоактивные биоматериалы обеспечивают пролонгированное высвобождение лекарственных веществ или сами обладают биоактивностью. Стимул-чувствительные регулируемые биоматериалы могут реагировать на определенные сигналы в окружающей среде, возникающие при биологических процессах или генерируемые извне, и затем в ответ на них высвобождать лекарственные вещества или изменять свои свойства. Автономные биоматериалы могут воспринимать сигнал, выделять в ответ на него определенные вещества и адаптировать свои свойства к изменяющимся условиям (Рисунок 11).

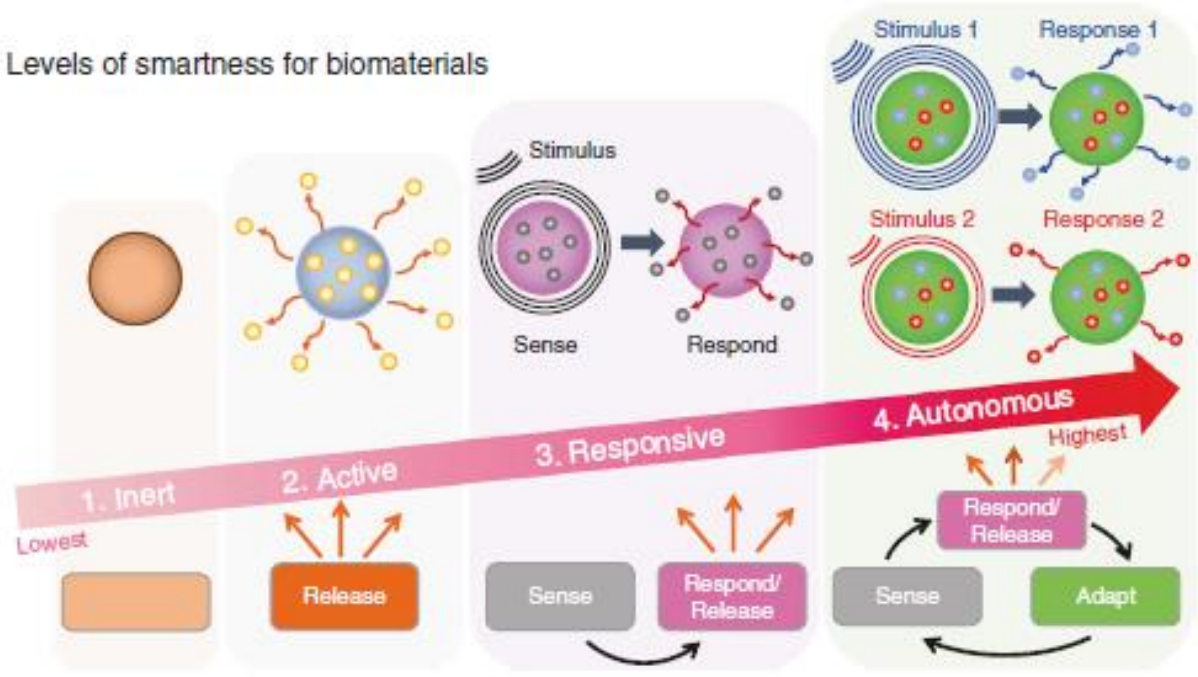


Рисунок 11. *Четыре возрастающих уровня технологической эволюции биоматериалов: инертные/биосовместимые, биоактивные, регулируемые стимул-чувствительные и автономно функционирующие (Montoya et al., 2021).*

Однако, не вполне понятен вклад биоинженерии и биотехнологии в исследование биоматериалов по-отдельности. И здесь мы сталкиваемся с интересным вопросом границ этих дисциплин и степени их пересечения друг с другом. Мы попробовали разобраться более глубоко в этом вопросе, так как вся эта работа является как биоинженерным, так и биотехнологическим исследованием.

В вопросе определения дисциплины «Биоинженерия» можно ориентироваться как на отечественные авторитетные источники, так и на зарубежные. К сожалению, отечественных источников совсем немного. Относительно недавно была издана Большая Российская Энциклопедия, что дает нам хороший ориентир главного русскоязычного источника

определений всевозможных терминов. В статье «Биоинженерия» за авторством профессора с кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ Долгих Д.А. (Долгих, БРЭ) приводится следующее определение: «Биоинженерия - технология, связанная с направленным изменением биологических объектов для нужд человека. Возникла на стыке физико-химической биологии, генетической инженерии и компьютерных технологий. Бурное развитие этих областей позволило перейти от простого исследования природных биологических объектов к их изменению, улучшению их полезных свойств и даже к созданию совершенно новых, не существующих в природе организмов. К числу задач Б. относятся также получение искусственных белков, выполняющих заданные функции (белковая инженерия), новых клеточных структур, обладающих полезными свойствами (клеточная инженерия) и др.».

В России есть национальный стандарт - ГОСТ под названием «Биотехнологии. Термины и Определения», в котором приводится следующее определение Биоинженерии: «3.4.7 биоинженерия (bioengineering): Совокупность методов и технологий создания биологических объектов (биомолекул, клеток, тканей, организмов) с определенными новыми свойствами путем целенаправленного воздействия на соответствующие формы этих биологических объектов генетическими и биохимическими методами» (ГОСТ Р 57095-2016). В этом определении Биоинженерия предстает скорее, как генетическая и молекулярная инженерия.

Русскоязычное определение Биоинженерии дается также в довольно широко используемом российскими учеными Словаре терминов Роснано (https://thesaurus.rusnano.com/) со ссылкой, однако, на англоязычный словарь Меррьям-Вебстер (https://www.merriam-webster.com). Согласно ему: «Биоинженерия иначе биомедицинская инженерия (англ. bioengineering) — направление науки и техники, развивающее применение инженерных принципов в биологии и медицине». В этом определении признается тесное соприкосновение Биоинженерии с Биотехнологией, но указывается на сдвиг Биоинженерии в сторону биомедицинских наук (Ширинский, Роснано; Bioengineering, Merriam-Webster).

Хотя это считается дурным тоном в научном сообществе, тем не менее, большинство ученых и, тем более, людей не из науки ищут определения каких-либо терминов в Википедии (https://ru.wikipedia.org/), в т.ч. если это русскоязычные термины, то в русскоязычной ее версии. Приоритет этой онлайн энциклопедии достигается также за счет того, что во всех онлайн поисковых системах статьи из Википедии появляются на самом верху, а то и особо выделяются. Разумеется, как правило, это с некоторыми вариациями переводы соответствующих статей в основной англоязычной версии этой онлайн энциклопедии. В статье «Биоинженерия» Википедии дается то же определение, что и в Словаре терминов Роснано со ссылкой на словарь Меррьям-Вебстер (Bioengineering, Merriam-Webster), но в более расширенном варианте, а также дается ссылка на Словарь Терминов Национальных Институтов Здоровья США (National

Institutes of Health (NIH), https://www.nibib.nih.gov/science-education/glossary/) (Bioengineering, NIH). Помимо повторяющихся частей, уже приведенных выше, это определение интересно тем, что здесь особо отмечено, что инженерные принципы и подходы могут быть использованы для фундаментальных исследований в биологии (Биоинженерия, Википедия). Следует отметить, что здесь также подчеркивается особое значение Биоинженерии для медицины и проводится разделение дисциплины на «биомедицинскую» и «биологическую». Кроме того, более четко описывается роль инженерного подхода в биологических науках.

К сожалению, высокоцитируемые отечественные (не переводные) источники (учебные пособия, книги, статьи), в которых приводится определение термина «Биоинженерия» практически отсутствуют. Если и есть какие-то книги и статьи на тему биоинженерии с хоть каким-то заметным уровнем цитирования (в данном случае по отечественной базе научных публикаций E-library.ru (на основе которой формируется система РИНЦ), то там нет определения этой дисциплины.

Теперь следует перейти к англоязычным определениям. Прежде всего, приведем дословный перевод англоязычного определения из уже упомянутого Словаря Терминов NIH (Bioengineering, NIH). В этом определении мы видим сугубо биомедицинский взгляд на Биоинженерию и подчеркивание ее мультидисциплинарности.

Далее приведем определение из уже указанного выше как источника русскоязычного определения дисциплины словаря Меррьям-Вебстер (Bioengineering, Merriam-Webster): «Определение Биоинженерии: 1) применение инженерных принципов, практики и технологий в области медицины и биологии, особенно при решении проблем со здоровьем человека и улучшении терапии (например, при разработке медицинских устройств и диагностического оборудования или создании биоматериалов и фармацевтических препаратов): биомедицинская инженерия; 2) применение биологических методов (таких как генетическая рекомбинация) для создания модифицированных версий организмов (например, сельскохозяйственных культур)». Здесь имеет место разделение Биоинженерии на Биомедицинскую инженерию и Биологическую инженерию (Общую биоинженерию). Причем, в данном определении Биологическую инженерию практически неотличима от Биотехнологии, как мы увидим ниже.

В энциклопедии Британника (https://www.britannica.com) приводится следующее определение: «Биоинженерия - это применение инженерных знаний в области медицины и биологии. Биоинженер должен хорошо разбираться в биологии и иметь обширные знания в электрических, химических, механических и других направлениях инженерии. Биоинженер может работать в любой из множества этих областей. Одной из них является применение искусственных изделий для поддержания функций организма при его повреждении, таких как слуховые аппараты и протезы, поддерживающие или заменяющие органы. В другом

направлении биоинженер может использовать инженерные методы для биосинтеза продуктов животного или растительного происхождения, например, для процессов ферментации». Здесь также подчёркивается биомедицинский уклон биоинженерии и ее мульти- и междисциплинарность, а краткое определение такое же, что и в предыдущих вариантах для биомедицинской инженерии, отдельно сказано и про микробиологическую инженерию. Приводится также историческая справка и указаны основные направления Биоинженерии: медицинская инженерия, сельскохозяйственная инженерия, бионика, биохимическая инженерия, инженерия человеческих факторов, инженерия гигиены окружающей среды, генетическая инженерия (Lewis, Britannica).

Калифорнийский университет в Риверсайде в своем определении проводит четкую границу между Биомедицинской инженерией и собственно Биоинженерией (или Общей Биоинженерией): «Термины Биоинженерия и Биомедицинская инженерия звучат сходно, но на практике между ними есть заметные различия. Биоинженерия - это изучение прикладных инженерных практик в общей биологии. Это более широкая тема по сравнению с биомедицинской инженерией; биоинженерия охватывает, среди прочего, такие тематики, как сельское хозяйство, фармацевтика, природные ресурсы и продукты питания. Кроме того, она охватывает общую медицинскую практику, хотя биомедицинская инженерия уделяет этой области больше внимания, чем общая биоинженерия. На практике биоинженерия применяется в различных отраслях промышленности, включая здравоохранение, но методы биологической инженерии не предназначены непосредственно для медицинских целей.

Биомедицинская инженерия - это более специализированная версия биоинженерии, в которой используются многие основные теории этой дисциплины и применение их на практике для улучшения здоровья человека. Эта область ориентирована на производство новых инструментов и процессов, которые можно использовать в здравоохранении. Из всех областей инженерии биомедицинский инженер, вероятно, оказывает самое большое влияние на жизнь человека. Биомедицинские инженеры обычно работают над решением проблем, присущих наукам о жизни; тех, кто занимается протезированием или развивающейся областью кибернетики (более формально известной как биомехатроника), также можно назвать инженерами-биомеханиками. Такие медицинские изделия, как кардиостимулятор, искусственное сердце и кохлеарный имплантат, являются инновациями в биомедицине. Медицинские и хирургические инструменты, такие как специализированные комплекты роботизированной хирургии, также входят в их компетенцию. Биомедицинские инженеры также работают над повышением эффективности естественных процессов с помощью биотехнологий, таких как регенерация тканей и диффузия клеток. Этих инженеров можно найти практически во всех областях медицины. Везде, где есть проблема, они работают, чтобы

найти решение. Биоинженеры часто сосредотачиваются на общей теории, которую можно применить к различным областям естествознания для решения проблем. С другой стороны, биомедицинская инженерия более сфокусирована и практична, особенно в контексте здравоохранения» (Bioengineering, UCR).

Факультет Биоинженерии в Калифорнийском университете в Беркли дает, напротив, краткое и общее определение нашей дисциплины, в котором опять подчеркивается мульти- и междисциплинарность этой дисциплины, и с сохранением корневого определения. (Bioengineering, UCB).

Мюнхенская школа биоинженерии Технического университета Мюнхена приводит определение, сходное с предыдущим, в котором подчеркивается медицинский уклон и междисциплинарность дисциплины: (Bioengineering, TUM).

Научное общество Институт биологической инженерии (США) также дает свое, довольно общее определение дисциплины, с попыткой привнести равновесие между биомедицинской и общей частями дисциплины (Bioengineering, IBE). Интересно, что в журнале Journal of Biological Engineering, который ассоциирован с этим научным обществом, приводится гораздо более пространное и общее определение (Bioengineering, JBE).

Ряд определений дисциплине приводятся в авторитетных высокоцитируемых статьях и книгах. В обзоре Бхата (Bhat) и Кумара (Kumar) приводится такое определение: «Зона биоинженерия охватывает две тесно связанные области интересов, т. е. (1) она применяет принципы инженерной науки с целью понять, как функционируют живые организмы, и (2) она применяет инженерные технологии для проектирования и разработки новых устройств, таких как диагностические или терапевтические инструменты или состав новых биоматериалов для медицинских целей, дизайна искусственных тканей или органов и разработка новых систем доставки лекарств». Это определение интересно тем, что здесь особо отмечено, что принципы инженерии используются не только для прикладных целей, но и как инструмент для фундаментальных исследований в биологии. В определениях, данных выше, этот смысл не был как следует выделен (Bhat and Kumar, 2013).

В весьма основательном труде «Справочник по биомедицинской инженерии» под редакцией профессора Жосефа Бронзино (Bronzino) (Bronzino, 2012), который имеет почти 2,5 тысячи цитирований, и в не менее объемном манускрипте более позднего времени под редакцией Эндерли (Enderle) и Бронзино (Bronzino) «Введение в биомедицинскую инженерию» (Enderle and Bronzino, 2012), имеющего под тысячу цитирований, наконец, можно увидеть довольно глубокие и обширные рассуждения по поводу терминологии: «Хотя то, что входит в область биомедицинской инженерии, многие считают совершенно ясным, имеется много противоречивых мнений и разногласий по поводу определения этой дисциплины. Например,

можно рассмотреть термины биомедицинская инженерия, биоинженерия, биологическая инженерия и клинический (или медицинский) инженер, которые приведены в Справочнике по биоинженерному образованию. В то время как Пацела (Pacela) определил биоинженерию как широкий термин, используемый для описания всей этой области, биоинженерия обычно определяется как ориентированная на фундаментальные исследования деятельность, тесно связанная с биотехнологией и генной инженерией, то есть модификация животных или растительных клеток, или частей клеток для улучшения растений или животных, или для разработки новых микроорганизмов для полезных целей. Например, в пищевой промышленности – для улучшения штаммов дрожжей для брожения. В сельском хозяйстве биоинженеры могут работать над повышением урожайности сельскохозяйственных культур с помощью таких организмов, уменьшить повреждение растений от мороза. Очевидно, что биоинженеры будущего получат возможность колоссального влияния на качество жизни человека». Здесь мы, наконец, впервые видим признание большой терминологической путаницы и неразберихи, которая имеет место в определении того, что есть Биоинженерия. Далее перечисляются различные направления биоинженерии. «Термин «биомедицинская инженерия» имеет наиболее полное значение. Биомедицинские инженеры применяют электротехническую, химическую, оптическую, механическую и другую инженерию, принципы понимания, изменения или контроля биологических (то есть человеческих и животных) систем». Далее снова приводится длинный список различных направлений биомедицинской инженерии. В заключении обозначается междисциплинарность Биоинженерии (Bronzino, 2012; Enderle and Bronzino, 2012). Однако в целом эти определения по своим основным идеям соответствуют тем, что можно увидеть в словарях, энциклопедиях, сайтах университетов и научных обществ.

Таким образом, все имеющиеся в настоящее время определения Биоинженерии в общем и целом согласуются в ее наиболее кратком варианте: «Биоинженерия – это применение инженерных принципов и знаний в биологии и медицине». В большинстве определений подчеркивается биомедицинское направление этой дисциплины, а сама она в этом случае носит более узкое название «Биомедицинская инженерия». В ряде определений постулируется разделение Биоинженерии на две равнозначимые поддисциплины: Биомедицинскую инженерию и Биоинженерию (Общую биоинженерию). В большинстве определений указывается вовлечение инженерно-технологических подходов в традиционные естественные науки, биологию и медицину, и подчеркивается мульти- и междисциплинарность этой дисциплины.

Однако помимо такой научной дисциплины как «Биоинженерия» имеется довольно близкий к нему термин и, соответственно, научная дисциплина – «Биотехнология». Интересно,

что слово биоинженерия образовано от древнегреческого слова βίος — «жизнь» и латинского слова *ingenium* — «искусность» или *ingeniare* — «изловчиться, разработать» — «изобретательность», «выдумка», «знания», «искусный», а слово биотехнология от древнегреческих слов: βίος — «жизнь», τέχνη — «искусство, мастерство, способность» и λόγος — «слово, смысл, мысль, понятие», т.е. по сути греческое слово τέχνη и латинское слово *ingenium* являются синонимами. И действительно в современной науке имеет место изрядная путаница в этих терминах и вообще в понимании того, что из себя представляет та или иная дисциплина. Попробуем теперь разобраться, что же такое Биотехнология и чем она отличается от Биоинженерии. Для этого вновь сначала обратимся к русскоязычным источникам, а затем к англоязычным. После чего сравним эти определения.

Согласно статьи «Биотехнология» в Большой Российской Энциклопедии за авторством академика В.Г.Дебабова (Дебабов и др., БРЭ): Биотехнология (от био…, греч. τέχνη – искусство, мастерство и ...логия), использование живых организмов, клеток и отдельных биополимеров в практической деятельности человека, основанное на достижениях современной биологической науки – молекулярной и клеточной биологии, генетической инженерии, геномике, постгеномных технологиях, биоинформатике. В статье также приводится историческая справка, где хотя и говорится о нескольких тысячелетиях истории использования живых организмов в хозяйственной деятельности человека, также особо подчеркивается ведущая роль генетической инженерии. В качестве основных направлений Биотехнологии указаны такие дисциплины как Промышленная биотехнология, Сельскохозяйственная биотехнология и Медицинская биотехнология. В этой энциклопедической статье ссылаются на учебное пособие «Основы биотехнологии» (Егорова и др., 2003), в котором четкого определения не приводится.

В ГОСТ под названием «Биотехнологии. Термины и Определения» (ГОСТ Р 57095-2016) приводится следующее определение этой дисциплины: «Биотехнология (biotechnology): применение науки и технологии к живым организмам, как к областям, продуктам и моделям, с целью преобразовать живые или неживые материалы для производства знания, продукции или услуг, соответственно». Как видно, это очень общее определение.

Другим высокоцитируемым источником, в котором приводится русскоязычное определение Биотехнологии является «Молекулярная биотехнология: принципы и применение» (Глик и Пастернак, 2002). Однако это переводное с английского языка издание за авторством канадских ученых. Тем не менее, оно вошло в Словарь терминов Роснано (Курочкин и Максименко, Роснано). Согласно соответствующей статье в этом онлайн словаре: «Биотехнология (англ. biotechnology) — это применение научных и инженерных принципов к

переработке материалов живыми организмами, биологическими системами и процессами с целью создания товаров и услуг». Как можно видеть, это определение гораздо более широкое.

Еще более широкое определение дает этой дисциплине Общество биотехнологов России им. Ю.А.Овчинникова (https://biorosinfo.ru/), в котором также указывается на особую роль генетической и клеточной инженерии для Биотехнологии и на основе этого проводится разделение Биотехнологии на «старую» и «новую» (Гаева, ОБР).

Другим активно цитируемым источником является учебное пособие с соответствующим названием за авторством Воловой Т.Г. (Волова, 1999). Согласно этому источнику «биотехнологию можно определить по ее основному признаку – управлению биотехнологическими процессами». Здесь мы видим опять довольно узкое определение, но с использованием другого смыслового ключа. Кроме того, автор справедливо отмечает неоднозначность и размытость термина «Биотехнология», что можно, впрочем, заметить и в других определениях (Волова, 1999).

Согласно другому активно цитируемому учебному пособию «Сельскохозяйственная биотехнология» (Шевелуха, 2003): «Биотехнологические процессы базируются на использовании биосинтетического потенциала микроорганизмов, растительных и животных клеток, тканей и органов, культивируемых на искусственных питательных средах». В данном случае под биотехнологией понимается клеточная инженерия.

Следует особо отметить и весьма интересную монографию Тищенко П.Д. из Института Философии РАН, которая обладает едва ли не лучшей цитируемостью согласно порталу отечественной научной литературы e-library.ru (РИНЦ). По его собственным словам, он дает истолкование концепта «Био-технология» как био-власти, которая отделяет человека от природы и дает ему как новые возможности, так и подвергает новым рискам (Тищенко, 2001). Таким образом, в данном случае под биотехнологиями понимаются в целом биомедицинские технологии, хотя он сам прямо оговаривает, что промышленная биотехнология не будет им рассматриваться. Интересно, что основная мысль о цели биотехнологии как создания запасных частей и материалов для жизни человека не противоречит классическому научному определению Биотехнологии, хотя, безусловно, идея о био-власти самобытна, что следует ценить в условиях почти тотального идейного преимущества переводных англоязычных терминов в этой научной области.

Наконец, имеется определение в таком русскоязычном источнике, как конвенция ООН по Биологическому разнообразию (статья 2). Согласно этой конвенции: «Биотехнология» означает любой вид технологии, связанный с использованием биологических систем, живых организмов или их производных для изготовления или изменения продуктов, или процессов с целью их конкретного использования» (ООН, 1992). Часто совпадает с областями

молекулярной биологии, биоинженерии, биомедицинской инженерии, биопроизводства, молекулярной и генетической инженерии, прикладная иммунология, биофармацевтики и др.

В Википедии приводится следующее также общее определение и дается историческая справка (Биотехнология, Википедия).

Далее обратимся к англоязычным источникам. Интересно, что в англоязычной версии Википедии приводится другое - более развернутое определение этой дисциплины со ссылками на определения Американского химического общества и Европейской федерации биотехнологий (Biotechnology, Wikipedia). Сходные по смыслу определения приводятся в словаре Меррьям-Вебстер (Biotechnology, Merriam-Webster) и Британнике (Biotechnology, Britannica). Приводится также историческая справка с указание главенствующей роли генетической инженерии для этой дисциплины. В определении Организации экономического сотрудничества и развития упоминается применение инженерных принципов для получения ценных и полезных продуктов (Bud, 1994). В определении Национального научного фонда США фигурирует термин «контролируемое использование» (Chawla, 2009).

Определение Биотехнологии дается на сайте Факультета биотехнологии Дублинского городского университета: «Биотехнологию можно определить, как контролируемое и преднамеренное манипулирование биологическими системами (будь то живые клетки или клеточные компоненты) для эффективного производства или обработки полезных продуктов. Тот факт, что живые организмы развили такой огромный спектр биологических возможностей, означает, что, выбирая подходящие организмы, можно получить широкий спектр веществ, многие из которых полезны для человека в качестве пищи, топлива и лекарств. За последние 30 лет биологи все чаще применяли методы физики, химии и математики, чтобы получить точные знания на молекулярном уровне о том, как живые клетки производят эти вещества. Объединив эти недавно полученные знания с методами инженерии и науки, появилась концепция биотехнологии, которая охватывает все вышеупомянутые дисциплины» (Biotechnology, DCU). Следует отметить, что здесь не только указывается на междисциплинарность Биотехнологии, но и на то, что ее можно использовать как инструмент для фундаментальных исследований.

Университет Абердин приводит на своем сайте самое, пожалуй, общее определение из представленных: «Биотехнология - это приложение биологии для улучшения качества жизни человека». Хотя потом дается расшифровка: «Биотехнология - это технология, основанная на уникальных свойствах биологических молекул, клеток и организмов, которая обеспечивает новые способы диагностики заболеваний, производства антибиотиков, фармацевтических препаратов и химического сырья для промышленных процессов, снижения промышленного загрязнения окружающей среды и повышения безопасности пищевых продуктов» (Biotechnology, UA).

В высокоцитируемой книге Чавла (Chawla) помимо прочих определений приводится также такое: «Применение науки и инженерии для прямого или косвенного использования живых организмов, частей или продуктов живых организмов в их природной или модифицированной форме» (Chawla, 2009).

В своей более новой книге «Биотехнология» Дэвид Кларк (Clark) и Наннет Паздерник (Pazdernik) признают, что Биотехнология стала слишком широкой дисциплиной, чтобы ей дать четкое определение и что определение этой дисциплины – это уже «вопрос моды». Эти авторы рассматривают Биотехнологию в очень широком аспекте – от классической «старой» биотехнологии до новых ее направлений: современной генетики, молекулярной биологии, компьютерных технологий и нанотехнологии (Clark and Pazdernik, 2015).

Таким образом, если провести анализ имеющихся определений Биоинженерии и Биотехнологии, что нами суммировано в Таблице 1, оказывается, что основное различие этих дисциплин состоит в целеполагании. Если Биоинженерия – это использование инженерных принципов для изменения живого, то Биотехнология – это использование живых организмов для получения полезных продуктов и услуг.

Таблица 1. *Смысловое содержание терминов «Биоинженерия» и «Биотехнология» на основе их определений.*

Основные идеи в определениях	**Биоинженерия**	**Биотехнология**
«Корневое определение»	Биоинженерия – это применение инженерных принципов и знаний в биологии и медицине.	Биотехнология – это применение технологий для получения полезных продуктов и услуг с использованием биологических объектов и процессов.
Мульти- и междисциплинарность	++ (Долгих, БРЭ; Ширинский, Роснано; Bioengineering, Merriam-Webster; Биоинженерия, Википедия; Bioengineering, NIH; Lewis, Britannica; Bioengineering, UCB; Bioengineering, TUM; Bioengineering, IBE;	+ (Дебабов и др., БРЭ; Тищенко, 2001; ООН, 1992; Биотехнология, Википедия; Biotechnology, Wikipedia; Biotechnology, DCU; Clark and Pazdernik, 2015)

	Bioengineering, JBE; Bronzino, 2012; Enderle and Bronzino, 2012)	
Инженерия и технология как инструмент фундаментальной биологии	+ (Долгих, БРЭ; Биоинженерия, Википедия; Bioengineering, UCB; Bhat and Kumar, 2013; Bronzino, 2012; Enderle and Bronzino, 2012)	+/- (Biotechnology, Wikipedia)
Разделение на биомедицинское и общее направление, старое и новые направления.	+ (Биоинженерия, Википедия; Bioengineering, Merriam-Webster; Lewis, Britannica; Bioengineering, UCR; Bronzino, 2012; Enderle and Bronzino, 2012)	+/- (Гаева, ОБР)
Приоритет биомедицины	+ (Bioengineering, NIH; Bioengineering, Merriam-Webster; Lewis, Britannica; Bioengineering, UCR; Bioengineering, TUM; Bhat and Kumar, 2013)	+/- (Тищенко, 2001)
Приоритет микробиологии, генетической инженерии, биохимии и молекулярной биологии.	+ (ГОСТ Р 57095-2016; Биоинженерия, Википедия; Bioengineering, Merriam-Webster; Курочкин и Максименко, Роснано)	++ (Дебабов и др., БРЭ; Курочкин и Максименко, Роснано; Гаева, ОБР; Шевелуха, 2003; Биотехнология, Википедия; Biotechnology, Wikipedia; Biotechnology, Merriam-Webster; Biotechnology, Britannica)
Основная задача – получение новых продуктов и услуг для нужд человека с использованием биологических	++ (Долгих, БРЭ; Ширинский, Роснано; Bioengineering, Merriam-Webster; Биоинженерия, Википедия; Bioengineering, NIH; Lewis, Britannica; Bioengineering,	++ (Дебабов и др., БРЭ; ГОСТ Р 57095-2016; Курочкин и Максименко, Роснано; Гаева, ОБР; Шевелуха, 2003; ООН,

объектов	UCR; Bioengineering, UCB; Bioengineering, TUM; Bioengineering, IBE; Bhat and Kumar, 2013; Bronzino, 2012; Enderle and Bronzino, 2012)	1992; Биотехнология, Википедия; Biotechnology, Wikipedia; Biotechnology, Merriam-Webster; Biotechnology, Britannica; Bud, 1994; Chawla, 2009; Biotechnology, DCU; Biotechnology, UA)
Основная задача – направленное изменение биологических объектов	++ (Долгих, БРЭ; ГОСТ Р 57095-2016; Ширинский, Роснано; Bioengineering, Merriam-Webster; Биоинженерия, Википедия; Bronzino, 2012; Enderle and Bronzino, 2012)	++ (ГОСТ Р 57095-2016; Курочкин и Максименко, Роснано; Гаева, ОБР; Тищенко, 2001; Биотехнология, Википедия; Biotechnology, Wikipedia; Biotechnology, DCU; Biotechnology, Merriam-Webster)
Управление процессами	-	+/- (Волова, 1999)
Риски и этические вопросы	+ (Bronzino, 2012; Enderle and Bronzino, 2012)	+/- (Тищенко, 2001)
Признание путаницы в терминологии и смешения понятий	+ (Bronzino, 2012; Enderle and Bronzino, 2012)	+ (Волова, 1999; Biotechnology, Wikipedia; Clark and Pazdernik, 2015)

Однако, на самом деле, это мало к чему приводит. Практически во всех определениях биоинженерии признается, что изменение живых организмов проводится с целью принесения практической пользы человеку, а в подавляющем большинстве определений биотехнологии указывается, что для получения полезных продуктов живые организмы подвергаются модификации. Остальные же смысловые аспекты так или иначе пересекаются для обеих диспциплин. Некоторые (но немное) авторы хорошо понимают эту проблему и прямо ее

признают (Bronzino, 2012; Enderle and Bronzino, 2012; Волова, 1999; Biotechnology, Wikipedia; Clark and Pazdernik, 2015).

Как видно, существующие определения дисциплин «Биотехнология» и «Биоинженерия» не позволяют провести четкое между ними различие, что усугубляет путаницу в этих терминах и позволяет при желании отнести практически любое междисциплинарное технологическое направление в естественных науках как к биотехнологии, так и к биоинженерии в равной степени. Однако в последние годы в связи с развитием электронных баз данных научной литературы нет уже такой насущной необходимости опираться лишь на те или иные определения, т.к. появилась возможность узнать непосредственно, что под тем или иным термином понимают сами ученые, разумеется, те, кто публикуют научные статьи хотя, к сожалению, преимущественно англоязычные. Для этого надо лишь провести несложный анализ частоты использования тех или иных терминов в научных публикациях, относящихся к «Биотехнологии» или, соответственно, к «Биоинженерии» в крупных базах данных научной литературы в сети Интернет.

Наиболее яркий пример такого терминологического анализа научной литературы, наиболее используемой и значимой англоязычной библиографической базы в области биомедицинских наук PubMed (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/) приведен на Рисунке 12, где исследовано число статей, относящихся к дисциплине «Биотехнология» и «Биоинженерия». На диаграмме приведено исследование совместного использование каждого из терминов «Биотехнология» и «Биоинженерия» (как категорий базы данных (mh)) со следующими терминами: «сельскохозяйственный», «энергетический», «генетический», «тканевой», «молекулярный», «клеточный», «человеческий», «биомедицинский».

Более того, такой же терминологический анализ был проведен в наиболее значимой русскоязычной базе научной литературы E-library.ru (https://elibrary.ru/). Причем, для анализа были выбраны те же, но русские термины, т.е. вместо “genetic” – «генетический», вместо “tissue” – «тканевой» и т.д. Единственное отличие этого анализа состоит в том, что охват статей по дисциплинам был проведен не по специальным категориям (как в PubMed - (mh)), а просто по словам (терминам) в названии, тексте тезисов и ключевых словах (Рисунок 13). Но таково уж ограничение инструментов поиска базы E-library.ru.

Из диаграмм этих рисунков видно, что в научных статьях, относящихся к Биоинженерии термины «(био)медицинский» и «тканевой» употребляются значительно чаще (до 3-х раз), чем в публикациях по Биотехнологии, тогда как термины «генетический» и «сельскохозяйственный» в публикациях, относящихся к Биотехнологии», встречаются в 2-4 раза чаще, чем в опубликованных исследованиях по Биоинженерии. Причем, это так и для англоязычных статей в американской библиографической базе данных и для русскоязычных

статей в российской базе научных статей. Таким образом, даже такой простой анализ выявляет в реальности существующее в научном сообществе различие между этими дисциплинами.

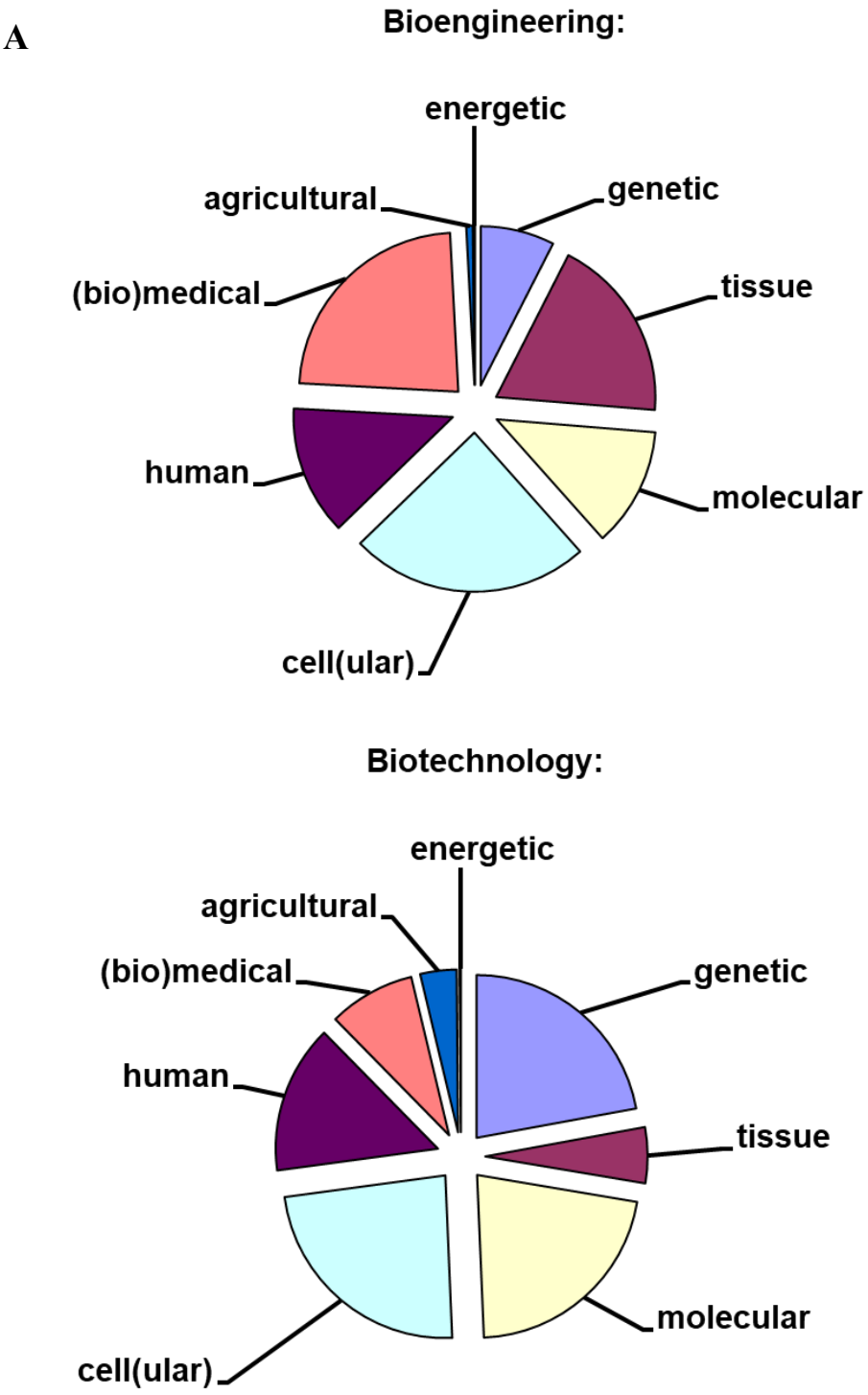
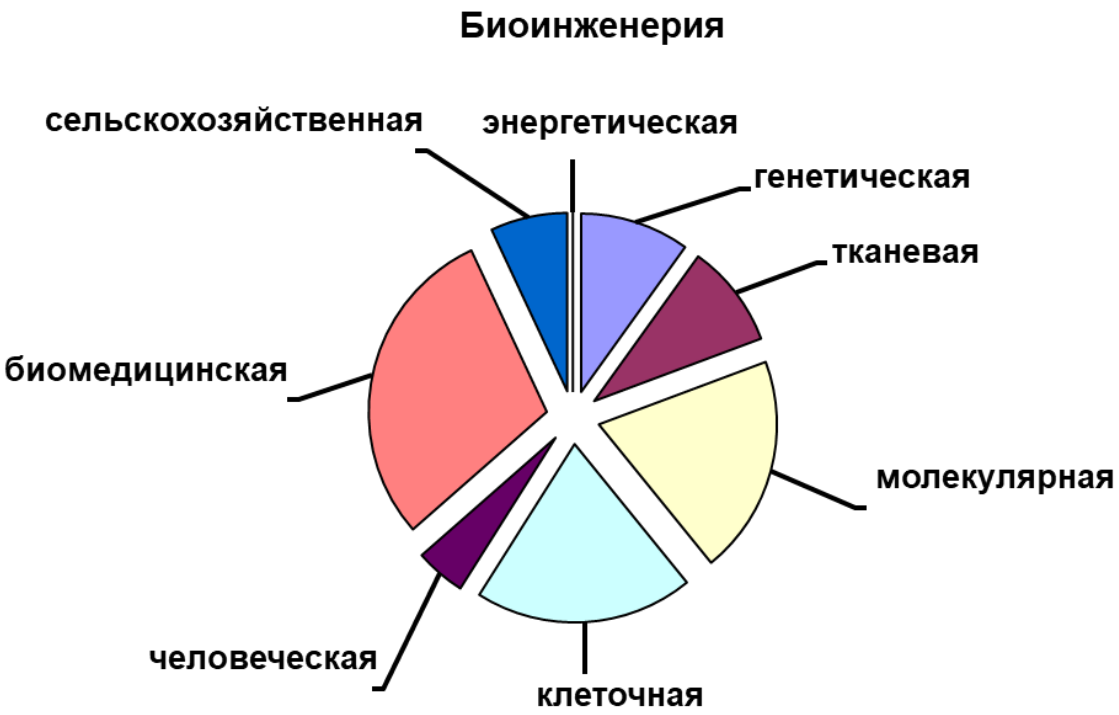


Рисунок 12. *Распределение научных публикаций в базе PubMed (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov) в категории «Биоинженерия» ("bioengineering(mh)") (А) и «Биотехнология» ("bioengineering(mh)") (Б) совместно с терминами: «сельскохозяйственный» (agricultural(tw)), «энергетический» (energetic(tw)), «генетический» (genetic(tw)), «тканевой» (tissue(tw)), «молекулярный» (molecular(tw)), «клеточный» (cell(ular)(tw)), «человеческий» (human)(tw), «биомедицинский» (biomedical(tw) по их количеству во временной период: 2001-2020 гг.*

А



Б

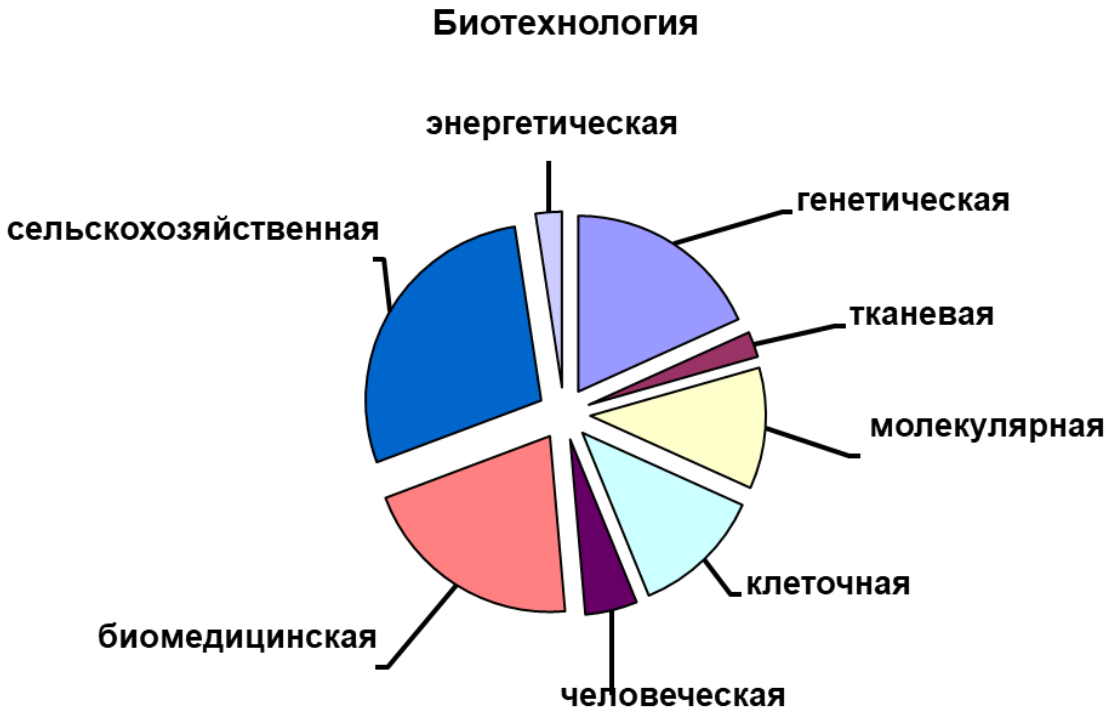


Рисунок 13. *Распределение научных публикаций в русскоязычной базе E-library.ry (https://www.elibrary.ru) по терминам «Биоинженерия» (А) и «Биотехнология» (Б) совместно с терминами: «сельскохозяйственный», «энергетический», «генетический», «тканевой», «молекулярный», «клеточный», «человеческий», «биомедицинский» (или «медицинский») по их количеству во временной период: 2001-2020 гг.*

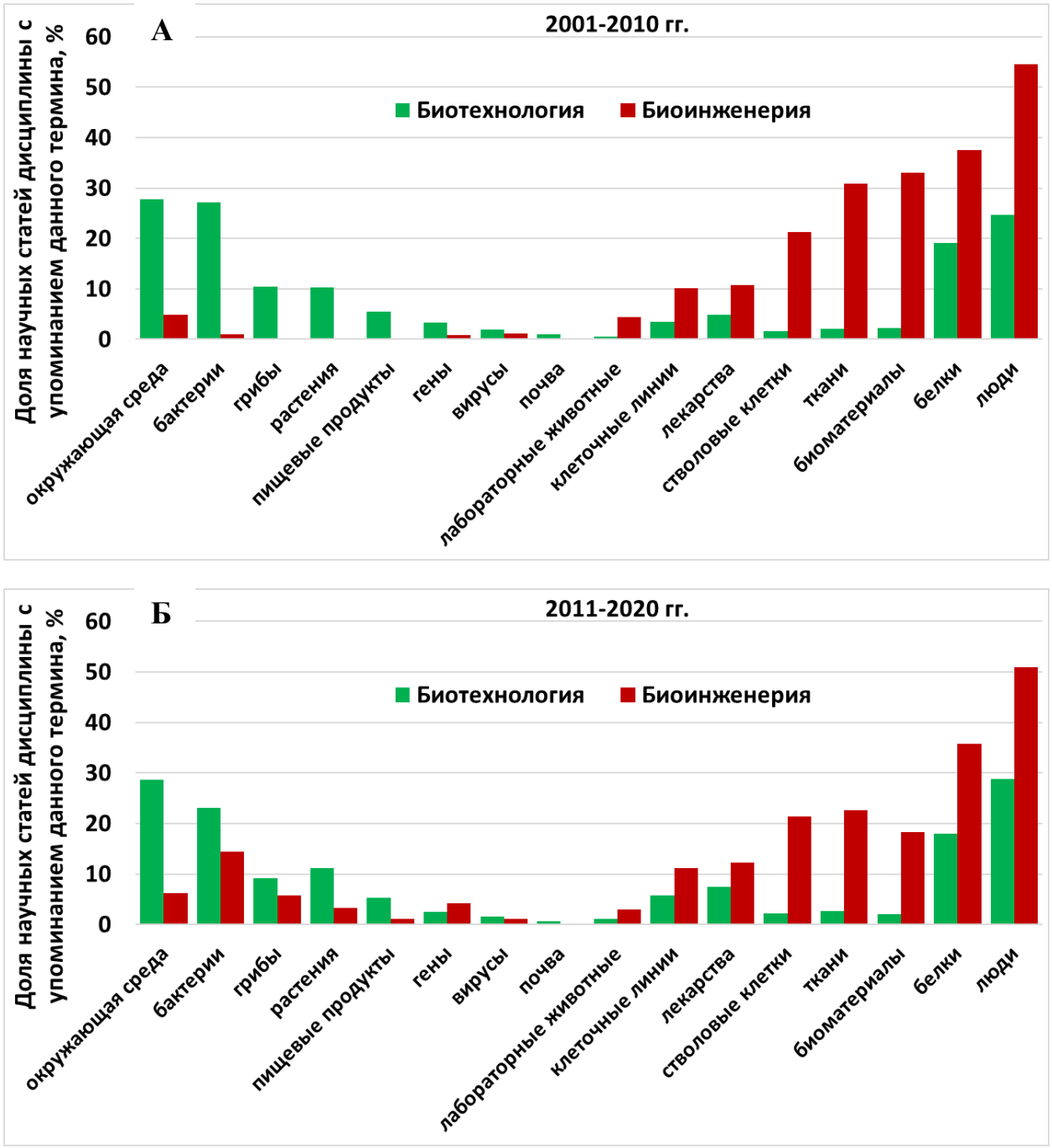


Рисунок 14. *Распределение научных публикаций в базе PubMed (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov) в категории «Биоинженерия» (“bioengineering(mh)”) и «Биотехнология» (“bioengineering(mh)”) совместно с категориями ((mh)): «окружающая среда» (environment(mh)), «бактерии» (bacteria(mh)), «грибы» (fungi(mh)), «растения» (plants(mh)), «пищевые продукты» (food(mh)), «гены» (genes(mh)), «вирусы» (viruses(tw)), «почва» (soil(mh)), «лабораторные животные» (soil(mh)), «клеточные линии» (cell lines(mh)), «лекарства» (drugs(mh)), «стволовые клетки» (stem cells(mh)), «ткани» (tissue(mh)), «биоматериалы» (biomaterials(mh)), «белки» (proteins(mh)), «люди» (humans(mh)) по их количеству во временные периоды: 2001-2010 гг. (А) и 2011-2020 (Б).*

Более тщательный анализ по терминам базы PubMed лишь подтвердил этот первичный результат. На Рисунке 14 представлен анализ числа статей, относящихся к дисциплинам «Биоинженерия» и «Биотехнология», в названии, резюме или ключевых словах, в которых не просто употреблены определенные термины (как слова), а которые намеренно привязаны к данным терминам специалистами этой базы данных. В качестве терминов были выбраны наиболее широко исследуемые и значимые объекты исследования этих научно-технологических дисциплин: окружающая среда, бактерии, грибы, растения, пищевые продукты, гены, вирусы, почва, лабораторные животные, клеточные линии, лекарства, стволовые клетки, ткани, биоматериалы, белки, люди. На этот раз для терминологического анализа было выбрано два временных периода: с 2001 по 2010 гг. и с 2011 по 2020 гг., чтобы оценить изменения в смысловом наполнении терминов рассматриваемых дисциплин.

Таким образом, база данных PubMed позволяет выявить различие между этими терминами: значение термина «Биотехнология» относится в большей степени к микробиологии, молекулярной биологии, генетики и сельскому хозяйству, тогда как значение термина «Биоинженерия» преимущественно относится к медицине, фармакологии и наукам о биоматериалах. Следует также отметить, что статей по Биотехнологии (33.3 тыс. за 2001-2010 гг. и 51,0 тыс. за 2011-2020 гг.) гораздо больше, чем по Биоинженерии (14,1 за 2001-2010 гг. и 36,9 тыс. за 2011-2020 гг.) - от 1,5 до 2-х раз, а в русскоязычной научной литературе – в 10 раз и более. Однако, с течением времени (с 00-х к 10-м гг.) видна тенденция сближения этих дисциплин, а не, напротив, их расхождение, что было характерно в 20-м веке для специализирующихся со временем «классических» дисциплин, таких как биохимия или микробиология.

Между тем, Биоинженерия и Биотехнология стоят в ряду других междисциплинарных инженерно-технологических направлений естественных наук: например, нанотехнологии и нейронауки (нейробиологии). Эти дисциплины обладают рядом характерных признаков, довольно сильно отличающих их от традиционных специализированных наук, таких как физическая химия, коллоидная химия, химия высокомолекулярных соединений, микробиология, биофизика, биохимия, физиология. Более того, эти научно-технологические дисциплины охватывают и вовлекают в свою орбиту специализированные науки. Они требуют использования в одном исследовании множества различных методов, относящихся зачастую к отдаленным по отношению друг к другу специализированным наукам, а поиск нового в них происходит на стыке этих наук; исследования в этих дисциплинах характеризуются наличием некого объединяющего элемента (материала, метода, параметра и т.п.), вокруг которого и формируется междисциплинарная сеть; в них происходит формирование общего научного языка, имеет место взаимное проникновение терминологии из разных традиционных наук;

исследования по этим дисциплинам обладают высокой гибкостью, широким охватом и разветвленной структурой; ведущая стратегия таких исследований происходит “снизу-вверх” (“bottom-up”), а новая информация рождается часто при искусственном конструировании новых объектов. Кроме того, в таких исследованиях особенно высока роль информационных технологий и биомиметики (Stock, 2011; Лысак, 2016). Таким образом, мне представляется, что эти общие смыслы и идеи междисциплинарных научно-технических направлений играют гораздо большую роль для развития науки, чем смысловое содержание их специализации. Тем не менее, иметь представление о различии этих дисциплин весьма полезно и важно.

1.3. Химическая структура и физико-химические свойства полиоксиалканоатов

1.3.1. Химическая структура полиоксиалканоатов

Биоразлагаемые полиэфиры оксикарбоновых кислот – полиоксиалканоаты (ПОА) стали активно использоваться в медицине еще с 70-х годов прошлого века. Так, первые биоразлагаемые шовные нити марки «Викрил», изготовленные из этих полимеров, были выведены на рынок медицинских изделий еще в 1974 г. Но наиболее интенсивно эти полимеры стали внедряться в медицинскую практику с начала нашего века, одновременно происходил практически экспоненциальный рост числа научных исследований этих полимеров медицинского назначения. Эти полимеры получают как путем химического синтеза, так и с помощью бактериального биосинтеза. В настоящее время в клинической практике и в научных исследованиях используют следующие полимеры из этого класса: синтетические поли-2-оксипропановую (полимолочная (ПМК), полилактиды), поли-2-оксиуксусную (полигликолевая (ПГК), полигликолиды) кислоты, поли-6-оксикапролактон (ПКЛ) и природные поли-3-оксимасляную (поли-3-оксибутират (ПОБ)), поли-4-оксимасляную (П4ОБ), поли-3-оксивалериановую (поли-3-оксивалерат (ПОВ) кислоты, поли-3-оксигексаноат (ПОГк), их сополимеры и близкие по структуре полимеры, такие как поли-*n*-диоксанон (ПДС). Мономерами этих полимеров являются гидроксикарбоновые кислоты или гидроксиалканоаты, которые считаются наиболее богатыми различными структурными вариациями, так как количество (-CH_2-) групп может быть от 0 до 5, а также присутствовать различные радикалы (R) – от алкильного до бензильного (Рисунок 15).

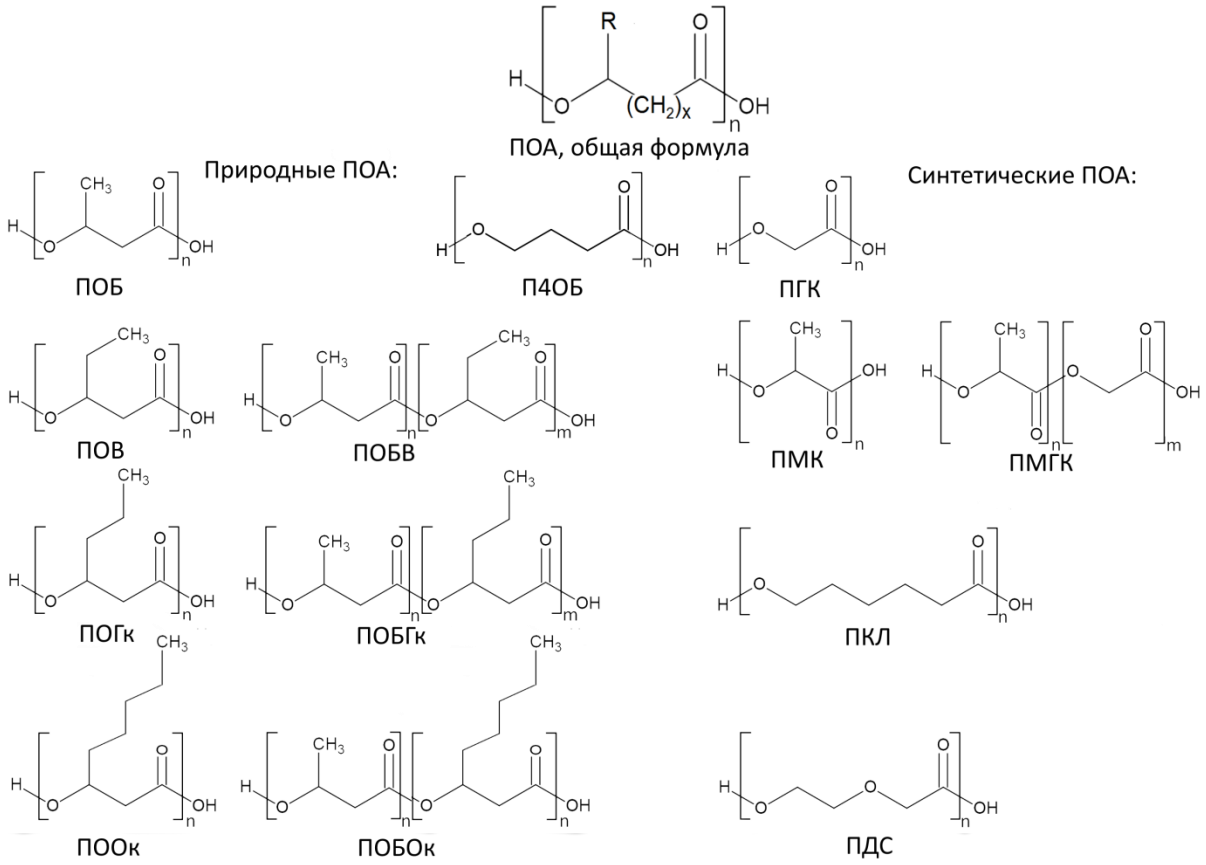


Рисунок 15. *Общая формула полиоксиалканоатов и структурные формулы ряда природных и синтетических полиоксиалканоатов биомедицинского применения. Сокращения: ПОБ – поли-3-оксибутират, ПОВ – поли-3-оксивалерат, ПОБВ – поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат, ПОГк – поли-3-оксигексаноат, ПОБГк – поли-3-оксибутират-со-3-оксигексаноат, ПООк – поли-3-оксиоктаноат, ПОБОк – поли-3-оксибутират-со-3-оксиоктаноат, ПМК – поли-2-оксипропановая кислота (полимолочная кислота, полилактид), ПГК – поли-2-оксиуксусная кислота (полигликолевая кислота, полигликолид), ПКЛ – поли-6-оксикапролактон, ПДС – поли-п-диоксанон.*

В медицине уже используется или разрабатывается огромный спектр различных медицинских изделий из ПОА: биоразлагаемые скобы, винты, пластины, штифты и шпагаты, биорассасываемые шовные нити и скобы для кожных степлеров, раневые и ожоговые покрытия, пародонтологические мембраны, хирургические сетчатые эндопротезы, хирургические заплаты для закрытия дефектов кишечника и перикарда, плаги-эндопротезы для колопроктологии и герниопластики, протезы сосудов, кардиоваскулярные стенты-эндопротезы, каркасные проводники для регенерации нервов, искусственные клапаны сердца и другие изделия. Используются ПОА и в фармацевтике как компонент новых лекарственных форм различных лекарственных средств, придающих им такие свойства, как: направленная доставка, пролонгированное действие, сниженная токсичность, увеличенная стабильность (Mokhtarzadeh

et al., 2016; Lim et al., 2017; Бонарцев и др., 2011; Bonartsev, 2019; Farah et al., 2016) (Рисунок 16).

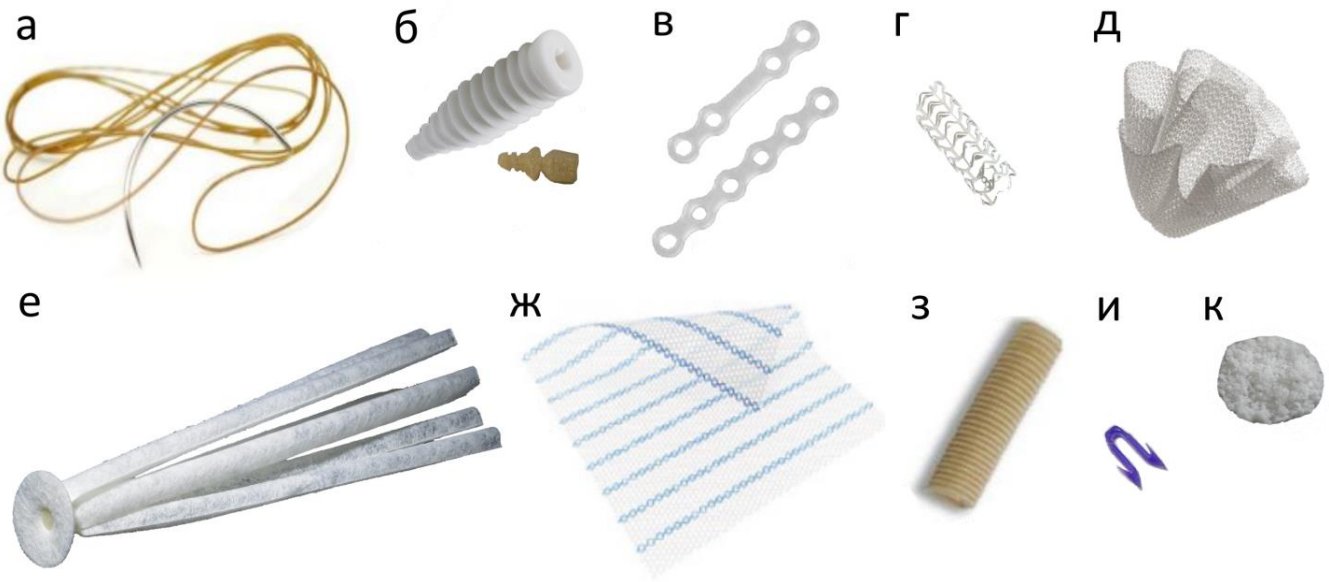


Рисунок 16. *Применяющиеся в медицинской практике и разрабатываемые медицинские изделия на основе синтетических и природных ПОА. А – Биоразлагаемые шовные нити на основе ПГК (Ethicon, Johnson & Johnson, США); Б – биоразлагаемый интерференциальный шуруп для костной фиксации на основе ПМК с пластификатором* Osteotwin^{TM} *(Biomatlante, Франция); В – биоразлагаемые пластины для костной фиксации LactoSorb® на основе ПМГК (Biomet, США); Г – биорассасывающийся кардиоваскулярный стент-эндопротез* Absorb *на основе ПМК (*Abbott*, США); Д – биорассасывающийся тканый плаг-эндопротез для герниопластики Phasix Plug на основе П4ОБ (C.R. Bard Inc., США); Е – биорассасывающийся плаг-эндопротез для колопроктологии Gore Bio-A fistula plug на основе ПМК (W. L. Gore & Associates Inc., США); Ж – частично биоразлагаемый сетчатый эндопротез для герниопластики на основе тканого материала из монофиламентных нитей из полипропилена и ПМГК Ultrapro Advanced™ (Ethicon, Johnson & Johnson, США); З – эндопротез-гид на основе тканого материала из ПГК для сращивания нервов GEM Neurotube (Synovis Micro Companies Alliance, США); И – биоразлагаемая скрепка на основе ПМК для автоматического степлера для сшивания кожи и мягких тканей (Ethicon, Johnson & Johnson, США); К – биоразлагаемая биополимерная мембрана для замещения дефектов мягких и хрящевых тканей ЭластоПОБ на основе ПОБВ (АО «БИОМИР сервис», г. Краснознаменск, Московская область, РФ).*

Такое активное использование и внедрение в медицинскую практику ПОА обусловлено уникальным сочетанием их свойств: способностью к биодеградации в организме без образования токсичных продуктов, биосовместимостью с органами и тканями человека, оптимальными физико-химическими свойствами (термопластичностью, относительно высокой

гидрофобностью, специфическими диффузионными свойствами, относительно высокой прочностью, пластичностью), возможностью использования эффективных технологических процессов при их получении. Несмотря на то, что благодаря сходству химического строения такое сочетание свойств присуще всем представителям класса ПОА, львиная доля случаев использования ПОА в медицине принадлежит таким синтетическим поли-2-оксиалканоатам (сПОА), как как поли-2-оксипропановая (полимолочная кислота, или полилактид), поли-2-оксиуксусная (полигликолевая кислота, или полигликолид), их сополимеры – полимолочно-со-полигликолевые кислоты (полилактид-со-гликолиды) (ПМГК), поли-6-оксикапролактон и поли-*п*-диоксанон (Рисунок 15). Это произошло по нескольким причинам. Прежде всего, первые биоразлагаемые медицинские изделия, а именно, хирургические шовные нити и импланты для фиксации костей (стержни, шурупы и пластины) были изготовлены из ПМК, ПГК и ПМГК еще в 70-х и 80-х гг. прошлого века (Farah et al., 2016; Athanasiou et al., 1996; Middleton and Tipton, 2000). Соответственно, сертификация и все испытания, доклинические и клинические, были проведены на медицинских изделиях из этих полимеров, а затем и вся статистика по клиническому использованию накапливалась именно по этим полимерам. Важнейшую роль сыграла разработка промышленного получения ПМК, ПГК, ПКЛ и их сополимеров биомедицинского назначения марки Resomer химическим подразделением концерна Evonik Industries AG (Германия), марки Purasorb компанией Corbion (Нидерланды, совместно с нефтегазовым концерном Total), марки Lactel компанией Durect (США) и другими. Разумеется, разработка новых биоразлагаемых изделий проводилась преимущественно с использованием уже сертифицированных, испытанных и известных медицинских полимеров: ПМК, ПГК, ПКЛ и их сополимеров (Farah et al., 2016; Athanasiou et al., 1996; Middleton and Tipton, 2000). Во-вторых, скорость гидролитической деструкции ПМК и ПГК значительно выше, чем у других ПОА, т.е. скорость их биодеградации не зависит от ферментов и клеток, находящихся в живых тканях области имплантации, т.к. их биодеструкция происходит преимущественно за счет обычного гидролиза в водной среде. Это существенно облегчает разработку медицинских изделий, т.к. в модельных условиях в водной среде можно довольно точно определить кинетику биодеструкции изделий, которая будет происходить в водной среде различных тканей в реальных условиях его эксплуатации *in vivo*. Более того, благодаря этому можно создать прогностическую математическую модель биодеградации полимерных изделий и изменения их физико-химических свойств в ее процессе (Farah et al., 2016; Weir et al., 2004; Antheunis et al., 2010; Shirazi et al., 2016). В-третьих, ПМК, ПГК и их сополимеры получают путем химического синтеза, хотя сами исходные простые вещества, лактоны оксикарбоновых кислот, могут быть продуктами биотехнологии. Традиционно химический синтез различных веществ, в т.ч. полимеров медицинского назначения активно развивался в прошлом веке еще с 1930-х гг. и

именно химическая промышленность являлась источником подавляющего числа биомедицинских полимеров (Farah et al., 2016; Middleton and Tipton, 2000; Jenkins, 2007; Shtilman, 2003). Более того, синтез ПМК был впервые открыт еще в 1932 г. американским химиком Уоллесом Карозерсом (Wallace Carothers), который возглавлял отдел органического синтеза компании Дюпонт и являлся изобретателем нейлона, а также занимался разработкой синтеза других ныне широко используемых в промышленности полимеров: неопрена, полиамидов и различных полиэфиров. Соответственно, вся система производства, контроля качества и испытаний была особенно хорошо отработана именно в этой области медицинской промышленности, что также сильно облегчало разработку новых медицинских изделий (Jenkins, 2007; Shtilman, 2003).

Однако, ПМК, ПГК и их сополимеры ПМГК, как и все прочие сПОА, не возникли из ниоткуда, и их важнейшие свойства - способность к биодеструкции и биосовместимость, оказавшиеся столь подходящими для их биомедицинского применения, не случайны. Эти полимеры являются синтетическими аналогами природных полиоксиалканоатов, поли-3-оксиалканоатов (пПОА). И хотя синтетические ПОА (в т.ч. ПМК, ПГК и ПМГК) довольно часто называют биополимерами, имея в виду их способность к биодеградации и биосовместимость, это не вполне корректно, т.к. биополимерами все-таки принято называть полимерные продукты жизнедеятельности живых организмов: бактерий, растений, грибов, животных, т.е. биомакромолекулы природного происхождения (Vert et al., 2012). Так, поли-3-оксиалканоаты, являются запасными полимерами многих видов бактерий (Mokhtarzadeh et al., 2016), тогда как сПОА (ПМК, ПГК, ПМГК, ПКЛ и другие) в природе вообще не встречаются (Farah et al., 2016; Jenkins, 2007), хотя и имеются работы, где методами генетической инженерии были синтезированы с помощью бактериальных штаммов-продуцентов сополимеры поли-3-оксибутирата с полимолочной кислотой (Park et al., 2013; Jung and Lee, 2011), но это лишь подтверждает их искусственное происхождение. Тем не менее, основные свойства этих полимеров похожи, хотя и имеются важные отличия, уже указанные выше. Таким образом, синтетические ПОА в той или иной степени являются биомиметическими материалами.

Природные поли-3-оксиалканоаты представляют собой полиэфиры 3-оксиалкановых кислот, соответственно, поли-3-оксибутират (ПОБ) является линейным полиэфиром 3-оксимасляной кислоты, которая наряду с D-(L-)молочной кислотой, янтарной кислотой, биоэтиленом, 1,3-пропандиолом, цис-3,5-циклогексадиен-1,2-диолами (Рисунок 17) являются наиболее распространенными веществами, которые синтезируются бактериями, и которые при этом являются мономерами используемых человеком полимеров.

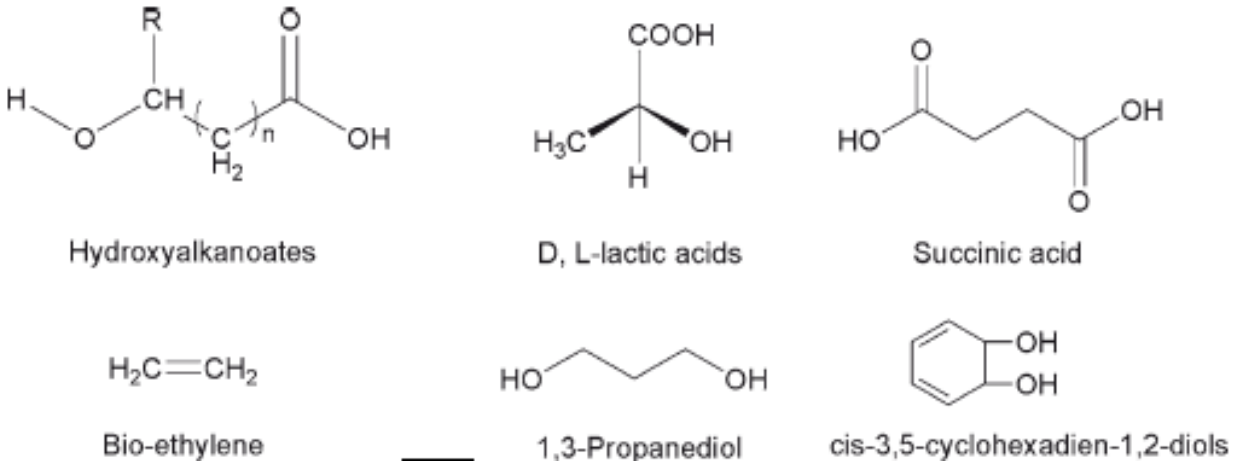


Рисунок 17. *Наиболее распространенные мономеры полимеров, имеющие природное (бактериальное) происхождение (Chen and Wu, 2005).*

В зависимости от бокового радикала, различают различные пПОА: поли-3-оксибутират, поли-3-оксивалерат, поли-3-оксигексаноат, поли-3-оксиоктаноат и так далее (Рисунок 15). Все они довольно сильно различаются по своим физико-химическим свойствам, таким как кристалличность, температура плавления, температура стеклования, гидрофобность, пластичность, модуль упругости и другим. Причем, как правило, при бактериальном биосинтезе образуются не чистые гомополимеры поли-3-оксивалерата, поли-3-оксигексаноата и других более длинноцепочечных мономеров пПОА, а их блок-сополимеры с ПОБ: поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат (ПОБВ), поли-3-оксибутират-со-3-гексаноат (ПОБГк), поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат-со-3-оксигексаноат (ПОБВГк), поли-3-оксибутират-со-3-оксиоктаноат (ПОБОк), поли-3-оксибутират-со-4-оксибутират (ПОБ4ОБ) и другие, но свойства этих сополимеров также сильно отличаются от свойств ПОБ и значительно зависят от мономерного состава этого сополимера (Bloembergen et al., 1986; Barham et al., 1984; Akhtar et al., 1992).

1.3.2. ПОА как частично кристаллические биополимеры

Полимерная цепь ПОБ состоит только из R-форм 3-оксимасляной кислоты, благодаря чему в выделенном и очищенном виде этот биополимер является частично кристаллическим полиэфиром – кристалличность ПОБ составляет от 55% до 80% (Holmes, 1998), хотя, находясь в бактериях, ПОБ имеет аморфную структуру (Amor et al., 1991). Кристаллическая структура ПОБ представляет собой левозакрученную 2_1-спиральную конформацию (Brückner et al., 1988) (Рисунок 18).

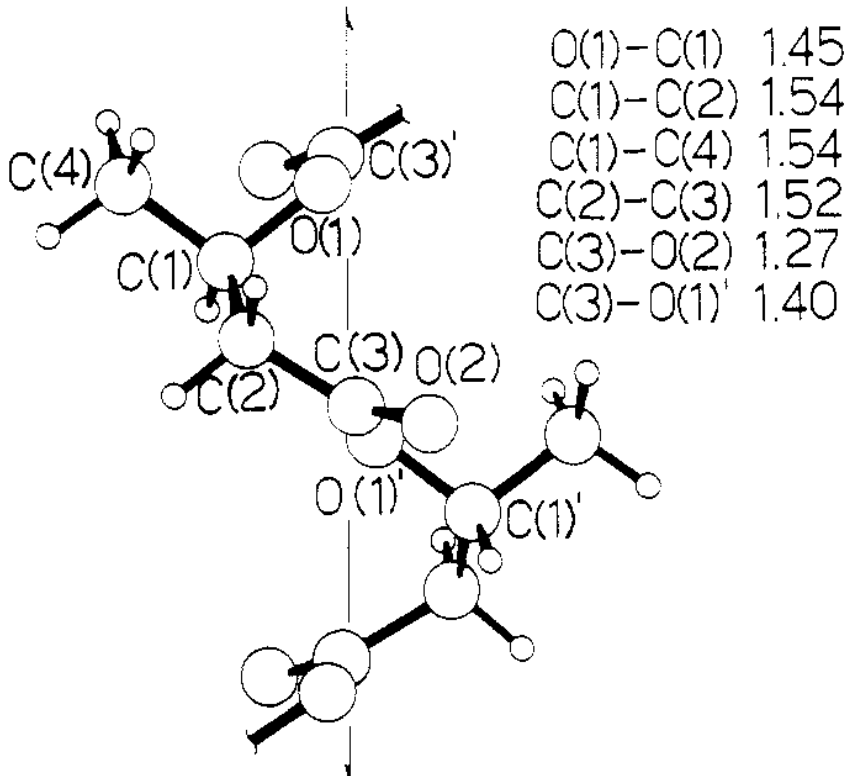


Рисунок 18. *Молекулярная модель ПОБ (Brückner et al., 1988).*

Единичные кристаллы ПОБ получали путем переосаждения в растворителях различных типов (Birley et al., 1995; Iwata et al., 2005). Как правило, ПОБ образует пластинчатый кристалл с размерами около 0,3-2 мкм и 5-10 мкм вдоль короткой и длинной осей соответственно (Рисунок 19).

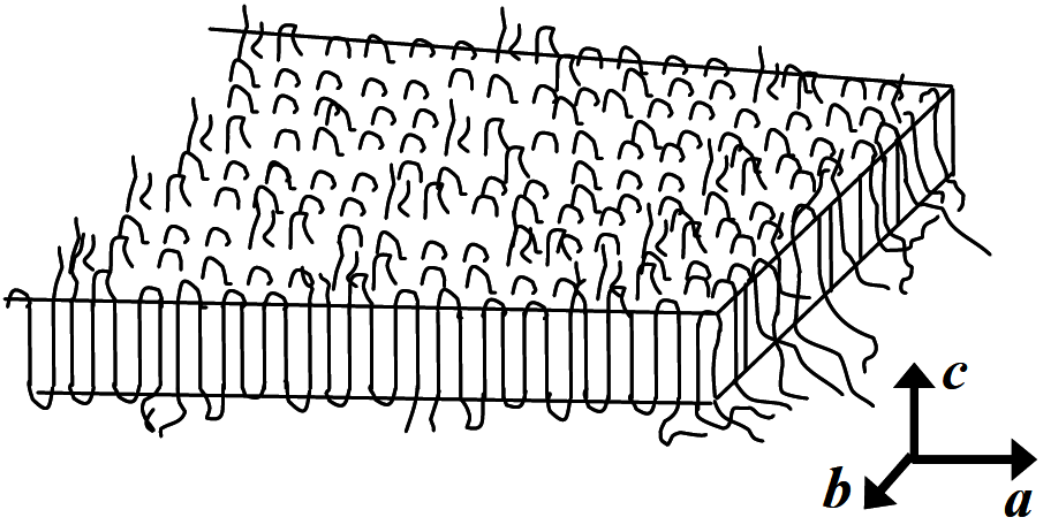


Рисунок 19. *Схематическая модель упаковки молекулярной цепи одиночных кристаллов ПОБ (Iwata et al., 1997).*

Толщина кристаллов ПОБ варьируется от 4 до 10 нм, в зависимости от молекулярного веса, растворителя и температуры кристаллизации (Iwata et al., 1997). ПОБ формирует как единичные кристаллы, так и кристаллические структуры в виде ламел и сферолитов (Barham et al., 1984). Ламелы в сферолитах ПОБ формируются радиально по оси *a,* вокруг которой вращаются оси *b* и *c*, из-за чего его сферолиты формируют структуры в виде полос (Рисунок 20).

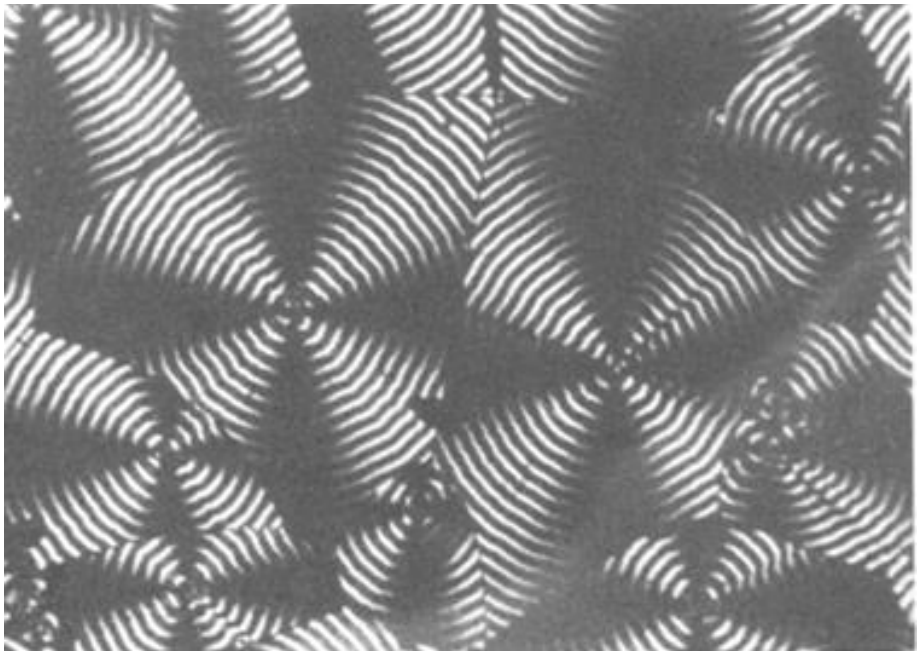


Рисунок 20. *Микроструктура сферолитов ПОБ, полученных при кристаллизации полимера при температуре 50ºC (Barham et al., 1984).*

Структура таких ламеллярных кристаллов и сферолитов зависит от того, при какой температуре происходит кристаллизация полимера, а также от молекулярной массы (Sudesh et al., 2000).

1.3.3. Физико-химические свойства ПОА

Природные ПОА довольно сильно различаются по своим физико-химическим свойствам, таким как кристалличность, температура плавления, температура стеклования, гидрофобность, пластичность, модуль упругости и другим. Так, температура плавления (T_m) может изменяться в пределах 60 - 177 °C, молекулярная масса – в пределах 10 - 2×10^6 г/моль (2000 кДа) со степенью полидисперсности – 1,2 – 6, модуль Юнга в пределах 1,4 - 3,5 ГПа, удлинение на разрыв - 2 – 1000 % (Chen, 2010; Doi et al., 1995; Wang et al., 2009).

Молекулярная масса ПОБ лежит в пределах 1×10^4 - 3×10^6 г/моль (10 – 3000 кДа), степень полидисперсности составляет примерно 2. Температура стеклования ПОБ составляет примерно 4 °C, а его температура плавления - около 180 °C. Аморфная и кристаллическая компоненты ПОБ составляют 1,18 и 1,26 и г/см^3, соответственно. По своим механическим свойствам ПОБ

сходен с изотактическим полипропиленом, его предел прочности (~43 МПа), модуль Юнга (~3,5 ГПа), однако полипропилен обладает гораздо большим удлинением на разрыв (400%) по сравнению с ПОБ (5%), т.е. ПОБ – гораздо более хрупкий и жесткий пластик (Sudesh et al., 2000).

Хрупкость ПОБ связано с его слабой трещиностойкостью, т.е. образованием трещин (Barham and Keller, 1986; Barham et al., 1992; de Koning and Lemstra, 1993). Трещиностойкость и, соотвественно, жесткость ПОБ можно увеличить, если подвергнуть его отжигу после начальной кристаллизации (de Koning et al., 1994). Механические свойства растянутых пленок из высокомолекулярного ПОБ значительно улучшаются (Kusaka et al., 1998).

Среди сополимеров ПОБ наиболее хорошо были исследованы свойства сополимеров 3-оксибутирата и 3-оксивалерата (ПОБВ). Кристалличность этих сополимеров составляет от 50 до 70% (Orts et al., 1991). В сополимерах ПОБВ, по-видимому, мономеры 3ОВ вносят дефекты в кристаллическую фазу ПОБ, т.к. происходит уменьшение теплоты плавления и, особенно, степени кристалличности. Было показано, что одиночные кристаллы ПОБВ с молярным содержанием 3-ОВ менее 10% схожи по своей морфологии с кристаллами ПОБ, тогда как одиночные кристаллы ПОБВ с молярным содержанием 3-ОВ 17 – 30% были морфологически неоднородны (Mitomo, 1987).

Для улучшения физико-химических свойств ПОБ, в т.ч. его механических свойств в его полимерную матрицу добавляют низкомолекулярные пластификаторы, например, полиэтиленгликоль (ПЭГ). Добавление пластификаторов способствует снижению кристалличности полимера из-за ослабления сил межмолекулярного взаимодействия между соседними полимерными цепями. Так, добавление ПЭГ 300 к ПОБ приводит к его полному смешению с этим низкомолекулярным полимером и снижению кристалличности (Parra et al., 2006; Rodrigues, 2005). Однако другие авторы показали, что добавление ПЭГ не оказывает влияние на кристалличность, но улучшает пластичность полимера (Bibers, 1999).

Как правило, для изучения биомедицинских свойств, в том числе биологической активности различных ПОА, проводят тестирование одного из материалов, предназначенного для разработки какого-то определенного медицинского изделия, т.е. используют технический подход. Но что если рассмотреть биомедицинские свойства ПОА на примере ПОБ как природного родоначальника практически всех ПОА, используемых в медицине, с точки зрения тех функций, которые этот биополимер выполняет в природе? Поиск причин уникальных свойств ПОБ в самой природе привел нас к такому интересному направлению в биологии, как биомиметика (Vincent et al, 2006), тем более, что биомиметический подход в последнее время все активнее используется для исследования различных полимеров (Kushner and Guan, 2011). Действительно, раз ПОБ является природным биополимером, то следует выяснить, какую роль

он выполняет в природе, прежде всего, какова его роль в человеческом организме. Возможно, это может дать ответы на вопросы использования не только этого биополимера, но и вообще всех ПОА в качестве материалов для медицины. Т.е. можно предположить, что ПОА, полученные человеком с помощью как химического синтеза, так и биотехнологии, благодаря схожести с ПОБ по своей химической структуре могут имитировать биологические свойства, присущие ПОБ, связанные с теми его функциями, которые этот биополимер приобрел в процессе долгой эволюции синтезирующих его организмов. Равно как этот же подход позволит выяснить причины некоторых ограничений использования ПОБ и других ПОА в медицине и экспериментальной биологии. Для решения этой задачи мы далее рассмотрим основные биомедицинские свойства ПОБ и возможно связанные с ними природные функции этого биополимера, т.е. попытаемся раскрыть биомиметические аспекты тех или иных биомедицинских свойств ПОБ как главного природного представителя всех ПОА.

1.4. Биодеградация ПОА как природных биосинтетических полимеров

1.4.1. Гидролитическая деградация ПОА

ПОБ и практически все ПОА являются биодеградируемыми полимерами, что и определяет в первую очередь спектр их использования в медицине. Как правило, разложение (деградация) полимера происходит путем разрыва основных или боковых цепей макромолекул, вызванных термической активацией, окислением, фотолизом, радиолизом или гидролизом (Iwata et al., 2002). Деградация путем гидролиза происходит в результате расщепления связей между мономерами в полимерной макромолекуле с их последующим высвобождением. При этом атаковать химические связи в полимерной цепи могут как молекулы воды в случае гидролиза в нейтральных условиях, так и кислота, щелочь или ферменты (Azevedo et al., 2004). Поэтому для проведения экспериментальных исследований деградации полимеров и других веществ используют модельные условия: это может быть модельная биомиметическая среда плазмы крови или межклеточной жидкости (pH 7,4 при 37°C), но это могут быть и более жесткие условия – при повышенной или пониженной pH и при повышенной температуре (более 55°C), что позволяет проводить ускоренное исследование деградации биоматериалов (Doi et al., 1990; Doi et al., 1995; Holland et al., 1987; Koyama et al., 1995).

Основным показателем продесса (био)деградации является молекулярная масса полимера (Göpferich, 1996). Известно, что деструкция полиэфирных цепей катализируется концевыми карбоксильными группами, а ее скорость пропорциональна концентрации воды и концентрации сложноэфирных связей. Пренебрегая диффузионной стадией в водной среде (т.е при избытке молекул воды в матрице), а также при условии низкой степени гидролиза (что

вполне справедливо для медленно деструктирующего ПОБ, в частности) кинетическое уравнение неферментативного гидролиза, которое связывает кинетику изменения ММ со скоростью гидролиза сложноэфирных связей (Lin and Anseth, 2013):

$1/MM_n = 1/MM_n^0 + kt$ 1)

где, M_n и M_n^0 - среднечисловой молекулярный вес в момент времени t и в начальный момент, соответственно, k – эффективная константа скорости гидролиза. Это математическое выражение предполагает наличие линейной зависимости $1/MM_n$ от времени. Однако следует также учитывать вклад автокатализа, т.е. каталитического влияния концевых карбоксильных групп, высвобождающихся в процессе гидролиза на дальнейщий процесс расщепления полимерной цепи (Pitt and Zhong-wei, 1987):

$d(E)/dt = - d(COOH)/dt = - k(COOH)(H_2O)(E)$ 2)

где (E), (H_2O) и (COOH) – концентрация полимерных молекул, молекул воды и карбоксильных групп, располагающихся на концах разорванной цепи сложноэфирного полимера, соответственно.

Среднее число разорванных связей в полимере (N), в первом приближении, при условии постоянной концентрации сложноэфирных полимерных молекул и молекул воды, может быть представлено уравнением:

$MM_n = MM_n^0 e^{-kt}$ 3)

Дальнейшее преобразование уравнения (3) приводит к следующему выражению:

$\ln(MM) = - kt + \ln MM_0$ 4),

из которого также следует линейная зависимость ln(MM) от времени.

Таким образом, если механизм разрыва цепи происходит по закону случая, то величина N линейно возрастает во времени. Падение молекулярной массы полимера во времени представляет также характерный признак гидролиза по отношению к ферментативному разложению. В определенной степени остается дискуссионным вопрос могут ли крупные продукты деструкции (олигомеры) ускорять дальнейший процесс разложения ПОБ. Положительно на это вопрос отвечают авторы работы (Koyama et al., 1995). Однако Фрайер (Freier) и соавторы (Freier et al., 2002) показали, что при появлении в системе олигомерных продуктов (их специально вводили) ускорения гидролиза не наблюдается. Скорости снижения общей массы и средневесовой молекулярной массы полимерной смеси (70:30) высокомолекулярного ПОБ (ММ = $6{,}4\times10^5$) и низкомолекулярного ПОБ (ММ = 3000) были такими же, как и у индивидуального высокомолекулярного компонента. Между тем, добавление аморфного атактического ПОБ (аПОБ) с молекулярной массой равной 10 кДа вызывает существенное увеличение скорости гидролиза: наблюдалась 7% потеря массы по сравнению с нулевой потерей чистого ПОБ и, соответственно, 88-ми процентное уменьшение

ММ в смеси по сравнению с 48%-ным снижением ММ для индивидуального ПОБВ (Freier et al., 2002, Scandola et al., 1997).

Для ускорения процесса гидролиза буферный раствор разогревают до 50, 70, а иногда и более высоких температур (Koyama et al., 1995). В этой работе показано, что пленки ПОБ диаметром 12 мм и толщиной 65 мкм, а также с ММ, равной 22 или 75 кДа, не изменяли свою исходную массу при 55 ℃ в течение 58 дней. Среднечисловая молекулярная масса снижалась с 768 до 245 кДа, а толщина пленки несколько увеличивалась с 65 до 75 мкм. Последние результаты свидетельствуют о том, что вода проникает в объем полимера, т.к. появление дополнительных функциональных групп, образующихся в результате гидролиза, приводят к возрастанию гидрофильности полимерной матрицы и, следовательно, к ее набуханию. Более того, сравнительные исследования поверхности и поперечного среза пленки до и после гидролиза, показывает, что поверхностный слой сохранялся неизменным, а внутренний слой характеризовался возрастанием пористости с образованием пор диаметром <0,5 мкм. Молекулярно весовое распределение ПОБ оставалось унимодальным, кинетика снижения массы образца подчинялась уравнению 1-го порядка, что подтверждает механизм разрыва полимерных цепей по закону случая, протекающий в аморфных областях образца. Интересно, что примерно в этом же интервале времени АПОБ гидролизуется по 2х-стадийному механизму. На первой стадии протекает статистический разрыв макромолекул, что сопровождается снижением ММ образца, а затем при достижении примерно ММ равной 10000 начинает уменьшаться собственно вес образца, т.е. начинают десорбироваться в раствор относительно низкомолекулярные фрагменты ПОБ (Doi, 1990; Koyama et al., 1995; Freier et al., 2002). Как будет показано далее, роль воды в организации ультраструктуры полимерной матрицы, прежде всего, для ПОБ в составе полимерных гранул бактерий сложно переоценить.

Анализ литературных данных демонстрирует широкий разброс результатов по измерению скорости гидролиза ПОБ в модельных средах *in vitro*. Очевидно, что в гетерофазной системе процесс разрыва сложноэфирных связей сопряжен с транспортными процессами молекул воды в полимере, а также с десорбцией продуктов гидролиза различной молекулярной массы и, следовательно, различной подвижности в полимерной матрице. В этом случае, наряду с уже упомянутыми различиями, связанными с биотехнологическим способом получения полимера, такими как разная молекулярная масса, степени очистки от белковых и липидных примесей, необходимо принимать во внимание геометрию/толщину образца, его пористость, метод приготовления образцов, источник их происхождения. Таблица 2 предлагает определенную сводку результатов скорости деградации ПОБ.

В условиях in vitro (буферный раствор; pH = 7,4; 37 ℃) ряд работ сообщают об отсутствии потери веса после года и двух лет инкубации пленки ПОБ толщиной 100 мкм и ММ

= 640 кДа. Аналогично вели себя в течение полугода такая же пленка, но толщиной 50 мкм и монофиламентная нить диаметром 30 мкм. Вместе с тем, потеря веса пленки ПОБ (к сожалению, неизвестной ММ) толщиной 500 мкм составляла 3% после 40 дней инкубации. Есть данные о более заметных изменениях веса пленки: 7,5 % (279 кДа и неизвестной толщины) после 50-ти дней инкубации и в дальнейшем отсутствие снижения при сроках инкубации в 150, 364 и 730 сут.; 12% после 3 месяцев инкубации (150 кДа, толщина 40 мкм). Как и следует ожидать, среднечисловая ММ менялась боле существенно, а в целом, наблюдается противоречие этих результатов (Таблица 2). Достаточно указать, что при одних и тех же условиях *in vitro* молекулярная масса ПОБ уменьшалась на 36% после 2-х лет инкубации, на 58% после 84 дней и на 87% после 98 суток инкубации пленок (Bonartsev et al., 2008).

Таблица 2. *Гидролитическая деградация ПОБ in vitro (сравнительные данные) (Bonartsev et al., 2008).*

Тип изделия	Начальная ММ ПОБ, кДа	Размер/ толщи-на, мкм	Условия	Относительная массовая потеря ПОБ, %	Относительная потеря ММ ПОБ, %	Время, дни
Пленка	650	50	37°C, pH=7,4	0	35	150
Пленка	640	100	37°C, pH=7,4	0	64	730
Пленка	640	100	37°C, pH=7,4	0	45	364
Пленка	279	-	37°C, pH=7,4	7,5	-	50
Пленка	640	100	70°C, pH=7,4	-	55	28
Пленка	650	50	55°C, pH=7,4	0	68	150
микросферы	50	250-850	37°C, pH=7,4	0	0	150
микросферы	50	250-850	85°C, pH=7,4	50	68	150
микросферы	600	250-850	85°C,	25	-	150

			pH=7,4			
Нить	470	30	37°C, pH=5,2	0	-	180
Нить	470	30	37°C, pH=7,0	0	-	180
пластина	380	2000	55°C, pH=7,4	0	61	98
пластина	-	510	37°C, pH=7,4	3	-	40
пластина	380	1000	37°C, pH=7,4	0	-	28

Кислотность водной среды сильно влияет на скорость гидролиза ПОБ. Во-первых, в большинстве случаев щелочного гидролиза (pH в интервале 11 – 13) меняется состояние поверхности. В присутствии NaOH она становится более шероховатой за счет образования малых по диаметру полостей, что, видимо связано с удалением продуктов гидролиза из аморфных областей биополимера. В этом диапазоне становится существенным изменение на каждую единицу pH. Например, при pH = 11 пленки ММ = 200 кДа и толщиной 100 мкм устойчивы к гидролизу в течение 140 дней, тогда как при pH = 13 при 37 ℃ наблюдается завершение гидролиза ПОБ уже после 19 дней инкубации. Переход в сильно щелочную среду гидролизующего агента (1М NaOH) придает поверхности полимера несколько меньшую «зернистость» - средний диаметр пор уменьшается примерно на 50% (Bonartsev et al., 2008).

Следует рассмотреть также изменение физико-механических характеристик ряда образцов ПОБ различной геометрии (нити, пластины, пленки) (Doyle et al., 1991, Miller and Williams, 1987). При инкубации шовных нитей на основе ПОБ в течение 182 дней при 70 ℃ и pH = 7,2 модуль Юнга не менялся, а напряжение при разрыве и относительное удлинение при разрыве снижались на 36% и 33%, соответственно. При 37 ℃ механические характеристики менялись несколько сложнее: вначале инкубации, первые 90 дней, напряжение и удлинение при разрыве возрастали на 17% и 16%, соответственно, а затем наблюдалось постепенное снижение этих механических характеристик до исходных значений к 182 дню выдержки в буферном растворе (Miller and Williams, 1987). Для пленок БПОБ в течение 120 дней происходит постепенное снижение модуля Юнга до 32%, а напряжения при разрыве на 77% (Doyle et al., 1991). И, наконец, для полимерных пластин модуль Юнга и напряжение при разрыве в течение 1-го дня уменьшились на 32 и 13%, соответственно. Столь резко в течение первых суток менялась и твердость образов (на 40%). В дальнейшем модуль Юнга и твердость

стабилизировались и не менялись в течение 28 дней, а напряжение при разрыве постепенно возрстало и достигало исходных значений (Coskun et al., 2005). Для пластин подобные изменения трудно объяснить влиянием деструкции. Здесь, по-видимому, мы имеем дело с относительно быстрым изменением поверхностного натяжения на границе полимер-раствор и диффузии растворителя в объем матрицы. Нити и пленки, как уже было сказано выше, подвергаются частичной деструкции и их прочностные и деформационные характеристики отражают соотношение диффузионно-кинетических процессов в аморфных областях и на границе кристаллических областей. К сожалению, степень кристалличности для данных образцов не приводится.

Скорость гидролитической деструкции синтетических поли-2-оксиалканоатов, таких как полилактиды и полигликолиды, гораздо выше, чем скорость гидролитической деструкции природных ПОА. Именно гидролитическая декструкция вносит основной вклад в биодеградацию полилактидов и полигликолидов, тогда как пПОА гораздо более стойки к гидролизу в водной среде. Было показано, что гидролиз ПОБ происходит гораздо медленнее, чем гидролиз ПЛА (Koyama et al., 1995). Если при инкубации пленок ПОБ в течение 150 суток в стандартной модельной среде (фосфатный буфер, 0,01 М, pH 7,4, 37 °С) их вес не менялся при падении ММ на 35%, то вес пленок из ПЛА падал на 83% при примерно таком же уменьшении ММ – 80% (Tokiwa et al., 1977).

Причина этого кроется в различном механизме гидролитической деструкции природных ПОА и синтетических П2ОА. Гидролиз П2ОА в воде происходит преимущественно по автокаталитическому механизму, где катализаторами дальнейшего гидролитического расщепления полимера выступают высвобождающиеся при разрыве сложноэфирной связи активные карбоксильные группы. Это и обуславливает относительно быструю и достаточно легко прогнозируемую биодеградацию этих полимеров при его имплантации в различные ткани. Продолжительность гидролитической деструкции П2ОА составляет от нескольких дней до нескольких месяцев, и ее скорость можно регулировать в широких пределах за счет изменения молекулярной массы и мономерного состава синтезируемого полимера (Farah et al., 2016). Но этот же механизм гидролитической деструкции П2ОА является и причиной многих проблем его применения в медицине. Так, основным побочным эффектом применения синтетических П2ОА в медицине является то, что в процессе быстрого гидролиза ПМК, ПГК и ПМГК продукты их деградации не успевают утилизироваться в организме и вблизи имплантата резко снижается pH окружающей среды. Хроническое раздражение ткани в результате снижения pH является серьезной проблемой применения полимерных имплантатов на основе сополимеров ПМГК, оптимальное решение которой так и не найдено до сих пор, несмотря на широкое использование в клинической практике медицинских изделий из этих полимеров

(Майбородин и др., 2013; Agrawal et al., 1997; Ignatius and Claes, 1996; Vacanti et al., 2012; Solheim et al., 2000; Böstman et al., 2000; Lickorish et al., 2004; Khouw et al., 1998; Su et al., 2005; Ceonzo et al., 2006; Kim et al., 2007; Taylor et al., 1994; Rihova, 1996; Stevanovic, 2011).

1.4.2. Ферментативная биодеградация ПОА

Низкая скорость гидролитической деструкции природных ПОА показана не только в различных водных средах, но и наблюдается в присутствии различных ферментов, которые могут осуществлять гидролиз сложноэфирных связей этих полиэфиров (Босхомджиев и др., 2009; Zhuikov et al., 2017a; Zhuikov et al., 2017b). Исследование ферментативной деструкции ПОБ проводили преимущественно с использованием специфических ПОА-деполимераз. ПОА-деполимеразы состоят из N-терминального каталитический домена, имеющего активный центр в виде серин-содержащего пентапептида (Gly-X_1-Ser-X_2-Gly) и связывающегося с субстратом С-терминального домена. Было показано, что триада аминокислот Ser..His..Asp входит в активный центр как деполимераз, так и липаз. Более того, серин содержащий пентапептид Gly-X_1-Ser-X_2-Gly локализован во всех известных ПОА-деполимеразах, а также липазах, эстеразах и сериновых протеазах (Nojiri and Saito, 1997). Активный центр ПОА-полимеразы стереоспецефичен по отношению к сложноэфирным связям полимерной макромолекулы, что определяет скорость ферментативного гидролиза ПОБ и его сополимеров (Sudesh et al., 2000). Ниже мы увидим, что строение этого фермента играет ключевую роль в процессе деградации с его помощью полимера (Bachmann and Seebach, 1999; Kasuya et al., 1996; Numata et al., 2009).

Анализ функционирования ПОА-деполимеразы следует начать с того факта, что скорость ферментативного гидролиза исследуемого полимера зависит от концентрации фермента. Природа этой зависимости заключена в том, что механизм ферментативного гидролиза ПОА под действием белковой молекулы ПОА-деполимеразы осуществляется в две стадии, т.е. это гетерогенная реакция (Nojiri and Saito, 1997; Sudesh et al., 2000). На первой стадии происходит адсорбция фермента на поверхности полимера по механизму закрепления одного из доменов деполимеразы на поверхности субстрата - ПОБ или его сополимера. Собственно, расщепление полиэфирных связей протекает на следующем втором этапе процесса ферментативной деградации, когда участвует активный центр каталитического домена ферментной макромолекулы. Скорость расщепления зависит от стереосостава ПОБ (R- и S-стереомеры) и его тактичности, поскольку активный центр стереоспецифичен по отношению к субстрату. Водорастворимые продукты гидролиза, а именно их растворимость является условием десорбции из зоны реакции, представляют смесь мономеров и олигомеров R-3-гидроксибутирата. Степень кристалличности субстрата сильно влияет на скорость биодеградации образцов, полученных из расплава: последняя в 20 раз выше в аморфных областях ПОБ, чем в кристаллических. Предполагается, что деструкция вначале развивается в

аморфных областях и затем переходит в кристаллические (Hocking et al., 1996; Spyros et al., 1997; Abe and Doi, 1999). Именно поэтому поверхность ПОБ после обработки ферментом становится шероховатой. Литературные данные свидетельствуют в пользу того, что механизм разложения лежит во внешней диффузионно-кинетической области или в рамках другой терминологии протекает по S-типу, т.е. в процессе ферментативного гидролиза деструкции протекает в поверхностной зоне, поскольку крупные по размеру макромолекулы фермента не в состоянии проникать в объем полимерного образца (Sudesh et al., 2000). При этом молекулы фермента необратимо сорбируются на полимерной поверхности, но могут замещаться другими молекулами, которые находятся в растворе (Yamashita et al., 2003). Помимо степени кристалличности другие факторы, такие как мономерный состав, молекулярная масса, модулируют скорость ферментативной деградации. Графически описание этого процесса приведено на Рисунке 21 (Sudesh et al., 2000).

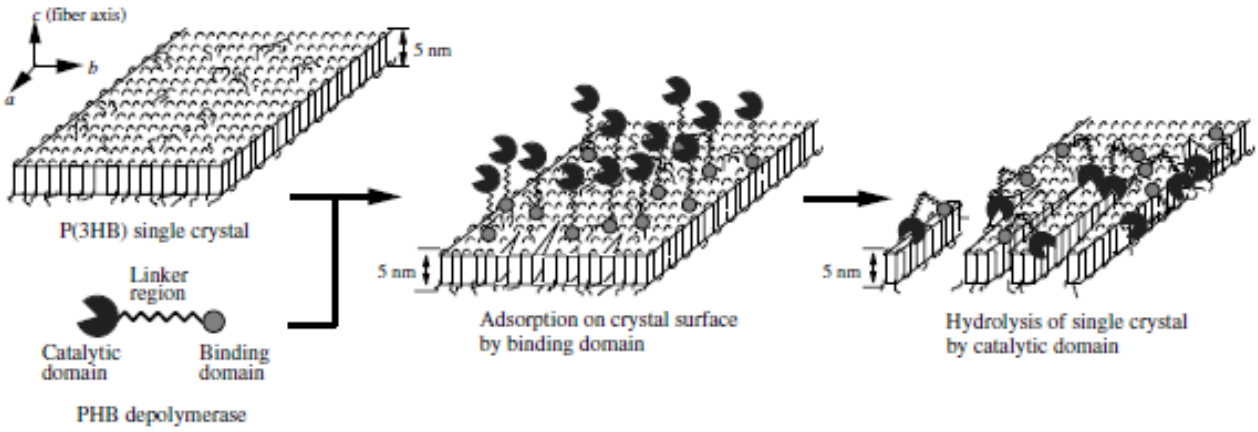


Рисунок 21. *Схема расщепления монокристалла ПОБ ПОА-деполимеразой (Sudesh et al., 2000).*

Показано, что расщепление полимерной цепи с конца происходит с большей скоростью, чем вероятностный процесс расщепления полимера по всей длине, но на поверхности полимерного изделия на основе ПОБ, например, пленки, концентрация концевых карбокцильных групп слишком мала, чтобы обеспечить эффективное расщепление полимера по первому типу, поэтому деградация происходит в основном по механизму случайного расщепления полимерной цепи по всей ее длине. Однако по мере снижения молекулярной массы полимера в процессе его деструкции вклад механизма расщепления полимера по «экзо-типу» значительно возрастает, что особенно актуально для низкомолекулярных полимеров (Hocking et al., 1996).

Ферментативная деградация ПОБ происходит со скоростью на 2 и даже 3 порядка более высокой, чем гидролитическая деградация (Kumagai et al., 1992). При добавлении ПОА-

деполимеразы, выделенная из *A. faecalis* и присутствующая в фосфатном буфере при 37оС и pH = 7,4, в течение 20 часов снижала массу пленок толщиной 50-65 мкм и с различными средневесовыми ММ (650-768 кДа и 22 кДа) на 68-85% и 58% соответственно. Скорость ферментативного гидролиза составляла 0, 17 и 0,15 мг/час, соответственно, а толщина образцов снижалась до 65 и 22 мкм, соответственно, т.е. на 32% от их исходной толщины. Исследования пленок ПОБ, проведенных методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), показали, что их поверхности под действием фермента приобретали ярко выраженные дефекты в виде шероховатости, тогда как объем биополимера остался в неизмененном состоянии (Doi et al., 1990; Koyama et al., 1995). Полученные результаты согласуются с постоянством среднечисловой ММ, что вполне объяснимо, если деструкция протекает во внешне диффузионной области, т. е. затрагивает поверхностную зону полимера.

Было показано, что при инкубации пленок ПОБ с молекулярной массой 650 и 768 кДа в растворе ПОБ-деполимеразы, выделенной из *A. faecalis*, масса пленок снижалась на 68 и 75% соответственно. Измеренная скорость деградации составляла 0,17 и 0,15 мг/ч. Также уменьшалась и толщина пленок. Методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) было продемонстрировано увеличение шероховатости поверхности (Doi et al., 1990; Koyama et al., 1995). Значительное влияние на процесс ферментативной деструкции оказывает кристаллическая структура ПОБ, не только общая степень кристалличности, но и характеристики самой кристаллической фазы полимерной матрицы: форма и размеры ламелей и сферолитов, поэтому экспериментальное исследование процесса деградации на ультратонких пленках и отдельных кристаллах ПОБ и других ПОА имеет большую ценность (Iwata et al., 1997; Iwata et al., 1999; Numata et al., 2005; Numata et al., 2007).

Хокинг (Hocking), Ноубс (Nobes) и Маршессо (Marchessault) с соавторами стали одними из первых, кто исследовал механизм ферментативной деградации ПОБ в виде его полимерных монокристаллов с помощью ПОА-деполимераз (Hocking et al., 1996; Nobes et al., 1996; Nobes et al., 1998). Они показали, что разрушение кристаллов ферментом происходит с его края и на концах, что приводит к образованию на краю кристалла «щетки» в виде множества игольчатых структур (Nobes et al., 1996), тогда как на поверхности расщепления кристаллов не происходит (Рисунок 22) (Iwata et al., 1997; Iwata et al., 1999; Murase et al., 2001).

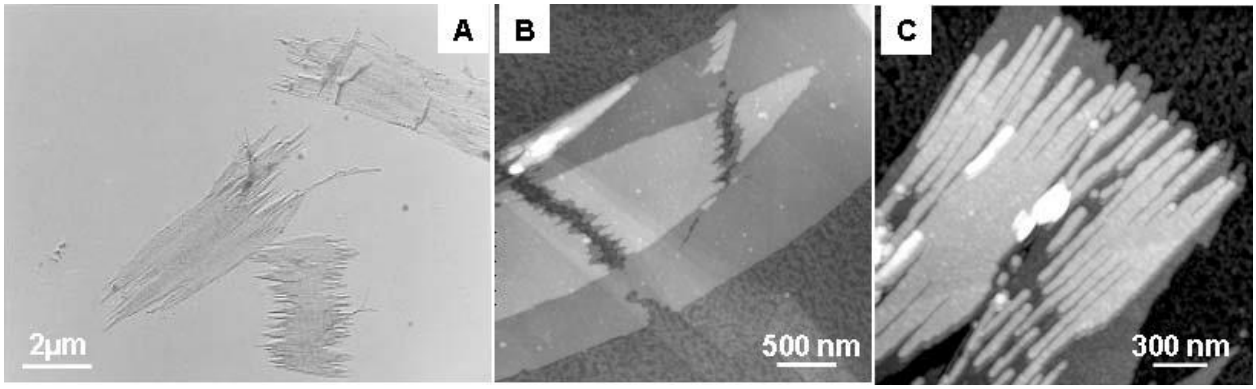


Рисунок 22. *А - ПОБ в виде одиночных кристаллов после ферментативной деградации с помощью ПОА-деполимеразы R. pickettii T1 (Iwata et al., 1997; Iwata et al., 1999; Murase et al., 2001). Одиночные кристаллы ПОБ после деградации с помощью ПОА-деполимеразы в течение 80 минут, СЭМ (Б), АСМ (В) (Numata et al., 2009).*

Таким образом, ферментативной деструкции подвергаются преимущественно аморфные области между кристаллами ПОБ и его сополимеров, их длинной оси, приводя к образованию трещин между ними (Numata et al., 2005). На схеме Рисунка 23 показана графическая модель этого процесса.



Рисунок 23. *Схематическая модель строения кристалла ПОБ (Numata et al., 2005). Белые участки – упорядоченные области упаковки, а голубые – неупорядоченные области упаковки кристаллов.*

Следующим логическим шагом представляется рассмотрение ферментативного разложения ПОБ в присутствии неспецифических эстераз, т.е. в среде моделирующей ткани и жидкости живых организмов (Löbler, 2002; Doi et al., 1995). Это, конечно, связано с биомедицинским использованием ПОБ и его сополимеров. В условиях *in vitro* деградация пленок ПОБ под действием липаз, как неспецифичных эстераз, была проведена в различных модельных средах: буферном растворе с добавлением липаз (Han et al., 2017; Hoshino and Isono, 2002; Tokiwa and Calabia, 1986), в соке поджелудочной железы (панкреатине) (Freier et al., 2002), в сыворотке и крови (Shishatskaya et al., 2005), в экстракте тканей, содержащей смесь

ферментов (Saito, 1991). Во всех этих случаях исследовался механизм неспецифической ферментативной деструкции.

Как уже было отмечено, триада аминокислот Ser..His..Asp входит в активный центр, как деполимеразы, так и липазы, что указывает на сходный механизм ферментативной реакции расщепления полимера (Jaeger et al., 1995; Tokiwa and Calabia, 2004). Что касается скорости ферментативной деградации, то здесь снова встречается много противоречивых данных, как и в случае гидролитического разложения ПОБ. Высокая устойчивость ПОБ была показана по отношению к воздействию липаз, выделенных из бактерий и грибов, когда его образцы оставались устойчивыми в течение 100 дней (Hoshino et al., 2002; Tokiwa et al., 1986). В другой работе также показано, что липазы также не способны к гидролизу ПОБ, но при этом гидролизуют другие полимеры со сложноэфирными связями (Tokiwa and Calabia, 2004). Другие авторы указывают хоть и на медленное, но заметное постепенное разложение этого полимера под действием липазы, выделенной из *B. subtilis*: происходило уменьшение ММ на 21,3% и массы полимера - на 28,3% (Kanmani, 2016). В некотором противоречии также находятся результаты работы (Shishatskaya et al., 2005), где сообщается о потере массы шовных нитей, помещенных на 180 дней в плазму и кровь, соответственно на 16 и 25%. Вытяжки из печени, почек, сердца, мозга, используемые как биоактивная среда, также приводили к потери массы образцов ПОБ, причем эта потеря зависела от pH среды. Так их инкубация в течение 17 часов при pH = 7,5 и 9,5 приводила к уменьшению массы на 2 и 18%, соответственно (Saito, 1991). Скорость деградации в присутствии панкреатина в концентрации 10 мг/мл (использовался не фосфатный буфер, а буфер Соренсена) возрастала примерно в три раза, так что потеря средневесовой молекулярной массы после 84 дней инкубации составляла 34% по сравнению с 11% потерей в чистом буфере (Freier et al., 2002). Эти результаты (особенно, падение ММ) находятся в определенном противоречии с результатами ферментативного гидролиза под действием ПОА-деполимеразы (см. выше), где было показано, что ферментативный процесс реализуется только на поверхности и, следовательно, почти не влияет на молекулярную массу полимера (Doi et al., 1990; Koyama et al., 1995). Однако это можно объяснить меньшими размерами молекул липаз по сравнению с молекулами ПОА-деполимераз, которые из-за этого не могут проникать в полимерную матрицу, тогда как липазы как ферменты малого размера вполне способны проникать через нано- и микропоры полимерного изделия на сколь угодно большую глубину, хотя им и требуется для этого некоторое время. Поэтому липазы могут осуществлять разложение ПОБ и его сополимеров как в объеме, так и с поверхности, т.е. путем ферментативной эрозии, что и подтверждается анализом поверхности полимерных пленок, структура которых после инкубации с липазами заметно меняется (Рисунок 24). На этих

изображениях видно, что исходная пористость на поверхности пленок из ПОБ после обработки липазой «размывается» и практически исчезает.

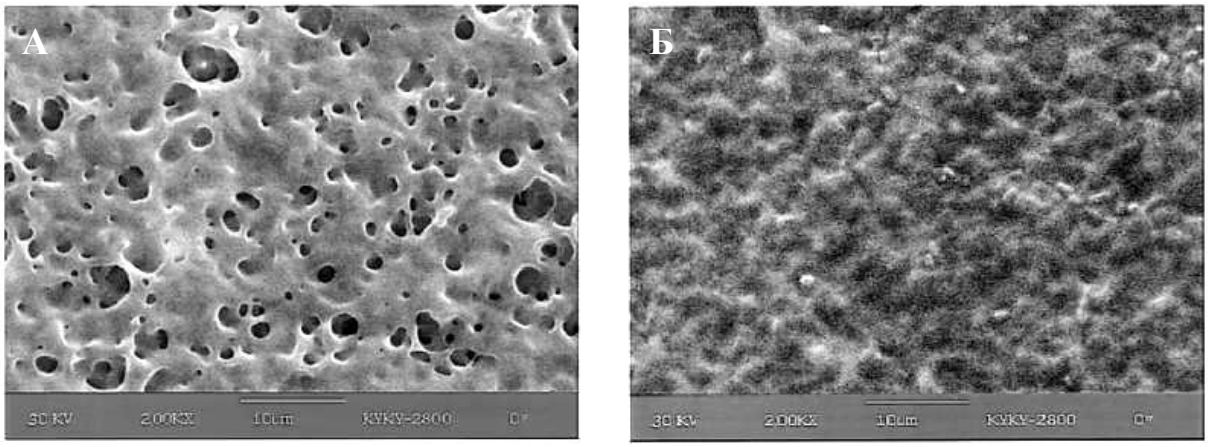


Рисунок 24. *Поверхность пленок ПОБ до (А) и после деградации (Б) с помощью липазы в течение 24 часов (Yang et al., 2002; Zhao et al., 2002).*

Интересно, что очень сильно на скорость как гидролитической, так и ферментативной деструкции ПОБ и его сополимеров влияет метод формования изделий из этих полимеров. Так, изделия, полученные методом отливки из расплава, вообще практически не подвергаются деструкции в водной среде (Бонарцев и др., 2011), что можно объяснить значительным повышением кристалличности полимера, т.н. вторичной кристаллизацией, в процессе его переплавления, а также просто высокотемпературной обработки (Tokiwa and Calabia, 2004; Kumagai and Doi, 1992).

Таким образом, многие факторы влияют на скорость ферментативной деградации ПОБ и его сополимеров: температура, pH, кристалличность, площадь поверхности, метод формования изделия и др.

1.4.3. Биодеградация поли-3-оксиалканоатов микроорганизмами почвы

Полимеры, отслужившие свой срок пользования и выброшенные в почву, разлагаются в результате комплексного воздействия гидролиза, термического и обычного окисления, фотохимических процессов и ферментативной биодеградации (Mergaert et al., 1992; Mergaert et al., 1993; Tokiwa and Calabia, 2004). Для биодеградируемого ПОБ преобладает последний процесс, причем цепочка химических превращений под действием микроорганизмов заканчивается углекислым газом и водой как конечными продуктами биоразложения. В связи с экологической чистотой данный биополимер начинает использоваться как упаковочный материал или материал для тары продуктов, медикаментов, химических соединений, а также как компонент текстиля, бытовых изделий и косметики (http://www.bio-on.it/index.php) (Рисунок

25А). К сожалению, процесс внедрения пПОА в промышленность был долгое время крайне затруднен из-за повсеместного использования очень дешевых химических пластиков, таких как полиэтилен и полипропилен. И лишь выявленный в ходе целого ряда исследований громадный масштаб вреда, который оказывают неразлагаемые отходы синтетических пластиков на окружающую среду, и высокий риск влияния так называемого микропластика на здоровье человека и животных, наконец, привел в последние несколько лет к введению в юридическую практику в различных странах законов, ограничивающих использование этих пластиков для изготовления упаковки (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014; Wright and Kelly, 2017; Sharma and Chatterjee, 2017; Alimba and Faggio, 2019). Эти меры возродили интерес к использованию пПОА для изготовления упаковки и бытовых предметов, хотя разработка этих изделий была проведена еще 15-20 лет назад (Lenz and Marchessault, 2005) (Рисунок 22Б).

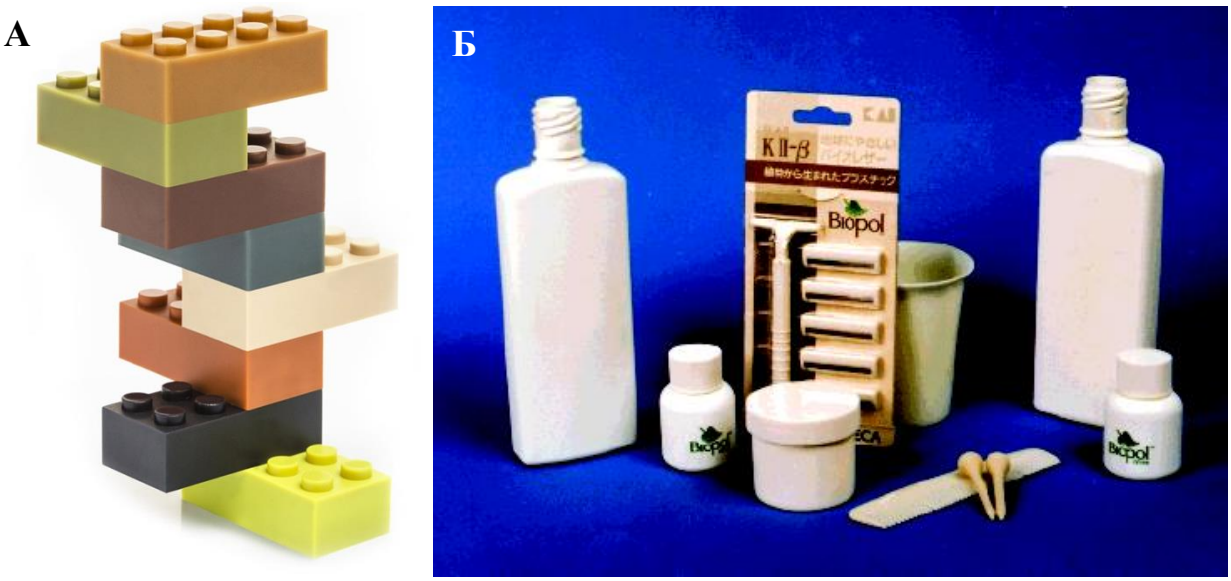


Рисунок 25. *Биоразлагаемые в почве кубики Лего MINERV PHA SUPERTOYS, изготовленные из ПОБ (http://www.bio-on.it/index.php) (А) и образцы различных бытовых изделий и упаковки на основе ПОБ и его сополимеров, способные к биодеградации в почве в течение 3 месяцев (Б).*

Проблема биоразложения ПОБ и его композитов в природной экосистеме, включающей почву, компост, донные отложения и т.п. активно рассматривалась в ряде публикаций (Mergaert et al., 1992; Mergaert et al., 1993; Tokiwa and Calabia, 2004). Так, Маргарт с коллегами выделили из почвы более 300 штаммов микробов способных разлагать ПОБ (Mergaert et al., 1992). В частности, среди бактерий, обнаруженных на деградируемых пленках БПОБ были следующие виды *Pseudomonas, Bacillus, Azospirillum, Mycobacterium,* and *Streptomyces etc.* Помимо этого, образцы полимера исследовались на устойчивость к разложению грибами, путем измерения скорости роста грибов, как в отсутствии, так и в отсутствии полимера. В качестве тестовых видов грибов использовались *Aspergillus, Aureobasidium, Chaetomium, Paecilomyces, Penicillum,*

Trichoderma, для роста которых ПОБ представлял собой вполне хороший субстрат (Mokeeva et al., 2002).

Помимо этих исследований, биоразложение пленок БПОБ исследовалось в аэробных, микроаэробных и анаэробных условиях, как в присутствии, так и в отсутствии нитратов. В качестве среды использовались почва и осадочные отложения, которые образовались в результате работы анаэробного нитрифицирующего/денитрифицирующего реактора. В случае денитрификации была сформирована культурная среда для деградации ПОБ. Различия в степенях разложения для различных бактериальных сред представлены на Рисунке 26 (Bonartseva et al., 2003). Для образцов, экспонированных в таких средах, регистрировались изменения молекулярной массы, кристалличности и механических характеристик. Для них наблюдалась прямая корреляция между потерей массы и падением молекулярного веса. В то же время при высоких степенях деградации наблюдалось возрастание степени кристалличности, что подтверждает представления о деградации ПОБ, протекающей преимущественно в аморфных областях (Spyros et al., 1997). В результате исчезновения аморфной фазы и возрастания степени кристалличности образцы становятся более хрупкими и одновременно рыхлыми (Bonartseva et al., 2003).

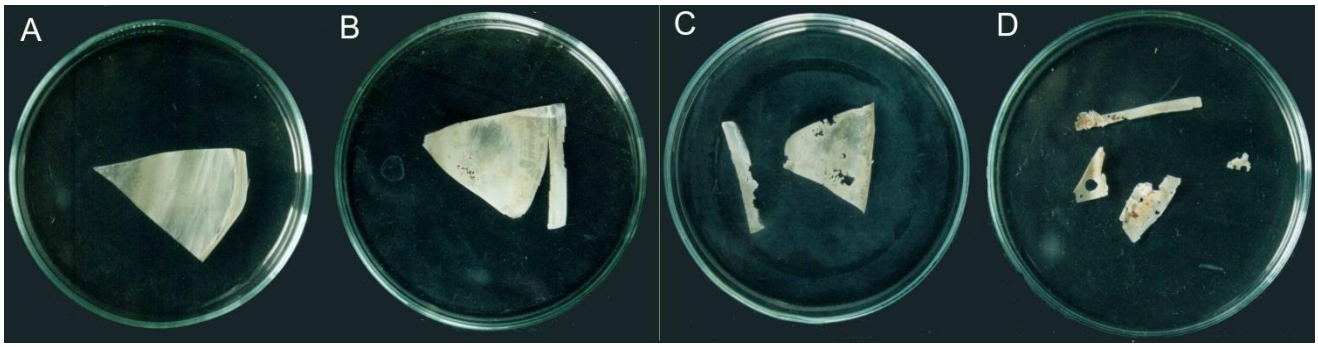


Рисунок 26. *Биоразложение пленок БПОБ при различных условиях. A – исходный образец, (B-D) – образцы после 2х-месячной инкубации в водной почвенной суспензии: B – анаэробные условия при отсутствии нитратов, C - микроаэробные условия в присутствии нитратов, D - микроаэробные условия в отсутствии нитратов (Bonartseva et al., 2003).*

Продолжая серию исследований разложения ПОБ в почве, в качестве среды, не содержащей нитраты, была использована микробиологическая реперная среда Гильтаи. В ней доминируют бактерии вида *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas stutzeri*, что привело к поразительно быстрому полному разложению биополимера, которое происходит всего за семь дней. В отличие от предшествующей работы Дои (Doi) с коллегами (Doi, 1990), где демонстрируется отсутствие деградации ПОБ в водном растворе ПОБ-деполимеразы, выделенной из *Alcaligenes faecalis*, в наших экспериментах (см. выше) средневязкостный молекулярный вес как у высокомолекулярных, так и образцов со средними значениями ММ

постепенно уменьшался от 1540 кДа до 580 кДа и от 890 кДа до 612 кДа, соответственно (Бонарцева и др., 2002; Bonartseva et al., 2003).

1.4.4. Биодеградация ПОА в тканях животных *in vivo*

Гораздо более высокая скорость биодеградации пПОА наблюдается не только в почве, но и в животных тканях *in vivo* при имплантации изделий из пПОА лабораторным животным, чем в водной среде в модельных условиях, даже в присутствии липолитических ферментов (например, липазы) в высоких концентрациях (Босхомджиев и др., 2009). Так, пленка из ПОБ, имплантированная подкожно или в брюшную полость крыс и кроликов, теряет от 6 до 100% своей первоначальной массы за 6 месяцев (Qu et al., 2006; Abe and Doi, 2002; Renstad et al., 1999; Kramp et al., 2002; Босхомджиев и др., 2009; Freier et al., 2002), а потери массы пленки из ПОБ при гидролитической деструкции в течение 6 месяцев вообще не происходит (Abe and Doi, 2002; Renstad et al., 1999; Koyama et al., 1995; Freier et al., 2002), т.е. скорость биодеградации ПОБ и его сополимеров может быть в десятки раз больше, чем скорость их гидролитической деструкции (Lim et al., 2017; Piskin, 1995).

Однако в целом данные по скорости биодеградации ПОБ в тканях животных in vivo характеризуются большим разбросом. Это можно объяснить тем, что подавляющая часть исследований биодеградации использует в качестве объектов прототипы медицинских изделий БПОБ, а именно, пленки и пластины, пористые заплаты для органов, не плетеные волокнистые заплаты для органов, фиксирующие крепления и винты, полые трубки как каркасные футляры для регенерации нервных волокон, монофиламентные хирургические нити, микросферы и др. Более того, эксперименты in vivo проводятся, а результаты сопоставляются при имплантации в организм различных животных: крыс, мышей, кроликов, свиней, кошек, телят, овец, и, наконец, людей в клинической практике. Очевидно, что все вышеупомянутые живые организмы отличаются друг от друга уровнем и особенностями метаболизма, не говоря уже о различии размеров животных. Достаточно сравнить вес мыши (10 - 20 г) и теленка (примерно 50 кг). Пестрота картины исследований дополняется расхождением в путях (способах) введения имплантата: подкожно, внутрибрюшинно, для фиксации костей черепа, внутримышечно, внутривенно, для закрытия дефектов в области перикарда, предсердия и как каркасного футляра для регенерации нервных волокон. Наконец, при описании поведения имплантата в живом организме времена имплантации варьируются в широком диапазоне от нескольких суток до 24 месяцев (Таблица 3) (Bonartsev et al., 2008).

Таблица 3. *Сравнительные результаты биодеградации ПОБ in vivo (Bonartsev et al., 2008).*

Вид образца	Толщина/ диаметр, Мкм	Живот-ное	Место имплантации/хирур-гическая процедура	Потеря массы %	Потеря ММ, %	Время, месяц
Пленка, экструзия	1200	мыши	Подкожно	1.6	43	6
Пленка (полив)	150-200	кролики	Подкожно дорзально	6	60	6
Пленка (полив)	50	крысы	Подкожно вентрально	100	100	3
Смесь БПОБ-АБОП заплата	100	крысы	Внутрибрюшинно	>90*	62	6.5
Пористый БПОБ-АБПОБ заплата	250	свинки	Контакт с черепной костью и мозговой оболочкой	>50*	65	6.5
Пленки и пластины	100-1000	Кролики, кошки	Фиксация на кости черепа или челюстной дуге.	100	-	25
Пленки и пластины	100 and 500	кролики	Фиксация на кости черепа или челюстной дуге.	<10*	-	20
Пленки и пластины	500 and 1500	кролики	Фиксация на кости черепа или челюстной дуге.	0	-	12
Цилиндр, нервный кондуит	150	крысы	Вокруг нервного волокна	0	-	1
Цилиндр, нервный кондуит	150	кошки	Вокруг нервного волокна	>25*	-	12
Монофи-ламентная нить	-	крысы	Подкожно	0	-	6

Монофи-ламентная нить	30	крысы	Подкожно (шейная складка)	30	-	6
пленка, частицы	-	кролики	Подкожно и внутримышечно	>30*	-	2
Волокнистая, неплетен-ная заплата	200-600 (патч) 2-20 (волокно)	овцы	На стенке перикарда, закрытие дефекта	>90*	-	24
Волокнистая, неплетен-ная заплата	200-600 (патч) 2-20 (волокно)	овцы	Легочная артерия, заплата стенки кишечника.	>99*	-	12
Волокнистая, неплетен-ная заплата	200-600 (патч) 2-20 (волокно)	теленок	на перегородке правого предсердия	>99*	-	12
Волокнистая, неплетен-ная заплата	200-600 (патч) 2-20 (волокно)	пациент	на стенке перикарда, с целью предотвращения адгезии.	27	-	24
Микросферы	0.5-0.8	крыса	внутривенно	8*	-	2
Микросферы	100-300	мышь	внутримышечно	0*	-	2
пластина	2300	кролик	Внутрикостно, латеральное сочленение бедренной кости	<10*	-	6

* - косвенные измерения

Все больше появляется данных в пользу того, что биодеградация ПОБ и его сополимеров происходит преимущественно за счет фагоцитирующей активности специализированных клеток – макрофагов (и гигантских клеток инородного тела (ГКИТ)) и остеокластов, т.е. имеет место специализированная клеточная биодеградация этих полимеров. Следует отметить, что функционирование макрофагов и ГКИТ являются одним из главных составляющих нормального процесса тканевой реакции на введение в организм инородного тела и играет важную роль при регенерации поврежденной ткани. В работах, посвященных изучению механизма биодеградации ПОБ *in vivo*, показано, что активность тканевых макрофагов и ГКИТ значительно ускоряет темп биодеградации ПОБ *in vivo* по сравнению со скоростью гидролиза ПОБ *in vitro*. Введение в организм животного изделий из ПОБ и его сополимеров вызывает привлечение макрофагов в область повреждения, которые плотно покрывают полимерный материал при формировании вокруг него соединительнотканной капсулы и активно участвуют в процессах его биодеградации. Полимерный биоматериал подвергается воздействию межклеточной жидкости и клеток, что может приводить к отщеплению от него микро- и наночастиц, олигомеров и мономеров (Бонарцев и др., 2011; Qu et al., 2006; Abe and Doi, 2002; Renstad et al., 1999; Kramp et al., 2002; Босхомджиев и др., 2009). Причем, клетки подвергают полимер поверхностной эрозии, не вызывая существенного изменения его физико-химических свойств, которое происходит при гидролитической деструкции полимера в объеме. Показано, что после удаления макрофагов и ГКИТ на поверхности полимера оставались следы его эрозии (Baptist and Ziegler, 1965; Malm et al., 1992a; Malm et al., 1994; Shishatskaya et al., 2005). Мы наблюдали похожие следы поверхностной эрозии пленок из ПОБ с помощью атомно-силовой микроскопии после их имплантации *in vivo* (Багров и др., 2010) (Рисунок 27). При этом происходила активация макрофагов полимерным материалом, которая способствовала их фагоцитирующей активности (Cool et al., 2007; Wu et al., 2006; Saad et al., 1996).

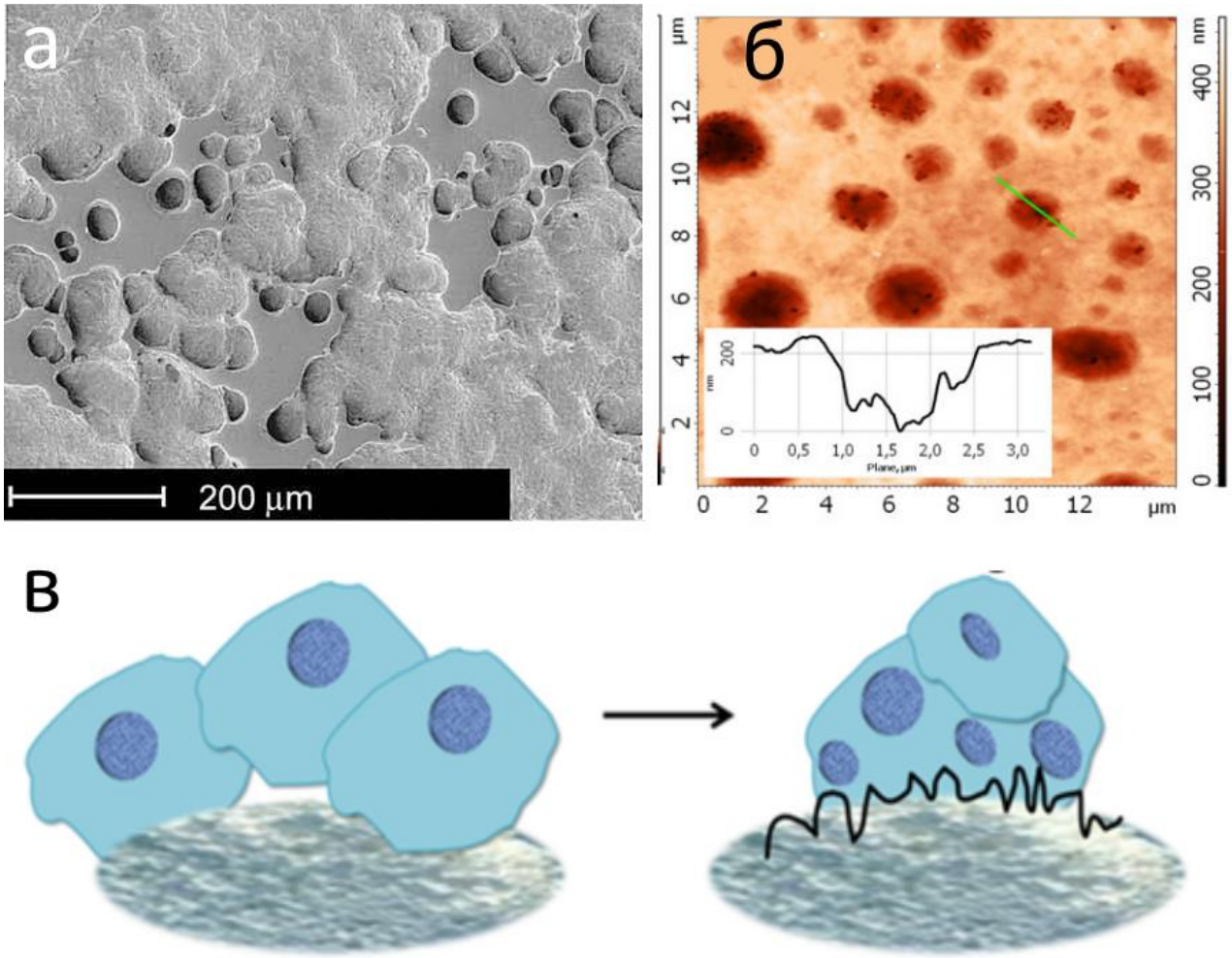


Рисунок 27. *Следы поверхностной эрозии пленок из поли(триметилен карбоната) при in vitro культивировании на них макрофагов, СЭМ, ×150 (Bat et al., 2009) (а); морфология поверхности гладкой стороны пленок из ПОБ, извлеченных из соединительнотканной капсулы после 1 месяца подкожной имплантации крысе, АСМ, ×500 (б) (Багров и др., 2010). Схема поверхностной эрозии ПОА макрофагами и ГКИТ (в).*

1.5. Биосинтетическая природа ПОА как резервного биоразлагаемого полимера у бактерий

Попытаемся теперь найти причины различия механизмов биодеградации синтетических ПОА и природных ПОА посредством рассмотрения роли ПОА в природе как биоразлагаемых полимеров. И здесь мы сразу встаем на благодатную почву, т.к. природные ПОА возникли в процессе эволюции, прежде всего, как резервные биополимеры, т.е. такие полимеры, которые как раз и предназначены для биодеградации ферментными системами живых организмов с целью извлечения из них энергии и углерода с целью обеспечения жизнедеятельности клеток и биосинтеза ими других биомолекул (Dawes and Senior, 1973; Wallen and Rohwedder, 1974). Способностью к синтезу ПОА в качестве запасного вещества обладают сотни видов бактерий:

грамотрицательные и грамположительные вместе пишется бактерии, некоторые археи и цианобактерии. За исключением немногих фототрофных микроорганизмов, *Clostridium* и *Syntrophomonas* - единственные строгие анаэробы, в клетках которых был обнаружен ПОБ. Интересно, что энтеробактерии, как например *Escherichia coli*, как правило, не синтезируют ПОБ в качестве резервного вещества. Но среди всех этих бактерий промышленное значение имеют штаммы-продуценты *Azotobacter* и *Ralstonia*, если не принимать во внимание рекомбинантные рекомбинантные *E. coli*. Эти бактерии могут использовать относительно недорогие и отличающиеся большим разнообразием субстраты: глюкозу, неочищенные сахара (*Azotobacter* sp.) газовые смеси, включающие в себя углекислый газ, этанол и водород (*Ralstonia eutropha*) (Forsyth et al., 1958; Brandl et al., 1990; Anderson and Dawes, 1990; Steinbuchel, 1991; Anjum et al., 2016). Для большинства микроорганизмов накопленные пПОА служат источником углерода и энергии при их недостатке. Роль ПОБ как резервного материала подробно освещена в обзоре Anderson и Dawes (Anderson and Dawes, 1990). Бактерии, способные к синтезу ПЗОА, запасают биополимер в цитоплазме в виде дискретных включений (гранул) обычно от 100 до 800 нм в диаметре. По одной из теорий гранулы окружены монослойной липидной мембраной, в которой локализованы ферменты биосинтеза и деградации/мобилизации (внутриклеточные ПОА-деполимеразы). Так, очищенный препарат гранул из *Bacillus megaterium* состоял из ПОБ - 97.7 %, белка - 1.8% и липидов - 0.5% (Griebel et al., 1968). Другие исследователи приводят доказательства в пользу того, что оболочка гранул содержит только функциональные белки – ферменты биосинтеза и биодеградации ПОА, а также белки-регуляторы этих процессов, такие как фасины (группа генов *Pha*), но вообще не содержат фосфолипидов (Jendrossek and Pfeiffer, 2014). Но в любом случае ПОА-гранулы представляют собой сложные органоидоподобные структуры и ферментативные системы для синтеза и использования ПЗОА - карбоносомы, что еще более подчеркивает значимость этого биосинтетического и биодеградируемого полимера для бактерий (Jendrossek and Pfeiffer, 2014).

Следует отметить, что ПОБ и другие ПЗОА представляют собой идеальный резервный материал, т.к. благодаря гидрофобности и высокому молекулярному весу не вызывают увеличения осмотического давления в клетке (Dawes and Senior, 1973).

Т.к. в ранние этапы процесса биосинтеза ПОБ было замечено, что бактерии накапливают его перед спорообразованием, и синтез ПОБ сначала связали с этим процессом (Slepecky and Law, 1961). Но потом было показано, что накопление ПОБ в клетках *B. megaterium* связано с увеличением в среде культивирования соотношения C/N (Macrae and Wilkinson, 1958) и при достаточном количестве источников углерода, хотя в ряде случаев происходит синтез в условиях ничем не ограниченного роста бактерий (Hrabak, 1992; Page and Knosp, 1989). Инициация биосинтеза ПОБ запускается в условиях дефицита таких компонентов

культуральной среды, как сульфат, азота, фосфат и магний (Dawes and Senior, 1973; Repaske and Repaske, 1976), но также и в условиях дефицита кислорода (Ward et al., 1977). Имеется теория, согласно которой ПОБ служит источником восстановленных эквивалентов (НАДН и НАДФН), которые обеспечивают защиту нитрогеназы от кислорода в повышенной концентрации (McDermott et al., 1989). Было показано, что при дефиците кислорода синтез ПОБ регулирует поддержание баланса восстановленных и окисленных адениндинуклеотидов у *Azotobacter beijerinckii* (Jackson and Dawes, 1976) и способствует альтернативному процессу окисления НАДН (Page and Knosp, 1989).

Подробное описание метаболических путей биосинтеза и утилизации ПОБ у бактерий дается многими авторами. Если рассматривать только основные этапы, то биосинтез ПОБ протекает следующим образом: фермент β-кетотиолаза катализирует образование углерод-углеродной связи двух ацетил-КоА остатков путем конденсации Кляйзена; молекулы ацетил-КоА поступают при этом из гликолиза через образование пирувата; далее НАДФН-зависимая ацетоацетил-КоА-редуктаза превращает ацетоацетил-КоА в 3-гидроксибутирил-КоА; а на следующем этапе молекулы 3-гидроксибутирил-КоА связываются с ПОБ-полимеразой (Рисунок 28) (Findlay and White, 1983; Anderson and Dawes, 1990; Steinbüchel et al., 1995; Madison and Huisman, 1999; Rehm, 2003).

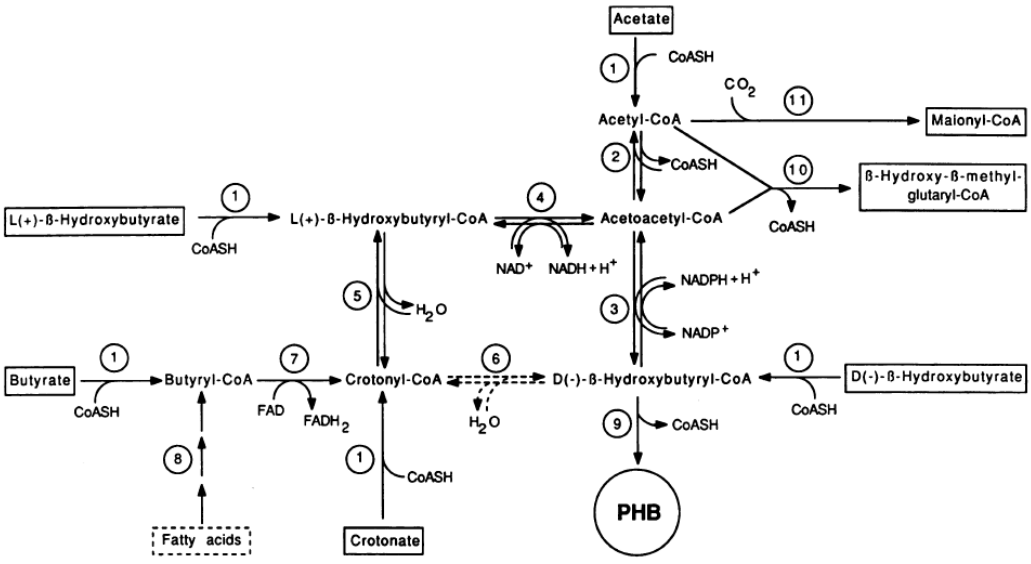


Рисунок 28. *Путь биосинтеза ПОБ у R. eutropha. 1 - ацил-КоА синтаза; 2 - β-кетотиолаза; 3 – НАДФН-зависимая ацетоацетил-КоА редуктаза; 4 – НАДН-зависимая ацетоацетил-КоА редуктаза; 5 - еноил-КоА гидратаза (образующая L-(+)-О-гидроксибутирил-КоА); 6 - еноил-КоА гидратаза (образующая D-(-)-Р-гидроксибутирил-КоА); 7 – бутирил-КоА дегидрогеназа; 8 – ферменты пути 1-окисления жирных кислот; 9 – ПОА-полимераза; 10 – гидроксиметилглутарил-КоА синтаза; 11 – ацетацетил-КоА карбоксилаза.*

ПОА-синтеза начинает процесс синтеза полимера при образовании димеров, а остатки 3-гидроксибутирата связываются с остатком серина в активном центре (Рисунок 29).

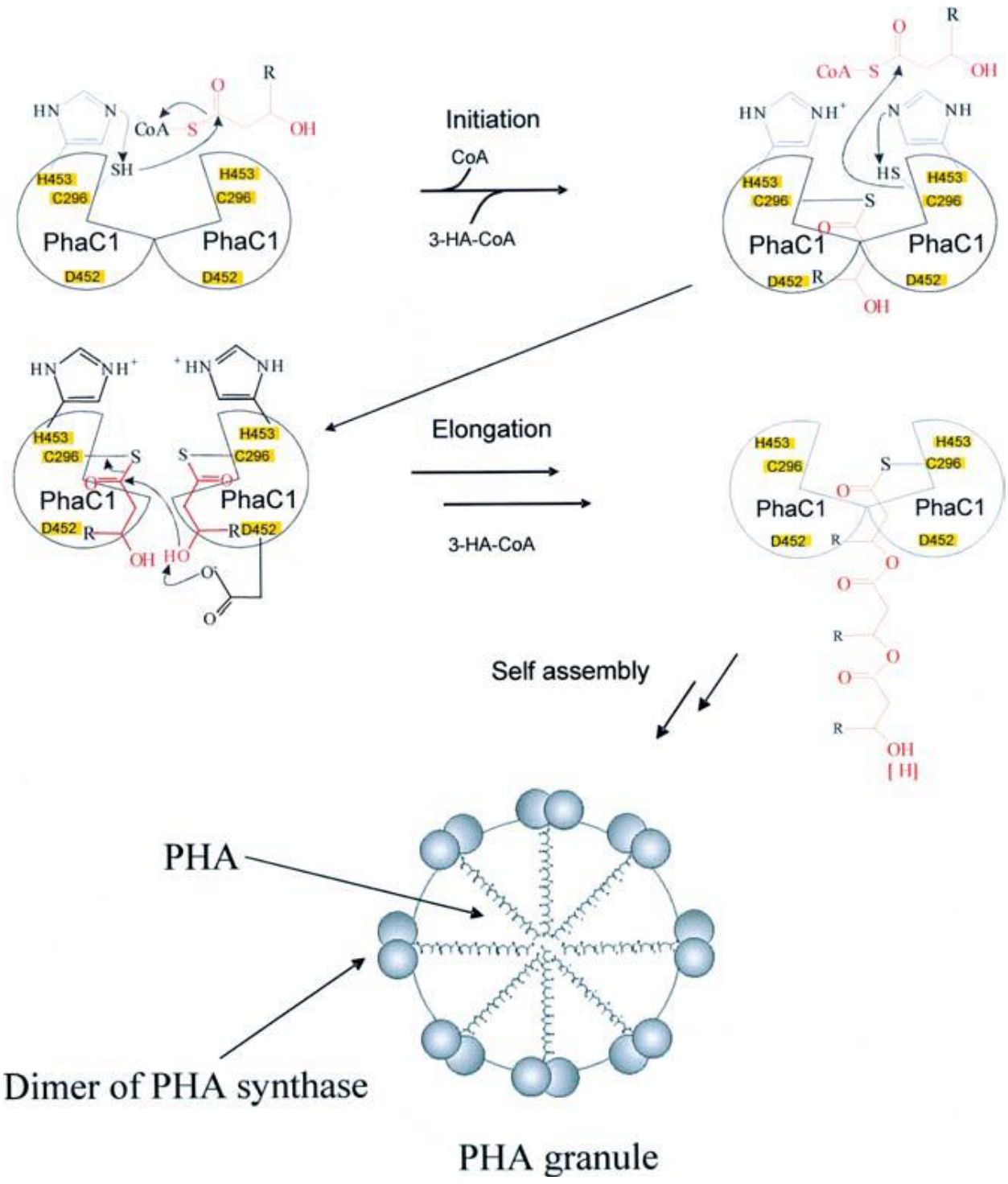


Рисунок 29. *Предположительный каталитический механизм активного центра на основе α/β-гидралазы ПОА-полимеразы II типа P. aeruginosa.*

В ходе удлинения синтезирующейся ферментом полимерной цепи димеры ПОА-полимеразы кооперируются и образуют специальные гранулы, в которых синтезируемые

гидрофобные цепи упаковываются внутри, а синтез молекулы ПОБ, связанных со вспомогательными белками, продолжается на поверхности этих гранул (Рисунок 30).

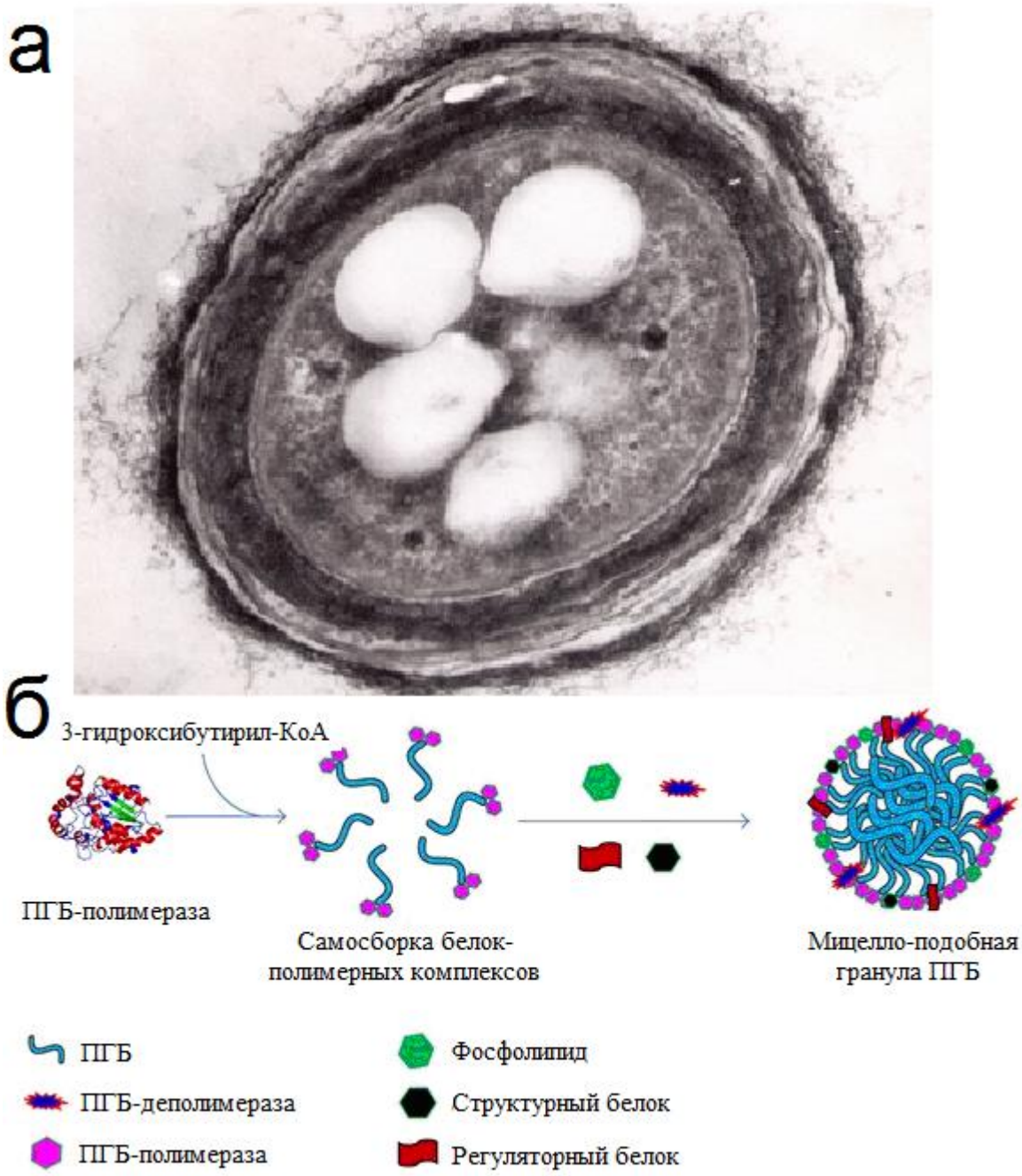


Рисунок 30. *Штамм-продуцент ПОА Azotobacter chroococcum 7Б с гранулами ПОБ в бактериальной клетке в процессе биосинтеза биополимера (сканирующая электронная микроскопия, ×50000) (а). Формирование полимерных гранул в цитоплазме бактериальных клеток при синтезе ПОБ, содержащих ПОБ в аморфном состоянии (б).*

При этом на каждую молекулу 3-гидроксимасляной кислоты или 3-гидроксибутирата (3ГБ) приходятся 2 молекулы ацетил-КоА (Shrivastav et al., 2013), а контроль синтеза ПОБ осуществляется путем регуляции соотношения НАДФН к НАДФ+ в цитоплазме. Синтез ПОБ начинается, когда уменьшение потока ацетил-КоА в условиях азотного голодания приводит к

снятию ингибирования β-кетотиолазы. Однако параллельно с синтезом идет также непрерывное разложение ПОБ ПОА-деполимеразой до мономеров (Lageveen et al., 1988). Таким образом, П3ОА являются энергетически насыщенными биополимерами, а их синтез и разложение играет огромную роль в биоэнергетике синтезирующих их бактерий. Неудивительно, что и в организме высших эукариот – млекопитающих, эти биополимеры и их химически синтезируемые аналоги, П2ОА, могут подвергаться биодеструкции фагоцитирующими клетками, т.к. и для клеток млекопитающих эти полимеры являются подходящим энергетически ценным питательным веществом, даже несмотря на отсутствие у них специализированных ПОА-деполимераз.

Фермент ПОА-полимераза высоко стереоспецифичен – только R-изомеры 3-гидроксимасляной кислоты могут участвовать в реакции, но, как ни странно, далеко не столь специфичен по отношению к использованию мономеров с различным строением углеродного скелета. Так, ПОА-полимеразы различных организмов могут включать в полимерную цепь не только остатки 3-гидроксибутирата, но и, например, 3-гидроксивалерата и более длинноцепочечных 3-гидроксикарбоновых кислот. Именно за счет этого возможно получение сополимеров ПОБ, обладающих различными свойствами, но высокая стереоспецифичность фермента приводит к синтезу полимеров, состоящих только из одного вида оптических изомеров, благодаря чему они обладают относительно высокой кристалличностью (Anderson and Dawes, 1990; Steinbüchel et al., 1995; Madison and Huisman, 1999; Rehm, 2003).

Не менее важным вопросом является утилизация накопленного в бактериальной клетке ПОБ. К настоящему времени известно более 300 микроорганизмов, способных к деградации ПОБ *in vitro* и относящихся к разным таксономическим группам (Jendrossek and Handrick, 2002). Эти микроорганизмы экскретируют внеклеточные деполимеразы, посредством которых они могут гидролизовать ПОБ до водорастворимых мономеров и олигомеров (Nojiri and Saito, 1997; Sudesh et al., 2000). Именно эти ПОА-деполимеразы используют в исследованиях механизма ферментативной деградации ПОБ и других ПОА (см. выше). Разделяют два типа ПОА-деполимераз: деполимеразы типа А с расположением пентапептида (Gly-X_1-Ser-X_2-Gly) в центре каталитического домена и деполимеразы типа Б, у которых пентапептид активного центра находится у N-концевого остатка фермента (Sudesh et al., 2000). ПОА-деполимеразы в основном специфичны по отношению к ПОБ, известны ферменты только двух видов бактерий *Pseudomonas lemoignei* и *P. fluorescens*, которые специфически расщепляют, поли-3-окивалерат и поли-3-оксиоктаноат, соответственно (Muller and Jendrossek, 1993; Schirmer et al., 1993).

Интересно, что частично-кристаллический ПОБ внутри полимерных гранул в условиях *in vivo* находится в аморфном состоянии (Barnard and Sanders, 1989). Это объясняет, почему полимер, выделенный из биомассы с помощью различных процедур, необратимо теряет

способность к деградации внутриклеточными деполимеразами. Этим же объясняются значительные различия в скорости биодеградации между образцами полимера, полученного способом осаждения или формования из раствора, и полученного методом литья или экструзии из расплава (Бонарцев и др., 2011). Существует гипотеза, что роль пластификатора выполняет вода, которая в небольших количествах (5-10%) присутствует в нативных гранулах ПОБ (Barnard and Sanders, 1989; Harrison et al., 1992). Удаление воды из нативных гранул приводит к тому, что полимерные цепи образуют ламеллярно-кристаллическую структуру. Было сделано предположение, что благодаря молекулам воды формируются водородные связи между карбонильными группами полиэфирных цепей и, таким образом, образуется что-то вроде сшивок между соседними полимерными цепями. Такая молекулярная организация может объяснить мобильное аморфное состояние ПОБ *in vivo* (Lauzier et al., 1992). Образцы полимера, высаженные из раствора, обладают наноструктурой, способствующей при помещении их в водную среду диффузии воды в толщу полимерной матрицы, пластифицируя тем самым полимер подобно тому (правда, в очень малой степени), как это происходит в ПОА-гранулах бактерий. С другой стороны, столь специфическая структура ПОБ, даже при поддержании аморфного состояния полимера в гранулах бактерий, препятствует гидролитической деструкции полимера той самой водой, которая его в этих гранулах пластифицирует (Iordanskii et al., 2006; Zhuikov et al., 2017a; Zhuikov et al., 2017b; Zhuikov et al., 2017c). Синтетические П2ОА, синтезированные из разных оптических изомеров 2-гидроксикарбоновых кислот, имеют аморфную структуру, т.е. вроде бы обладают биомиметическим сходством с ПОБ, находящимся в бактериальных гранулах. И, действительно, аморфные рацемические как П2ОА, так и П3ОА (например, т.н. атактический ПОБ) обладают гораздо более высокой скоростью как гидролитической, так и ферментативной деструкции, чем частично кристаллические П2ОА и П3ОА, состоящие преимущественно из одного вида оптических изомеров (Farah et al., 2016; Schliecker et al., 2003; Kunze et al., 2006; Abe and Doi, 1999; Sudesh et al., 2000). Такая аналогия была бы справедлива, если бы не то важное обстоятельство, что аморфные синтетические ПОА неустойчивы именно к гидролитической деструкции, а ферментативная деструкция уже не вносит существенный вклад в падение молекулярной массы полимеров и изменение других их свойств (Farah et al., 2016; Cai et al., 2003; Schliecker et al., 2003). Поэтому, несмотря на то, что с помощью генетической инженерии был осуществлен бактериальный биосинтез П2ОА, он требует поддержания особых условий ферментации, т.к. накопление этих полимеров в бактериальных клетках и их последующая утилизация ферментными системами проблематичны из-за гидролиза полимеров и закисления цитоплазмы молочной и гликолевой кислотами (Park et al., 2013; Jung and Lee, 2011). Скорее всего, этим и можно объяснить тот факт, что в процессе эволюции именно П3ОА, а не П2ОА стали резервными биополимерами у

бактерий, хотя человек для биомедицинских целей использует, напротив, преимущественно П2ОА, причем, зачастую аморфные полимеры или полимеры с низкой степенью кристалличности.

1.6. Биосовместимость ПОА

Как и в случае с биодеградацией, биосовместимость ПОА и изделий на их основе *in vivo* также обусловлена преимущественно взаимодействием с клетками, участвующими в формировании тканевого ответа на имплантацию чужеродного материала, т.к. физическое или химическое влияние на органические компоненты ткани минимально. В большинстве случаев для ПОБ и его сополимеров наблюдается хорошая биосовместимость. Не отмечена острая воспалительная реакция, не регистрировались абсцессы или некрозы тканей вблизи полимера. Более того, на достаточно удаленном от имплантата расстоянии, отсутствовали клеточная реакция и клеточная мобилизация (Qu et al., 2006; Freier et al., 2002; Kawaguchi et al., 1992). В целом ряде работ при сопоставлении тканевой реакции ПОБ и синтетических полиэфиров ПЛА, ПГА или их сополимеров продемонстрировано, что, для ПОБ тканевая реакция мягкая или умеренная, тогда как для ПЛА, ПГА и ПЛГА нередко наблюдается выраженная хроническая воспалительная реакция (Agrawal et al., 1997; Vacanti et al., 2012; Solheim et al., 2000; Bostman and Pihlajamäki, 2000; Lickorish et al., 2004; Khouw et al., 1998; Su et al., 2005; Ceonzo et al., 2006; Kim et al., 2007; Taylor et al., 1994). При стандартной подкожной имплантации ПОБ и его сополимеров в виде пленок, применяемой в протоколах доклинических исследований, наблюдается слабая или умеренная тканевая реакция на чужеродный материал, в течение 1 месяца формируется тонкая фиброзная капсула (около 100 мкм), в ряде работ показано рассасывание этой капсулы после биодеградации образцов (Qu et al., 2006; Freier et al., 2002; Босхомджиев и др., 2009). Мы наблюдали, что при подкожной имплантации пористого матрикса из ПОБ, помещенного в трубку из ПОБВ, происходит постепенное прорастание соединительной ткани в матриксе с края трубки к ее центру. При этом тканевая реакция на биоматериал слабо выраженная. Это также свидетельствует о хорошей биосовместимости ПОБ по отношению к мягкой соединительной ткани. Во многих работах показано очень малое количество или практически полное отсутствие лимфоцитов (в частности, Т-лимфоцитов) в области имплантации ПОБ, что свидетельствует о значительно сниженной или отсутствующей иммунной реакции на этот полимерный биоматериал (Malm et al., 1992a; Malm et al., 1994; Shumilova et al., 2017; Бонарцев и др., 2018б). Но особенно ярко проявляется биосовместимость ПОБ при использовании изделий на его основе, например, пористых матриксов, для регенерации костной ткани. При имплантации изделий из ПОБ в область дефекта костной ткани не происходит присущее многим другим биомедицинским материалам (например, ПМК) образование соединительнотканной капсулы, изолирующей полимерный материал от костной

ткани, т.е. происходит полная интеграция ПОБ с костной тканью. В случае имплантации пористого матрикса из ПОБ происходит активная васкуляризация матрикса и образование в виде островков (балок) новой костной ткани из грануляционной ткани в порах матрикса (Бонарцев и др., 2018б; Shumilova et al., 2017; Kostopoulos and Karring, 1994). Исследование уровня экспрессии генов различных цитокинов и других биомолекул в области имплантации изделий из ПОБ (и его сополимера ПОБВ) показало, что наблюдается сниженный (по сравнению с другими материалами) уровень экспрессии провоспалительных цитокинов (интерлейкинов, фактора некроза опухоли, белок-хемоатрактанта моноцитов, индуцибельной NO-синтазы, С-реактивного белка) и повышенная экспрессия генов различных белков (коллагена I, кавеолина-1, цитокератина, гепарин-сульфат-протеогликана, тромбомодулина, простациклина), являющихся маркерами регенеративных процессов в различных тканях (сердца и сосудов, кишечника, нервной, костной) (Malm et al., 1992a; Malm et al., 1992b; Malm et al., 1992c; Shumilova et al., 2017; Löbler et al., 2002; Löbler et al., 2003; Castellano et al., 2014; Pontailler et al., 2015). Однако, в некоторых случаях наблюдалась хроническая воспалительная реакция на имплантацию изделий из ПОБ, например, прототипов стентов-эндопротезов. Но, следует отметить, что эти изделия были получены плавлением или могли быть плохо очищены (Unverdorben et al., 2002; Wu et al., 2006). Как и в случае с биодеградацией, на биосовместимость ПОБ и его сополимеров может сильно влиять способ формования изделий из этого полимера, особенно, если этот метод экструзия или формование из расплава. Плавление вызывает перекристаллизацию полимера и резко изменяет диффузионные свойства полимера по отношению к воде, а именно вода играет ключевую роль в формировании ультраструктуры ПОБ, которая сильно влияет на его биологические свойства.

Благодаря своей высокой биосовместимости ПОБ представляет собой довольно перспективный материал для клеточной биологии и инженерии. Хороший уровень клеточной адгезии, пролиферации и жизнеспособности в ходе культивирования *in vitro* на пленках или пористых матриксах из ПОБ проявляют клетки млекопитающих различных типов: фибробласты человека и мыши, мезенхимные стволовые клетки крысы, мыши и человека, остеобласты костной ткани кролика, остеогенные клетки саркомы человека, хондроциты суставного хряща кролика и клетки гладкой мускулатуры кролика (Бонарцев и др., 2011). Нано- и микрочастицы из ПОБ и его сополимеров не оказывают цитотоксического эффекта на различные клетки вплоть до концентрации 1 мг/мл, а к их эндоцитозу способны не только макрофаги, но и остеобласты, фибробласты и опухолевые эпителиальные клетки (Bonartsev et al., 2017; Ermakova et al., 2017; Saad et al., 1996; Saad et al., 1998; Xiong et al., 2010; Lu et al., 2014; Peñaloza, 2017). Водорастворимые олигомеры ПОБ, состоящие из примерно 25 остатков 3-

оксибутирата, конъюгированные с липоевой кислотой, также не оказывали цитотоксического действия *in vitro* на кераноциты в концентрации до 9 мкг/мл (Maksymiak et al., 2012).

Вместе с тем, следует принимать во внимание, что такие характеристики полимеров как химический состав, морфология поверхности, поверхностная энергия и гидрофобность полимера оказывают большое влияние на жизнеспособность клеток и их рост (Fischer et al., 2003), например, химическая обработка поверхности изделий из ПОБ способствует росту клеток на них (Бонарцев и др., 2011).

Что же касается синтетических П2ОА, то, несмотря на очень широкое их использование в медицине в качестве материалов для изготовления самых разных медицинских изделий и лекарственных форм, остается много вопросов по поводу биосовместимости этих полимеров. Так, в процессе быстрого гидролиза ПМК, ПГК и ПМГК продукты гидролиза не успевают утилизироваться в организме, и вблизи имплантата резко снижается pH окружающей среды. Хроническое раздражение ткани в результате снижения pH является серьезной проблемой применения полимерных имплантатов на основе сополимеров ПЛГК (Майбородин и др., 2013; Agrawal et al., 1997; Ignatius et al., 1996; Vacanti et al., 2012; Solheim et al., 2000; Bostman and Pihlajamäki, 2000; Lickorish et al., 2004; Kim et al., 2007). Хроническое воспаление как ответ на деструкцию полилактидов и полигликолидов может усугубляться иммунным откликом на высвобождение нестереорегулярных водорастворимых олигомеров, образуемых в результате деградации данного класса полимеров (Ignatius et al., 1996; Rihova, 1996; Ceonzo et al., 2006). Показана цитотоксичность продуктов гидролитической деструкции ПМК и ПГК (Taylor et al., 1994; Ignatius et al., 1996), и, хотя цитотоксичность наночастиц из ПМК и ПМГК не проявлялась вплоть до концентрации 66-100 мкг/мл, но была уже выраженной при концентрации более 100 мкг/мл (Stevanovic et al., 2011; Xiong et al., 2010). В формировании иммунной воспалительной реакции на имплантированный ПЛГК большую роль играют дендритные клетки, которые этот полимер, как было показано, способен активировать непосредственным образом (Zhu et al., 2015). Такой воспалительный ответ, в частности, является одной из причин торможения биодеградации внутрикостных имплантатов из этих полимеров благодаря «консервации» их в соединительнотканной капсуле, что вызывает различные осложнения: миграцию имплантатов в кости, образование свищей, отторжение имплантата и др. (Pereira et al., 2013; Konan and Haddad, 2009). Чтобы устранить это хроническое воспаление приходится даже прибегать к различным ухищрениям. Так, в медицинские изделия из ПЛГК вводят противовоспалительные лекарственные вещества (дексаметазон, куркумин) (Vacanti et al., 2012; Su et al., 2005), антитела к провоспалительным цитокинам (интерферону-γ) (Khouw et al., 1998) и используют мезенхимальные стволовые клетки (Zhu et al., 2015).

С чем же может быть связана высокая биосовместимость бактериальных ПЗОА и, несмотря на вышеприведенные примеры, их синтетических аналогов П2ОА, которая обуславливает широкое применение этих полимеров в медицине? Попробуем снова поискать ответ на этот вопрос, рассмотрев природные свойства этих биополимеров. Как было показано выше, запасные высокомолекулярные ПЗОА синтезируют многие виды бактерий. Соответственно, можно предположить, что и бактерии микробиоты кишечника, а также различные инфекционные бактерии также способны к синтезу ПОБ и других ПЗОА. А если это так, то распознавание этих биополимеров иммунной системой человека может происходить с самого раннего возраста именно в кишечнике, который, как известно, играет важнейшую роль в формировании иммунитета человека и других высших животных. Действительно, к синтезу ПОБ способны или обладают ферментами (и их генами) биосинтеза ПОБ (прежде всего, ПОА-полимеразой) симбиотические и инфекционные бактерии человека следующих родов: *Agrobacterium, Clostridium, Ralstonia, Bacillus, Burkholderia, Vibrio, Legionella, Pseudomonas, Mycobacterium, Acinetobacter, Sphingomonas, Fusobacterium, Neisseria, Streptomyces, Bordetella, Rickettsia.* А некоторые из этих бактерий, такие как *Pseudomonas sp.* способны к синтезу не только ПОБ, но и различных его сополимеров (Бонарцев и др., 2018а). Как можно убедиться, многие из этих бактерий формируют значительную долю нормальной микробиоты кишечника и других органов (ротовой полости, легких, кожи) или являются возбудителями многих обычных инфекционных заболеваний. Соответственно, иммунная система человека распознает антигены этих бактерий с самых ранних этапов жизни человека, вероятно, с периода формирования иммунитета в младенчестве. И одним из таких обычных и привычных для иммунитета антигенов является ПОБ. Возможно, этим можно объяснить высокую биосовместимость этого биополимера, как и его синтетических аналогов. Тем не менее, липополисахарид тоже является биополимером, с которым иммунная система знакомится на этапе формирования иммунитета, что не мешает этой биомолекуле быть не нейтральным соединением, а, напротив, мощным стимулятором иммунитета. А ПОБ является таким же продуктом как симбиотических, так и инфекционных бактерий.

И здесь можно обнаружить интересные исследования, раскрывающие природные свойства ПЗОА гораздо шире, нежели чем как запасное вещество у бактерий. Дело в том, что ПОА были найдены не только у бактерий, способных к биосинтезу этого полимера, но и у различных грамм-отрицательных и грамм-положительных бактерий, не способных к его синтезу и не обладающих синтазой ПОБ (Reusch et al., 1986), но, более всего, эти полиэфиры были обнаружены в различных тканях эукариот и даже у наивысших их представителей – млекопитающих. Следует сразу отметить, что обнаружен был не высокомолекулярный запасной полимер, синтез которого характерен для ряда бактерий, а так называемый

короткоцепочечный комплексообразующий кПОБ и низкомолекулярный оПОБ (Jendrossek et al., 2014).

В настоящее время считается, что в природе существует три типа ПОБ, различающиеся по своей молекулярной массе и биофункциональности: (а) высокомолекулярный запасной ПОБ, состоящий более чем из 1000 звеньев 3-оксибутирата (запасной ПОБ (зПОБ, в англоязычной терминологии - sPHB)), (б) низкомолекулярный гидрофобный ПОБ, с длиной цепи примерно от 100 до 200 мономеров (олиго-ПОБ (оПОБ, в англоязычной терминологии - oPHB)), и (в) конъюгированный или комплексообразующий ПОБ (кПОБ, в англоязычной терминологии - cPHB), который состоит не более чем из 30 остатков 3-оксимасляной кислоты, относительно гидрофильный, ковалентно связан с белками и образует комплексы с другими биополимерами. Иногда, впрочем, низкомолекулярный оПОБ, особенно если этот полимер образует комплексы с другими биополимерами, в литературе относят к комплексообразующему ПОБ и обозначают как кПОБ (cPHB). Запасной ПОБ присутствует у многих прокариот (*Eubacteria* и *Archaea*), тогда как оПОБ и кПОБ можно обнаружить у всех прокариот и эукариот при проведении такого исследования и, соответственно, могут присутствовать у всех живых организмов (Jendrossek et al., 2014).

Вопреки всеобщему мнению, что ПОБ образуется только у прокариот, этот биополимер был обнаружен группой Реуш (Reusch) у организмов практически всех типов. Впервые, у эукариот и в т.ч. в организме млекопитающих оПОБ был обнаружен этими исследователями в 1989 г., полимер был выделен из мембран, митохондрий и микросом клеток эукариот, а в 1992 г. этими же исследователями был выделен из липопротеинов очень низкой плотности и низкой плотности из плазмы крови человека (Reusch, 1989; Reusch et al., 1992). Было показано, что, как и в бактериях оПОБ находится в мембранах эукариотических клеток в форме ПОБ-полифосфат-кальциевого комплекса (Reusch, 1989; Seebach et al., 1994). Немного позднее кПОБ был изолирован из шпината, митохондрий сердца быка и тканей аорты человека (Seebach et al., 1994). Более того, идентичность обнаруженного оПОБ как полиэфира оксимасляной кислоты была подтверждена посредством ^{1}H-ЯМР спектроскопии (Reusch et al., 1992; Seebach et al., 1994). Затем коротко- и среднецепочечный ПОБ были найдены во множестве различных органов и тканей млекопитающих, включая человека (а также коровы, овцы, свиньи) и птиц (цыпленка, индейки), а именно, в крови, мозгу, сердце, печени, почках, сосудах, нервах, липопротеиновых частицах, тромбоцитах и др. Так, в печени быка локализация ПОБ была выявлена преимущественно в митохондриях и микросомах и в меньшем количестве в плазматических мембранах. Оказалось, что эукариотический ПОБ имеет такой же узкий диапазон длины цепи (120 – 200 субъединиц) как и в мембранах бактерий (Reusch, 1989). Показано, что ПОБ присутствует в хлороформном экстракте из митохондрий печени крысы

(Pavlov et al., 2005). Молекулярная масса ПОБ оказалась равна 12200 Да, что соответствует длине примерно в 140 остатков 3-оксимасляной кислоты, т.е. обнаруженный ПОБ был также олиго-ПОБ (Pavlov et al., 2005). Было высказано предположение о физической интеграции ("растворении") гидрофобного среднецепочечного ПОБ в богатых липидами компартментах клетки и во внеклеточных жидкостях. Так, эту версию подтверждает то, что сПОБ был выделен из фракций крови, богатых липопротеидами низкой и очень низкой плотности (VLDL и LDL) (Reusch, 1989; Reusch et al., 1992), из мембраны и микросом эукариот (Reusch, 1989), из атеросклеротических бляшек кровеносных сосудов человека (Reusch, 1989; Reusch et al., 1992; Seebach et al., 1994).

С использованием теста определения кротоновой кислоты и антител к ПОБ было показано, что концентрация кПОБ в различных тканях составляет от 3-4 мкг/г в нервных тканях и мозгу до 12 мкг/г в плазме крови (Reusch et al., 1992; Reusch et al., 2003). В плазме крови человека концентрация оПОБ может изменяться в достаточно широком пределе от 0,6 до 18,2 мкг/мл при усредненном значении 3,5 мкг/мл (Reusch et al., 1992). Более того, отмечена положительная корреляция концентрации оПОБ во фракции с низкой плотностью с общим содержанием холестерина в этой же фракции и в плазме крови в целом, причем, а основным переносчиком ПОБ в крови является альбумин (Reusch et al., 1992). Следует отметить, что промежуточный продукт биодеградации ПОБ - D-3-гидроксимасляная кислота является т.н. кетоновым телом и в норме содержится в крови и тканях млекопитающих в концентрациях 0,3 - 1,3 мМ, а при патологических состояниях и намного выше (Wiggam et al., 1997; Larsen and Nielsen, 2005).

Более того, несмотря на то, что высокомолекулярный запасной ПОБ присутствует только у прокариот, и не был обнаружен у эукариот, структуры, подобные гранулам зПОБ у ПОБ-запасающих бактерий были обнаружены в клетках человека – опухолевых клетках глиобластомы человека (Elustondo et al., 2012). С помощью сочетания методов окраски флуоресцентным липофильным красителем BODIPYR и обработки клеток ПОА-деполимеразой было обнаружено множество липофильных гранул, распределенных по цитоплазме клеток, гранулы не были ко-локализованы с митохондриями, лизосомами и эндоплазматическим ретикулумом. Авторы предполагают, что в этих гранулах содержится ПОБ, хотя и нельзя установить какого именно типа – зПОБ, оПОБ или кПОБ (Elustondo et al., 2012).

ПОБ был найден также и в тканях различных растений, что тесным образом связано с двумя научными направлениями: получение трансгенных растений, способных к синтезу ПОБ, и получение внутриклеточных бактериальных азотфиксирующих симбионтов в растительных клетках. Так, японскими учеными с помощью метода радиоактивного мечения был показан синтез ПОБ из ацетил-КоА через 3-гидроксибутирил-КоА в рисе (*Oryza sativa*). Они

утверждают также, что выделили синтезированный в рисе ПОБ (Tsuda et al., 2016). Японские ученые из другой научной группы (Suzuki et al., 2005), используя практически все известные методы для определения ПОБ в живых тканях: ЯМР (H^1 ЯМР, ^{13}C ЯМР и даже ^{31}P ЯМР), эксклюзионную (гель-проникающую) хроматографию, ГХ-МС, MALDI-MS, доказали наличие ПОБ в тканях листьев и стеблей сахарной свеклы (*Beta vulgaris*). Более того, они определили молекулярную массу ПОБ и химическую структуру концов полимерной цепи, выделив различные формы биополимера. Это низкомолекулярный ПОБ с M_n = 9124 Да, который они называют кПОБ (cPHB), но в терминах Йендрошек (Jendrossek) с соавт. это все-таки скорее олигоПОБ (оПОБ, oPHB) (Jendrossek et al., 2014). Всего им удалось выделить из растения более 1 мг ПОБ, что позволяет изучить этот полимер. Содержание ПОБ составляло в зависимости от метода экстракции из растительных тканей – 12,5 мкг ПОБ/г сухого веса ткани и 6 мкг ПОБ/г сухого веса ткани. В обсуждении авторы также признают отсутствие ПОА-полимеразы у эукариот, но предполагают, что существует некий альтернативный биохимический путь его синтеза, и предлагают схемы возможных биохимических реакций синтеза ПОБ (Suzuki et al., 2005). ПОБ был обнаружен также в стеблях и листьях льна дикого типа, который был использован в качестве контроля при проведении трансфекции этого растения генами синтеза ПОБ. Наличие ПОБ, хотя и в очень низких количествах – 60 нг/г сырого веса растительной биомассы, было показано методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии (Wrobel et al., 2004; Wrobel-Kwiatkowska et al., 2009). Помимо риса и льна ПОБ в небольших количествах был обнаружен также в контрольных, т.е. не подвергнутых агробактериальной трансформации генами синтеза ПОБ образцах кукурузы дикого типа (Hahn et al., 1999).

Анализ баз данных по белкам UniProt (http://www.uniprot.org) и Protein NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein) показал, что белок ПОА-полимераза или ПОА-полимераза (или ПОА-синтаза, ген *PhaC*) в обоих базах данных был обнаружен у эукариот только пяти видов: моллюска *Crassostrea gigas* (UniProt: K1QX58; NCBI: EKC26101.1) (Zhang et al., 2012), китайского хомячка *Cricetulus griseus* (UniProt: A0A0L0DUY1; NCBI: ERE46547.1), актинии *Nematostella vectensis* (UniProt: A7TBP6; NCBI: EDO26560.1), а также как неохарактеризованный белок у растения клещевины *Ricinus communis* (UniProt: B9T9C3B; NCBI: EEF27538.1) и губки *Amphimedon queenslandica* (UniProt: I1EHL3; NCBI: XP_011407756.1). В базе данных UniProt (но не Protein NCBI) ПОБ-синтаза была идентифицирована также у фораминиферы *Reticulomyxa filosa* (UniProt: X6PA37) и другой одноклеточной водоросли *Thecamonas trahens* (UniProt: A0A061HTL5). В базе данных Protein NCBI (но не UniProt) ПОБ-синтаза указана как гипотетически идентифицированный белок также и у многих видов растений: *Arabidopsis thaliana* (NP_565071.1, AEE35504.1), *Glycine max* (XP_006583441.1, KRH48569.1, KRH39135.1), *Citrus clementina* (XP_006442577.1), *Glycine soja*

(KHN44581.1), *Camelina sativa* (XP_010428311.1), *Gossypium raimondii* (XP_012478347.1), *Zea mays* (DAA58014.2) (Schnable et al., 2009), *Nicotiana tabacum* (XP_016477107.1) и других. У грибов и вирусов ни в базе данных UniProt, ни в базе данных Protein NCBI информация о ПОА-полимеразе не приведена. Столь экзотическое представительство фермента ПОА-синтазы в надцарстве Эукариот наталкивает на мысль о возможно ошибочной ее идентификации у представленных выше видов животных и растений или, что гораздо интереснее, косвенно может свидетельствовать в пользу явления горизонтального переноса генов.

Следует отметить, что помимо ПОБ и другие неинформационные биополимеры, в т.ч. обладающие энергетической функцией (гликоген, цианофицин, полифосфаты, полипренолы, долихолы, сквален) присутствуют как у бактерий, так и у высших животных и растений, выполняя те или иные важные функции. Соответственно, для иммунной системы человека подобные биополимеры (гликоген, долихолы, сквален, полифосфаты) являются веществами, естественно присущими здоровым клеткам и тканям, причем, структура этих биополимеров стабильна и не отличается большим разнообразием (Nelson and Cox, 2008). Тогда как структура белков и нуклеиновых кислот очень разнообразна и существенно отличается у разных животных и даже у разных людей, что является, например, причиной иногда довольно выраженной тканевой реакции на имплантацию человеку бычьего или свиного коллагена и развитие серьезных осложнений при применении медицинских изделий и препаратов на его основе (Anderson et al., 2008; Lucey and Goldberg, 2014; Lemperle et al., 2009). Однако, для этих биополимеров метаболические пути их синтеза у высших эукариот изучены довольно хорошо, тогда как для ПОБ этот вопрос остается все еще в тени, несмотря на довольно большое число работ, свидетельствующих о его обнаружении в тканях высших растений и животных, в т.ч. у человека. При имплантации ПОБ и его сополимеров все-таки происходит активация клеток иммунной системы, которые экскретируют провоспалительные цитокины (Löbler et al., 2002; Löbler et al., 2003) и подвергают эрозии поверхность полимера (Malm et al., 1992a; Malm et al., 1994; Shishatskaya et al., 2005), на него вырабатываются антитела (Reusch et al., 2003). Но подобная тканевая реакция на имплантируемый материал является нормальной реакцией организма и возникает даже при трансплантации собственных тканей, например, жировой (Mikus et al., 1995).

Первооткрыватели ПОБ в организме человека являются сторонниками теории эндогенного синтеза биополимера в клетках человека с помощью еще неизвестных биохимических механизмов и наличия у этого биополимера важных функций в клетке (Reusch, 1989; Reusch et al., 1992). Ими было показано, что кПОБ связывается с одним из белков из группы рецепторов меластатина, *TRPM8*, млекопитающих и человека, что приводит к изменению его функционирования (Zakharian et al., 2009; Cao et al., 2013). *TRPM8* является

мембранным кальциевым каналом, функционирующим в качестве температурного сенсора нейронов периферической нервной системы млекопитающих. Методами масс-спектрометрией и иммуноферментного анализа было показано, что этот белок ковалентно связан с короткоцепочечными ПОБ с длиной цепи от 1 до 26 мономеров (кПОБ) во множестве (более 25) сайтов связывания через остатки серина во внеклеточном домене и трансмембранном доменах. Была также продемонстрирована связь этого белка не только с кПОБ, но и с гораздо более длинноцепочечным оПОБ (Jendrossek et al., 2014). Причем, ПОБ, связанный с трансмембранными доменами, находится в мембране в комплексе с полифосфатом. Более того, функция *TRPM8* как температурного сенсора зависит от того, связан этот белок с ПОБ или нет, т.е. для нормального функционирования *TRPM8* должен быть модифицирован ПОБ, и авторы предположили, что подобная функциональность ПОБ связана с изменением конформационного состояния ПОБ при переходе через температуру стеклования этого полимера, которая составляет примерно +10ºС. Ко-экспрессия в клетках помимо *TRPM8* еще и ПОБ-деполимеразы *PhaZ7* или модификация методами генетической инженерии сайтов связывания белка с ПОБ приводило к нарушению функции этого мембранного рецептора как сенсора температуры (Handrick et al., 2001; Cao et al., 2013). Авторы делают вывод о том, что связывание белкового канала-рецептора *TRPM8* с кПОБ является пострансляционной модификацией этого белка, необходимое для его нормального функционирования (Zakharian et al., 2009; Cao et al., 2013).

Небольшие количества кПОБ были выделены из митохондрий, изолированных из здоровых бычьих сердец (Seebach et al., 1994). Была исследована физиологическую роль кПОБ в митохондриях млекопитающих и показано, что кПОБ участвует в увеличении тока ионов кальция в митохондрию за счет возможного увеличения проницаемости внутренней мембраны митохондрии для этих ионов и изменения вязкости липидного бислоя мембраны (Elustondo et al., 2013; Smithen et al., 2013).

Этой же группой ученых найдены и предположены другие специфические функциональные роли у ПОБ, кроме его роли как запасного вещества и энергетического депо у бактерий, что оказалось сопряжено с образованием короткоцепочечных кПОБ и оПОБ как нековалентных, так и ковалентных связей с другими биополимерами – белками, полифосфатами и ДНК (Reusch, 1989; Seebach et al., 1994; Huang and Reusch, 1996; Reusch, 2013). Так, было показано, что низкомолекулярный оПОБ образует нековалентные комплексы с неорганическими полифосфатами (Reusch and Sadoff, 1988; Reusch, 1995; Das et al., 1997) и ДНК (Castuma et al., 1995; Huang and Reusch, 1996). В виде таких ПОБ-Ca-Полифосфатных комплексов оПОБ может функционировать как небелковые каналы, способные к проведению через плазматическую мембрану неорганических ионов, эти структуры образуют также нековалентные комплексы с белками ионных каналов и входят в их состав (Reusch, 1995; Das et

al., 1997). Для прокариот (в частности, на примере *E. coli*) было показано, что низкомолекулярный ПОБ может образовывать комплексы с различными белками не только за счет гидрофобных взаимодействий, но и путем ковалентного связывания с макромолекулами различных белков в мембране и цитоплазме бактериальной клетки (Reusch, 1989; Seebach et al., 1994; Huang and Reusch, 1996). Причем, физико-химические свойства олигомеров ПОБ и их макромолекулярная структура при ковалентном связывании оказывает на структуру и функциональность белка значительное влияние. Было показано даже, каким образом осуществляется процесс образования такой ковалентной связи между олигомерами ПОБ и белком, названный ПОБилированием (PHBylation) по аналогии с ПЭГилированием (PEGylation) – процессом присоединения полимера ПЭГ к белкам для модификации их функциональности (Bonartsev et al., 2013a; Bonartsev et al., 2013b; Bonartsev et al., 2017a). Сначала при биохимическом превращении олигомера ПОБ образуется высокоэргическая С-концевая КоА-эфирная группа полимера, которая затем действует в качестве кофактора в ферментативной реакции, в ходе которой происходит образование ковалентной связи кПОБ с молекулой белка. Одним из первых модифицированных кПОБ белков был идентифицирован белок *OmpA E. coli*. Ковалентная пришивка кПОБ к специфическим сериновым остаткам *OmpA* определяла правильную интеграцию и ориентацию этого белка во внешней мембране бактерии, были найдены и другие белки *E. coli*, модифицированные кПОБ (Huang and Reusch, 1996; Xian et al., 2007; Reusch, 2013). Была предложена теория об участии этого процесса в фолдинге и сортинге некоторых белков (Xian et al., 2007; Reusch, 2013; Cao et al., 2013). Подобные процессы были описаны и для млекопитающих. Так, было показано, что олигомеры ПОБ ковалентно связываются с кальциевой АТФазой плазматической мембраны эритроцитов человека, формируя одновременно комплекс с неорганическими фосфатами (Reusch et al., 1997). Другие исследователи косвенно подтверждают, что подобная конъюгация кПОБ с белками может иметь определенную физиологическую функцию. Так, было показано, что конъюгация противоопухолевых пептидов DP18L с 3-гидроксидеканоатом усиливает их противоопухолевую активность (O'Connor et al., 2013; Szwej et al., 2015). Образование ковалентных связей ПОБ с белками в ходе биохимических процессов косвенно может подтверждаться способностью многих бактериальных штаммов, продуцентов высокомолекулярного ПОБ, к утилизации добавленных в культуральную среду других полимеров, часто значительно отличающихся по своим физико-химическим свойствам (например, гидрофильный ПЭГ), путем их ковалентной сшивки с концом цепи синтезируемого ПОБ и образования диблок-сополимеров (например, ПОБ-ПЭГ) (Bonartsev et al., 2013a; Bonartsev et al., 2013b).

Авторы признают, что ферментов, способных синтезировать ПОБ у эукариот не обнаружено, однако, предполагают, что в связи с тем, что основные метаболиты биохимического пути синтеза ПОБ (например, ацетоацетил-КоА) у прокариот присутствуют также и у эукариот, в частности, в метаболическом пути синтеза холестерина, то и синтез ПОБ у эукариот, в т.ч. млекопитающих и человека возможен посредством еще не обнаруженных биохимических механизмов (Cao et al., 2013; Norris et al., 2009). Особенно интересно, что авторы при этом обнаружили у *E. coli* особый тип ПОА-полимеразы *YdcS*, отличной от «классической ПОБ-синтазы *PhaC* и способной к синтезу не запасного высокомолекулярного ПОБ, а короткоцепочечного кПОБ. Причем, следует отметить, что кПОБ водорастворим, соответственно, домен ПОА-полимеразы *YdcS*, который осуществляет синтез кПОБ, в отличие от обычной ПОА-синтазы *PhaC* сильно отличается и имеет сродство к гидрофильному полимеру. Впрочем, у мутантов E. coli, у которых отсутствовал ген *YdcS*, в некотором количестве все-таки был найден кПОБ, из чего авторы делают предположение о наличии еще каких-то механизмов синтеза кПОБ у *E. coli* (Dai and Reusch, 2008).

Следует обратить здесь внимание не столько на то, откуда в культивируемых клетках млекопитающихся возник ПОБ, сколько на саму возможность успешной трансфекции клеток млекопитающих – эмбриональных клеток почек человека и нейронов крысы геном бактериального фермента ПОБ-деполимеразы - *PhaZ7* ДНК с последующим синтезом функционального фермента. Ведь это косвенно свидетельствует о возможности трансфекции клеток млекопитающих геном ПОА-синтазы. Проведение же исследования на клетках, трансфецированных *TRPM8*, может указывать на возможный неспецифический механизм ковалентной модификации белка олигомером кПОБ. Косвенно на подобную неспецифичность могут указывать работы этой же научной группы, в которых впоследствии было показано, что *TRPM8* является также рецептором тестостерона, и его экспрессия увеличена в опухолевых клетках, что указывает на вовлеченность этого белка в онкогенез (Asuthkar et al., 2015).

Ярким примером других биополимеров, по химической структуре весьма сходных с ПОБ, осуществление функций которых в клетке происходит посредством ковалентного связывания с белками, являются полипренолы (у бактерий, растений и грибов) и долихолы (у бактерий и животных). Полипренилование (ковалентное связывание с полипренолами) играет важнейшую роль в посттрансляционной модификации ряда белков с целью их заякоревания в мембране (Nelson and Cox, 2008). Все организмы, как эукариоты, так и прокариоты обладают биохимическими механизмами синтеза этих биополимеров и их конъюгации с белками, идентифицированы и соответствующие ферменты, что косвенно может свидетельствовать об эндогенных путях синтеза ПОБ у млекопитающих. Соответственно, есть основания полагать,

что функциональность кПОБ и оПОБ у эукариот может быть подобной функциональности полипренолов и долихолов.

Однако, ПОБ может осуществлять и другие функции в организме человека, не требующие его обязательного синтеза в клетках. Можно предположить, что ПОБ каким-то образом участвует во взаимодействии бактерий микробиоты кишечника, где этот биополимер и синтезируется, с клетками иммунной системы и эпителием слизистой кишечника. В пользу этой версии свидетельствует особая роль ПОБ в симбиозе бактерий микробиоты и организмом животного-хозяина. Например, синтез ПОБ играет важную роль в симбиотических отношениях кишечных бактерий рода *Burkholderia* с организмом-хозяином бобовым жуком *Riptortus pedestris*. Было показано, что число полимер-содержащих гранул гораздо больше у симбиотических бактерий и более интенсивный биосинтез ПОБ у них ассоциирован с большим количеством регуляторных белков фазинов на поверхности гранул. Бактерии-мутанты с нокаутированными генами синтеза ПОБ и фазинов обладали гораздо худшими способностями к заселению и размножению в кишечнике жука, что приводило к уменьшению размеров тела и массы самого жука. Но самое интересное, что способность к биосинтезу ПОБ значительно увеличивало стрессоустойчивость бактерий, т.к. выживаемость бактерий-мутантов с выключенными генами синтеза ПОБ в условиях стресса различных видов (воздействия высокой температуры, обедненной среды роста, высокого осмотического давления) была резко снижена. Анализируя эти результаты, авторы предположили, что синтез ПОБ позволяет бактериям жить в симбиозе в стрессовых условиях кишечника жука, вызываемых иммунной системой организма-хозяина с целью регуляции численности симбиотических бактерий (Kim et al., 2013). В другой работе показано, что биосинтез ПОБ имеет большое значение для микробиоты голотурии (морской огурец) *Apostichopus japonicus*. Промышленное разведение этой аквакультуры (трепанга) сильно осложнено тем, что популяция голотурий состоит из животных, сильно различающихся по своим размерам (до 50 раз) при одинаковом возрасте. Метагеномный анализ состава микробиоты ЖКТ голотурий показал, что у крупных животных преобладают бактерии из порядка *Rhodobacterales*, что коррелирует с большей долей генов синтеза ПОБ – *PhaA, PhaB, PhaC*, т.е. синтез ПОБ, по-видимому, модулирует микробиоту ЖКТ голотурии, что способствует многократному увеличению размеров животного (Yamazaki et al., 2016). Заслуживает внимания работа, в которой показана способность гистамина регулировать синтез низкомолекулярного кПОБ у *E. coli*. Гистамин играет важную роль для бактерий микробиоты, как средство коммуникации бактерий с организмом-хозяином и регулятор иммунной системы желудочно-кишечного тракта, позволяющий бактериям быть «своими» для организма-хозяина, поэтому влияние гистамина на синтез кПОБ может свидетельствовать о вовлечении этого биополимера в процессы адаптации и сосуществования с организмом-

хозяином (Kyriakidis et al., 2008; Kyriakidis et al., 2009). Более того, показана эффективность ПОБ против инфекционных заболеваний у животных: использование в качестве корма порошка ПОБ защищало рачков Артемий (*Artemia nauplii*) от инфекционного заболевания, вызываемого патогенными бактериями *Vibrio campbellii*, причем эффективность ПОБ была в 100 раз больше, чем мономера 3-гидромасляной кислоты (Defoirdt et al., 2007), кроме того, ПОБ обладает потенциалом подавления патогенных бактерий не только *Vibrio sp.*, но и *E. coli* и *Salmonella sp.*(Defoirdt et al., 2009; Boon et al., 2013). Показано также, что продукты биодеградации некоторых ПЗОА, например, 3-гидроксиоктаноат, обладают антимикробной активностью по отношению к целому ряду инфекционных грамм-отрицательных и грамм-положительных бактерий, а также ингибируют продукцию метаболитов, ассоциированных с их патогенной активностью, при проявлении цитотоксического эффекта на фибробластах человека при значительно большей концентрации этого мономера (Radivojevic et al., 2016).

Возможность того, что ПОБ может выполнять какие-то сигнальные функции в организме довольно причудливо отражены в том факте, что димеры и тримеры 3-оксибутирата являются половыми феромонами у пауков (Schulz and Toft, 1993). Причем, не исключено, что эти феромоны тоже могут быть продуктами биосинтеза бактерий микробиоты членистоногого. Так, например, у жуков *Costelytra zealandica* половым феромоном является фенол, который продуцируется из тирозина в специальных железах симбиотическими бактериями *Morganella morganii* (Marshall et al., 2016). Хотя димеры и тримеры 3-оксибутирата обнаружены в грибе *Hypoxylon truncatum*, однако механизм их синтеза также не был раскрыт (Quang et al., 2003).

Мы предполагаем, что все-таки ПОБ является продуктом бактерий микробиоты, а в тканях человека он появляется по нескольким возможным причинам: из-за проникновения через слизистую кишечника, благодаря транслокации бактерий микробиоты в различные ткани человека в норме и при патологии, благодаря возможной трансфекции клеток слизистой кишечника, легких и других органов симбиотическими и инфекционными бактериями генов ферментов синтеза этого биополимера (Бонарцев и др., 2018а). Поэтому, вероятно, иммунная система человека воспринимает этот полимер как естественное присущее организму с самого раннего возраста вещество, не опасное для организма. Соответственно, и все другие ПОА, в т.ч. синтетические, обладая структурной близостью к ПОБ, не вызывают выраженной активации иммунной системы человека при их введении в организм.

1.7. Матриксы для тканевой инженерии

Тканевая инженерия - в широком понимании, это применение принципов и методов технических и естественных наук для фундаментального понимания структурных и функциональных взаимодействий тканей млекопитающих в норме и патологии, а также

развитие биоматериалов для восстановления, поддержания или улучшения функционирования клеток, органов и тканей (Skalak and Fox, 1988). Научные группы проф. Ваканти (Vacanti) и проф. Лэнджера (Langer) заложили основу для развития тканевой инженерии как отдельной интегрированной дисциплины в биологии и медицине (Langer and Vacanti, 1993).

Как и другие технологические дисциплины в естественных науках тканевая инженерия является междисциплинарной областью науки и включает такие направления, как проектирование и изготовление матриксов, исследования биосовместимости и биодеградации матриксов, выделение и характеристика клеток, исследование пролиферации и дифференцировки клеток, изучение регенерации тканей на лабораторных животных и т.п.

Однако, есть и довольно распространенное узкое понимание тканевой инженерии, как одной из биомедицинских технологий. Она состоит из следующих стадий: извлечение стволовых клеток из костного мозга или жировой ткани пациента, наращивание их в искусственных условиях вне организма и затем снова пересадка тому же пациенту для лечения поврежденного органа или ткани. При этом используют различные подходы, такие как использование различных видов биоматериалов, например, гидрогелей, микросфер/микроносителей и трехмерных (3D) матриксов для выращивания клеток в условиях in vitro (Amini et al., 2012), а также применение биологически активных веществ и клеточных продуктов (факторов роста, полностью лиофилизированных клеточных фракций, пептидов и т.д.) для доставки сигнальных молекул в неоднородную клеточную популяцию ткани пациента с целью ее регенерации (Porter et al., 2009). Одной из целей использования биоматериалов является создание трехмерной среды для роста клеток, которая призвана имитировать естественный внеклеточный матрикс. Таким образом, тканевая инженерия является не только сложной и междисциплинарной областью, но и направлением, где исследовательская группа имеет несколько вариантов в разработке стратегии и технологической платформы (Hutmacher et al., 2007). На завершающем этапе проводят трансплантацию клеток (например, миокардиоцитов в сердечную мышцу, пересадка гемопоэтических клеток костного мозга) в небольшом объеме питательной среды, и клеток в комплексе с биосовместимым материалом, который вводят или пересаживают в место дефекта.

Согласно современным представлениям для каждого типа ткани необходимо тщательно подбирать материал, наилучшим образом подходящий для ее восстановления. В этом контексте следует использовать комплексный подход при создании матриксов, учитывая разные свойства: состав материала, структура матрикса, механические свойства, свойства поверхности, скорость биодеградации и свойства продуктов биодеградации, совместимость с биологическими факторами (биологически активными веществами, клетками, тканями), а также изменение всех этих свойств с течением времени.

Для каждого определенного применения оптимальная конструкция для тканевой инженерии должна соответствовать следующим минимальным требованиям:

- матриксы должны обеспечивать первоначальную механическую прочность и жесткость, соответствующие замещенной ткани при повреждении,
- прочность и жесткость материала должна быть достаточной, чтобы при засевании клетками и стягивании раны *in vivo*, матрикс не разрушался.

Таким образом, поддержание структурной целостности является критическим фактором как для клеток, так и для успешного ремоделирования тканей, так как обеспечивает стабильность биохимических условий и васкуляризацию.

Помимо основных требований существуют также другие важные характеристики, которым должны соответствовать матриксы для инженерии костной ткани:

А) Форма, архитектура, микроструктура, пористость, размер и открытость пор.

Архитектура и микроструктура матриксов должна обеспечивать адгезию клеток и миграцию во всем объеме, а также доступ к питательным веществам и метаболитам, образуя при этом достаточное пространство для формирования, а затем ремоделирования новообразованной ткани (Hutmacher et al., 2007) . Основную роль микроструктура матриксов играет в остеогенезе. Результаты исследований *in vitro*, при культивировании клеток на матриксах с более низкой пористостью, демонстрируют стимуляцию остеогенеза путем агрегации клеток и подавления пролиферации клеток. Напротив, *in vivo*, высокая пористость и большой размер пор обеспечивает обширное врастание костной ткани, что подтверждается отсутствием работ, которые показывали бы улучшенные результаты в остеогенезе для матриксов с низкой пористостью. Однако, эта тенденция приводит к ухудшению механических свойств, тем самым устанавливая верхний предел функционального размера пор и пористости (Habibovic et al., 2005). Минимальный размер пор в диапазоне от 100 до 150 мкм необходим для формирования костной ткани, при этом усиленное формирование костной ткани, перенос питательных веществ и васкуляризация происходит у матриксов с размером пор более 300 мкм (Bose et al., 2013). В настоящее время большинство применяемых матриксов состоят из быстро деградируемых видов полимеров и обладают высокой пористостью (90%). К сожалению, такие типы матриксов не обладают структурной устойчивостью, и не могут быть использованы при реконструкции дефектов костной ткани средних и больших размеров (Zhou et al., 2007).

Еще одним важным параметром служит топография поверхности, на которой растут клетки. Так, например, вогнутые поверхности и трубки обеспечивают более тесные контакты между клетками (Рисунок 31 В, Г). Выпуклые поверхности с радиусом кривизны менее 400 нм наоборот вызывают растяжение мембраны (Рисунок 31 А, Д) (Mathur et al., 2012). Интегрины, отвечающие за прикрепление клеток, посылают в клетку определенные сигналы, влияющие на

экспрессию белков, в том числе отвечающих за дифференцировку клетки в остеогенном направлении (Baptista et al., 2019).

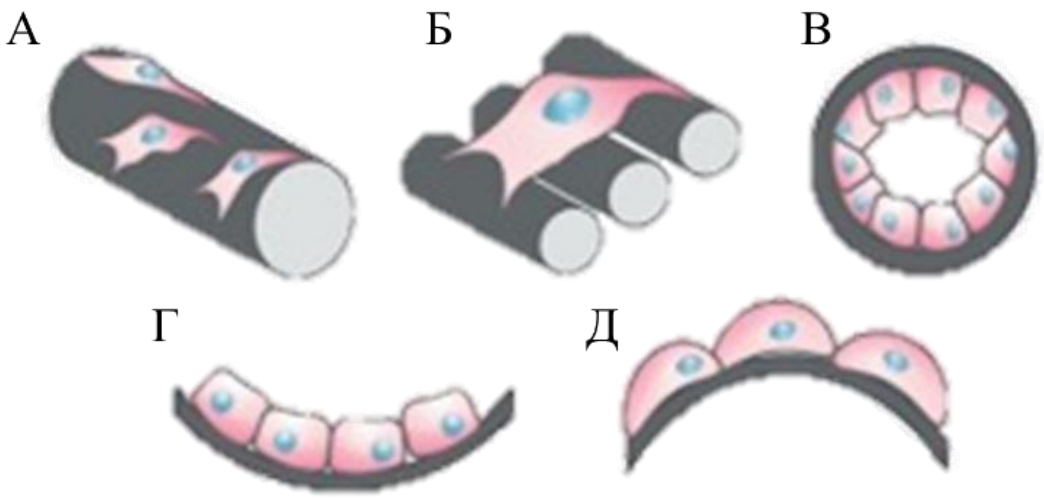


Рисунок 31. *Подложки для роста клеток различной формы: А – цилиндрические матриксы, Б – волокна, В – полые трубки, Г – вогнутые поверхности, Д – выпуклые поверхности (адаптированная иллюстрация из (Baptista et al., 2019)).*

Другим интересным эффектом неровной подложки является изменение градиента сигнальных молекул, которыми клетки активно обмениваются друг с другом. Например, клетки, выстилающие дно углубления, сближены, а пространство вокруг них ограничено (Рисунок 31 Г). При недостаточно интенсивном обмене среды внутри ямки с общим объемом жидкости, в ней могут накапливаться определенные сигнальные молекулы и факторы. Такой эффект могут запускать процессы дифференцировки в мульти- и плюрипотентных клетках (Flier van der and Clevers, 2009).

При механическом воздействии со стороны межклеточного матрикса также возникают процессы растяжения цитоскелета через фокальные контакты. Сжатие клетки за счет внешней силы, приложенной со стороны матрикса может значительно изменить локальную плотность заряда и концентрацию ионов, из-за чего могут открываться ионные каналы. Такие механические стимулы тоже сильно влияют на рост и дифференцировку стволовых *клеток in vivo* и *in vitro*.

Не менее важной характеристикой, влияющей на дифференцировку МСК, служит площадь доступной для роста клеток поверхности. Было показано, что при росте на небольшом участке, клетки имеют большую тенденцию к дифференцировке в адипогенном направлении, в то время как большая плоская поверхность способствует остеодифференцировке. Тем не менее, кроме ограничения площади адгезионного материала, в среде для этого эксперимента должны

были присутствовать факторы, индуцирующие как остео-, так и адипогенную дифференцировку (McBeath et al., 2004). Другим интересным примером воздействия большой плоской поверхности служит дедифференцировка на ней хондроцитов до клеток, близких по свойствам к фибробластам. Причем при создании условий, схожих с условиями 3D-роста, дедифференцированные хондроциты возвращаются к своему изначальному фенотипу (Guilak et al., 2009).

Для монослойных культур, сложная микроструктура подложки с выступающими участками, расположенными друг относительно друга на расстоянии несколько десятков нанометров (Рисунок 32 Б), в отличии от далеко расположенных структур (Рисунок 32 А), участвует в перестройке актинового цитоскелета и может оказывать влияние на дифференцировку клеток (Arnold et al., 2004).

Итого, при росте на структурированном матриксе, МСК подстраиваются под его форму, из-за чего происходят перестройки цитоскелета, перераспределение фокальных контактов, активности киназ и Rho-зависимых ГТФаз, играющих важную роль в дифференцировке клеток (McBeath et al., 2004; Titushkin and Cho, 2007). Для получения имплантов желаемой формы и с заданными физико-химическими характеристиками необходимо правильное сочетание материала и формы полученного изделия.

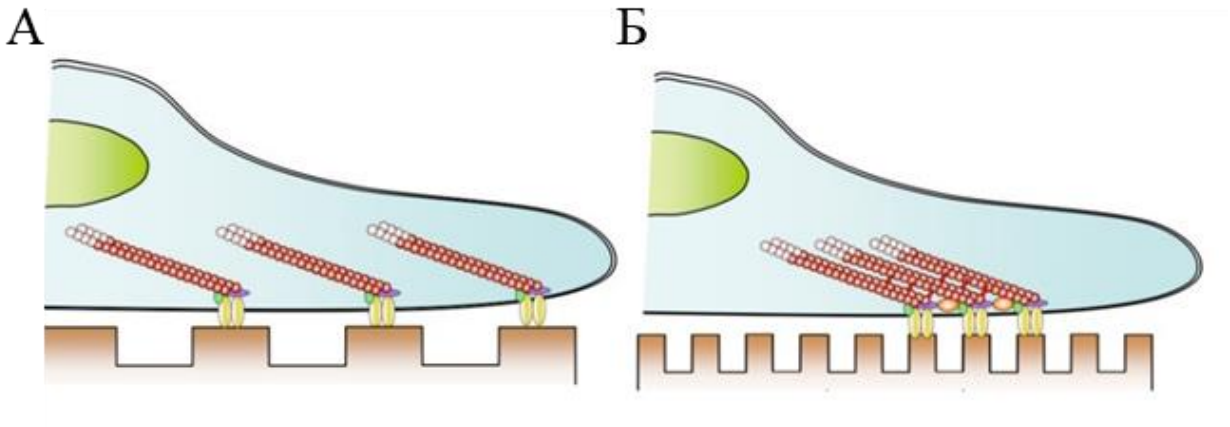


Рисунок 32. *Взаимодействие интегринов с адгезионными участками подложки, расположенных на разном расстоянии друг от друга (адаптированная иллюстрация из (Guilak et al., 2009)).*

Биоразлагаемые микросферы могут использоваться как для заполнения дефектов мягких тканей, так и для костных структур. Их обтекаемая форма позволяет обеспечить удобное заполнение поврежденной ткани, не травмируя прилегающие участки. Кроме того, в микросферы можно легко поместить лекарственные вещества и ростовые факторы, способствующие ускорению регенеративных процессов.

Б) Механические и физико-химические свойства.

Механические свойства биоматериалов для восстановления костной ткани особенно важны, т.к. предполагается, что биоматериал должен обеспечивать восстановление утеренной функции поврежденной ткани, а в случае кости – это прежде всего механические свойства (Chen et al., 2015), причем, имеется как макроскопический, так и микроскопический уровни проявления механики костной ткани, которые биоматериал призван также компенсировать (Liebschner, 2004). Однако не меньшее значение имеет интеграция скаффолдов и регенерация кости в тесном контакте с тканью хозяина, что обеспечивает быструю и эффективную регенерацию кости. Таким образом, матриксы для регенеративной терапии критических дефектов костной ткани следует изготавливать из материала со стабильными механическими свойствами, например, медленно деградируемых видов полимеров.

В материале, из которого создают имплант, важны не только его биосовместимость и отсутствие токсичности. Жесткость, гибкость, кристалличность и гидрофобность материала играют определяющую роль в его взаимодействии клетками. Исследование особенностей роста клеточных культур в непосредственном контакте с такими материалами позволяет предположить, как будет вести себя медицинское изделие внутри живого организма. Высокая гидрофобность материала, например, будет препятствовать прикреплению клеток.

Механочувствительность МСК позволяет им определять разные по жесткости материалы. Благодаря растяжению механочувствительных белков на наиболее подходящей по жесткости подложке могут запускаться сигнальные каскады, приводящие к дифференцировке клеток. Наиболее чувствительными к механическим свойствам подложки белками являются цитоплазматические киназы (Meyers et al., 2006). Например, MAPK-путь запускает остеодифференцировку МСК за счет активации экспрессии Runx2. Более подробно механизм механочувствительности клеток разобран в исследовании Фогель (Vogel) и Шитц (Sheetz) (Vogel and Sheetz, 2006). Fyn-киназа относится к Src-киназам, регулирующим жесткость цитоскелета и, тем самым, влияющим на фенотип клетки. Этот фермент активируется в случае растяжения линкера и фосфорилирует его. На примере разобщения адгезионного линкера и Fyn-киназы показано, что движение цитоскелета на субстрате разной жесткости ведет к разному эффекту. В случае высокой жесткости субстрата, киназа остается рядом с линкером и фосфорилирует его, предотвращая дальнейшее растяжение клетки. Мягкий субстрат, наоборот, тянется в месте контакта и разносит киназу и линкер друг от друга. Растянутый линкер остается нефосфорилированным и продолжает растягиваться еще больше. Таким образом получается разное натяжение цитоскелета, влияющее на морфологию клетки (Рисунок 33).

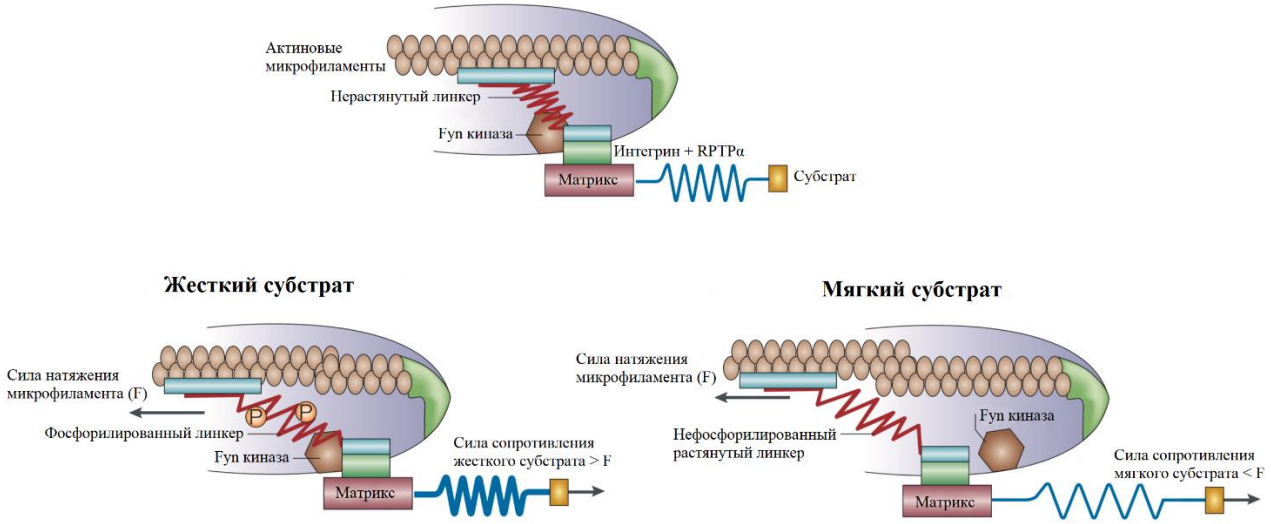


Рисунок 33. *Механизм механочувствительности клетки на примере растяжения и адгезионного линкера и его взаимодействии с Fyn киназой (иллюстрация адаптирована из (Vogel and Sheetz, 2006)).*

Для дифференцировки в остеогенном направлении, наиболее благоприятными для быстрой регенерации ткани будут характеристики плотности и жесткости, приближенные к костному матриксу. Например, материал, коэффициент упругости которого близок к 30 кПа (Engler et al., 2006), эффективнее активирует процессы остеодифференцировки. Согласно исследованию Пен (Peng) способность матрикса к деградации также играет огромную роль в индукции остеодифференцировки. Скорость распада матрикса может играть даже более существенную роль, чем жесткость подложки (Peng et al., 2018).

Интересно, что в случае мягких имплантов, например гидрогелей, МСК активнее дифференцируются в хондрогенном направлении на гидролизуемых матриксах (Reilly and Engler, 2010).

В) Управляемая биодеградация.

Процесс восстановления костной ткани происходит в течение длительного времени и в случае применения биодеградируемых материалов и изделий крайне важным является проблема соответвия скорости биодеструкции этого материала с процессом регенерации костной ткани. Это связано с упомянутой выше проблемой компенсации функции костной ткани в период времени, когда дефект еще не восстановился и новообразованная костная ткань не взяла на себя функции утерянной ранее кости. Соответственно, в этот критический период времени имплантируемый биоматериал призван взять на себя, например, поддержание необходимых механических функций, и не потерять свои механические свойства раньше времени в результате биодеградации. С другой стороны, этот биоматериал должен в конечном

итоге заместиться новой костной тканью. Как можно видеть, это весьма непростая задача (Hutmacher et al., 2000). К сожалению, внимание проблеме биодеградации материалов, прежде всего, проблеме изменения физико-химических и биологических свойств во время биодеградации, уделяется недостаточно (Hollister et al., 2002; Horner et al., 2016; Farah et al., 2016).

Г) Остеоиндуктивные свойства.

Особо стоит проблема остеоиндуктивных свойств биоматериалов. Предполагается, что под индуктивностью понимается активная стимуляция процесса образования и нормального развития костной ткани после ее повреждения за счет действия каких-то дополнительных биоактивных веществ, вводимых в используемый для замещения костной ткани биоматериал, например, тканеинженерный матрикс, будь то ростовые факторы, низкомолекулярные лекарственные вещества или стволовые клетки (Chen et al., 2003). Однако сам процесс остеоиндукции может зависеть от самых различных факторов, например, от особенностей экспрессии генов остеобластов (Hollinger et al., 2004) или пористости матриксов (Wildemann et al., 2007). Одной из наиболее интересных и малоизученных проблем остается при этом проблема собственных остеоиндуктивных свойств тех или иных биоматериалов, которые могут быть связаны с их естественными свойствами.

Процессы обновления и заживления костной ткани происходят сложнее, чем в мягких тканях за счет наличия минерализованного матрикса. В ремоделировании костей участвуют два вида клеток: остеобласты и остеокласты. Остеобласты продуцируют новый слой минерализованного матрикса, в то время как остеокласты занимаются резорбцией костной ткани. Баланс в работе этих клеток и определяет эффективность перестроек в костной ткани.

В нашем организме рост кости регулируется за счет огромного количества цитокинов и факторов роста. Так, костный морфогенетический белок (BMP) активирует экспрессию транскрипционного фактора *SOX9*, отвечающего за дифференцировку в хондрогенном направлении. Факторы *Wnts, Hedgehogs, Notch, VEGF, FGFs, IGF-1* и *TGF-β* также участвуют в сложном сигналинге управления и активации остеодифференцировки. Примерное представление о сигнальных путях, способствующих дифференцировке, можно видеть на Рисунке 34.

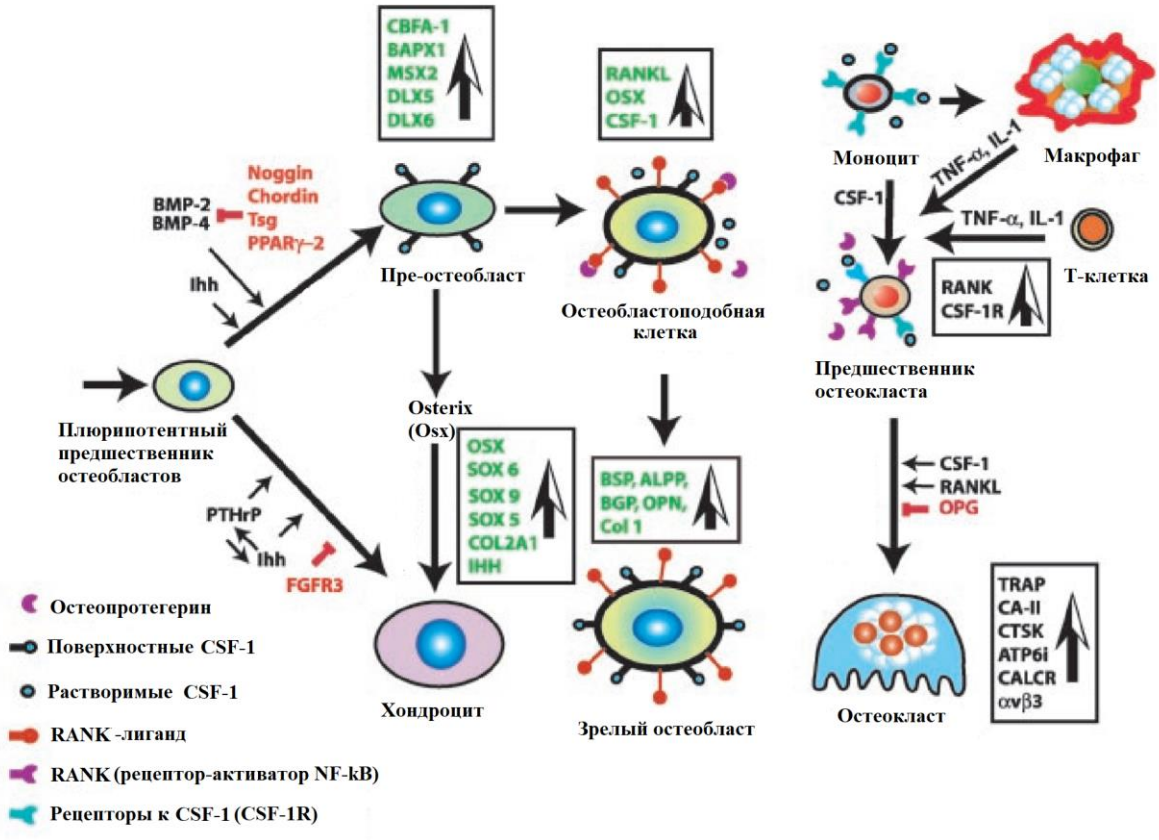


Рисунок 34. *Механизм остеогенеза: факторы, влияющие на дифференцировку плюрипотентных клеток в остеогенном направлении. Красным шрифтом отмечены ингибиторы (Hollinger et al., 2004).*

Из схемы видно, что на разных уровнях дифференцировки, в клетках увеличивается экспрессия различных генов. С помощью искусственного введения в материал импланта участвующих в сигналинге молекул, можно индуцировать остеогенную дифференцировку *in vitro* и *in vivo.* Соли кальция, магния и стронция являются естественным компонентом костной ткани и необходимы для нормальной минерализации матрикса. Включения этих солей в материал импланта также позволяют значительно повысить его остеоиндуктивность (Yu et al., 2019).

Е) Технологичность.

Проблема технологичности биоматериалов для замещения костной ткани стоит особенно остро, т.к. биоматериалы и изделия нового поколения становятся все более сложны в производстве, и в связи с этим все больше возрастает проблема стандартизации получения этих биоматериалов и изделий и совмещения различных технологических платформ для их производства.

Ж) Персонализация и индивидуальный дизайн.

Развития т.н. точной (прецизионной) и персонализированной медицины открывает возможности для получения биоматериалов, предназначенных для восстановления костной ткани, с индивидуальными свойствами и функциональностью для конкретного пациента. Предполагается, что производство изделия должно производиться на основании индивидуальных данных диагностики, как геометрии дефекта кости, так и патофизиологических особенностей регенерации костной ткани в месте дефекта.

1.8. Материалы для изготовления матриксов

Существует большое разнообразие материалов для изготовления матриксов. Сегодня в качестве материалов для нужд регенеративной медицины нужны не просто нетоксичные, биосовместимые и биоразлагаемые материалы. Для имплантов третьего поколения требуются вещества, способные направлять клетки в сторону дифференцировки и ангиогенеза (Bongio et al., 2010). К материалам для создания таких имплантов выдвигаются следующие требования:

- Отсутствие токсичности материала и продуктов его взаимодействия с клетками и биологическими жидкостями;
- Отсутствие реакции отторжения материала, как инородного тела: то есть создания соединительно-тканой капсулы;
- Физические характеристики материала, приближенные к окружающим тканям;
- Наличие факторов, способствующих дифференцировке мультипотентных клеток;
- Простота и доступность получения материала (Hubbell, 1995).

Среди материалов, используемых для регенеративной медицины, можно выделить неорганические и органические, инертные и биоактивные. Классификация материалов и их свойства приведены в Таблице 4 (Севастьянов и Кирпичников, 2011; Кузнецова и др., 2014; Polo-Corrales et al., 2014).

Таблица 4. *Материалы и их свойства для тканевой инженерии.*

Материалы	Представители	Характеристики
Природные полимеры	Коллаген	Естественный компонент кости является идеальным кандидатом для создания 3D - матриксов. Этот биосовместимый и биодеградируемый стимулирует пролиферацию и остеодифференцировку клеток. Однако, коллаген обладает плохими механическими

		свойствами. В связи с чем в современных исследованиях его модифицируют различными полимерами.
	Хитозан	Биоразлагаемый, биосовместимый материал оказывает антибактериальные, ранозаживляющие и адгезивные свойства. Главный минус - это недостаточная механическая прочность, поэтому хитозан комбинируют с другими материалами.
	Фиброин шелка	Этот материал имеет оптимальные механические свойства, стабильность, биосовместимость, контролируемую протеолитическую биоразлагаемость и морфологическую гибкость. Недостатком является медленная скорость биодеградации, которой не всегда подходит для замещения новообразованной костной тканью место дефекта, но это успешно можно решить с помощью химической модификации.
	Альгинат	Данный материал образует гель при взаимодействии с двухвалентными катионами. Материал обладает хорошей биосовместимостью, оптимальной пористостью, а также индуцирует хондрогенную дифференцировку. Однако скорость биодеградации альгината очень медленная.
	Полиоксиалканоаты	Биосинтетические полимеры, которые характеризуются отсутствием токсичности, минимальным раздражающим действием на окружающие ткани, антиоксидантными свойства, биодеградируемостью и биосовместимостью.
	Гиалуроновая кислота	Гидрофильная, неиммуногенная, а также была обнаружена в цитоплазме остео прогениторных

		клеток. Этот природный полимер используют в сочетании с другими материалами, факторами и лекарствами для повышения его остеогенного потенциала.
	Пептидные гидрогели	Самособирающиеся пептидные гидрогели представляют собой новый класс материалов, исследование которого активно ведется в настоящее время. Они могут легко модифицированы биоактивными мотивами. Составляющие гидрогелей биосовместимы и биоразлагаемы. Они состоят из со-комплементарных амфифильных пептидов, которые формируют 3D-структуру, которая имеет много общего с внеклеточным матриксом.
Синтетические полимеры	Полиэфиры	Алифатические полиэфиры, например, полигликолевая кислота, полимолочная кислота (полилактид), поликапролактон, часто используют для применения в тканевой инженерии. Продукты их распада присутствуют в организме человека и могут быть удалены с помощью естественных метаболических процессов. 3D - матриксы из этих материалов могут быть изготовлены с помощью различных методов, и подбирая молярную массу этих полимеров можно влиять на механические свойства и скорость деградации.
Керамика	Биостекло	Биостекло обладает такими преимуществами, как контроль скорости деградации, остеокондуктивность, биоактивность и доставка клеток. Однако есть ограничения в механических свойствах, таких как низкая прочность и стабильность.
	Фосфаты кальция	Гидроксиапатит (ГА) - это минеральная основа костной ткани. В регенерации костной ткани

		этот минерал демонстрирует высокую степень биосовместимости и хорошие остеоиндуктивные свойства. Однако у этого материала плохие механические свойства и медленная скорость биодеградации. Он применяется вместе с другими материалами, чтобы увеличить остеокондуктивные и остеоиндуктивные свойства матриксов.
	Кораллы	Привлекательный материал для создания матриксов, обладающий контролируемым размером пор и взаимосвязанной системой пор аналогичной трабекуллярной кости. Имеет ограничения по источникам добывания материала и механическим свойствам материала.
Металлы	Стандартные хирургические имплантаты из нержавеющей стали 316 L (ASTM F138), сплавы на основе кобальта (ASTM F75 и ASTM F799) и титановые сплавы, где Ti-6Al-4V (ASTM F67 и F136).	Поскольку металлы являются материалами с высокой механической прочностью и стойкостью на излом, они часто используются как металлические биоматериалы в стоматологии и ортопедии для замещения и поддержания поврежденной и заживающей кости. Тем не менее, они имеют такие недостатки как возможный выброс токсичных ионов и/или частиц металлов в результате коррозии или износа, которые вызывают процессы воспаления и аллергические реакции, что влияет на биологическую совместимость. Кроме того, они способствуют плохой стимуляции нового роста кости за счет упругих модулей, которые не соответствуют естественной костной ткани.
Композиты	Полимеры с керамикой, металло-керамика,	Композитные материалы были разработаны с целью улучшения свойств известных материалов, таких как реакционной способности поверхности, биологической

	металлы с полимерами	активности, механической прочности, и доставки препаратов или ростовых факторов. Они используют свойства из различных материалов для получения синергетического эффекта.

Для того, чтобы выбрать оптимальный материал при создании конструкций для тканевой инженерии, следует определить свойства, которыми он должен обладать.

Интересным примером неразлагаемого материала, широко применяемого в регенерации кости, служит титан и его сплавы. Этот прочный материал позволяет создавать долговечные изделия, выдерживающие огромные нагрузки. Несмотря на то, что после операции имплант сперва активирует локальный иммунный ответ, с течением времени титан поддерживает процессы образования новой костной ткани (Trindade et al., 2018).

Среди мягких неорганических материалов особый интерес представляет биостекло. Это вещество, близкое по физическим характеристикам к хрящевой ткани человека. Его можно использовать для регенерации костной и хрящевой ткани. Благодаря наличию в составе солей фосфатов, биостекло имитирует нормальный межклеточный матрикс костной ткани, влияя на экспрессию генов, отвечающих за процессы остеодифференцировки (Krishnan and Lakshmi, 2013).

Начиная с 1970-х ведется разработка и изучение материалов для регенеративной медицины, способных со временем полностью деградировать в организме, постепенно замещаясь новой тканью. Преимуществом такого материала служит полная совместимость с телом пациентом. Спустя некоторое время поврежденная ткань возвращается к своему первоначальному состоянию. Для детских патологий особенно важно использование таких материалов, поскольку не придется делать повторные операции, неизбежные из-за естественного роста и увеличения органов.

Применение биоразлагаемых материалов не вызывает дополнительных неудобств. В то время как в случае металлических имплантов, их наличие может стать, к примеру, причиной искажений при прохождении процедуры МРТ или даже показанием для полного отказа от применения этого метода медицинского исследования.

После проведения необходимых тестов на цитотоксичность in vitro, чтобы понять можно ли будет использовать исследуемый материал в клинике, необходимо проверить его свойства при имплантации лабораторным животным. Для проверки биосовместимости и иммуногенности исследуемого материала его помещают животным подкожно или внутрибрюшинно (Azab et al., 2007). Если материал не показал острую токсичность, сильный

иммунный ответ и в целом его свойства кажутся перспективными для дальнейшего изучения, можно проводить испытания в интересующей ткани или органе.

В качестве моделей исследования регенерации костной ткани используют модели некритический дефект бедренной кости, критический дефект лучевой кости, черепной крышки или челюсти (Yu et al., 2019). У животных извлекают часть здоровой ткани и замещают ее исследуемым биоматериалом. Для увеличения биосовместимости, материал можно предварительно помещать животным подкожно. По истечении эксперимента производят гистологическое и иммуногистохимическое исследование срезов в районе дефекта (Ge et al., 2018).

Для изготовления биоматериалов для тканевой инженерии, в частности, матриксов для инженерии костной ткани в настоящее время используется целый ряд традиционных и новых высокотехнологичных методик. Главной задачей этих методов является формирование матриксов с микроструктурой и физико-химическими (в т.ч. механическими) свойствами, обеспечивающими наиболее эффективное функционирование биоматериала и изделия на его основе. Среди трациционных методов следует отметить следующие: формование из раствора с использованием формы и послойное формование из раствора на подложке (Atala and Lanza, 2002), метод фазового разделения (Ma and Zhang, 2001), лиофильное высушивание (Deschamps et al., 2002), метод полимеризации *in situ* (Huang et al., 2004), методом химического газового вспенивания (с использованием, например, карбоната аммония) (Nam et al., 2000), компрессионное формование (Wu et al., 2005), спекание (Borden et al., 2002), выщелачивание (с использованием, например, хлорид натрия и сахарозы, которые в результате вымывания образуют поры в получаемом матриксе) (Nam et al., 2000), получение композитов с минеральными веществами (стеклами и керамикой) (Kokubo et al., 2003). Недостатками этих методов являются: наличие остаточных растворителей, которые могут быть токсичными, сложность контроля формы и микроструктуры (пористости) получаемых матриксов, распределение компонентов (например, минеральных веществ) в композитных матриксах, наличие остаточных денатурированных белков и др. (Atala and Lanza, 2002). Относительно новыми методами являются использование в качестве растворителя в описанных выше традиционных методах CO_2 в сверхкритическом состоянии, что обеспечивает отсутствие остаточных токсичных растворителей в изготавливаемых матриксах (Залепугин и др., 2006; Sheridan et al., 2004). Происходит активное внедрение методов быстрого прототипирования для изготовления медицинских изделий, в т.ч. матриксов для регенерации костной ткани: моделирование методом наплавления (Fused deposition modeling (FDM)) (Hutmacher et al., 2001; Williams et al., 2005), селективное лазерное спекание (SLS) (Hutmacher et al., 2004), стереолитография (Cooke et al., 2003) и, собственно, трехмерная печать (3D-печать) с

предварительным автоматизированным проектированием (CAD) – получением цифровой модели (Sachs et al., 1993; Seitz et al., 2005; Dutta Roy et al., 2003). Однако и эти методы не лишены недостатков, это, например, деградация, сшивание и окисление полимеров в процессе их обработки, ухудшенные механические свойства и усадка материала. Кроме того, далеко не все материалы подвергаются обработки при использовании методов быстрого прототипирования. В частности, прямая 3D-печать с использованием ПОБ и его сополимеров неизбежно связана с плавлением полимера, что приводит его к перекристаллизации, ухудшающей все основные его свойства (Hutmacher et al., 2004). Довольно перспективным методом для получения матриксов является также электроформование, которое позволяет формировать за счет действия электрического поля волокна из раствора полимера и путем наслоения этих волокон друг на друга конструировать пористые маты различной микроструктуры (Zhang et al., 2015). Однако для изготовления матриксов с помощью этого метода в ряде случаев приходится использовать дополнительные вещества, а волокнистая структура не всегда подходит для восстановления костной ткани.

Гибридные конструкции в тканевой инженерии представляют собой сочетание живых клеток, биологически активных молекул и структурной основы - матрикса. Применение таких конструкций обеспечивает эффективную регенерацию тканей, и является наиболее распространенной концепцией, лежащей в основе тканевой инженерии (Hutmacher et al., 2007). Одним из перспективных направлений в этой области является технология биопечати живыми клетками (Mironov et al., 2003; Mironov et al., 2017), но нерешенной проблемой этого метода остается низкое разрешение при конструировании прототипов ткани, что не позволяет, в частности, конструировать с помощью этой технологии кровеносные капилляры и нервные волокна, а значит полученные этим методом матриксы необходимо васкуляризировать, как и матриксы, полученные с помощью традиционных методов; остаются нерешенными и многие проблемы, связанные с развитием искусственной ткани из собранных таким образом вместе клеток (Huang et al., 2003).

1.9. Инженерия костной ткани

Разработка новых биомедицинских методик для регенерации костной ткани является актуальной проблемой в травматологии, нейрохирургии, челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии. Поражения костных тканей в результате патологических заболеваний, травм и врожденных патологий занимают одни из первых мест среди причин смертности, временной нетрудоспособности и развития инвалидности. Каждый год около 12% населения России получают травмы, из них 80% - люди молодого и трудоспособного возраста. Кроме того, в последнее время наблюдается рост числа больных заболеваниями,

сопровождающимися обширными разрушениями костной ткани (опухоли, туберкулез). Широко распространенные в хирургии методики реконструкции костей, основанные на ручном или инструментальном перемещении и фиксации костных фрагментов с помощью металлических имплантатов не обеспечивают решения поставленной задачи (т.н. «остеогенная недостаточность» (Деев и др., 2007)) и, более того, являются причиной развития различных побочных патологий: хронических воспалений, инфекций, остеомиелита и др.

В настоящее время в медицине, в частности в челюстно-лицевой хирургии, параллельно с усовершенствованием традиционных методов лечения происходит бурное развитие принципиально новых методов терапии, в т.ч. тканевой инженерии. Тканевая инженерия представляет собой принципиально иную концепцию по отношению к хирургии и трансплантологии. Она основана не на замещении, а на регенерации тканей и органов. Организм сам может восстанавливать поврежденную костную ткань, если для этого созданы надлежащие условия: имеется скаффолд (каркас) соответствующей микроструктуры, на котором происходит наращивание ткани, и необходимые стимулы для остеогенеза. Регенерация любой ткани, в том числе костной, протекает с участием стволовых клеток, в частности, мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (МСК), которые дифференцируются в тканеспецифические клетки. Важнейшее значение при разработке скэффолдов для роста и дифференцировки МСК приобретает биоматериал, из которого он изготовлен, и микроструктура каркаса. Физико-химические и биологические свойства биоматериала скэффолда имеет ключевое значение для роста и дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток, в качестве носителя которых он используется. Особое значение имеет возможность регуляции физико-химических свойств биополимерного материала: гидрофильности, механических и диффузионных свойств (Деев и др., 2011)

Основная идея создания такой тканеинженерной конструкции для регенерации костной ткани является стремление к некому «идеальному» биоматериалу, обладающему сочетанием таких свойств как остеогенность (наличие в конструкции клеточных источников для формирования новой костной ткани), остеокондуктивность (способность быть проводником для роста костной ткани), остеоиндуктивность (способность стимулировать процесс восстановления костной ткани по месту имплантации матрикса), остеопротективность (способность частично компенсировать механические свойства кости) (Лысенок, 1997). Исследования в области создания таких биоматериалов и тканеинженерных конструкций на их основе ведутся уже более 15 лет и продолжают активно развиваться (Seitz et al., 2005; Ge et al., 2004, Agarwal and García, 2015). Одной из наиболее важных проблем для создания таких гибридных конструкций из клеток и биоматериалов является проблема адгезии клеток к поверхности биоматериала (Aplin et al., 1998; Duggal et al., 2009).

Кость отличается от других тканей наличием неорганических (гидроксиапатита) и широкого спектра органических компонентов, главным образом представленных коллагеном I типа. Минеральная часть составляет 65%-70% матрикса кости, в то время как на органическую часть приходится оставшиеся 25%-30%. С позиций полимерной химии, кость можно рассматривать как композиционный материал. Минерализованная коллагеновая основа внеклеточного матрикса является главной характеристикой костной ткани, который обеспечивает ее уникальные биомеханические свойства.

Коллаген I типа является главным органическим компонентом кости. Коллагены составляют 90 % по весу от всех белков внеклеточного матрикса. Неколлагеновые белки составляют, соответственно, 10 %, и включают щелочную фосфатазу (ЩФ), остеопонтин, сиалопротеин кости, остеокальцин, которые регулируют процесс минерализации костной ткани, а остеонектин регулирует диаметр коллагеновых фибрилл (Polo-Corrales et al., 2014).

Сложная иерархическая структура, свойства составляющих материалов, клеточная организация и молекулярные сигналы работают согласованно и в унисон, чтобы выполнять функции костной ткани. Иерархическая структура костной ткани имеет решающее значение не только для макроскопических механических свойств, но и для специализированных клеток костной ткани, остеобластов, остеокластов и других, для которые преобразуют биомеханические сигналы, полученные при контакте со сложной поверхностью костного матрикса во внутриклеточные сигналы, запуская тем самым каскадные пути, приводящие к экспрессии определенных генов, продукции белка, изменению физиологической активности и фенотипа клеток, экскрецию цитокинов и тканевых факторов.

В случае повреждения костная ткань способна к самовосстановлению в отличие от мягких тканей, который восстанавливаются за счет формирования рубцовой ткани. Подавляющее большинство дефектов заживает самостоятельно или излечивается после стандартных ортопедических процедур. Хирургические методы лечения костных дефектов, как правило, делятся на две группы: метод Илизарова и трансплантация костной ткани. Метод остеотомии по Илизарову с последующей дистракцией кости заключается в хирургическом процессе рассечении костей и последующем их растягивании за счет потенциала регенерации костной ткани. И, хотя описанный метод использует внутренние ресурсы костной ткани, - это остается очень тяжелой для пациента процедурой. За последние десятилетия медицина значительно продвинулась в понимании лечения и заживления тканей и органов. Трансплантация органов или тканей по-прежнему - это общепринятая методология для лечения таких заболеваний. Описанные методы не являются оптимальным, так как имеют ряд очевидных ограничений, включая отсутствие доноров, сложное хирургическое вмешательство, иммунное отторжение, хроническое воспаление, а также отсутствие клинической

предсказуемости. Кроме того, экстремальные ситуации и/или осложнения, такие как биомеханическая нестабильность или недостатки хирургических методов, могут привести к большим дефектам с существенно ограниченным потенциалом регенерации, которые часто называют дефектами критических размеров. В этих случаях полное восстановление без дополнительного вмешательства невозможно.

Метаболизм кости - это сложный процесс, который регулируется большим количеством биологически активных молекул, а репарация костной ткани - это в значительной степени повторение процессов развития. Во время процесса восстановления перелома кости, клетки проходят через этапы дифференциации, напоминающие те, что происходят во время нормального развития костной ткани плода (Santo et al., 2013). Восстановление кости можно рассматривать с точки зрения метаболических процессов (анаболизм и катаболизм) и биологических процессов (воспаление, эндохондриальное окостенение, ремоделирование) (Рисунок 35).

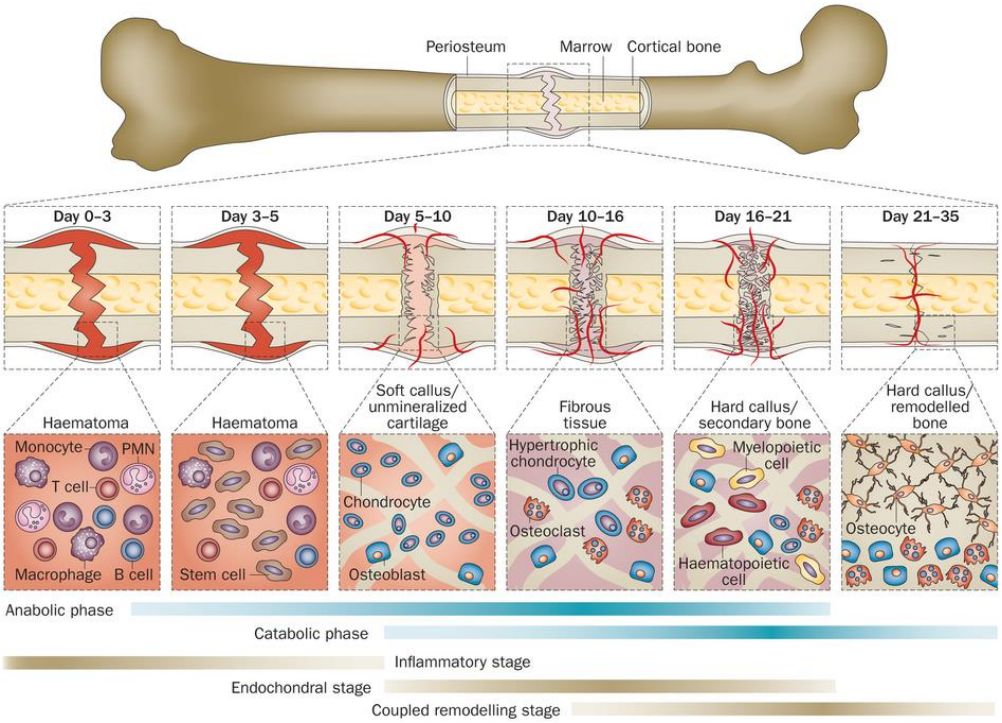


Рисунок 35. *Восстановление перелома бедренной кости. Основные метоболические процессы (синие линии) пересекаются с биологическими процессами (коричневые линии). Первичные метаболические процессы (анаболизм и катаболизм) восстановления переломов представлены в контексте трех основных биологических процессов (воспаление, эндохондральное окостенение и ремоделирование). Основные типы клеток, которые участвуют на каждом этапе восстановления и сроки их распространенности обозначены на рисунке. Масштаб времени исцеления приравнивается ко времени восстановления закрытого перелома бедра мыши, фиксированного стержнем, расположенным к костному мозгу. ПЯЛ - полиморфноядерные лейкоциты (Einhorn and Gerstenfeld , 2014).*

Воспаление является ранней стадией реагирования на повреждение кости. Воспалительные клетки, привлеченные в повреждение костной ткани, высвобождают цитокины, хемокины и различные факторы роста, которые усиливают процесс. Воспаление в начале восстановления дефекта связано с ускорением регенерации, в то время как хроническое воспаление оказывает пагубное влияние на заживление дефекта. После имплантации материалов воспалительные ответы ожидаемы. У пациента инициируется физиологическая реакция репарации, состоящая из первого острого воспалительного ответа с последующим регенеративными процессами. Этап воспаления обеспечивает соответствующие сигналы для перехода от воспаления к восстановлению и ремоделированию ткани. Степень воспалительной реакции контролируется размером повреждения тканей или органов в процедуре имплантации материала, и степенью формирования временного матрикса. Первая неделя воспалительного этапа сращения перелома характеризуется притоком воспалительных клеток, то есть, нейтрофилов, лимфоцитов и макрофагов и высвобождением различных цитокинов и факторов роста. Процесс воспаления представляет фундаментальное различие между развитием и регенерацией кости. Таким образом, модуляция воспаления имеет все более широкое распространение для контроля регенерации тканей (Santo et al., 2013).

Заживление перелома кости связано с инициацией анаболической фазы, которая характеризуется увеличением объема ткани, связанным с дифференциацией МСК, формирующих костную и сосудистую ткани (обеспечением внеклеточного матрикса). Непосредственно возле линии перелома будет формироваться хрящевая мозоль. От периферии к центральной области, по краям новых хрящевых тканей, нарастает надкостница и формируется первичная костная ткань. Одновременно с развитием хрящевой ткани, клетки, которые образуют зарождающиеся кровеносные сосуды, поступают в новообразованную кость, и дифференцируются в окружающую мышечную оболочку. Увеличение сосудистого русла, что окружает, а затем прорастает в костную мозоль, способствует притоку крови в область восстановления ткани. В то время как прогрессирует дифференцировка хондроцитов, внеклеточный матрикс хряща подвергается минерализации, и анаболическая фаза восстановления кости завершается апоптозом хондроцитов.

После анаболической фазы следует длительная катаболическая фаза, которая характеризуется уменьшением костной мозоли в объеме. В течение этой фазы происходят преимущественно катаболические процессы, например, резорбция хряща. Однако, присутствуют и конкретные анаболические процессы, такие как формирование вторичной костной ткани, инициируемое рассасыванием хряща, первичный ангиогенез. Впоследствии, когда начинается ремоделирование кости последовательно резорбируется остеокластами сначала минерализованный матрикс первичной костной ткани, а затем вторичный костный

матрикс. В то время пока ткань костной мозоли продолжает рассасываться, катаболический период характеризуется сочетанием циклов активности остеобластов и остеокластов, что способствует замещению костной мозоли на нативную костную ткань. Восстановление костного мозга происходит на заключительной стадии катаболической фазы, на которой протекают процессы ремоделирования сосудов таким образом, что прорастание сосудистого русла регрессирует, а высокая скорость кровотока возвращается на прежний уровень как до травматизации. Хотя эти процессы происходят последовательно, они существенно перекрываются непрерывным изменением популяции клеток и сигнальных процессов в регенерирующей ткани (Einhorn and Gerstenfeld, 2014).

Временная последовательность процессов восстановления обеспечивает максимальные уровни факторов роста и цитокинов, специфических для каждой стадии. Существует несколько мобильных (факторы роста, транскрипционные факторы и цитокины) и иммобилизованных (коллаген I типа, фибронектин, декорин и бигликан) макромолекул во внеклеточном матриксе кости, управляющих поведением клеток костной ткани. Некоторые из наиболее важных водорастворимых подвижных макромолекул включают тромбоцитарный фактор роста (PDGF), костный морфогенетический белок (BMP), инсулиноподобный фактор роста (ИФР, IGF), и трансформирующий фактор роста (TGF) (Santo и др., 2013). Факторами роста в формировании и восстановлении кости являются TGF-β, BMP, FGF, IGF, PDGF, Wnt, а ген sonic hedgehog (Shh) в сигнализации. Хотя существует множество факторов транскрипции, участвующих в остеогенезе, наиболее важные TAZ, Runx-2 и osterix, определяющие дифференцировку, в то же время ингибируют адипогенез. Профили экспрессии генов транскрипционных и ростовых факторов предполагают взаимную регуляцию. Например, факторы транскрипции активируют экспрессию факторов роста в ответ на сигналы факторов роста, полученных из соседних тканей, тем самым регулируя рост тканей (Polo-Corrales et al., 2014).

Восстановление костной ткани - это сложный и многофакторный процесс, условия и факторы которого важно учитывать при проектировании оптимальной конструкции для тканевой инженерии.

1.10. Мезенхимальные стволовые клетки

Наиболее перспективным направлением в тканевой инженерии является использование стволовых клеток, которые способны под воздействием определенных факторов дифференцироваться в клетки соответствующей ткани. Стволовые клетки подразделяют на три типа: мезенхимальные или стромальные стволовые клетки, эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК).

ЭСК демонстрируют отличный регенеративный потенциал, чем привлекают большой интерес исследователей в связи с их потенциальным использованием для лечения многих патологических состояний и для использования в тканевой инженерии. Растущее число работ является следствием успеха экспериментальных подходов по направленной дифференцировки ЭСК как in vitro, так и in vivo. Несмотря на это, их способность образовывать тератомы (опухоли, образующиеся в период внутриутробного развития тканей и органов), сложные условия культивирования, и плохо изученные иммуногенные свойства являются ограничением для ввода ЭСК в клиническую практику.

иПСК - это перепрограммированные взрослые соматические клетки, использование которых не ставит под угрозу целостность генома клеток и позволяет подготовить неограниченное количество пациент-специфических клеток для восстановления тканей. Применение аутологичных иПСК устраняет необходимость подавления иммунитета после трансплантации, но не избавляет от проблем, связанных со сложностью культивирования и риском образования тератомы (Peppo De and Marolt, 2013).

Однако, большую часть исследований по тканевой инженерии, в частности, по изучению остеокондуктивных и остеоиндуктивных свойств биоматериалов и матриксов на их основе проводят с использованием МСК/ЭСК.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) – относятся к классу мультипотентных клеток. Эти клетки служат предшественниками различных клеточных линий: адипогенной, хонгроденной и остеогенной (Mushahary et al., 2018). Поскольку полностью дифференцированные клетки теряют способность к пролиферации, именно мультипотентные клетки ответственны за процессы обновления тканей. МСК принимают и интерпретируют огромное количество сигналов от окружения, вследствие чего могут оперативно перемещаться в необходимое место и запускать реакции обновления и регенерации тканей (Murphy et al., 2013). МСК выделяют из тканей взрослого млекопитающего (жировой ткани, костного мозга, пуповинной крови, плаценты), и могут быть использованы для аутотрансплантации, не образуя опухолей (Peppo De and Marolt, 2013; Mushahary et al., 2018).

Основными отличительными чертами МСК, которые используются на практике для их идентификации, являются их способность к адгезии на пластике и способность к дифференцировки в различных направлениях (Pittenger et al., 1999). Однако, сейчас основным методом идентификации МСК среди других типов клеток служит иммунофенотипирование популяции по определенным поверхностным маркерам. Клетки можно относить к МСК, если на их поверхности наблюдается повышенная плотность таких поверхностных маркеров, как CD90, CD105 и CD73 и минимальная экспрессия CD34, CD45, CD14 и HLA-DR (Mushahary et al., 2018). Тем не менее было показано, что CD105 и CD73 также активно экспрессируют

фибробласты, поэтому использование этих маркеров не позволяет эффективно отличить МСК от них (Boxall and Jones, 2012).

В настоящее время для фенотипирования МСК применяют ряд признаков, утвержденных международным сообществом клеточной терапии (Dominici et al., 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 et al., 2004), что МСК мыши отличаются от человеческих по экспрессии маркеров и поведению. Согласно исследованию Боксалл (Boxall) и Джонс (Jones) (Boxall and Jones, 2012), у МСК, выделенных из крыс, наблюдается следующий фенотип: CD29, CD49e, CD73, CD90, CD105 и Stro-1 – 50-100%, CD44 – 1-50%, CD45<5% (в % от популяции клеток, которые экспрессируют вышеперечисленные маркеры), что довольно значительно отличается от фенотипа МСК человека. МСК, выделенные из различных тканей взрослого организма, обладают разной морфологией, способностью к дифференцировке и профилем экспрессии генов (Nombela-Arrieta et al., 2011). Тем не менее, простота выделения МСК, и способность к направленной дифференцировки сделали из этих клеток перспективный и широко используемый инструмент в тканевой инженерии (Uccelli et al., 2008).

Впервые МСК были выделены из костного мозга и идентифицированы более 50 лет назад (Friedenstein et al., 1970; Caplan et al., 1991). В последующие 30 лет была показана их способность дифференцироваться в клетки мезодермального происхождения (остеобласты, хондроциты, адипоциты (Piersma et al., 1985), миоциты (Wakitani et al., 1995), эндотелиальные клетки, кардиомиоциты (Mushahary et al., 2018), клетки эктодермального происхождения (нейроны) (Kopen et al., 1999), клетки эндодермального происхождения (печени, поджелудочной железы, эпителия дыхательных путей) (Sato et al., 2005; Toma et al., 2002; Mushahary et al., 2018) (Рисунок 36).

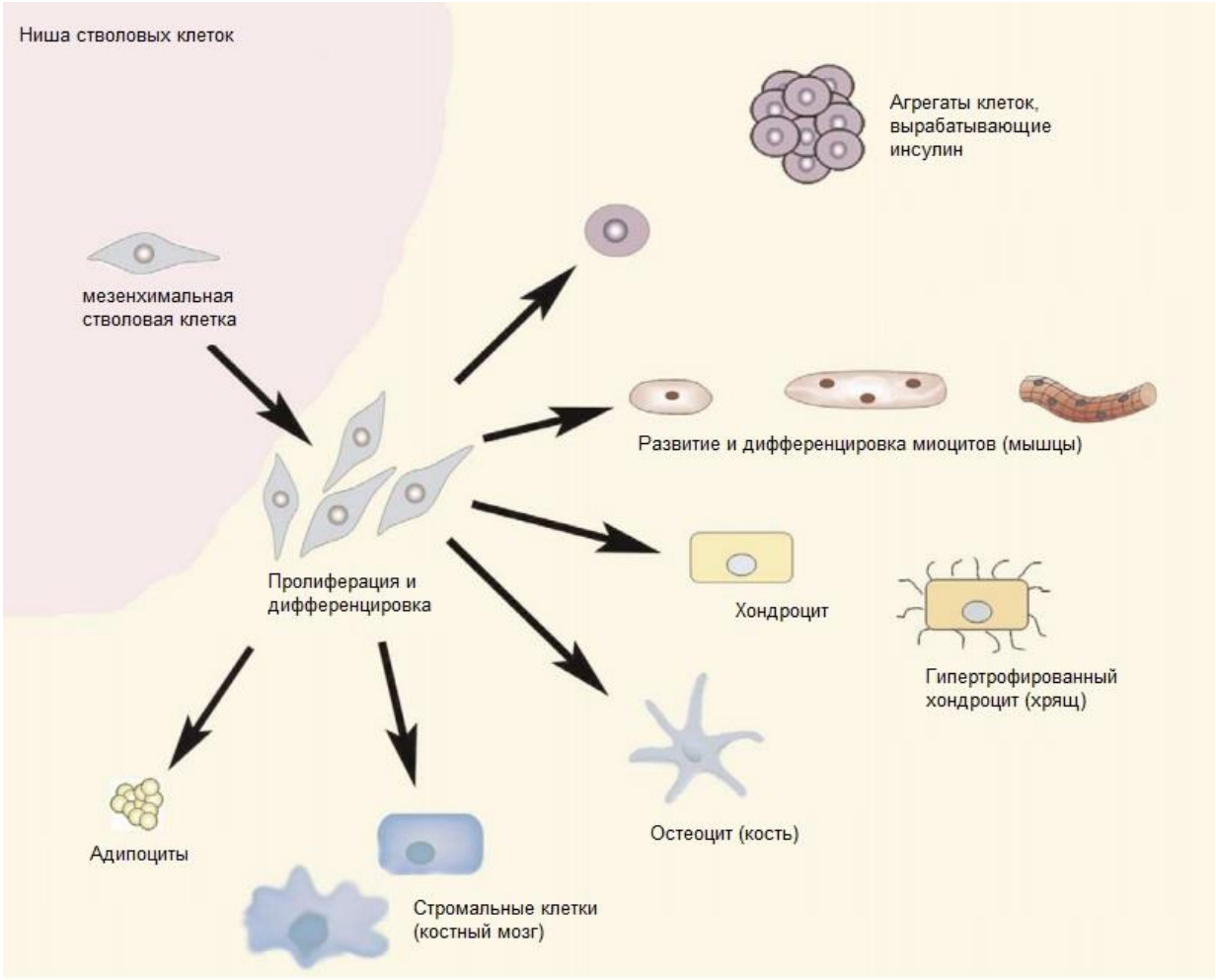


Рисунок 36. *Потенциал дифференцировки МСК (по Kode et al., 2009).*

В активации дифференцировки МСК играют роль множество факторов. Среди них можно выделить факторы физической и химической природы. Так, помимо факторов роста, цитокинов и других сигнальных молекул, выделяемыми окружающими клетками, в дифференцировке участвуют микроструктура и материал окружающего клетки материала (Baptista et al., 2019).

Факт произошедшей дифференцировки можно отслеживать по:

1) изменению соотношений поверхностных маркеров, характерных для МСК. Цитофлуориметрия со специфичными для клеточных линий маркерами позволяет определить, в каком именно направлении происходит дифференцировка;
2) морфологии клеток, визуализируемой при помощи световой, сканирующей электронной и флуоресцентной (конфокальной) микроскопии;
3) дифференциальному окрашиванию специфичных для клеточных линий продуктов жизнедеятельности. Например, окрашивание жировых капель в адипоцитах или отложений солей кальция в остеобластах;

4) измерению уровня экспрессии генов, связанных со специализацией клеток (Harting et al., 2008).

В сравнении с лекарственными препаратами МСК считаются гораздо лучшим терапевтическим агентом для терапии ряда клинических патологий и ускорения регенеративных процессов. Эти клетки могут целенаправленно продвигаться в очаг заболевания, внутри которого они начинают продуцировать сигнальные молекулы, факторы роста и цитокины, привлекающие и регулирующие действия других клеток (Murphy et al., 2013). Такое влияние приводит к противовоспалительным и иммуномодуляторным эффектам в пораженной области (Iyer and Rojas, 2008). За счет способности МСК к активации процессов ангиогенеза, ткань активно снабжается кислородом и питательными веществами, благодаря чему уменьшается риск некроза. Было показано, что МСК играют ключевую роль в приостановке апоптоза кардиомиоцитов при ишемии, а также помогают восстановлению поврежденных нейронов и фибробластов легких (Weiss et al., 2011). Все вышеперечисленное позволяет проводить слаженную и эффективную терапию ряда патологий, с минимизированным риском осложнений.

МСК проявляют также иммуномодулирующие свойства через активацию Т-хелперов 1-го типа (Th1) и снижение высвобождения интерферона-гамма клетками-киллерами (Kode et al., 2009) (Рисунок 37).

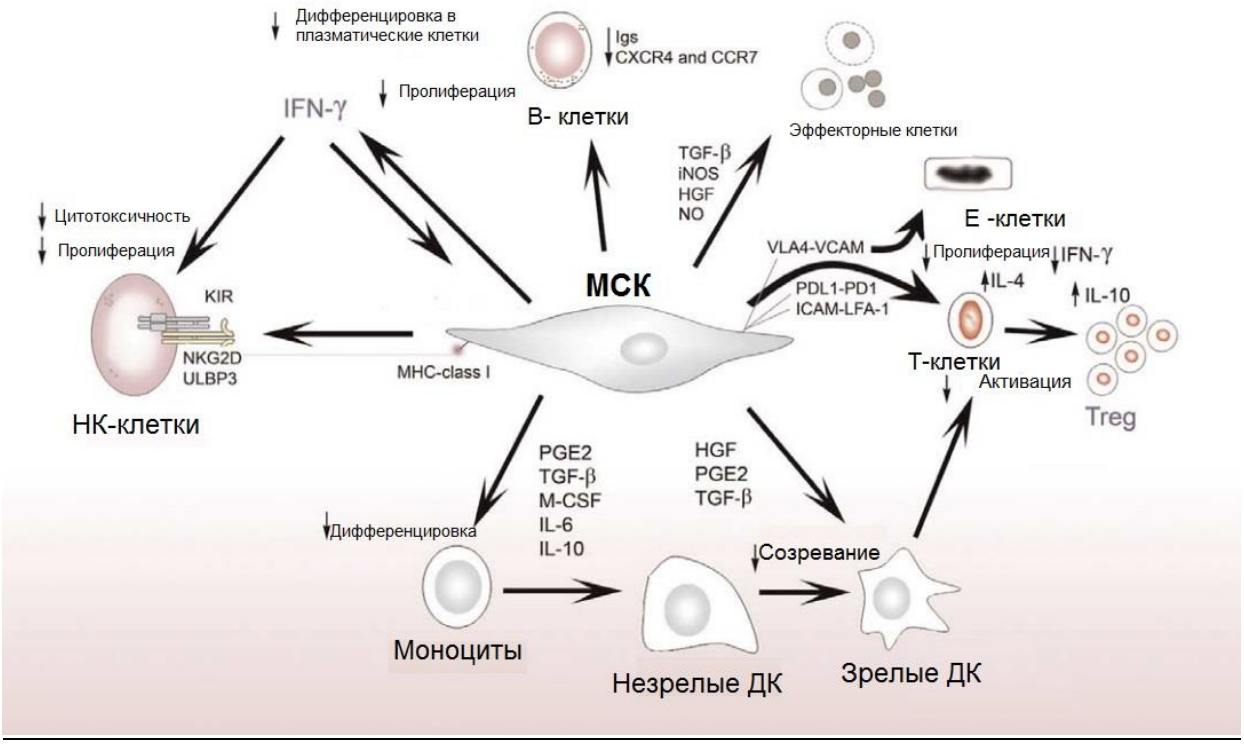


Рисунок 37. *Схема проявления иммуномодулирующих свойств МСК (по Kode et al., 2009).*

Однако, имеются сведения о том, что МСК могут оказывать и, напротив, иммуносупрессорный эффект, а также способствовать иммунному ответу у реципиента, что приводит к снижению приживаемости (Batten et al., 2007). В связи с этим в настоящее время ведутся дискуссии о возможности не только аутотрансплантации, но и аллотрансплантации МСК.

Часто МСК применяют для регенерации тканей после обширных ожогов и для медленно заживающих ран (Yagi et al., 2010). Одним из наиболее медленных и сложных процессов регенерации происходит в костной ткани (Jahangir et al., 2019). Она постоянно перестраивается в процессе роста, однако во взрослом организме эта способность постепенно утрачивается. С возрастом кости становятся все более хрупкими и различные переломы заживают медленнее и с риском осложнений.

Однако несмотря на перспективность применения МСК в регенеративной медицине, следует помнить об ограничениях, связанных с данным типом клеток, в том числе ограниченная доступность и высокая степень гетерогенности, снижение регенеративных свойств, связанных с увеличением пассажа и возрастом донора. Последнее является ограничением применения МСК для лечения дефектов костной ткани у пожилых пациентов, которые составляют значительную часть пациентов, нуждающихся в заместительной терапии костей. Серьезным недостатком терапии стволовыми клетками при обширных травмах является недостаток опорного каркаса, внутри которого и происходят процессы формирования новой здоровой ткани. Таким образом, необходимы материалы, имитирующие межклеточный матрикс и способствующие более быстрому заживлению тканей.

1.11. Использование поли-3-оксиалканоатов для разработки лекарственных систем на их основе

Одним из приоритетных направлений развития медицины и фармакологии является создание новых высокоэффективных лекарственных форм. На сегодняшний день лекарственные препараты в традиционных лекарственных формах для лечения различных хронических заболеваний (опухолевых, инфекционных, иммунных, гормональных, психических), с одной стороны, не полностью проявляют терапевтический потенциал заключенных в них лекарственных веществ (ЛВ), а, с другой стороны, не устраняют их побочного отрицательного действия. Так, большинство химиопрепаратов, применяющихся в онкологии, обладают высокой токсичностью, что вызывает тяжелые осложнения и снижает качество жизни пациента. Это могут быть поражения печени, почек, стволовых кроветворных клеток, нарушение свертываемости крови, анорексия и др. Более того, токсичностью нередко обладает сама лекарственная форма, в которую заключено действующее ЛВ. В связи с этим,

создание новых форм лекарственных препаратов, которые широко используются в клинической практике, но обладают серьезными недостатками, является перспективным направлением в фармацевтике. Новые лекарственные формы на основе микрочастиц из биодеградируемых и биосовместимых полимеров, таких как ПОА, позволит устранить многие недостатки традиционных лекарственных препаратов. Использование ПОА придает этим лекарственным системам новые свойства. Эти биополимеры способны образовывать с различными низкомолекулярными веществами композиты, которые обладают свойством последующего пролонгированного высвобождения ЛВ, что снижает его токсичность.

В настоящее время существует множество лекарственных веществ, обладающих высокой фармакологической активностью, но физико-химические свойства, которых (плохая растворимость, нестабильность, побочная химическая активность и др.) препятствуют разработки на их основе лекарственных препаратов. Между тем, молекулы ЛВ обладают кинетическими характеристиками, которые можно использовать для создания полимерных транспортных системам с управляемой доставкой таких ЛВ. Полимерные лекарственные формы позволяют обеспечивать постепенное высвобождение ЛВ в течение длительного времени, что позволяет поддерживать постоянную концентрацию ЛВ в плазме крови – такие лекарственные формы называются пролонгированными (в англоязычной литературе – sustained).

Лекарственные формы на основе ПОА стали активно использоваться в фармацевтике еще с 80-х годов прошлого века. Но наиболее интенсивно препараты с лекарственными формами на основе этих полимеров стали внедряться в фармацевтику с начала нашего века, одновременно происходил бурный рост числа научных исследований этих полимеров медицинского назначения. Придание медицинским изделиям новых терапевтических свойств за счет инкапсулирования или загрузки в них различных лекарственных веществ открывает широкие возможности для применения таких новых медицинских изделий в медицине. Разработка инъекционных систем для пролонгированного высвобождения ЛВ на основе микро- и наночастиц, изготовленных из биодеградируемых полимеров является еще более перспективным направлением в современной фармакологии. Иммобилизация ЛВ в полимерной матрице медицинского изделия или лекарственной формы в виде микро- и наночастиц и последующее его пролонгированное высвобождение обеспечивает оптимальный уровень концентрации ЛВ локально в органе или ткани в течение длительного периода времени (до нескольких месяцев), что дает эффективный фармакологический ответ. Поддержание концентрации ЛВ в течение длительного времени в терапевтических, но не токсичных концентрациях позволяет избавиться от побочных эффектов традиционных лекарственных препаратов. Среди таких побочных эффектов следует отметить повышенную токсичность,

нестабильность, неравномерную подачу ЛВ, неэффективный расход ЛВ. Применение таких терапевтических полимерных систем обеспечивает равномерное и целенаправленное высвобождение ЛВ в оптимальной дозе, что очень важно при лечении различных заболеваний, особенно хронических (Коржавых и Румянцев, 2003; Jenkins, 2007; Pillai and Panchagnula, 2001). В настоящее время как в клинической практике, так и в научных исследованиях используют следующие полимеры из этого класса: синтетические поли-2-оксипропановую (полимолочная (ПМК), полилактиды), поли-2-оксиуксусную (полигликолевая (ПГК), полигликолиды), поли-6-оксикапролактон (ПКЛ) и природные поли-3-оксимасляную (поли-3-оксибутират (ПОБ)), поли-4-оксимасляную (П4ОБ), поли-3-оксивалериановую (поли-3-оксивалерат (ПОВ), поли-3-оксигексаноат (ПОГк), поли-3-оксиоктаноат (ПОО), их сополимеры и близкие по структуре полимеры, такие как поли-р-диоксанон (ПДС) (Mokhtarzadeh et al., 2016; Lim et al., 2017; Бонарцев и др., 2011; Farah et al., 2016). В фармацевтике уже используется или разрабатывается огромный спектр различных лекарственных форм на основе ПОА, придающих им такие свойства, как: направленная доставка, пролонгированное действие, сниженная токсичность, увеличенная стабильность. С 1989 г. на фармацевтическом рынке представлены и активно используются в клинической практике целый ряд препаратов с лекарственной формой на основе ПОА: пролонги пептидных гормонов на основе микрочастиц из ПМГК для лечения рака предстательной железы (Zoladex, Lupron Depot, Trelstar, Eligard), акромегалии (Sandostatin LAR, Somatuline) и карликовости (Nutropin depot), пролонг противоопухолевого ЛВ в форме имплантируемой мембраны для лечения множественной глиобластомы (Gliadel), пролонги микрокапсулированных антибиотиков для лечения пародонтоза (Atridox, Arestin), пролонг микрокапсулированного противовоспалительного ЛВ для лечения макулярной эдемы глаза (Ozurdex), пролонг микрокапсулированного антинаркотического ЛВ для лечения алкогольной и наркотической зависимости (Vivitrol), пролонг микрокапсулированного атипического антипсихотика для лечения шизофрении (Risperdal Consta) и другие (Zhang et al., 2013).

Такое активное использование и внедрение в медицинскую практику ПОА обусловлено уникальным сочетанием их свойств: способностью к биодеградации в организме без образования токсичных продуктов, биосовместимостью с органами и тканями человека, физико-химическими свойствами (термопластичность, специфические диффузионные свойства), возможностью использования эффективных технологических процессов при их получении. Несмотря на то, что такое сочетание свойств присуще всем представителям класса ПОА, львиная доля случаев использования ПОА в фармацевтике принадлежит таким синтетическим ПОА (сПОА), как поли-2-оксипропановая (полимолочная кислота или полилактид), поли-2-оксиуксусная (полигликолевая кислота или полигликолид) и их сополимеры - полимолочные-со-полигликолевые кислоты (ПМГК). Это произошло по

нескольким причинам. Прежде всего, первые лекарственные препараты на основе синтетических ПОА, такие как Zoladex и Lupron Depot, были изготовлены из ПМГК еще в конце 80-х гг. прошлого века. Соответственно, сертификация и все испытания, доклинические и клинические, были проведены на препаратах, лекарственные формы которых были изготовлены из этих полимеров, а затем и вся статистика по клиническому использованию накапливалась именно по этим полимерам. (Farah et al., 2016, Zhang et al., 2013).

Природные ПОА являются перспективными полимерными материалами для изготовления лекарственных систем контролируемого высвобождения ЛВ. Для разработки лекарственных систем на основе ПОБ и его сополимеров были использованы различные ЛВ: модельные ЛВ (2,7-дихлорофлуоресцеин (Gursel et al., 1995), декстран-ФИТЦ (Li et al., 2006), метиловый красный (Akhtar et al., 1991; Akhtar et al., 1992), 7-гидроксиэтилтеофиллин (Korsatko et al., 1983; Korsatko et al., 1984), кальцеин и суданový красный 5Б (Oil Red O) (Pignatello et al., 2009), родамин В, изотиоцианат (Xiong et al., 2010), тимохинон (Shah et al., 2010)), антибиотики и антибактериальные ЛВ (рифампицин (Kassab et al., 1997; Kassab et al., 1999), тетрациклин (Sendil et al., 1999), цефоперазон и гентамицин (Gursel et al., 2002; Francis et al., 2011), сульперазон и дуацид (Turesin et al., 2001; Turesin et al., 2000; Gursel et al., 2001; Korkusuz et al., 2001), сульбактам и цефоперазон (Yagmurlu et al., 1999), фузидиевая кислота (Yang et al., 2009), нитрофурал (Kosenko et al., 2007), норфлоксацин (Abdelwahab et al., 2018), азитромицин (Zhang et al., 2014), цефтиофур (Vilos et al., 2014)), противоопухолевые ЛВ (5-флуороурацил (Khang et al., 2001), 2',3'-диацил-5-флуоро-2'-деоксиуридин (Kawaguchi et al., 1992), паклитаксел (Бонарцев и др., 2012; Bonartsev et al., 2017; Ermakova et al., 2017; Зернов и др., 2017; Cheng et al., 2018; Gagliardi et al., 2010; Löbler et al., 2011), доцетаксел (Vardhan et al., 2017), рубомицин (Shishatskaya et al., 2008), такролимус (Gagliardi et al., 2010), хлорамбуцил и этопозид (Filatova et al., 2012), доксорубицин (Şahin et al., 2018)), противовоспалительные ЛВ (индометацин (Бонарцев и др., 2006), флурбипрофен (Coimbra et al., 2008), ибупрофен (Wang et al., 2007); триамцинолона ацетонид (Löbler et al., 2011)), анальгетики (морфин, гидроксиморфин, кодеин, бупивакаин (Keskin et al., 2004), трамадол (Salman et al., 2003)), антитромбогенные ЛВ (дипиридамол (Бонарцев и др., 2006; Лившиц и др., 2009), донор оксида азота FPTO (Bonartsev et al., 2005; Bonartsev et al., 2007), нимодипин (Riekes et al., 2013), фелодипин (Bazzo et al., 2012)), гипотензивные (манидипин гидрохлорид (Barboza et al., 2014)), иммуносупрессоры (финголимод (Rezaie Shirmard et al., 2017)), гормональные контрацептивы (левоноргестрел (Lu et al., 2001), модельные и терапевтические белки и пептиды (бычий сывороточный альбумин (Zhu et al., 2009, Atkins and Peacock, 1996; Yilgor et al., 2010), фактор роста гепатоцитов (Zhu et al., 2009), микобактериальный белок для получения вакцин (Parlane et al., 2012), костный

морфогенетический белок (Yilgor et al., 2009; Yilgor et al., 2010), нафарелин (Alizadeh et al., 2018), инсулин (Peng et al., 2012; Peng et al., 2013)).

Для получения содержащих ЛВ полимерных изделий и микро- и наночастиц на основе ПОБ были использованы различные методы: осаждение из раствора (Akhtar et al., 1991; Akhtar et al., 1992; Korsatko et al., 1983; Korsatko et al., 1984; Abdelwahab et al., 2018; Gagliardi et al., 2010), одно- двух- и многоэтапное эмульгирование (Kassab et al., 1997; Kassab et al., 1999; Sendil et al., 1999; Gursel et al., 2002; Francis et al., 2011; Turesin et al., 2001; Turesin et al., 2000; Gursel et al., 2001; Korkusuz et al., 2001; Wang et al., 2007; Şahin et al., 2018; Alizadeh et al., 2018; Pignatello et al., 2009; Atkins and Peacock, 1996; Shah et al., 2010; Francis et al., 2011), распылительное высушивание (Stefanescu et al., 2011; Зернов и др., 2017), послойная самосборка в растворе (Coimbra et al., 2008; Wang et al., 2007), диализ (Errico et al., 2009), осаждение с помощью углекислого газа в сверхкритическом состоянии (Costa et al., 2007), электроформование (Zhang et al., 2014).

Для изготовления ЛВ-содержащих медицинских изделий и лекарственных форм были использованы как гомополимер ПОБ (Errico et al., 2009, Lu et al., 2001; Gursel et al., 1995; Korsatko et al., 1984; Xiong et al., 2010; Francis et al., 2011; Löbler et al., 2011; Зернов et al., 2017), так и его различные сополимеры: поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат (Coimbra et al., 2008; Wang et al., 2007, Zhu et al., 2009, Şahin et al., 2018; Alizadeh et al., 2018; Rezaie Shirmard et al., 2017; Vardhan et al., 2017; Atkins and Peacock, 1996; Turesin et al., 2001; Gagliardi et al., 2010; Yilgor et al., 2010; Vilos et al., 2014), поли-3-оксибутират-4-оксивалерат (Turesin et al., 2001; Turesin et al., 2000; Gursel et al., 2001; Korkusuz et al., 2001, Löbler et al., 2011), поли-3-оксибутират-со-3-оксигексаноат (Xiong et al., 2010; Peng et al., 2012; Peng et al., 2013), поли-3-оксибутират-со-3-оксиоктаноат (Zhang et al., 2014), поли-3-оксибутират-со-ε-капролактон и поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат- ε-капролактон (Pignatello et al., 2009), поли-3-оксибутират-со-b-поли(2-(диметиламино)этил метакрилат) (Cheng et al., 2018) а также композиты с другими полимерами и веществами: полилактид-со-гликолидом (Koyama and Doi, 1995), ПЭГ и оксидом никеля (Abdelwahab et al., 2018), монометокси-ПЭГ (Shah et al., 2010), альгинатом и полоксамером 407 (Alizadeh et al., 2018), поли-2-гидроксиэтилметакрилатом (Keskin et al., 2004), фосфолипидами (Peng et al., 2012; Peng et al., 2013).

Были получены экспериментальные объекты (пленки) (Abdelwahab et al., 2018), прототипы медицинских изделий (Gursel et al., 2001; Korkusuz et al., 2001; Zhu et al., 2009; Gagliardi et al., 2010; Löbler et al., 2011), а также микрочастицы (Yang et al., 2009; Khang et al., 2001; Kawaguchi et al., 1992; Şahin et al., 2018; Cheng et al., 2018; Alizadeh et al., 2018; Vardhan et al., 2017; Rezaie Shirmard et al., 2017; Pignatello et al., 2009; Francis et al., 2011; Зернов и др.,

2017), и наночастицы (Zhu et al., 2009; Errico et al., 2009; Xiong et al., 2010; Yilgor et al., 2010; Shah et al., 2010; Peng et al., 2012; Peng et al., 2013) содержащие ЛВ.

Первая лекарственная форма контролируемого высвобождения ЛВ на основе ПОБ была разработана Корсатко (Korsatko) с соавторами, которые показали быстрое высвобождение инкапсулированного ЛВ, 7-гидроксиэтилтеофиллина, из таблеток на основе ПОБ (с молекулярной массой 2000 кДа), которое сопровождалось потерей массы этих таблеток при их подкожной имплантации. Авторы сделали вывод о том, что ПОБ с молекулярной массой свыше 100 кДа нежелательно использовать для изготовления форм пролонгированного высвобождения ЛВ (Korsatko et al., 1983; Korsatko et al., 1984).

Более детально влияние химического строения ЛВ и молекулярной массы ПОБ на кинетику высвобождения ЛВ было исследовано в работе Кавагучи (Kawaguchi) (Kawaguchi et al., 1992). Микросферы диаметром от 100 до 300 мкм, изготовленные из ПОБ различной молекулярной массы (65, 135 и 450 кДа) были загружены модельным ЛВ 5-фтор-2’деоксиуридином (ФДУ). В зависимости от природы замещаемого в эфирной группе радикала (пропианата, бутирата или пентаноата) гидрофильность (растворимость в воде) этого соединения изменялась от 70 мг/мл для самого ФДУ до 0,1 мг/мл для бутирил-ФДУ. Таким образом, в работе показана возможность регуляции скорости высвобождения ЛВ путем смещения гидрофильно-гидрофобного баланса в последовательности пропионил-ФДУ > бутирил-ФДУ > пентаноил-ФДУ. Кроме того, было исследовано влияние молекулярной массы ПОБ на кинетику высвобождения этих ЛВ. Скорость высвобождения ЛВ из микросфер, изготовленных из низкомолекулярного ПОБ (65 кДа) для производных ФДУ была значительно выше по сравнению со скоростью высвобождения этого ЛВ из микросфер на основе высокомолекулярного ПОБ (135 и 450 кДа). Было также исследовано влияние массовой доли загруженного в микросферы ЛВ на кинетику его высвобождения: чем больше была загрузка ЛВ в микросферы, тем быстрее ФДУ и его производные высвобождались в последствие из них (Kawaguchi et al., 1992). Большое значение гидрофильности как ЛВ, так и полимеров на кинетику высвобождения ЛВ было продемонстрировано и при исследовании других ПОА (Korzhikov et al., 2016; Frank et al., 2005).

В другой работе было исследовано высвобождение низкомолекулярных ЛВ из ПОБ и показали, что высвобождение ЛВ связано с увеличением проницаемости воды и формированием пор в полимерной матрице (Pouton and Akhtar, 1996). Эффективность загрузки и кинетика высвобождения модельного ЛВ, метилового красного, из полимерной матрицы ПОБ, полученной путем кристаллизации из расплава, зависели от кинетики кристаллизации и наноструктуры кристаллических областей полимера, тогда как общая степень кристалличности не влияла на кинетику высвобождения ЛВ. Высвобождение метилового красного происходило

в течение более чем 7-ми суток с начальным этапом быстрого высвобождения ("взрывной эффект" или "burst effect") и длительным периодом относительно равномерного высвобождения. Причем, "взрывной эффект" был выражен значительно больше при высвобождении ЛВ из полимерной пленки, сформированной путем кристаллизации при 110˚С, чем из пленки ПОБ, полученной кристаллизацией при 60˚С. Ранее было показано, что кристаллические области ПОБ непроницаемы для молекул ЛВ и по этой причине препятствуют его диффузии в полимерной матрице (Pouton and Akhtar, 1996; Iordanskii et al., 2006). Формирование кристаллических структур приводит к увеличению пористости полимерной матрицы, в результате чего при помещении пленки ПОБ в водный раствор образуется водная фаза, заполняющая сформированную систему пор, в которой и движутся молекулы ЛВ. Этим и может объясняться высокая скорость высвобождения ЛВ из полимерной матрицы с высокой степенью кристалличности, при этом кристаллиты не препятствуют его движению (Akhtar et al., 1991; Akhtar et al., 1992). Эти результаты подтверждает данные по исследованию кинетики высвобождения модельного ЛВ, рисперидона, из микрочастиц на основе различных ПОА аморфных и частично кристаллических. Высвобождение рисперидона из частично кристаллических поли-L-лактида, поли-ε-капролактона и полипентадекалактона происходило значительно быстрее и в три стадии по сравнению с медленным и двустадийным высвобождением ЛВ из аморфных поли-L,D-лактида и поли-лактид-ко-гликолида. Хотя различие в кинетике высвобождения ЛВ могло быть связано и с разной гидрофильностью используемых в работе полимеров (Korzhikov et al., 2016). Однако в другой работе при исследовании высвобождения модельного ЛВ, папаверина, из микрочастиц на основе частично кристаллического ПОА – поли-ε-капролактона, напротив, было показано, что при повышении молекулярной массы полимера скорость высвобождения ЛВ увеличивалась, что было сопряжено с падением общей кристалличности у более высокомолекулярного поли-ε-капролактона. Причем, более правильная кристаллическая структура полимера и ламели большего размера препятствуют высвобождению ЛВ из полимерной матрицы, приводя к более равномерному и медленному высвобождению ЛВ из полимерных микрочастиц (Jeong et al., 2003). Замедление выхода ЛВ из полимера из-за повышения его кристалличности было показано при исследовании наночастиц из различных полиэфиров полипропилена с различными дикарбоновыми кислотами, обладающими степенью кристалличности от 29,8 до 67,5%. Скорость и величина высвобождения модельного ЛВ солянокислого ропинирола из наночастиц на основе этих полимеров была тем меньше, чем больше была степень их кристалличности (Karavelidis et al., 2011). Такой же эффект наблюдался и при высвобождении лидокаина из пленок, изготовленных из частично-кристаллического и аморфного полилактида (Frank et al., 2005). Однако исследование высвобождения модельных ЛВ, кальцеина и

суданового красного 5Б (Oil Red O) из наночастиц на основе сополимеров ПОБ и ПОБВ с поли-ε-капролактоном показало, что кристалличность сополимеров влияет лишь на размер частиц, тогда как молекулярная масса сополимеров влияет на эффективность загрузки и кинетику высвобождения этих ЛВ (Pignatello et al., 2009). В другой работе при исследовании кинетики высвобождения рифампицина из микросфер, изготовленных из ПОБ, было показано, что основное влияние на кинетику высвобождения ЛВ имеет диаметр микросфер и массовая доля загруженного в микросферы ЛВ (Kassab et al., 1997).

Физико-химические свойства ПОБ и других ПОА благодаря которым можно загрузить полимерную матрицу лекарственным веществом и добиться его пролонгированного высвобождения с заданной скоростью и продолжительностью были использованы для разработки различных лекарственных форм. Была показана фармакологическая активность и исследована токсичность in vitro и in vivo некоторых из таких медицинских изделий и лекарственных форм на основе ПОА как вспомогательного вещества: антибактериальная активность (Abdelwahab et al., 2018; Vilos et al., 2014), цитотоксичность и противоопухолевая активность на культурах опухолевых клеток млекопитающих (Şahin et al., 2018; Xiong et al., 2010; Zhang et al., 2014), биобезопасность и терапевтическая эффективность на лабораторных крысах и мышах (Kassab et al., 1999; Gursel et al., 2001; Korkusuz et al., 2001; Yagmurlu et al., 1999; Bonartsev et al., 2017; Ermakova et al., 2017; Salman et al., 2003). Так, нами было показано, что пленки из ПОБ, содержащие дипиридамол или индометацин, а также микрочастицы из ПОБ, загруженные цитостатиком паклитакселом, вызывают довольно мягкую локальную тканевую реакцию, их токсичность была минимальна (Ermakova et al., 2017). Микросферы, загруженные анальгетиком трамадолом, вообще практически не оказывали токсического эффекта. Но при этом эти микросферы благодаря пролонгированному высвобождению из них трамадола оказывали обезболивающее действие при эпидуральной анестезии в течение 21 часа, тогда как эквивалентная доза трамадола в традиционной лекарственной форме, вызывала обезболивание только в течение 5 часов (Salman et al., 2003). Были получены также микрочастицы из поли-2-гидроксиэтилметакрилатом с оболочкой из сополимера ПОБ с 3-оксивалератом, загруженные различными обезболивающими ЛВ: гидроморфином, морфином, кодеином и бупивакаином. При использовании теста болевой чувствительности на лабораторных крысах было показано, что благодаря пролонгированному высвобождению (более 24 часов) гидроморфин и морфин вызывают обезболивание в течение 2-3 сут., кодеин и бупивакаин – 2 сут. (Keskin et al., 2004). Имплантаты из сополимеров ПОБ с 3-оксивалератом и 4-оксибутиратом, содержащие антибиотик сульперазон или дезинфицирующее средство дуацид, были исследованы при их внутрикостной имплантации на модели остеомиелита, вызванной *Staphylococcus aureus*. Было показано, что имплантаты полностью подавляли

инфекционный процесс, который не проявлялся в течение 6 недель, при этом полное высвобождение ЛВ происходило в течение 1 недели (Gursel et al., 2001; Korkusuz et al., 2001). Другая противобактериальная лекарственная форма была разработана на основе микрочастиц из ПОБО, загруженных антибиотиком ацитромицином. Исследование фармакокинетики показало пролонгированное поддержание терапевтических концентраций ЛВ (Zhang et al., 2014). Антибактериальная эффективность микрочастиц, загруженных цефтиофуром, была продемонстрирована на крысах, инфицированных *Salmonella Typhimurium* (Vilos et al., 2014). Была разработана дренажная система в виде трубочки из композита ПОБ с ПОБ4ОБ, в полимерную матрицу которых были одновременно введены паклитаксел и триамцинолона ацетонид. Была показана высокая биосовместимость изделия с тканями глаза и продемонстрирована его способность подавлять фиброз для лечения глаукомы (Löbler et al., 2011). Была разработана пролонгированная форма инсулина на основе наночастиц из композита ПОБО с фосфолипидами, помещенных в термочувствительный гидрогель. Эта форма обеспечивала высвобождение инсулина в течение более чем 16 сут., что вызывало при подкожном введении пролонгированный гипогликемический эффект в течение более чем 5 сут. у крыс с моделью диабета (Peng et al., 2012; Peng et al., 2013). Были получены микрочастицы, загруженные антагонистом кальция манидипином гидрохлоридом, и показано, что они обеспечивают пролонгированную стабилизацию артериального давления у крыс с моделью гипертензии (Barboza et al., 2014).

Были разработаны лекарственные формы на основе ПОА для пролонгированного противоопухолевого действия. Так, на собаках была исследована терапевтическая эффективность эмболизации почки при использовании микросфер из ПОБ. Сопоставление почечных ангиограмм, полученных до и после эмболизации, и данные соответствующего гистологического исследования показали высокую эффективность применения полимерных микросфер в качестве альтернативного химиоэмболизующего агента (Kassab et al., 1999). Другая лекарственная форма на основе микрочастиц из ПОБ, загруженных противоопухолевыми действующими веществами, бутирил-флуороурацилом-dR и пентаноил-флуороурацилом-dR при внутрибрюшинном введении лабораторным мышам с моделью лейкемии P388 продемонстрировала высокую эффективность в течение 5 дней (Kawaguchi et al., 1992). Нами были разработана пролонгированная противоопухолевая форма на основе микрочастиц из ПОБ, загруженных паклитакселом. Доклинические исследования этой пролонгированной противоопухолевой лекарственной формы показали терапевтическую эффективность при лечении опухолевых заболеваний на моделях асцитной опухоли Эрлиха (штамм ELD), солидной эпидермальной высокометастазирующей карциномы легкого Льюис (LLC), карциномы молочной железы РМЖ-1 и плазмоцитомы МОПС-406, имплантированных и

развивающихся в брюшной полости иммунокомпетентных или иммунодефицитных мышей BDF1 и Balb/c (Bonartsev et al., 2017; Ermakova et al., 2017).

Таким образом, природные свойства ПОБ и других ПОА, определяющие, в частности, наноструктуру и диффузионные свойства полимера, позволяют разрабатывать различные лекарственные системы на основе этих биополимеров. А возможность управления свойствами этих полимеров при их биотехнологическом получении позволяет получать полимеры с заданными свойствами, обеспечивающими ту кинетику высвобождения ЛВ, которая необходима для той или иной лекарственной формы пролонгированного и контролируемого высвобождения. Полученные данные свидетельствуют о широких перспективах применения лекарственных форм пролонгированного действия и направленной доставки на основе микро- и наночастиц из ПОА для лечения различных заболеваний: опухолевых, сердечно-сосудистых, инфекционных (туберкулеза, остеомиелита), аутоиммунных (артрита) и других.

Проведенный обзор научной литературы показывает, что долгое время поли-3-оксибутират, рассматривали и применяли в биомедицинских исследованиях как конструкционные материалы с удовлетворительными механическими свойствами, т.е. как аналоги синтетическим термопластикам с соответствующей биомедицинской функциональностью (Farah, 2016; Hasirci, 2018; Voinova, 2019; Bonartsev, 2019; Sikhosana, 2021). Такой взгляд на природные поли-3-оксиалканоаты был и остается обусловлен традиционной системой исследования материалов медицинского назначения, где силами одной исследовательской лаборатории (научной группы, института, научного центра, R&D подразделения компании) или в рамках одного комплексного исследовательского проекта изучается то или иное свойство или группа свойств полимера, непосредственно необходимых для разработки уже спроектированного медицинского изделия с предварительно запланированной функциональностью (Castellano, 2014; Fan, 2014; Karahaliloğlu, 2015; Lim, 2017). Тогда как фундаментальных исследований биоматериалов в области столь ориентированной на прикладные разработки биоинженерии гораздо меньше (Lobler, 2002; Paula, 2020; Peñaloza, 2017). Но даже самые комплексные из этих исследований не охватывают все уровни междисциплинарного биоинженерного исследования биополимеров, как правило, отсутствует начальный уровень - биотехнологического получения полимеров с помощью бактериальных штаммов-продуцентов или конечный уровень – исследования биофункциональности полимеров на экспериментальных моделях *in vivo* на лабораторных животных в тесном контакте со специалистами-медиками. Работы такого уровня охвата научных компетенций крайне редки, однако, именно такой комплексный биоинженерный подход и дает надежду составить максимально полную картину биофункциональности того или иного биоматериала, в данном случае - поли-3-оксибутирата.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ[2]

2.1. Биосинтез, выделение, очистка и определение химического состава полимеров

2.1.1. Материалы для микробиологического биосинтеза

В работе были использованы компоненты культуральной среды: $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, $CaCO_3$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, цитрат натрия, $CaCl_2$, KH_2PO_4, сахароза, агар; производные этиленгликоля (ЭГ): диэтиленгликоль (ДЭГ), триэтиленгликоль (ТЭГ), полиэтиленгликоль 200 Да (ПЭГ 200), полиэтиленгликоль 300 Да (ПЭГ 200), полиэтиленгликоль 400 Да (ПЭГ 200) и полиэтиленгликоль 1000 Да (ПЭГ 1000); натриевые соли карбоновых кислот: пропионовой (пропановой) (ПК), валериановой (пентановой) (ВК), 4-метилвалериановой (4-метилпентановой) (4МВК), гексановой (ГкК), гептановой (ГпК), октановой (ОК), додекановой (ДК); фосфатно-солевой буфер (БСФ). Все материалы были заказаны в компании Сигма-Алрич (Sigma-Aldrich (Merck), Германия) и использованы в том виде, в котором предоставлены поставщиком.

---

[2] В главе изложено описания методов, опубликованные в следующих научных статьях автора:

1. **Бонарцев А.П.**, Яковлев С.Г., Филатова Е.В., Соболева Г.М., Махина Т.К., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В., Попов В.О., Кирпичников М.П. Пролонгированное высвобождение противоопухолевого лекарственного вещества, паклитаксела, из микросфер на основе поли-3-оксибутирата // Биомедицинская химия. – 2011. – Т. 57. – № 2. – С. 232–240.
2. 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, культивиируемых на полимерных пленках // Биомедицинская химия. – 2012. – Т. 58. – №. 5. – С. 579–591.
3. Зернов А.Л., Иванов Е.А., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Самсонова О.В., Феофанов А.В., Волков А.В., Гажва Ю.В., Рябова В.М., Мураев А.А., Иванов С.Ю., Шайтан К.В., Бонарцева Г.А., **Бонарцев А.П.** Микрокапсулы из поли(3-гидроксибутирата) для пролонгированного высвобождения белка // Современные технологии в медицине. – 2015. – Т. 7. – № 4. – С. 50–57.
4. Андреева Н.В., **Бонарцев А.П.**, Жаркова И.И., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Харитонова Е.П., Воинова В.В., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В., Белявский А.В. Культивирование мезенхимальных стволовых клеток мыши на матриксах из поли-3-оксибутирата // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2015. – № 2. – С. 114–119.
5. **Бонарцев А. П.**, Бонарцева Г.А., Мышкина В.Л., Воинова В.В., Махина Т.К., Жаркова И.И., Яковлев С.Г., Зернов А.Л., Иванова Э.В., Акулина Е.А., Кузнецова Е.С., Жуйков В.А., Алексеева С.Г., Подгорский В.В., Бессонов И.В., Копицына М.Н., Морозов А.С., Милановский Е.Ю., Тюгай З.Н., Быкова Г.С., Кирпичников М.П., Шайтан К.В. Биосинтез сополимера поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерат штаммом Azotobacter chroococcum 7B // Acta Naturae. – 2016. – Т. 8. – № 3(30). – С. 85–96.
6. Мураев А.А., **Бонарцев А.П.**, Гажва Ю.В., Рябова В.М., Волков А.В., Жаркова И.И., Стамболиев И.А., Кузнецова Е.С., Жуйков В.А., Мышкина В.Л., Махина Т.К., Бонарцева Г.А., Яковлев С.Г., Кудряшова К.С., Воинова В.В.; Шайтан К.В., Иванов С.Ю. Разработка и доклинические исследования ортотопических костных имплантатов на основе гибридной конструкции из поли-3-оксибутирата и альгината натрия // Современные технологии в медицине. – 2016. – Т. 8. – № 4. – С. 42–50.
7. Зернов А.Л., **Бонарцев А.П.**, Яковлев С.Г., Мышкина В.Л., Махина Т.К., Паршина Е.С., Харитонова Е.П., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В. Микрочастицы из низкомолекулярного поли(3-гидроксибутирата) для пролонгированного высвобождения паклитаксела, полученные методом пьезоэлектрического распылительного высушивания // Российские нанотехнологии. – 2017. – Т. 12. – № 3–4. – С. 84–90.
8. Жуйков В.А., **Бонарцев А.П.**, Махина Т.К., Мышкина В.Л., Воинова В.В., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В. Гидролитическая деградация поли-3-оксибутирата и его сополимера с 3-оксивалератом различной молекулярной массы in vitro // Биофизика. – 2018. – Т. 63. – № 2. – С. 249–257.

9. **Бонарцев А.П.**, Воинова В.В., Кузнецова Е.С., Жаркова И.И., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Чеснокова Д.В., Кудряшова К.С., Феофанов А.В., Шайтан К.В., Бонарцева Г.А. Адсорбция БСА пористыми матриксами на основе БиоПЭГилированного поли-3-оксибутирата // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54. – №. 4. – С. 366–374.
10. **Бонарцев А.П.**, Воинова В.В., Акулина Е.А., Дудун А.А., Жаркова И.И., Жуйков В.А., Меньших К.А., Чеснокова Д.В., Махина Т.К., Бонарцева Г.А., Парий И.О., Сурменев Р.А., Сурменева М.А. Пьезоэлектрические свойства поли-3-оксибутирата-со-3-оксивалерата-полиэтиленгликоля, полученного методом контролируемого биосинтеза // Биологический журнал: эл.научный журнал. –2019 – №10(10).
11. **Bonartsev A.P.**, Boskhomodgiev A.P., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A., Rebrov A.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Yakovlev S.A., Filatova E.A., Ivanov E.A., Bagrov D.V., Zaikov G.E. Hydrolytic Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate), Polylactide and their derivatives: kinetics, crystallinity, and surface morphology // Molecular Crystals and Liquid Crystals. – 2012. – V. 556. – N. 1. – P. 288–300.
12. **Bonartsev A.P.**, Yakovlev S.G., Boskhomdzhiev A.P., Zharkova I.I., Bagrov D.V., Myshkina V.L., Mahina T.K., Charitonova E.P., Samsonova O.V., Zernov A.L., Zhuikov V.A., Efremov Yu.M., Voinova V.V., Bonartseva G.A., Shaitan K.V. The terpolymer produced by Azotobacter chroococcum 7B: effect of surface properties on cell attachment // PLoS ONE, – 2013. – V. 8. N. 2. P. e57200.
13. **Bonartsev A.P.**, Yakovlev S.G., Zharkova I.I., Boskhomdzhiev A.P., Bagrov D.V., Myshkina V.L., Makhina T.K., Kharitonova E.P., Samsonova O.V., Feofanov A.V., Voinova V.V., Zernov A.L., Efremov Yu.M., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P. Cell attachment on poly(3-hydroxybutyrate)-poly(ethylene glycol) copolymer produced by Azotobacter chroococcum 7B // BMC Biochemistry. – 2013. – V. 14. – P. 12.
14. **Bonartsev A.P.**, Zharkova I.I., Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Makhina T.K., Zernov A.L., Kudryashova K.S., Feofanov A.V., Akulina E.A., Ivanova E.V., Zhuikov V.A., Volkov A.V., Andreeva N.V., Voinova V.V., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P. Adhesion and growth of bone marrow mesenchymal stem cells on 3D scaffolds from poly(3-hydroxybutyrate)-poly(ethylene glycol) copolymer // Journal of Biomaterials and Tissue Engineering. – 2016. – V. 6. – N. 1. – P. 42–52.
15. **Bonartsev A.P.**, Zernov A.L., Yakovlev S.G., Zharkova I.I., Myshkina V.L., Mahina T.K., Bonartseva G.A., Andronova N.V., Smirnova G.B., Borisova J.A., Kalishjan M.S., Shaitan K.V., Treshalina H.M. New poly(3-hydroxybutyrate) microparticles with paclitaxel sustained release for intraperitoneal administration // Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry. – 2017. – V. 17. – N. 3. – P. 434–441.
16. **Bonartsev A.P.**, Zharkova I.I., Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Mahina T.K., Voinova V.V., Zernov A.L., Zhuikov V.A., Akoulina E.A., Ivanova E.V., Kuznetsova E.S., Shaitan K.V., Bonartseva G.A. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) copolymers by Azotobacter chroococcum 7B: a precursor feeding strategy // Preparative Biochemistry and Biotechnology. – 2017. – V. 47. – N. 2. – P. 173–184.
17. Ermakova N.P., **Bonartsev A.P.**, Zernov A.L., Konyaeva O.I., Kulbachevskaya N.Y., Merkulova I.B., Abramova T.V., Chaley V.A., Yakovlev S.G., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Bukhman V.M. Preclinical toxicity evaluation of paclitaxel biopolymer formulation // Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry. – 2017. – V. 17. – N. 15. – P. 1661–1668.
18. Zhuikov V.A., **Bonartsev A.P.**, Zharkova I. I., Bykova G.S., Taraskin N.Y., Kireynov A.V., Kopitsyna M.N., Bagrov D.V., Bonartseva G.A., Shaitan K.V. Effect of poly(ethylene glycol) on the ultrastructure and physicochemical properties of the poly(3-hydroxybutyrate) // Macromolecular Symposia. – 2017. – V. 375. – P. 1600189.
19. Zhuikov V.A., **Bonartsev A.P.**, Bagrov D.V., Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Makhina T.K., Bessonov I.V., Kopitsyna M.N., Morozov A.S., Rusakov A.A., Useinov A.S., Shaitan K.V., Bonartseva G.A. Mechanics and surface ultrastructure changes of poly(3-hydroxybutyrate) films during enzymatic degradation in pancreatic lipase solution // Molecular Crystals and Liquid Crystals. – 2017. – V. 648. – N. 1. – P. 236–243.
20. **Bonartsev A.P.**, Zharkova I.I., Voinova V.V., Kuznetsova E.S., Zhuikov V.A., Makhina T.K., Myshkina V.L., Potashnikova D.M., Chesnokova D.V., Khaydapova D.D., Bonartseva G.A., Shaitan K.V. Poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ethylene glycol) scaffolds with different microstructure: the effect on growth of mesenchymal stem cells // 3 Biotech. – 2018. – V. 8. – P. 328.
21. Zhuikov V.A., Zhuikova Y.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Rusakov A., Useinov A., Voinova V.V., Bonartseva G.A., Berlin A.A., **Bonartsev A.P.**, Iordanskii A.L. Comparative structure-property characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)s films under hydrolytic and enzymatic degradation: finding a transition point in 3-hydroxyvalerate content // Polymers (Basel). – 2020. – V. 12. – N. 3. – P. E728.
22. Volkov A.V., Muraev A.A., Zharkova I.I., Voinova V.V., Akoulina E.A., Zhuikov V.A., Khaydapova D.D., Chesnokova D.V., Menshikh K.A., Dudun A.A., Makhina T.K., Bonartseva G.A., Asfarov T.F., Stamboliev I.A., Gazhva Y.V., Ryabova V.M., Zlatev L.H., Ivanov S.Y., Shaitan K.V., **Bonartsev A.P.** Poly(3-hydroxybutyrate)/hydroxyapatite/alginate scaffolds seeded with mesenchymal stem cells enhance the regeneration of critical-sized bone defect // Materials Science and Engineering: C, Materials for biological application. – 2020. – V. 114. – P. 110991.
23. Zhuikov V.A., Akoulina E.A., Chesnokova D.V., Wenhao Y., Makhina T.K., Demyanova I.V., Zhuikova Y.V., Voinova V.V., Belishev N.V., Surmenev R.A., Surmeneva M.A., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., **Bonartsev A.P.** The growth of 3T3 fibroblasts on PHB, PLA and PHB/PLA blend films at different stages of their biodegradation in vitro // Polymers. – 2021. – V. 13. – P. 108.

2.1.2. Культивирование штамма *Azotobacter chroococcum* 7Б

Для биосинтеза сополимеров ПОБ был использован штамм-продуцент ПОБ - *Azotobacter chroococcum* 7В. Это свободноживущая (несимбиотическая) почвенная азотфиксирующая бактерия, способная к сверхпродукции ПОБ (до 80% от сухого веса клеток). Ранее этот штамм-продуцент был отобран, как наиболее эффективный продуцент ПОБ (Bonartseva et al., 2001a; Bonartseva et al., 2001б). 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, and 20 г/л агара.

Все эксперименты были проведены в лабораторных условиях. Для достижения высокой продуктивности клеток культуру *A. chroococcum* 7Б выращивали в качалочных колбах в микробиологической качалке Innova 43 (New Brunswick Scientific, США) при постоянном перемешивании при скорости 250 об/мин при 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. Объем среды в колбе составлял 100 мл, что при высокой продуктивности штамма-продуцента *A. chroococcum* 7Б в случае отбора проб в конце эксперимента позволяет проводить все необходимые анализы процесса биосинтеза, и обеспечивать наличие достаточного количества проб для статистической обработки (каждый эксперимент был проведен в 8-ми кратной повторности) (Мышкина и др., 2008; Мышкина и др., 2010).

2.1.3. Анализ 16S рРНК

Для подтверждения видовой принадлежности штамма-продуцента *A. chroococcum* 7В было проведено секвенирование его 16S рРНК. Для этого были отобраны праймеры fD1 - (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и rD1 - (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') were. После амплификации на T100 Thermal Cycler (Bio-rad, США), ПЦР-продукты были очищены при помощи Cleanup Standard kit (Евроген, Россия). Секвенирование полученного 16S ампликона было проведено на 3730xl секвенаторе (Thermofisher Scientific, США).

2.1.4. Условия синтеза ПОБ и его сополимеров

Для регуляции биосинтеза ПОБ и синтеза сополимеров ПОБ в культуральную среду были добавлены дополнительные источники углерода. Другие компоненты культуральной среды и условия культивирования штамма-продуцента не изменяли. Для регуляции молекулярной массы синтезируемого ПОБ добавляли ацетат натрия в концентрациях 20, 35, 60

и 100 мМ, соответственно. В качестве предшественника 3-оксивалерата в цепи сополимера, валерат был добавлен в виде натриевой соли в концентрации 5, 10, 20, 35 и 150 мМ через различные промежутки времени: через 0, 4, 12 и 18 ч после начала инкубации культуры. Концентрации от 5 до 35 мМ были выбраны как наиболее оптимальные согласно ранее полученным данным (Мышкина и др., 2008; Мышкина и др., 2010). В качестве предшественника 3-окси-4-метилвалерата (3О4МВ) в цепи сополимера поли(3-оксибутират-3-окси-4-метилвалерат (ПОБ-3О4МВ) в культуральную среду добавляли натриевую соль 4-метилвалериановой кислоты (4МВК) в концентрациях 5, 10, 20 и 35 мМ через 12 час. культивирования штамма-продуцента и в концентрации 20 мМ через 0 час. Такие концентрации этой карбоновой кислоты были выбраны по аналогии с другими карбоновыми кислотами, используемыми для биосинтеза новых сополимеров ПОБ и по литературным данным (Мышкина и др., 2010; Бонарцева и др., 2006; Lau et al., 2011). Для проверки возможности биосинтеза сополимеров ПОБ с остатками других 3-оксикарбоновых кислот в культуральную среду добавляли следующие карбоновые кислоты в виде их натриевых солей в качестве дополнительных источников углерода: пропионовую (пропановую) (ПК), гексановую (ГкК), гептановую (ГпК), октановую (ОК), додекановую (ДК) также в концентрации 20 мМ (Мышкина и др., 2010). Различные производные этиленгликоля (ДЭГ, ТЭГ, ПЭГ 200, ПЭГ 300, ПЭГ 400 и ПЭГ 1000), а также пропиленгликоль 400 (ППГ 400) были добавлены в культуральную среду в концентрации 150 мМ с целью синтеза сополимеров ПОБ и ПОБВ с производными этиленгликоля. Было показано, что дальнейшее увеличение концентрации ПЭГ в культуральной среде приводит к резкому подавлению роста культуры, снижению синтеза полимера и снижению его молекулярной массы. Таким образом, нами была выбрана максимальная концентрация ПЭГ, которая, тем не менее, еще оптимальна для роста культуры. Продолжительность эксперимента составлял 72 ч. Оптическую плотность в ходе роста культуры контролировали методом нефелометрии. Для наблюдения и контроля роста культуры и накопления в клетках полимера использовали световой микроскоп Биомед-1 (Биомед, Россия). Измеряли следующие параметры биосинтеза сополимеров: урожай биомассы (г/л среды) и общее содержание полимера в клетках (вес.% от сухого веса клеток), которые определяли согласно ранее разработанным методикам (Мышкина и др., 2008; Мышкина и др., 2010).

Все компоненты культуральной среды, рабочие растворы, растворы реактивов (включая солей карбоновых кислот и производные ПЭГ), а также стеклянная лабораторная посуда, используемая в экспериментальной работе, были стерилизованы автоклавированием с использованием автоклава ВК-75=01 (Тюменский ЗМОИ, Россия). Все эксперименты были проведены в лабораторных условиях.

2.1.5. Определение содержания полимеров в клетках

Суспензию клеток (20-100 мг сухой биомассы) центрифугировали при 5000 g в течение 20 мин. Затем клетки суспендировали в 10 мл воды и гомогенизировали, используя УЗ-обработку (30 сек). Получали суспензию плотностью по ФЭК около 0,4-0,5 (кювета №1), длина оптического пути 1 мм. К 2 мл суспензии клеток добавляли 2М HCl и нагревали суспензию при 100 ºС в течение 2 часов на водяной бане; нерастворимый остаток (гранулы ПОБ) отделяли центрифугированием при 8000 g в течение 20 мин. К полученному остатку добавляли 5 мл хлороформа. Пробирки закрывали герметически и оставляли на ночь при 28 ºС на качалке. Затем содержимое пробирок центрифугировали и к 0.1 мл чистого хлороформного экстракта, предварительно высушенного воздушным потоком, добавляли 5 мл концентрированной серной кислоты; нагревали при 100ºС на водяной бане в течение 10 мин. После охлаждения количество кротоновой кислоты, образующейся в результате кислотного гидролиза ПОБ и последующей дегидратации гидроксимасляной кислоты, определяли на спектрофотометре СФ-2000: длина волны - 235 нм, кювета - 1 см, контроль - H_2SO_4 концентрированная (Zevenhuizen, 1981).

2.1.6. Выделение ПОБ и его сополимеров из бактериальной биомассы, анализ эффективности очистки полимеров

Процесс выделения и очистки полимеров из биомассы *A. chroococcum* включал следующие стадии:

1) выделение полимера из бактериальной массы экстракцией хлороформом при встряхивании на качалке в течение 12 часов при 37 °С;

2) отделение раствора полимера от клеточных остатков фильтрованием;

3) выделение полимера из раствора хлороформа осаждением изопропанолом;

4) последующее многократное (4-5 раз) растворение полимера в хлороформе и осаждение изопропанолом для очистки от добавок и возможных загрязнителей;

5) высушивание при 40 °С.

Процесс выделения и очистки полимера из биомассы штамма-продуцента включал стадии выделения полимера экстракцией хлороформом, фильтрование, осаждение полимера изопропиловым спиртом, очистку полимера путем нескольких циклов растворения-осаждения и высушивание согласно (Мышкина и др., 2008; Мышкина и др., 2010; Bonartsev et al., 2013а; Bonartsev et al., 2013б).

Состав исходной сырой биомассы, а также продуктов, образующихся в процессе её очистки, исследовали методом ИК-Фурье-спектроскопии. ИК-спектры образцов

регистрировали на Фурье спектрометре IFS-66 v/s (Bruker, Германия) в области 400-4000 $см^{-1}$ в виде таблеток, запрессованных с KBr для твердых образцов, и в виде пленок, нанесенных на окошки KRS-5 или KBr для жидких. Разрешающая способность составляла 1 $см^{-1}$ (рис. 4). Содержание азота определяли по методу Кьельдаля. Зольность оценивалась по ГОСТ 15973-82. Сухой остаток определяли сушкой при температуре 105 °С до постоянной массы, содержание воды в растворителях — методом кулонометрического титрования с реактивом Фишера на влагомере мод. CA-02 (Mitsubishi, Япония).

2.1.7. Определение молекулярной массы полимеров

Молекулярная масса ПОБ и его сополимеров была определена методом гель-проникающей хроматографии (ГПХ) с использованием насоса Waters 1525, подключенного к четырем столбцам Waters styragel (Styragel HT 6E, 4,6 × 300 мм). Система детекции полимера состояла из дифференциального детектора показателя преломления Waters 2414 и УФ-детектора. Хлороформ элюировали при скорости потока 1,0 мл/мин. Стандартные объемы образцов составляли 50 мкл при концентрации полимера 2 мг/мл. Для определения молекулярного веса использовалась универсальная калибровочная кривая, построенная при помощи стандартов ограниченной полидисперсности полистиролов (Sigma-Aldrich (Merck), Германия), с поправкой на изменение объема расходованного элюента (Bonartsev et al., 2013a; Bonartsev et al., 2013б; Bonartsev et al., 2017a; Bonartsev et al., 2016a).

Работа выполнена совместно с сотрудницей ОАО «Институт пластмасс» С. Г. Алексеевой и на оборудовании предприятия.

Молекулярная масса, определённую ГПХ, соотносили с данными оценки методом вискозиметрии (Мышкина и др., 2008; Мышкина и др., 2010; Bonartsev et al., 2013a; Bonartsev et al., 2013б). Вязкость раствора ПОБ в хлороформе измеряли при 30°С на вискозиметре RT RheoTec (диаметр капилляра 0,56 мм) (RheoTec, Германия). Для измерения вязкости в вискозиметр заливали 10 мл раствора и помещали его строго вертикально в термостат. Вязкость определяли при температуре 30±0,5ºС. До измерения времени истечения раствор термостатировали 15-20 мин. 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. Удельную вязкость рассчитывали по формуле:

$\eta_{уд} = (t - t_0) / t_0$ (1)

где: t_0 - время истечения растворителя, сек;

t - время истечения раствора полимера, сек.

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

$(\eta) = 7{,}7 \times 10^{-5} \times M^{0,82}$ (2) (Akita et al., 1975).

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

2.1.8. Снижение молекулярной массы ПОБ химическим путем

Для получения низкомолекулярного ПОБ, что необходимо для определенных целей, например, для получения микрочастиц, загруженных низкомолекулярными лекарственными веществами и белками, был использован химический способ снижения молекулярной массы полимера, основанный на кислом гидролизе выделенного полимера в растворе хлороформа (Yu and Marchessault, 2000). Раствор ПОБ титровался хлороформным раствором 100 мМ соляной кислоты при постоянном перемешивании. В пробах, отбиравшихся с заданным временным интервалом, вискозиметрически определялась молекулярная масса полимера с помощью уравнения Марка-Куна-Хаувинка (подраздел данного раздела 2.1.7). Гидролиз был остановлен нейтрализацией раствора по достижении значения молекулярной массы 25 кДа.

2.1.9. Исследование состава полимеров методом газовой хроматографии

Содержание летучих жирных кислот в жидкой фазе почвенной суспензии определяли на хроматографе "Chrom 5" с пламенно-ионизационным детектором, в качестве сорбента использовали "Chromosorb-101". Пробу объемом 2 мкл вводили в стеклянную колонку длиной 1,2 м и диаметром 3 мм, температура колонки 170 ℃, газ-носитель - аргон. N_2O в газовой фазе определяли на газовом хроматографе "Chrom 5" с детектором по теплопроводности (температура детектора 20^{o} С), на колонке с сорбентом Э+ “Porapak Q” (длина колонки - 1,2 м, диаметр - 3 мм) , газ-носитель – аргон (Мышкина и др., 2010).

2.1.10. Исследование химического состава полимера методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР)

Спектры ^{1}H ЯМР 1% (вес./об.) растворов полимеров в дейтерированном хлороформе были сняты на спектрометре MSL-300 300 МГц (Bruker, Германия) с экспериментальными параметрами: температура 313 K, релаксационная задержка 2.5 с, ширина спектрального окна, и на спектрометре Bruker Avance III 500 МГц с трехканальным криодатчиком TCI Prodigy (Bruker, Германия) с экспериментальными параметрами: температура 310 K, 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). Количество накоплений NS при исследовании полимеров ПОБ4МВ, ПОБ-ПЭГ и ПОБВ-ПЭГ = 40.

Процентное содержание мономеров 3-оксивалерата (3ОВ) в сополимере ПОБВ рассчитывали по соотношению интегральных интенсивностей сигнала метильной группы 3-оксивалерата (0.89 м.д.) и суммарных сигналов метильной группы 3-оксивалерата (0.89 м.д.) и метильной группы 3-оксибутирата (1.27 м.д.) (Мышкина и др., 2010; Bonartsev et al., 2013б; Bloembergen et al., 1986). Процентное содержание мономеров 3-окси-4-метилвалерата (3О4МВ) в сополимере ПОБ4МВ рассчитывали по соотношению суммы интегральных интенсивностей сигналов 4-метильной группы (g) (0.90 м.д.) и –CH (f) (1.91 м.д.) и суммы интегральных интенсивностей сигналов 4-метильной и –CH-групп остатка 3-окси-4-метилвалерата и метильной группы остатков 3-оксибутирата (1.27 м.д.) (Bonartsev et al., 2016a; Bonartsev et al., 2017a; Lau et al., 2011).

Процентное содержание элементарных звеньев ЭГ в сополимерах ПОБ-ПЭГ и ПОБВ-ПЭГ рассчитывали по соотношению суммы интегральных интенсивностей сигнала группы ЭГ–CH_2– (3,61; 3,70; 3,66; 3,73; 4,24 ppm) к сумме интегральных интенсивностей сигналов метильных групп 3-оксибутирата, 3-оксивалерата и ПЭГ (1,27 ppm) (Bonartsev et al., 2013a; Bonartsev et al., 2013б; Bonartsev et al., 2016a, Bonartsev et al., 2017a).

Работа выполнена совместно с ст.н.с. Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства В.В. Подгорским и на оборудовании центра.

2.2. Методы изготовления различных изделий из полученных полимеров

2.2.1. Материалы для изготовления полимерных изделий

В работе были использованы: хлороформ (трихлорметан, ОСЧ) (Экос-1, РФ); бычий сывороточный альбумин (Sigma Aldrich (Merck), Германия); ФИТЦ-меченный бычий сывороточный альбумин (ФИТЦ-БСА) (Sigma Aldrich (Merck), Германия); поливиниловый

спирт (ПВС) (Sigma Aldrich (Merck), Германия); калий-фосфатный буфер pH 7,4 (Химмед, РФ); лизоцим (Sigma Aldrich (Merck), Германия); декстран (нГА) (Sigma Aldrich, Германия), твин 80 (Sigma Aldrich, Германия), нано-гидроксиапатит (ГА) (Sigma Aldrich (Merck), Германия), полиэтиленгликоль (ПЭГ) (Sigma Aldrich (Merck), Германия), полилактид для 3D-печати (Lider-3D, Россия).

2.2.2. Изготовление экспериментальных образцов полимерных пленок для исследования физико-химических и биологических свойств полимеров

Для исследования физико-химических свойств и изучения роста клеток in vitro на полимерных пленках была получена серия экспериментальных образцов полимерных пленок толщиной 40 мкм и диаметром 30 мм. Полимерные пленки были приготовлены из 2% (вес./об.) растворов соответствующих полимеров в хлороформе путем испарения растворителя на стеклянной подложке в течение суток под тягой. Вес пленок был измерен с помощью весов AL-64 (Max=60 g, d=0,1 mg, Acculab, США) и составил 61±8 мг. Была измерена толщина пленок магнитным толщинометром и она составила 38±6 мкм. Для работ с культурами клеток пленки были стерилизованы автоклавированием и их предварительно инкубировали в дистиллированной воде при 37°С в термостате (ЕС 1/80 СПУ, РФ) в течение 2 час (Bonartsev et al., 2013а; Bonartsev et al., 2013б; Bonartsev et al., 2016а; Bonartsev et al., 2017а).

Другие изделия из полимеров: матриксы, микрочастицы, наночастицы были использованы в том виде, в котором были изготовлены, для исследования их физико-химических и биологических свойств.

2.2.3. Изготовление ультратонких полимерных пленок для исследования наноструктуры полимеров

Ультратонкие пленки готовили методом нанесения на вращающуюся подложку (spin-coating, спин-коатинг) (Schultz, 2013). 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 ω = 3000-5000 об/мин (Zhuikov et al., 2017в). Работа была выполнена совместно с научной группой вед.науч.сотр. кафедры биоинженерии Багрова Д.В.

2.2.4. Изготовление полимерных матриксов

2.2.4.1. Изготовление 2D-матриксов

Для получения матриксов плоской формы (2D-матриксов) использовали модифицированный метод выщелачивания, широко применяемый в тканевой инженерии (Houben et al., 2017; Rumian et al., 2013; Nosenko et al., 2017). Эта модификация основана на температурном разложении твердой соли, в то время как стандартный метод подразумевает вымывание соли растворителем. В качестве такой порообразующей соли использовали карбонат аммония из-за его уникальной способности разлагаться в сухих условиях и при гидролизе в воде растворы при высокой температуре (> 60 °C) с выделением газов и воды без посторонних примесей:

$(NH_4)_2CO_3 \rightarrow 2NH_3\uparrow + CO_2\uparrow + H_2O$,

$(NH_4)_2CO_3 + 2H_2O \leftrightarrow 2NH_4OH + H_2CO_3 \rightarrow 2NH_3\uparrow + CO_2\uparrow + 3H_2O$.

Данная модификация метода была предложена Park T.G. в 1999 году (Nam and Park, 1999), а также описана в работах (Nublat et al., 2006; Nam et al., 2000). Для данной модификации необходимым условием является то, что используемый раствор полимера должен быть достаточно вязким. Поэтому концентрация полимера варьировалась от 40 до 80 мг/мл в зависимости от молекулярной массы используемых полимеров. Для изготовления матриксов использовали ПОБ-364, сополимер ПОБ-ПЭГ и композит ПОБ/ПЭГ. Раствор полимера смешивался с порошком бикарбоната аммония (Химмед, Россия) в соотношении 10:1 по массе (Nam et al., 2000) и тщательно перемешивался шпателем. Размеры частиц соли варьировали в диапазоне 100-300 мкм. 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 (Bonartsev et al., 2018).

2.2.4.2. Изготовление 3D-матриксов

Метод двойного выщелачивания

Для получения матриксов свободной объемной формы (3D-матриксов) была использована модификация широко применяемого для изготовления матриксов в тканевой инженерии метода выщелачивания – метод двойного выщелачивания (Kundu et al., 2013) с использованием двух видов порогенов: кристаллов сахарозы (Sigma-Aldrich (Merck), Германия) и карбоната аммония (Химмед, Россия) нужного размера. В зависимости от композита,

используемого для изготовления матрикса, в раствор полимера также добавляли порошок гидроксиапатита ГА (10% по массе).

Для создания пор, оптимальных для культивирования клеток, перед использованием кристаллы сахарозы и карбоната аммония просеивали через специальные лабораторные сита У1-ЕСЛ (Крафт, Россия) с размером ячеек 40, 94 и 315 мкм. Минимальный размер пор для роста клеток составляет 75 - 100 мкм, а оптимальный диапазон составляет от 100 до 200 мкм при пористости более 80% (Klawitter et al., 1976; Misra et al., 2010; Ribeiro-Samy et al., 2013; Shishatskaya et al., 2014). В связи с чем для изготовления матриксов использовали кристаллы сахарозы размером примерно от 100 до 300 мкм.

Затем раствор ПОБ-105 в хлороформе (60 мг/мл) послойно смешивали с просеянным кристаллы сахарозы и карбоната аммония в соотношении 6: 1: 1 (мас. / мас.) в чашке Петри.

В ходе разработки метода вначале в качестве шаблона были использованы чашка Петри, стандартная пластиковая пробирка или стеклянная трубка диаметром 10 мм, но затем был разработан метод изготовления шаблонов заданной формы по технологии 3D-печати. Формование 3D-матриксов на таких шаблонах носит название непрямой 3D-печати (Houben et al., 2017).

Стандартные или изготовленные с помощью 3D-печати шаблоны были равномерно заполнены дисперсией смеси порогенов в растворе ПОБ (или ПОБ/ГА) и оставлены на несколько часов для испарения растворителя. Затем образцы помещали в горячую воду (~65 °C) для формирования пористости матрикса как за счет выделения газа, так и выщелачивание сахарозы. После прекращения газообразования полученный матрикс промывали 5 раз дистиллированной водой до полного вымывания сахарозы и высушивали около 24 ч при 20 °C (Bonartsev et al., 2018; Volkov et al., 2020).

Компьютерное моделирование и 3D-печать шаблона для изготовления 3D-матриксов заданной формы.

Для создания шаблона методом непрямой 3D-печати сначала была выполнена компьютерная томография черепа крысы. На основании полученных данных была построена 3D-модель черепа крысы на основе базы данных цифровых изображений в медицине (DICOM). Далее была построена модель костного дефекта цилиндрической формы диаметром 8 мм и толщиной 1 мм, локализованного по центру теменной кости. Модель имплантата была изготовлена таким образом, чтобы она не только заполняла костный дефект, но и перекрывала его снаружи. Этот обеспечивает защиту твердой мозговой оболочки и головного мозга от внешних воздействий. Исследование проводилось на крысах одинакового веса и размера, все модели также были одинакового размера (Рисунок 35) (Volkov et al., 2020).

Изготовление шаблонов методом 3D-печати для изготовления 3D-матриксов заданной формы

Шаблоны для 3D-матриксов были изготовлены из полилактида с использованием 3D-модели. Принтер PrusaMendel v2 (NWRepRap, США) функционирует по технологии моделирования методом послойного наплавления (FDM-Fused Deposition Modeling). Процесс изготовления шаблонов достаточно легко масштабируется для изготовления имплантатов размером до 5×5×5 см размером. После изготовления поверхность шаблонов изолировали тонкой алюминиевой фольгой для того, чтобы в дальнейшем шаблоны не подверглись воздействию хлороформа на следующей стадии изготовления имплантата. Для изготовления 3D-матриксов методом непрямой 3D-печати шаблон равномерно заполняли пастой из смеси раствора ПОБ (без или с ГА) в хлороформе с сахарозой и карбонатом аммония, а далее, как и в случае использования обычной формы. Полученные по такому шаблону 3D-матриксы должны иметь одинаковый размер: внутренний цилиндр диаметром 8 мм, внешний цилиндр диаметром 12 мм, толщина 2 мм (Рисунок 38) (Volkov et al., 2020).

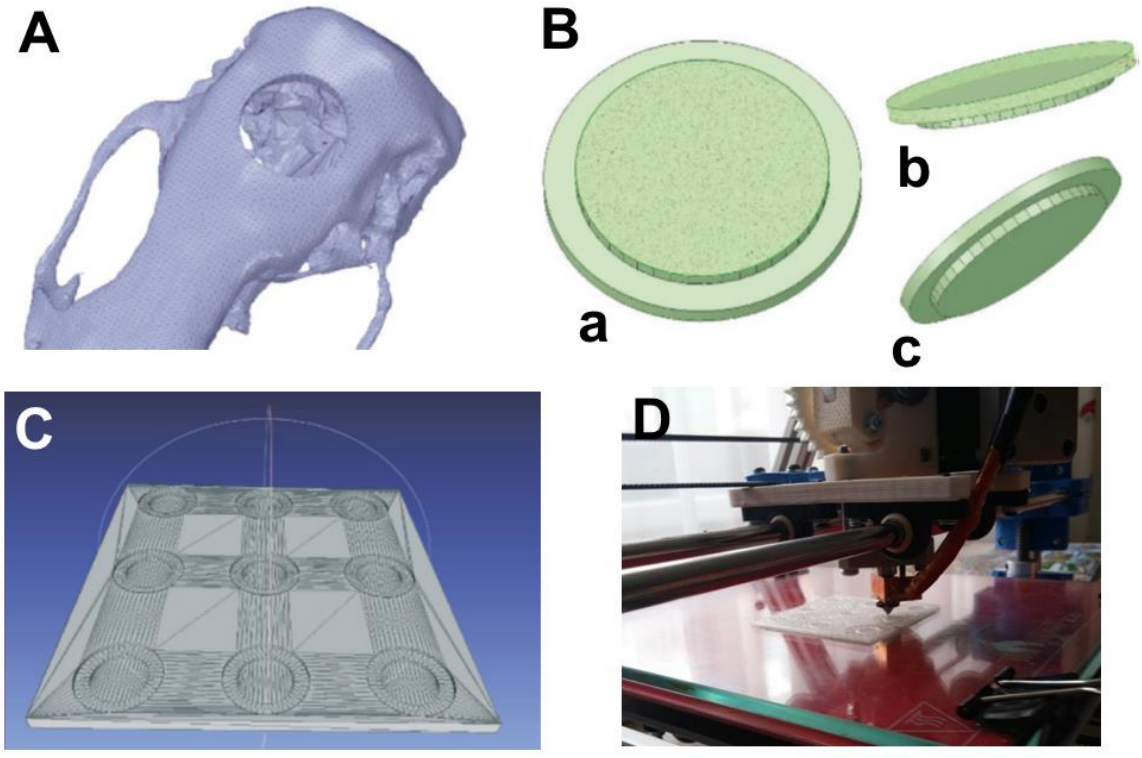


Рисунок 38. *Разработка 3D-шаблона для изготовления матриксов: (А) модель черепа крысы с моделью критического дефекта теменной кости (диаметром 8 мм); (Б) модель 3D-матрикса для закрытия критического дефекта кости (а, б, в – различные ракурсы); (В) модель 3D-шаблона для изготовления пористых матриксов заданной формы; (Г) изготовление шаблона для матриксов на основе ПОБ методом 3D-печати.*

2.2.4.3. Создание матриксов из пористых биополимерных микросфер

Были также получены 3D-матриксы на основе микросфер из ПОБ. Пористые биополимерные микросферы на основе ПОБ-364 необходимого диаметра получали методом двухэтапного эмульгирования «водная фаза/масляная фаза/водная фаза» (W/O/W). В качестве порообразователя в раствор полимера добавляли водный раствор карбоната аммония (Nam et al., 2000; Kyoung et al, 2006), поскольку он способен к термическому разложению до аммиака и углекислого газа (Рисунок 39А).

Для приготовления крупных микросфер со средним диаметром около 500 мкм использовали хлороформный раствор ПОБ с концентрацией 63,8 мг/мл. Раствор полимера смешивали с 5%-ным (w/v) раствором карбоната аммония в воде в соотношении 20:11. Из полученной смеси подготавливали мелкодисперсный коллоид на высокоскоростном гомогенизаторе IKA T 25 digital Ultra-Turrax (IKA-Werke, Германия) в течение 5 минут на скорости 15 000 об/мин. Полученный коллоид по каплям добавляли в 1%-ный (w/v) раствор поливинилового спирта при постоянном перемешивании на верхнеприводной мешалке R2R 2021 (Heidolph, Германия) на скорости 500 об/мин до полного испарения хлороформа.

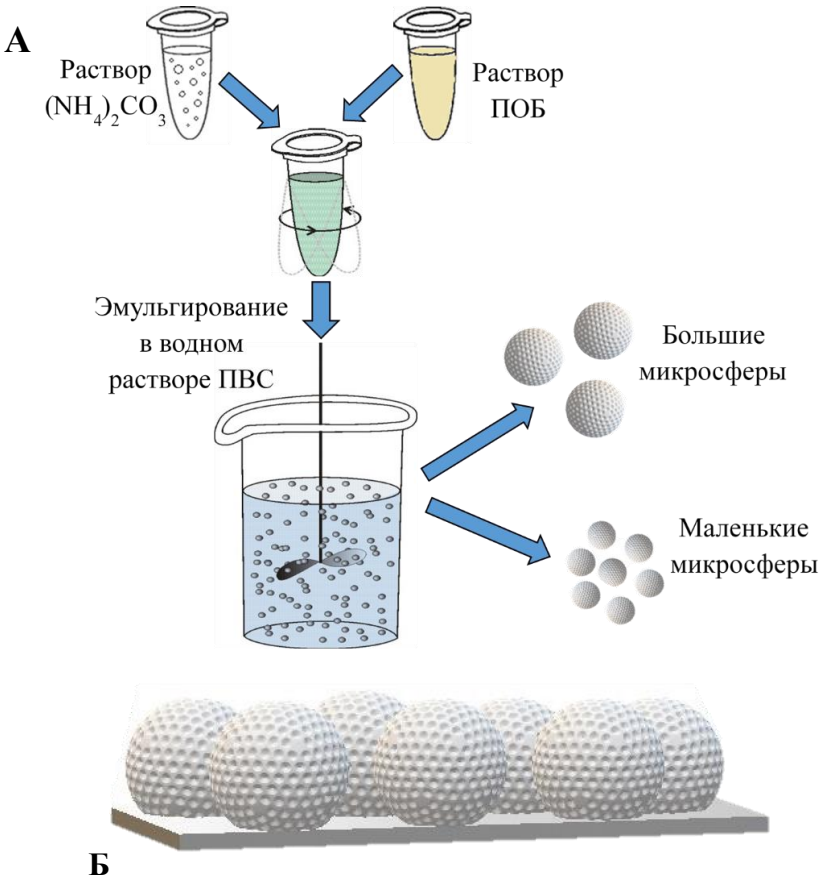


***Рисунок 39**. Схема получения пористых микросфер на основе ПОБ (А) и схема 3D-матрикса из пористых микросфер на пленке (Б).*

Мелкие пористые микросферы со средним диаметром 120 мкм готовили из хлороформного раствора ПОБ с концентрацией 36,5 мг/мл. Раствор полимера смешивали с 5%-ным (w/v) раствором карбоната аммония в воде в соотношении 35:11. Из полученной смеси также подготавливали мелкодисперсный коллоид на высокоскоростном гомогенизаторе IKA T 25 digital Ultra-Turrax (IKA-Werke, Германия) в течение 5 минут на скорости 15 000 об/мин. Полученный коллоид по каплям добавляли в 1%-ный (w/v) раствор поливинилового спирта при постоянном перемешивании на верхнеприводной мешалке R2R 2021 (Heidolph, Германия) на скорости 750 об/мин до полного испарения хлороформа.

Для оценки влияния формы подложки на рост и дифференцировку МСК были созданы матриксы путем иммобилизации пористых биополимерных микросфер на пленке из ПОБ. Для этого отдельно подготавливали полимерную пленку толщиной 100 мкм. После высыхания ее покрывали с одной стороны тонким слоем полимерного раствора, на котором фиксировали микросферы (Рисунок 39Б).

2.2.4.4. Определение остаточных солей в полученных матриксах

Определение остаточных солей в полученных матриксах проводили с помощью двух методов: по изменению окраски индикатора и с помощью антронового теста на остаточные сахара. По первому методу матриксы заливали горячей дистиллированной водой и инкубировали на шейкере при 37 в течение 2 часов. После этого проверяли pH среды раствором фенолфталеина. Для количественного 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 повторах) 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 (Самылина, 2009).

2.2.5. Получение полимерных микро- и наночастиц с низкомолекулярными лекарственными веществами

2.2.5.1. Получение полимерных микро- и наночастиц с низкомолекулярными лекарственными веществами

Микрочастицы были получены при помощи метода одноэтапного эмульгирования с последующим выпариванием растворителя (Лившиц и др., 2009; Бонарцев и др., 2011). Метод был адаптирован для инкапсулирования различных лекарственных веществ (ЛВ). Раствор ЛВ и ПОБ, молекулярная масса которого варьировалась от 6 до 260 кДа (в различных экспериментах), в соотношении 1:9 в 4 мл хлороформа (оптимальная концентрация полимерной фазы в хлороформе 45-50 мг/мл) постепенно добавляли к 80 мл раствора поливинилового спирта (ПВС) в дистиллированной воде (1,5 % масс./об.) при перемешивании. Перемешивание производили в течение 2ч при помощи механической верхнеприводной мешалки RZR 2021 (Heidolph, Германия) при 1000 об/мин. После полного испарения органического растворителя микрочастицы отделяли центрифугированием (10 мин при 4400 об/мин) при помощи центрифуги 5702 R (Eppendorf, Германия), а затем 3 раза промывали дистиллированной водой для полного удаления эмульгатора и ЛВ на поверхности частиц. Затем микрочастицы высушивали в термостате при 37°С.

2.2.5.2. Получение полимерных наночастиц с низкомолекулярными лекарственными веществами

Полимерные наночастицы с включением ПТЛ были получены методом прямого мембранного эмульгирования. Совместный раствор ПТЛ и ПОБ в соотношении 1:9 в 4 мл хлороформа (оптимальная концентрация полимерной фазы в хлороформе 45-50 мг/мл) пропускали с помощью экструдера Mini-Extruder Avanti (Polar Lipids Inc.) через мембранные фильтры Omnipore (Millipore, Ireland) с диаметром пор 100 нм в водную среду (1,5% р-р ПВС). Полученную эмульсию добавляли по каплям к 40 мл 1,5% р-ра ПВС при перемешивании со скоростью 26000 об/мин. Полученную смесь центрифугировали 15 мин при 14000 об/мин с использованием MiniSpin (Eppendorf, Германия) и отмывали дистиллированной водой от остатков ПВС. Очищенный раствор наночастиц лиофилизировали с помощью лабораторной лиофильной сушки ALPHA 1-2LD plus (Martin Christ, Германия). Данная методика позволяет получать частицы из ПГБ с помощью метода эмульгирования минимального размера.

2.2.5.3. Получение микрочастиц методом пьезоэлектрического распылительного высушивания

Микрочастицы были приготовлены по методике ультразвукового пьзоэлектрического мембранного распылительного высушивания в бескислородной атмосфере (Nano Spray Dryer B-90 Application Booklet, 2009; Heng et al., 2011).

Характеристики прибора: максимальная температура испарителя – 120 ˚C, мощность испарителя по воде – 0.2 л/ч, размер капель – 8-21 мкм, размер частиц продукта – 300 нм-5 мкм, распылительные головки с отверстиями – 4.0, 5.5, 7.0 мкм. Характеристики охлаждающего блока Inert Loop B-295: минимальная температура на выходе – минус 25 ˚C. Охлаждающий блок позволяет конденсировать растворитель на выходе из прибора, возвращая рабочий газ в систему и защищая окружающую среду и пользователей от возможного загрязнения. Производительность прибора составляет от 1 до 10 г/час в зависимости от параметров технологического процесса. Прибор закуплен в рамках программы МГУ ПНР-9 «Инфраструктура инновационной деятельности МГУ имени М.В. Ломоносова» (контракт № 2758-2011 от «12» декабря 2011 г.).

На первом этапе ПОБ и ПТЛ были растворены в хлороформе в соотношении 90% биополимера к 10% ЛВ. Конечная концентрация этой композиции была 50 мг/мл. Однако было выяснено, что без добавления каких-либо сурфактантов получались лишь несуспендируемые в воде, слипшиеся частицы. Именно поэтому было решено добавить твин-80 в соотношении 1:1000 к композиции. Полученный раствор был профильтрован через стеклянный фильтр (маркировка 3) и загружен в распылительную сушилку Buchi Nano Spray Dryer B-90 (Buchi, Швейцария). Объем одной загрузки был выбран 50 мл. Для создания бескислородной среды были использованы газы N_2 и CO_2 категории ОСЧ. На приборе были выбраны следующие параметры – Таблица 5 (Зернов и др., 2017; Bonartsev et al., 2017в). Следует отметить, что температура осушающего воздуха была выбрана равной температуре кипения растворителя – хлороформа. После распылительного высушивания частицы были собраны специальным шпателем (Buchi electrostatic particle collector) и оставлены на ночь под вакуумом для удаления остатков хлороформа.

***Таблица 5**. Параметры процесса распылительного высушивания при помощи нанораспылительной сушилки Nano Spray Dryer B-90.*

Технологический параметр процесса	Значение параметра
Режим работы по концентрации O_2	~4%
Скорость ламинарного потока воздуха	150 л/мин
Температура осушающего воздуха	70°C
Внутреннее давление в камере	50 мБар
Температура конденсатора	10°C
Интенсивность распыления	50%
Диаметр пор в распытительной головке	5,5 мкм
Режим подачи жидкости перистальтическим насосом	1
Давление CO_2	1,5 мБар
Давление N_2	1 мБар

В качестве контроля были получены микрочастицы, не загруженные паклитакселем. Важно отметить, что данная методика позволяет получать микрочастицы с помощью метода распылительного высушивания минимального размера.

2.2.5.4. Определение содержания ЛВ в микро- и наночастицах

Содержание ЛВ в микрочастицах определяли спектрофотометрически после их растворения в хлороформе путем измерения светопоглощения на спектрофотометре DU-650 (Beckman Coulter, США) (максимумы поглощения при 242 и 278 нм для паклитаксела, 245 и 254нм – для ивермектина) при сравнении с контрольным раствором ПОБ в хлороформе и с помощью построения калибровочной кривой с использованием растворов ПОБ и соответствующего ЛВ в хлороформе в различных концентрациях (Зернов и др., 2017; Bonartsev et al., 2017в).

2.2.6. Получение полимерных микрочастиц с белками

2.2.6.1. Получение композита нано-гидроксиапатита с лизоцимом

Для изучения систем пролонгированного высвобождения белков в качестве модельного белка был использован лизоцим (Sigma-Aldrich, Германия) – фермент мурамидаза, полученный из яичного белка. Его молекулярная масса равняется 14,3 кДа, pI = 11,35, т.е. Таким это

небольшой положительно заряженный белок. Помимо лизоцима в работе был использован бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma Aldrich, Германия) – белок плазмы крови, молекулярная масса равняется 66,4 кДа, pI 4,7. Для исследований на конфокальном микроскопе был использован флуоресцентно меченный БСА (ФИТЦ-БСА) и лизоцим (ФИТЦ-лизоцим) (Sigma Aldrich, Германия).

Композит нано-гидроксиапатита (нГА) (со средним размером наночастиц 50 нм, Sigma-Aldrich, США) с лизоцимом получали с помощью лиофильного высушивания дисперсии частиц гидроксиапатита в растворе соответствующего белка, предварительно замороженной в жидком азоте, используя Freeze dryer ALPHA 1-2 LDplus (Германия). Данная методика представляет собой комбинацию техник изготовления композиции лекарственного вещества с носителем (Castellanos and Griebenow, 2003; Wang et al., 2007). Соотношение количества белка и количества ГА было выбрано как 1:9 по массе. Для этого навеску 100 мг лизоцима растворяли в 1 мл деионизированной воды. Затем в нее добавляли 900 мг нГА и интенсивно перемешивали на вортексе. Не допуская оседания частиц нГА, полученную дисперсию немедленно помещали в жидкий азот. После заморозки, ее помещали в камеру и лиофилизировали в течение ночи.

Аналогичным образом были приготовлены композиты с ФИТЦ-меченным лизоцимом для исследований на конфокальном микроскопе (Зернов и др., 2017б).

2.2.6.2. Получение полимерных микрочастиц с инкапсулированным в них композитом нано-гидроксиаппатита с лизоцимом

Микрочастицы получали при помощи использования метода «твердая фаза/масляная фаза/водная фаза» (T/M/B) (Castellanos and Griebenow, 2003), заключающегося в покрытии частиц белка с носителем оболочкой из полимера. В качестве наполнителя был выбран нГА, сам по себе обладающий биологической активностью. Весовое соотношение полимер/ наногидроксиапатит/ лизоцим было выбрано как 90/9/1 (вес.). Ранее было показано, что соотношение ПОБ к композиту лизоцим/нГА, выбранное как 90/10 является максимальным, при котором происходит полное связывание микрочастиц композита (Зернов и др., 2015). Была приготовлена дисперсия композита ГА с белком объемом 1 мл и концентрацией 15 мг/мл (масса/объем) в органическом растворителе. Затем был приготовлен раствор ПОБ молекулярной массы 25 и 255 кДа, либо сополимера ПОБ-ПЭГ с концентрацией 25 мг/мл (масса/объем) в органическом растворителе объемом 5,4 мл. Полученную дисперсию и раствор сливали вместе и тщательно перемешивали на вортексе. Конечный коллоидный раствор по каплям добавляли к 100 мл раствора ПВС с концентрацией 1,5 % (масса/объем). Перемешивание проводили на верхнеприводной мешалке R2R 2021 (Heidolph, Германия) при 700 об/мин. После полного испарения органического растворителя микрочастицы осаждали

центрифугированием (10 мин при 4400 об/мин) с использованием центрифуги 5707R (Eppendorf, Германия), а затем 3 раза промывали дистиллированной водой для полного удаления эмульгатора. Затем микрочастицы лиофилизировали, используя Freeze dryer ALPHA 1-2 LDplus (Германия), предварительно заморозив их в жидком азоте.

Аналогичным образом были приготовлены микрочастицы с ФИТЦ-меченым лизоцимом для исследований на конфокальном микроскопе.

Рассчитывали следующие параметры получения полимерных микрочастиц, загруженных белком, по приведенным ниже уравнениям (Зернов и др., 2017б).

Эффективность инкапсулирования (ЭИ, %):

$$\text{ЭИ}\ (\%) = \frac{\text{Масса инкапсулированного белка}}{\text{Общая масса использованного белка}} \quad (3)$$

Степень загруженности (СЗ, %):

$$\text{СЗ}\ (\%) = \frac{\text{Масса высвободившегося из микрочастиц белка}}{\text{Общая масса микрочастиц}} \quad (4)$$

Величина «взрывного эффекта» (ВЭ) (“burst effect”) (%):

$$\text{СЗ}\ (\%) = \frac{\text{Масса высвободившегося из микрочастиц белка в первые 3 часа}}{\text{Общая масса высвободившегося белка}} \quad (5)$$

2.2.6.3. Спектрофотометрическое определение содержания лизоцима и БСА в полученных образцах

Содержание белка в полученных образцах определяли спектрофотометрически с окрашиванием по Бредфорду, а также методом определения концентрации белка в растворе при длине волны 280 нм (Bradford, 1976; Whitaker and Granum, 1980). Измерения проводились на спектрофотометре UV-1601PC (SHIMADZU, Япония) при λ = 595 нм и λ = 280 нм для каждого метода соответственно. Для определения каждого белка строились отдельные калибровочные кривые зависимости концентрации от величины оптического поглощения для лизоцима и для БСА.

2.3. Методы микроскопии

2.3.1. Атомно-силовая микроскопия

Исследование морфологии поверхности пленок (толщиной в несколько десятков мкм – макроскопические пленки) и ультратонких пленок (толщиной в несколько десятков нм) из ПОБ и его сополимеров было проведено при помощи метода атомно-силовой микроскопии (АСМ). 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 50×50×4 мкм. При работе с макроскопическими пленками использовали микроскоп Smena с полем зрения 100×100×7 мкм.

Для получения АСМ изображений кусок макроскопической пленки из ПОБ (~ 2×2 мм^2) фиксировали на держателе образца на двустороннюю клейкую ленту, образцы ультратонких пленок готовили непосредственно перед использованием методом спин-коатинга (см. подраздел данного раздела 2.2, 2.3). Для получения АСМ изображений полимерных нано- и микрочастиц (см. подразделы данного раздела 2.5, 2.6) их суспензию в дистиллированной воде наносили на поверхность слюдяной подложки, закрепленной на держателе, и высушивали на воздухе. 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)). Частота сканирования составляла 1-3 Гц, размер кадров – от 3×3 до 20×20 мкм^2, при каждом снимки были также изучены топография и фазовые сигналы. Для проведения измерений методом АСМ при заданной температуре использовали термостолик атомно-силового микроскопа SU045NTF, максимальная температура нагрева которого равна 120°С. Для выбора области сканирования использовали оптическую систему, совмещенную с АСМ. Обработка изображений проводилась с использованием программного обеспечения для анализа изображения (ЗАО «Нанотехнология МДТ», Россия) и ФемтоСкан Онлайн (ЗАО «Центр Перспективных Технологий»).

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

$$R_a = \frac{1}{N}\sum_{n=1}^{N}|r_n| \quad (6)$$

Этот параметр был рассчитан по результатам сканирования трех областей 20×20 мкм^2 (512×512 точек). Кроме того, для каждого образца были проведены несколько сканирований с более высоким разрешением (5×5 мкм^2 (512×512 точек)) для более подробного описания поверхности полимера (Босхомджиев и др., 2009; Bonartsev et al., 2013а; Bonartsev et al., 2013б).

Работа была выполнена совместно с научной группой вед.науч.сотр. кафедры биоинженерии Багрова Д.В.

2.3.2. Световая микроскопия

Первичное изучение морфологии микрочастиц проводилось с помощью светового микроскопа Биомед 1 Вар.2 (Биомед, Россия) с цифровым окуляром MYscope 300M (Webbers,

Тайвань)). Контроль роста клеток на полимерных пленках и матриксах осуществляли с помощью инвертированного светового микроскопа Биомед 3И (Биомед, Россия) (Bonartsev et al., 2018; Volkov et al., 2020).

2.3.3. Просвечивающая электронная микроскопия бактериальных клеток

Клетки фиксировали в 1,5%-ном растворе $KMnO_4$ в 1,5 мМ фосфатном буфере, pH 7,2 (24 ч), затем трижды отмывали фосфатным буфером путем центрифугирования при 3000 g (3 мин) и дополнительно фиксировали в 2% OsO_4 (2 ч). Фиксированные клетки обезвоживали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заливали в эпоксидную смолу (ЭПОН). Срезы клеток, полученные на микротоме LKB-4800 (Швеция), окрашивали водным уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали под просвечивающим электронным микроскопом Temsan - 100 CX фирмы "Jeol" (Япония) при увеличении ×50 000 (Bonartsev et al., 2017б).

2.3.4. Сканирующая электронная микроскопия

Для исследования на сканирующем электронном микроскопе все образцы специальным образом подготавливали. Образцы, не содержащие живых клеток и тканей, покрывали золотом или палладием на распылительном приборе IB-3 (Giko, Япония).

Полимерные образцы (пленки, 2D-матриксы и 3D-матриксы) с прикрепленными к ним живыми клетками подвергали дегидрированию в растворах с повышающейся концентрацией этанола 30%, 50%, 70%, 82%, и 96%, в каждом растворе образцы инкубировали дважды по 5 минут. Затем спирт замещали ацетоном, промывая в смеси спирта и ацетона в соотношениях: 3:1, 1:1, 1:3. В каждом типе раствора образцы инкубировали 5 мин, затем промывали в 100% ацетоне и подвергали сушке в критической точке на аппарате Hitachi critical point dryer HCP-1 (Hitachi, Япония). Высушенные образцы также покрывали тонким слоем платины на распылительном приборе IB3 (Giko, Япония).

Исследования проводились на следующих электронных микроскопах: JSM-25S (JEOL, Япония), CAM-SCAN-S2 (Cambridge Instruments, Великобритания), CamScan SEM (Elektronen-Optik-Service GmbH, Германия) (с напылением золота на образцы), JEOL JSM-638 OLA (JEOL, Япония) (с напылением палладия на образцы), FEI-SMA-QUANTA 200 (FEI Company, США) и SMA QUANTA FEG (FEI Company, США) (без напыления образцов, микрофотографии были получены как в электронном, так и ионном излучениях) (Bonartsev et al., 2018; Volkov et al., 2020).

Работа на СЭМ была выполнена при содействии и на оборудовании Общефакультетской лаборатории электронной микроскопии (отв. профессор кафедры биоинженерии Соколова О.С., руководитель Давидович Н.Д.).

2.3.5. Флуоресцентная и 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 2мкМ в течении 15 мин при комнатной температуре, который имеет свойство проникать через мембраны живых клеток и под действием внутриклеточных эстераз гидролизоваться в отрицательно заряженное флуоресцентное соединение (Gantenbein-Ritter et al., 2011; Bonartsev et al., 2018; Volkov et al., 2020).

Микрофотографии процесса эндоцитоза микрочастиц, загруженных флуоресцентным ЛВ – дипиридамолом, были получены с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M с цифровой камерой AxioCam, обработка изображений проводилась программным обеспечением Zeiss LSM Browser 4.2.0 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия).

Микрокапсулы и микрочастицы, содержащие ФИТЦ-БСА и ФИТЦ-лизоцим, соответственно (дисперсия микрочастиц в воде) были также исследованы с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 510 META (Германия) с объективом C-Apochromat63x/1.2 W corr. Возбуждение проводилось лазером с длиной волны 488 нм, радиус конфокальной диафрагмы был равен 1 диску Эри (112 мкм). Использовался фильтр LP 505 нм (Зернов и др., 2015).

Эта работа проведена совместно с сотрудниками научной группы профессора кафедры биоинженерии Феофанова А.В.

Микроскопическое исследование костной ткани, меченной флуоресцентными маркерами, проводилось при помощи флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B с использованием штатного программного продукта Leica для флуоресцентной микроскопии. Микрофотографирование проводилось с использованием стандартного набора светофильтров с последующим сложением RGB-каналов в единое изображение - мультиканальная гистопантомограмма. Фотодокументирование проводилось с использованием фотокамер G3 (LG, Южная Корея) и Cyber-shot DSC-RX100 (Sony, Япония) (Volkov et al., 2020).

Эта работа была проведена совместно с ст. науч. сотр. ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова» МЗ РФ Волковым А.В.

2.3.6. Определение размера пор матриксов

Диаметр пор оценивали по фотографиям, полученным с помощью СЭМ (JSM-6380LA, JEOL, Japan) (см. подраздел данного раздела 3.4). Было исследовано по 6 образцов каждого матрикса, замеры производились по 8 полям зрения.

2.3.7. Определение размера микро- и наночастиц

Средний диаметр и стандартное отклонение полученных партий микрочастиц определяли по микрофотографиям, полученных с помощью светового микроскопа Биомед 1 Вар.2 (Биомед, Россия) с цифровым окуляром MYscope 300M (Webbers, Тайвань) с использованием программы ImageJ 1.46. Средние значения и отклонение диаметра микрочастиц каждой партии рассчитаны при измерении более 100 частиц. Диаметр наночастиц и их морфологию определяли по снимкам атомно-силовой микроскопии (см. п.2.2.6). Распределение размеров наночастиц и их Z-потенциал определяли с помощью метода динамического светорассеивания на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). (Выполнено совместно с ст.науч.сотр. кафедры биофизики Паршиной Евгенией Юрьевной на оборудовании ЦКП МГУ).

2.4. Методы исследования физико-химических свойств полимеров и изделий на их основе

2.4.1. Определение пористости матриксов

Пористость матриксов рассчитывали по формуле (Masaeli et al., 2012)

$$Плотность матрикса \quad (г/см^3) = \frac{масса(г)}{толщина матрикса(см) \times площадь поверхности(см^2)} \qquad (7)$$

$$Пористость(\%) = \left(\frac{Плотность\ матрикса \quad (г/см^3)}{Плотность\ материала(г/см^3)} \right) \times 100\% \qquad (8)$$

Поли-3-оксибутират имеет известную плотность 1.243 g/cm^3 (Misra et al., 2006). Массу образцов измеряли, с помощью весов Acculab AL-64, USA, размеры оценивали с помощью штангенциркуля (Krino, Italy) (n=8).

2.4.2. Измерение степени кристалличности биополимеров и изделий на их основе дифференциальной сканирующей калориметрией (ДСК)

Теплофизические характеристики пленок, матриксов и микрочастиц полученных полимеров (температуры плавления и кристаллизации, теплоты плавления и кристаллизации) исследовали с помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии согласно (Savenkova et al., 2000; Zheng et al., 2005). Полимерные пленки были проанализированы с помощью дифференциального сканирующего калориметра DSC 204 F1 Phoenix (Netzsch, Германия). Около 2-4 мг полимерной пленки помещали в 25 мкл алюминиего тигеля. Образцы нагревали от 25 до 220°C при скорости нагрева 10°C/мин в атмосфере аргона. Для точной калибровки температуры и энтальпии в диапазоне температур от –100ºС до 600ºС в соответствии с инструкциями производителя был использован калибровочный набор Netzsch (образцы высокой чистоты KNO_3, In, Bi, Sn, Zn, CsCl, Hg, C_6H_{12}). Температуру начала и максимума пика плавления или кристаллизации обозначали как $T_{пл.}^{0}$, $T_{пл.}^{пик}$ и $T_{кр.}^{пик}$, соответственно. Кристалличность ПОБ и его сополимеров (X_c) рассчитывали согласно (Zheng et al., 2005):

$X_c = \Delta H_m(ПОА) / \Delta H_{0m}(ПОБ) \times 100\%$, (9)

где ΔH_m(ПОА) – экспериментальная величина изменения энтальпии, вызванная плавлением исследуемого образца, ΔH_{0m}(ПОБ) - теоретическое значение для термодинамической энтальпии плавления, которое было бы получено для 100%-кристаллических образцов ПОБ (146,6 Дж/г) (Barham et al., 1984). Расчеты степени кристалличности образцов и температуры плавления произведены для данных, полученных на втором цикле нагрева полимеров, температура кристаллизации – на основании данных, полученных на первом цикле охлаждения. (Asrar and Gruys, 2002; Zheng et al., 2005). Данные представлены как средние значения из трех измерений.

Исследования методом ДСК были выполнены в лаборатории химической термодинамики на Химическом факультете МГУ, на оборудовании ЦКП МГУ (оператор н.с. Быков Михаил Арнольдович).

2.4.3. Рентгеноструктурный анализ

Степень кристалличности образцов полимеров определяли методом рентгеноструктурного анализа на стандартном дифрактометре (Rigaku Denki, Япония) с использованием 18 кВт -генератора с вращающимся медным анодом. Для фильтрации излучения использовали никелевый фильтр. Степень кристалличности определяли по соотношению интегральных интенсивностей рассеяния кристаллической и аморфной фазы (Ребров и др., 2002).

Работа выполнена совместно с Ребровым Александром Васильевичем, вед. науч.сотр. Института нефтехимического синтеза им. А.В.Топчиева РАН.

2.4.4. ИК-спектроскопия

ИК-спектры образцов полимеров регистрировали с помощью ИК-спектроскопии с Фурье преобразованиями. Спектры полимерных образцов снимались на Фурье спектрометре IFS-66 v/s (Bruker, Германия) в области 400-4000 $см^{-1}$. Разрешающая способность составляла 1 $см^{-1}$. (Vogel et al., 2008).

Помимо ИК-спектров полученных ПОБ и его сополимеров были получены ИК-спектры серии полимерных микрочастиц на их основе из разных полимеров различной молекулярной массы (ПОБ-6, ПОБ-260 и ПОБ-ПЭГ) с включением противоопухолевых ЛВ (паклитаксел и этопозид), а также с включением различных добавок-пластификаторов (лецитин, ПЭГ и частицы без добавок). В качестве контроля были также получены спектры соответствующих частиц, не содержащих ЛВ, частиц без пластификаторов и ЛВ, а также отдельно ПКТ и ЭТП.

Работа по ИК-спектроскопии ПОБ и его сополимеров была выполнена совместно с д.х.н. профессором Института нефтехимического синтеза им. А.В.Топчиева РАН Галиной Николаевной Бондаренко и на оборудовании Института.

2.4.5. Измерение контактных углов

Гидрофильность поверхности полимерных пленок ПОБ и его сополимеров оценивали, измеряя контактный угол смачивания, формирующийся между каплей воды и поверхностью полимерной пленки. Т.к. пленка имеет две стороны: "гладкую" и "шероховатую", то каплю наносили как на одну, так и на вторую сторону. Контактный угол смачивания измеряли с помощью цифрового угломера – системы анализа формы капли Drop Shape Analysis System – DSA100 (KRÜSS, GmbH, Германия) согласно (Bonartsev et al., 2013a; Bonartsev et al., 2013б; Bonartsev et al., 2016a; Bonartsev et al., 2017a; Zheng et al., 2005). Исследуемый образец полимерной пленки, зафиксированный на предметном стекле, помещали в поле зрения видеокамеры прибора перед источником света. При измерении система дозирования подавала тестируемую жидкость (деаэрированную дистиллированную воду), на поверхность подготовленных образцов каплями, увеличивающимися в объеме от 1,5 до 5 мкл с постоянной скоростью (200 μл/мин). Прибор записывает момент подачи капли и ее постепенного увеличения на видео. Динамическое равновесие в системе наступало через некоторое время, когда угол контакта становился 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. Таким образом были получены углы смачивания (динамические углы натекания) для исследуемых материалов. Аппроксимация формы капли осуществляется методом Лапласа-Юнга. Среднее значение контактного угла было посчитано из не менее 10 измерений на обеих сторонах полимерной пленки при температуре 25°С. Хотя контактный угол может быть измерен с высокой точностью (точность метода составляет 0,1%), но в результате шероховатости образца стандартная статистическая погрешность находится в пределах 1-2% (Zheng et al., 2005).

Работа по измерению контактных углов смачивания водой была выполнена совместно с лабораторией физики и технологии почв кафедры физики и мелиорации почв факультета почвоведения МГУ (ст.науч.сотр. Быкова Г.С., доцент Милановский Е.Ю., ст.науч.сотр. Тюгай З.Н.) и на оборудовании ЦКП МГУ.

Для расчета свободной поверхностной энергии (СПЭ) полимеров и её компонентов (дисперсной и полярной) были измерены контактные углы с тремя другими жидкостями – ДЭГ, ТЭГ и ПЭГ 400. Расчет компонент СПЭ полимеров проводился геометрическим методом (методом Фоукса) (Shimizu and Demarquette, 1999). СПЭ рассчитывали, как среднее для разных пар жидкостей.

2.4.6. Механические испытания образцов пленок полимеров

Механические свойства пленок и матриксов из ПОА были исследованы при помощи 3-х методов: на разрывной машине, реометрии и наноиндентирования.

Для проведения исследования механических свойств полимеров высекали образцы пленок полимера в виде лопаток с длиной рабочей части 10 мм, шириной 3 мм и толщиной 0,03-0,04 мм. Механические свойства пленок полимера (прочность, удлинение при разрыве, модуль упругости) определяли на универсальных динамометрах Инстрон 1121 и 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 движения траверсы для определения модуля Юнга – 2-5 мм/мин; тип захвата - вулкалан. Испытания проводили при 20 ℃ (Кабанов, 1985).

Исследования выполнены совместно с Лабораторией химии и технологии материалов для сердечно-сосудистой хирургии Национального медицинского исследовательского центра сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева МЗ РФ, руководителем лаборатории профессором Новиковой Светланой Петровной.

Реологические измерения пористых 3D-матриксов и микросфер на основе ПОА были проведены на реометре MCR-302 (Anton Paar, Австрия). Измерения проводили на влажных образцах при температуре 25°C. Использовали геометрию плита–плита с диаметром верхней плиты равной 25 мм, толщина образцов составляла 2–4 мм. Скорость сжатия была линейной и равнялась 0,01 мм/с. Выходные данные нормальной силы (F_n) и изменение зазора между плитами (gap) пересчитывались в программе OriginPro 8.6 (США) в величины давления (P) и относительной деформации (σ). Затем строилась кривая в координатах зависимости давления (P) от относительной деформации (σ). Модуль Юнга образца высчитывался по тангенсу угла наклона линейной части графика (Shikanov et al., 2009).

Исследование механических свойств пленок ПОА на микроуровне проводилось при помощи метода наноиндентирования в соответствии с рекомендациями ISO 14577 на сканирующем нанотвердомере NanoScan-4D (ФГБНУ ТИСНУМ, Троицк, Москва, Россия) (Maslenikov et al., 2015). Наноиндентирование проводилось на гладкой стороне пленок, для нивелирования влияния шероховатости на измерение модуля Юнга полимера. Пленки с размерами 2×2 мм^2 были зафиксированы фенилсалицилатом. Загрузка осуществлялась в линейном режиме, пиковая нагрузка на образец составляла 5 мН. Время нагрузки было равно времени разгрузки и составляло 30 секунд. Пиковая нагрузка поддерживалась в течение 5 секунд. Средняя глубина проникновения в образец составляло 1 мкм. Механические свойства усреднялись по 6 измерениями (Zhuikov et al., 2020).

Эта работа сделана совместно с Отделом исследования физико-механических свойств ФГБНУ ТИСНУМ, научной группой под рук. в.н.с., к.ф.-м.н. В.Н. Решетова и в.н.с., к.ф.-м.н. А.С. Усеинова.

2.4.7. Водопоглощение

Водопоглощение полимерных пленок, 2D- и 3D-матриксов измерялось в соответствии со стандартом (ГОСТ 4650-2014 (ISO 62:2008)). Пленочные образцы выдерживали при t = 50ºC до постоянного значения массы (m_1). Это составляло 2-3 сут. После этого их погружали в деионизированную воду (t=25ºC) на определенное время. После удаления капель воды образцы взвешивали снова. Опыт проводили до того момента, когда увеличение массы не превышала 0,1 мг (m_2). После этого образцы снова высушивали при t=50ºC в течение суток и взвешивали (m_3).

Содержание воды затем рассчитывали на основе разницы в весе пленки до и после гидратации. Водопоглощение полимерных пленок рассчитывалось по следующей формуле:

$$\text{Водопоглощение (\%)} = (m_2 - m_0)/m_0 \times 100\%, \quad (9)$$

где m_0 и m_2 - массы образцов полимерных пленок до и после погружения в воду, соответственно. 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=8) (Li et al., 2011; Bonartsev et al., 2013а; Bonartsev et al., 2013б; Bonartsev et al., 2018).

2.4.8. Адсорбция белков

Полимерные пленки инкубировали в модифицированной среде Игла (DMEM), содержащей 10% (об./об.) эмбриональной бычьей сыворотки (Invitrogen, США), при 37°С в течение 24 часов. После инкубации образцы инкубировали в отмывочном буфере, состоящем из 10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА и 0,1% SDS (об./вес); образцы перемешивали в течение 6 ч при 3-4°С. Эта процедура позволяла удалить белки, адсорбированные на поверхности образца. Их количество затем определяли методом с использованием реагента Брэдфорда (Sigma-Aldrich, США) с помощью спектрофотометра Ultrospec 1100 pro (Amersham Biosciences Corp., США). Экспериментальные данные представлены как количество белка, адсорбированного на единицу площади поверхности ($см^2$) полимерных мембран (Zheng et al., 2005). Чтобы визуализировать адсорбированный на поверхности полимерной пленки белок был использован Фитц-меченый БСА (Фитц-БСА)(Sigma-Aldrich, США). Адсорбция белков на интенсивно промытые (используя воды MilliQ) и высушенные полимерные пленки была исследована путем инкубации пленок в растворе Фитц-БСА в 10 мМ Трис в течение 2ч при 37°С. Анализ адсорбированного белка на «гладкой» поверхности полимерных пленок проводился с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием флуоресцентного микроскопа Axiovert 200 M с цифровой камерой AxioCam b программного обеспечения Zeiss LSM Image Browser 4.2.0 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия) (Bonartsev et al., 2013а; Bonartsev et al., 2013б).

2.4.9. Исследование биодеградации изделий из ПОА *in vitro*

Для изучения гидролитической и ферментативной деградации *in vitro* пленок, изготовленных из ПОБ и его сополимеров, а также пористых 3D-матриксов на основе ПОБ и его композита с ГА, образцы (образцы использовали массой не менее 100 мг) инкубировали в 15 мл стандартного натрий-фосфатного солевого буферного раствора (БФС) (pH = 7,4) или в 15 мл раствора (концентрация 0,25 мг/мл) свиной панкреатической липазы (Type II, Sigma Aldrich A=30-90 U/mg белка, используя триацетин) в БФС при 37° в течение 183 сут., а в случае матриксов – 30 и 180 сут. За pH следили с помощью pH-метра Orion 420+ (Thermo Fisher ScientificThermo Electron Corporation, США). В буферный раствор добавляли азид натрия (NaN_3) 2 г/л для ингибирования роста микроорганизмов и предотвращения их вклада в биодеструкцию. Замену буфера в пробирках производили дважды в неделю. Для измерения веса пленки вынимали из раствора и сушили до установления равновесия на весах. Перед

измерениями пленки обрабатывали 0,1% SDS в дистиллированной воде в течение 2 часов, отмывали детергент водой и затем высушивали. Для оценки изменения массы 3D-матриксов их извлекали из раствора липазы через 1 и 6 месяцев, обрабатывали 0,1% SDS в дистиллированной воде в течение 2 часов, отмывали детергент водой, сушили и взвешивали на весах. Изменение массы 3D-матриксов в процессе разложения определяли гравиметрически на весах AL-64 (макс. =60 г, d =0,1 мг, ACCULAB, США) (Zhuikov et al., 2020).

Гидролитическую деградацию микрочастиц на основе ПОА изучали на протяжении всего опыта по высвобождению активного действующего вещества *in vitro*. Для этого микрочастицы, инкубировавшийся в БФС (pH = 7,4) при 37°, отбирали на разных сроках, осаждали на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) и лиофилизировали с помощью Freeze dryer ALPHA 1-2 LDplus (Германия). Полученные образцы были изучены с помощью электронного микроскопа Quanta 200 3D (FEI Company, США) без напыления (Zhuikov et al., 2020; Zhuikov et al., 2021).

2.4.10. Изучение кинетики высвобождения ЛВ и белка из микрочастиц на основе ПОБ

Экспериментальное исследование пролонгированного высвобождения ПКЛ из микро- и наночастиц, а также лизоцима и БСА из композитных микрочастиц *in vitro* проводили при 37°C в термостате ТС-1/20 (Россия) в БФС (в случае микрочастиц с белков – в калий-фосфатном буферном растворе) (pH = 7,4) с небольшим добавлением эмульгатора (0,1% Твин 80): 6 партий микрочастиц или наночастиц по 20 мг микрочастиц в 4 мл буфера перемешивали на шейкере (BioSan, США) при 350 об/мин на орбитальном шейкере (ОС-10 Biosan, Латвия). Т.е. исследовали высвобождение ПКЛ из твердых полимерных микро-/наночастиц в жидкую фазу водной дисперсии микро-/наночастиц. При исследовании высвобождения ЛВ в установленные моменты времени (во временном интервале до 110 сут.) образцы буфера с высвободившимся ПКЛ отделяли от частиц центрифугированием смеси при 14000 оборотов в минуту на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) и анализировали их спектрофотометрически на содержание ЛВ. Полученные данные использовались для построения кинетических профилей высвобождения. Удаленная среда заменялась равным объемом свежей среды после каждого отбора проб. УФ анализ образцов проводился, как было описано ранее с использованием УФ-спектрофотометра на спектрофотометре DU-650 (Beckman Coulter, США). Содержание ЛВ и белка в буфере определяли спектрофотометрически при сравнении с фосфатным буфером и с помощью построения калибровочной кривой с использованием спиртоводных растворов ЛВ в различных концентрациях. Остаточное содержание ЛВ в микрочастицах определяли также спектрофотометрически, растворяя их в хлороформе (Зернов и др., 2017а; Зернов и др., 2017б).

2.4.11.1. Определение целостности первичной структуры лизоцима при помощи электрофореза в ПААГ в присутствии SDS

Для определения целостности первичной структуры лизоцима, высвобождаемого из полимерных микрочастиц, была проведена стандартная процедура электрофореза по Лэммли в ПААГ в присутствии SDS (Laemmli, 1970) и с использованием камеры BG-verMINI **(**Baygene, Китай).

Для приготовления образцов высвободившегося белка микрочастицы в количестве 100 мг инкубировали при 37ºС в термостате ТС 1/20 (Россия) в БФС с добавлением антибактериального агента азида натрия с концентрацией 0,004% (вес/объем) при постоянном перемешивании на орбитальном шейкере OS-10 (BIOSAN, Латвия). Через заданные интервалы времени полимерные микрочастицы отделяли от буфера центрифугированием при 10 000 об/мин на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия). Осажденные частицы заливали свежим буфером, а в полученном супернатанте повышали концентрацию с помощью мембранных центрифужных концентраторов (Millipore, Германия). Так как пределом чувствительности метода данного метода является ~1 мкг белка в пробе (Сафронова и др., 2009), необходимо было проводить концентрирование образцов до достижения значения 1 мкг в наносимой пробе.

Для проведения электрофореза были приготовлены растворы для концентрирующего и разделяющего гелей и буферные растворы:

-Разделяющий гель

Раствор для приготовления разделяющего геля готовился на основе 4х-кратного Трис-HCl буфера (1,5М; pH=8,8; 0,8% SDS) и содержал 14% акриламида (АА) и 0,8% метиленбисакриламида (МБА). Раствор для приготовления геля доводили до нужного объема деионизированной водой.

-Концентрирующий гель

Раствор для приготовления концентрирующего геля готовился на основе 4х-кратного Трис-HCl буфера (0,5 М; pH=6,8; 0,8% SDS) и содержал 7% акриламида (АА) и 0,4% метиленбисакриламида (МБА). Раствор для приготовления геля доводили до нужного объема деионизированной водой.

-Электродный буфер

В качестве электродного буфера использовали Трис-глициновый буфер с добавлением додецил-сульфата натрия (25 мМ Трис-HCl; 192 мМ глицина; 0,1% SDS; pH 8,6).

-Буфер для образцов

Для нанесения образцов был приготовлен специальный 2-х кратный буфер (Трис-HCl 0,5 М; 4% SDS; 0,04% бромфеноловый синий; 10% глицерин; 4% β-меркаптоэтанол; pH=6,8)

-Раствор для фиксации и промывки гелей

Раствор, содержащий 10% уксусной кислоты и 30% изопропанола в воде

-Раствор для окрашивания гелей

0,1% раствошпр красителя Кумасси G-250, содержащий 10% уксусной кислоты и 30% изопропанола в воде

Непосредственно перед заливкой в гели добавляли TEMED (0,1%) и персульфат аммония (PSA) на кончике шпателя для полимеризации гелей. В ячейку камеры заливали около 6 мл разделяющего геля, полимеризация проводилась при 37 °С в термостате. Затем поверх разделяющего, заливали около 1,5 мл концентрирующего геля и, вставив гребенку, ставили в термостат для прохождения реакции полимеризации.

На дорожки наносились следующие образцы: лизоцим, высвободившийся из микрочастиц различного состава, контрольный раствор лизоцима, белки-маркеры. Исследуемые образы смешивали в равных объемах с буфером для образцов и подвергались кипячению 3-5 мин. После этого они наносились на дорожки, камера подключалась к току (10 мА на один гель) и проводился электрофорез. После вхождения образцов на 3-5 мм в разделяющий гель ток переключали на 25 мА. Когда краситель достигал нижней границы геля, отключали ток от камеры, вынимали гель, промывали его водой и помещали в раствор для фиксации на 15 мин. За это время белки фиксировались на геле, избыток додецил-сульфата натрия вымывался из него. Затем гель помещали в окрашивающий раствор и инкубировали в течение ночи. Затем гель отмывали раствором для промывки гелей при нагревании (Зернов и др., 2017б).

2.4.11.2. Исследование вторичной структуры высвободившегося белка методом кругового дихроизма

Для определения целостности вторичной структуры лизоцима, высвобождаемого из полимерных микрочастиц, белок был исследован с помощью метода кругового дихроизма на дихроиметре Chirascan (Applied Photophysics, Великоблитания).

Для приготовления образцов высвободившегося белка микрочастицы в количестве 100 мг инкубировали при 37ºС в термостате ТС 1/20 (Россия) в БФС без добавления азида натрия в стерильных условиях при постоянном перемешивании на орбитальном шейкере OS-10 (BIOSAN, Латвия). Через 14 суток инкубации полимерные микрочастицы отделяли от буфера центрифугированием при 10 000 об/мин на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия). Осажденные частицы заливали свежим стерильным буфером, а в полученном супернатанте повышали концентрацию с помощью мембранных центрифужных концентраторов (Millipore, Германия). В качестве контрольного образца сравнения исследовался свежеприготовленный раствор лизоцима с концентрацией 0,33 мкг/мл, а также эталонный спектр лизоцима, полученный из литературных данных (Matsuo et al., 2004; Зернов и др., 2017б).

Работа выполнена на оборудовании центра общего пользования ФИЦ «Биотехнологии» РАН и при содействии ст.науч.сотр. Шубина В.В.

2.4.11.3. Исследование третичной структуры высвободившегося белка методом определения его ферментативной активности

Определение ферментативной активности белка осуществляли на спектрофотометре UV-1601PC (SHIMADZU, Япония). В качестве субстрата для лизоцима использовали лиофилизированную культуру *Micrococcus luteus* (McKenzie and White, 1986). Для этого была приготовлена суспензия данной культуры с концентрацией 0,2 мг/мл в Трис-HCl буфере. Два миллилитра раствора помещали в кювету, к ним добавляли 0,3 мл раствора высвободившегося лизоцима, проводили измерение при длине волны 450 нм и строили зависимость поглощения от времени реакции. Для построения калибровочной прямой зависимости изменения поглощения в единицу времени от концентрации лизоцима также использовались растворы лизоцима с концентрациями от 1 до 100 мкг/мл. Активность оценивалась как отношение к контрольному образцу нативного лизоцима (Зернов и др., 2017б).

2.5. Методы исследования цитотоксичности, биосовместимости и остеогенной активности полимеров и изделий на их основе *in vitro*

2.5.1. Культуры клеток

Для тестирования цитотоксичности и биосовместимости полимеров и изделий на их основе были использованы различные линия клеток: фибробласты обезьяны COS-1 (Биолот, Россия) (Demirel et al., 2007; Gizdavic-Nikolaidis et al., 2012), фибробласты мыши 3T3 (любезно предоставлены Мойсеновичем М.М.) (Moisenovich et al., 2011; Arkhipova et al., 2016)) (Borenfreund et al., 1988; Webb et al., 1998; Schwarze et al., 2002), культуру клеток рака молочной железы человека линии MCF-7, культуру клеток гепатомы мыши линии MH-22a, а также мезенхимальные стволовые клетки, выделенные из костного мозга и жировой ткани крыс.

Мезенхимальные (стромальные) стволовые клетки (МСК) выделяли из костного мозга бедренных костей 3-дневных крыс линии Вистар по стандартной методике (Maniatopoulos et al., 1988; Harting et al., 2008; Boxall and Jones, 2012). Животных забивали декапитацией, выделяли бедренные кости, отрезали эпифизы, костный мозг вымывали из диафизов с помощью шприца (2 мм, игла 27G). Полученную суспензию инкубировали в среде DMEM с коллагеназой типа 1 (1075 ед/мл) («ПанЭко», Россия) в течение 1 ч при 37°C, центрифугировали (10 мин, 100 об/мин), осадок собирали в 25 мл культуральные флаконы (NUNC, Дания). Суспензию клеток переносили из флаконов на культуральные планшеты. На следующий день меняли ростовую

среду и далее культивировали до появления первичной монослойной культуры. Использовали клетки второго пассажа, так как пролиферация клеток первого пассажа была не вполне стабильной, в повторных экспериментах наблюдались значительные различия в росте клеток первого пассажа на полимерных пленках (Bonartsev et al., 2018; Volkov et al., 2020).

Клетки культивировали в модифицированной среде Игла (DMEM, Invitrogen, США) с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки теленка, 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл раствора стрептомицина (Invitrogen, США). Клетки инкубировали при 37°С в увлажненной атмосфере 5% CO_2, с ежедневной заменой среды (Шевлюк и др., 2010). Клетки трипсинизировали раствором трипсин-версена (0,05% трипсина (об./вес) и 0,02% (об./вес) ЕДТА в фосфатном буфере) (Serva, Германия) и подсчитывали с помощью Coulter Z1 (Beckman Coulter, США) (Bonartsev et al., 2018; Volkov et al., 2020).

2.5.2. Исследование биосовместимости *in vitro*

Для анализа биосовместимости полимеров и изделий на их основе было проведено исследование жизнеспособности клеток в их присутствии по двум методикам: определения цитотоксичности пленок/матриксов и определения прикрепления и пролиферации клеток на при их росте на пленках/матриксах.

Для исследования цитотоксичности *in vitro* полученных полимеров ПОБ, ПОБВ, ПОБ4МВ, ПОБ-ПЭГ, ПОБВ-ПЭГ, композита ПОБ/ПЭГ, ПМК, а также матриксов на основе ПОБ, ПОБ-ПЭГ, ПОБ/ПЭГ и ПМК было проведено исследование по методу прямого контакта согласно ГОСТ ISO 10993-5-2011 (Севастьянов и Кирпичников, 2011). Для этого 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 = 6-12) помещали в те же лунки. 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 37ºС в атмосфере, содержащей 5% CO_2, среда менялась каждые три дня (Шевлюк и др., 2010). По прошествии определенного времени извлекали полимерные образцы из инкубационных планшетов и проводили исследование цитотоксичности с помощью XTT теста. Измерение проводили через 24, 48(72) и 96 часов культивирования.

Для исследования прикрепления и пролиферация клеток на полимерных пленках и матриксах из ПОБ, ПОБ-ОВ и ПОБ-ПЭГ образцы для каждого вида полимера (n = 6-12) помещали в 96-луночные культуральные планшеты, клеточную суспензию наносили сверху из расчета 2000 клеток на образец в каждой лунке. Полимерные пленки, вырезанные по форме дна лунки, помещали в лунки "грубой" (шершавой) поверхностью вверх. То же самое количество

клеток высевали в качестве отрицательного контроля. 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 37ºС в атмосфере, содержащей 5% CO_2, среда менялась каждые три дня (Шевлюк и др., 2010). Образцы инкубировали в течение 24, 48 (72), 96 и 168 часов. Начальное прикрепление клеток к поверхности материала и последующая пролиферация клеток на (или в) материале показывает количественные косвенные данные о его свойствах, которые можно использовать для оценки совместимости живых клеток с исследуемым образцом: биохимическая реакционноспособность материала, высвобождение токсичных продуктов из его матрикса, влияние морфологии поверхности материала на роста клеток, биофизические свойства поверхности (заряд, гидрофильность) материала и т.д. Поэтому, оценка жизнеспособности клеток *in vitro* для определения адгезии и пролиферации клеток на различных материалах широко используется для анализа биосовместимости этих материалов (Jenkins, 2007; Shtilman, 2003; Chen and Wu, 2005; Demirel et al., 2007; Gizdavic-Nikolaidis et al., 2012). Измерение проводили через 24, 48 (72), 96 и 168 часов культивирования (Bonartsev et al., 2018; Volkov et al., 2020).

Жизнеспособность и пролиферацию клеток измеряли с помощью теста XTT (Sutherland and Learmonth, 1997), основанном на превращении соли тетразолия в растворимую соль формазана активными митохондриями жизнеспособных клеток (XTT-proliferation kit, Biological Industries, Израиль). В конце времени культивации, полимерные пленки с прикрепленными клетками осторожно и быстро перемещали из лунок инкубационного планшета в соответствующие лунки нового планшета с предварительно добавленными 100 мкл чистой среды. Затем в каждую лунку добавляли 50 мкл раствора XTT-реагента и активатора (1 мл + 20 мкл) и планшеты инкубировали при 37°С еще в течение 4 часов. Полимерные пленки удалялись, и поглощение образцов измеряли спектрофотометрически при 450 нм, вычитая фоновое поглощение при 620 нм. В случае исследования цитотоксичности лунки уже не содержали пленок, поэтому реагент XTT добавляли сразу непосредственно в лунки планшета, содержащего клетки, прикрепленные к культуральному пластику. Количество жизнеспособных клеток в лунках или на ПОА пленках затем определяли по калибровочной кривой на основе их XTT-реакционной способности. Результаты были представлены в виде оптической плотности (ОП), а также по калибровочной прямой пересчитывались на число клеток на $см^2$. Калибровочную прямую строили на основании подсчета клеток с помощью камеры Горяева (или соответствующей измерительной сетки окуляра микроскопа). В случае исследования цитотоксичности выживаемость клеток под влиянием тестируемого агента, вычислялась по формуле:

N% = (кол-во клеток в опыте / кол-во клеток в контроле) × 100%

(Шевлюк и др., 2010; Bonartsev et al., 2013а; Bonartsev et al., 2013б; Bonartsev et al., 2018; Volkov et al., 2020).

2.5.3. Исследование цитотоксичности полимерных нано- и микрочастиц

Для оценки биобезопасности микро- и наночастиц *in vitro* использовали культуру клеток рака молочной железы человека линии MCF-7 и культуру клеток гепатомы мыши линии MH-22a. Для оценки цитотоксичности микрочастиц, загруженных композитом ГА/лизоцим, их инкубировали с МСК крысы (Santos et al., 2010).

Клетки культивировали в среде DMEM (Dubecco Modified Eagle Medium, Invitrogen, США) с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл раствора стрептомицина (Invitrogen, США) (Шевлюк и др., 2010). Клетки инкубировали при 37ºС в увлажненной 5% CO_2 атмосфере с ежедневной сменой сред. Трипсинизировали клетки раствором трипсин-версена (0,05% (об./мас.) трипсина и 0,02% (об./мас.) EDTA в PBS) (Serva, Германия) и подсчитывали их количество с помощью Coulter Counter Z1 (Beckman Coulter, США).

Выживаемость клеток под влиянием тестируемого агента, вычислялась по формуле: N% = (кол-во клеток в опыте / кол-во клеток в контроле) х 100%. При этом использовался стандартный XTT-тест (аналог MTT), как наиболее показательный метод при работе с используемыми культурами опухолевых клеток (см. подраздел данной Главы 2.5.2) (Шевлюк и др., 2010).

Предварительно стерилизованные автоклавированием микро- или наночастицы, диспергированные в культуральной среде, добавляли в различных концентрациях к культивируемым в 96-луночных планшетах клеткам, которые были высажены из расчета 5000 клеток/лунку. Исследуемые образцы частиц с включением паклитаксела и этопозида (включение 10% по массе) были испытаны в 6 параллельных измерениях в следующих концентрациях: 3 мкг/мл, 10 мкг/мл, 30 мкг/мл, 100 мкг/мл, 300 мкг/мл, 1 мг/мл и 3 мг/мл (т.е. содержащие 0,3 мкг/мл, 1 мкг/мл, 3 мкг/мл, 10 мкг/мл, 30 мкг/мл, 100 мкг/мл и 300 мкг/мл паклитаксела соответственно). Суспензию биополимерных микрочастиц в концентрациях 3 мг/мл, не содержащих ЛВ, использовали в качестве отрицательного контроля. Раствор чистого ЛВ без биополимерных микрочастиц в концентрации 3 мг/мл использовали в качестве положительного контроля. Микрочастицы, загруженные композитом ГА/лизоцим, добавляли в различных концентрациях (от 1 до 20 мг/мл), в качестве контролей использовали пустые

частицы из соответствующих полимеров. Измерения проводили через 24, 48 и 72 часа от начала культивации (Бонарцев и др., 2011; Bonartsev et al., 2017в).

2.5.4. Фенотипирование МСК крыс методом проточной цитометрии

Для подтверждения основных характеристик МСК проводят фенотипирование клеток по определенным маркерам. Для этого сначала проводят снятие клеток с поверхности культурального пластика с помощью инкубации в растворе Трипсин-ЭДТА (ПанЭко, Россия) (в случае, когда клетки снимали с полимерных подложек время инкубации в растворе Трипсин-ЭДТА увеличивалось до 15 мин), подсчитывают с помощью гемоцитометра и готовят суспензию 10^5 клеток в 100 мкл РЕ буфера (2 мМ ЭДТА, 0,5% ЭТС в БФС). Затем взвесь МСК инкубируют с антителами к поверхностным маркерам МСК, с CD45 и CD11b/c, как наиболее показательными позитивными маркерами, и с CD90 и CD29 (eBioscience, США), как наиболее показательными негативными маркерами (Harting et al., 2008; Boxall and Jones, 2012), в темноте в течение 40 минут при температуре +5°С. Клетки отмывают центрифугированием один раз в БФС и анализируют на проточном цитометре FACSAria SORP. Чтобы оценить число жизнеспособных клеток в популяции МСК, был использован маркер живых клеток 7-аминоактиномицин D (7ААД). Клетки были промыты центрифугированием один раз в БФС и их анализировали на проточном цитометре FACS ARIA II (BD Biosciences, США). Анализ результатов и построение графиков выполнены с помощью программы Flowing Software 2.5.1. (Bonartsev et al., 2018; Volkov et al., 2020).

Работа выполнена совместно с ст.науч.сотр. кафедры клеточной биологии и гистологии Поташниковой Дарьей Марковной на оборудовании ЦКП МГУ, приобретенном за счет средств Программы развития МГУ.

2.5.5. Остеонаправленная дифференцировка МСК

2.5.5.1. Среда для остеогенной дифференцировки

Культуральная среда для остеодифференцировки МСК готовилась на основе DMEM и содержала 10% ЭТС (Biological Industries, Израиль), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, 10 мМ дексаметазона (KRKA, Чехия), 10мМ β-глицерофосфата (Sigma-Aldrich (Merck), США) и 50 мМ аскорбиновой кислоты (Sigma-Aldrich (Merck), США) (Shakibaei 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.

2.5.5.2. Дифференциальное окрашивание отложений солей кальция

С помощью реактива ализаринового красного производили дифференциальное окрашивание минерализованного межклеточного матрикса и отложений солей кальция (Hosseini et al., 2019) при росте МСК на полимерных 2D- и 3D-матриксах и пористых микросферах. Перед окрашиванием образцы дважды промывали БФС и 10 минут фиксировали в 10%-ном формалине. Затем образцы трижды промывали БФС и окрашивали 40 мМ раствором ализаринового красного в НФБ на 5 минут. Краситель отмывали дистиллированной водой, после чего образцы матриксов анализировали при помощи стереомикроскопов Nicon SMZ800 (Nikon Inst., Япония) или AxioLab A1FL (Carl Zeiss, Германия).

2.5.5.3. Измерение активности щелочной фосфатазы

Для определения щелочной фосфатазы (ЩФ) в МСК, культивируемых на матриксах на основе ПОБ использовали образцы полимерных матриксов диаметром 1 см. Изначально МСК засевали из расчета 7000 клеток на образец и анализировали на 7, 14 и 21 сутки. Образцы, с растущими на них клетками, промывали 2 раза в БФС, затем помещались в лизирующий буфер (250мМ NaCl, 0,1% Triton X-100, 50мМ Hepes, pH 7,5) и подвергали 3-м циклам замораживания-оттаивания. Затем образцы центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин и измеряли активность щелочной фосфатазы. В 96-луночную плашку добавляли 100 мкл пробы и 15 мкл реагента (15 мМ н-нитрофенилфосфат (Sigma-Aldrich (Merck), США), 2 мМ MgCl, pH=10), инкубировали в термостате 120 мин. при 37 °С, а затем измеряли оптическую плотность при 405 нм. Отрицательным контролем служил лизирующий буфер, также в качестве положительного контроля использовали клетки, растущие на культуральном пластике (Bonartsev et al., 2018; Volkov et al., 2020). Активность ЩФ является одним из основных маркеров остеогенной дифференцировки МСК (de Paula et al., 2013; Lü et al., 2013; Shumilova et al., 2017).

2.5.6. Помещение МСК в 3D-матриксы и изготовление тканеинженерных конструкций

В качестве средства доставки для помещения МСК в полученные нами 3D-матриксы был использован альгинатный гидрогель. Для инженерии костной ткани в экспериментах *in vivo* были получены матриксы на основе композита ПОБ/ГА, в которых были загружены МСК в альгинатном гидрогеле: группа ПОБ/ГА/АЛГ/МСК. Соответственно, в качестве контрольных групп были использованы 3D-матриксы на основе ПОБ и ПОБ/ГА, заполненные альгинатным гидрогелем без клеток: группы ПОБ/АЛГ и ПОБ/ГА/АЛГ. Чтобы получить матриксы ПОБ/АЛГ и ПОБ/ГА/АЛГ их заполняли 1% раствором альгината натрия (АЛГ) до полного насыщения.

Затем их помещали в 5% (мас./об.) раствор $CaCl_2$ до полного желирования альгината в порах матрикса, после чего полученные композитные матриксы промывали БФС. Альгинат натрия был выбран в качестве средства доставки МСК в пористые матриксы, т.к. его применяют для инкапсуляции МСК и других клеток, используемых для стимуляции регенерации костной и хрящевой тканей в матриксах (Salinas and Anseth, 2009; Bai et al., 2010; Sun et al., 2017).

Перед заполнением пористых матриксов ПОБ/ГА МСК помещали в раствор альгината натрия ALG. Для этого стерилизовали порошок альгината натрия в этаноле и с помощью УФ-облучении, после чего полимер растворяли в течение 6 ч при перемешивании на магнитной мешалке в БФС в концентрации 1% (мас./об.) в асептических условиях. Затем готовили суспензию МСК в полученном растворе альгината натрия в концентрации 200000 клеток на 1 мл. Пористые матриксы ПОБ/ГА пропитывали полученной суспензией МСК в альгинате автоматической пипеткой в объеме 100 мкл (20000 клеток) на матрикс. После пропитки лишний раствор альгината удалили, после чего пропитанные матриксы заливали стерильным 5 мМ раствором $CaCl_2$ для получения альгинатного гидрогеля, содержащего клетки. После инкубации в течение 3 мин в хлористом кальции каркасы промывали БФС (Volkov et al., 2020).

2.6. Исследование биосовместимости конструкций на основе поли-3-оксибутирата и их биоактивности на моделях заболеваний *in vivo*

2.6.1. Исследование тканевой реакции на имплантацию пленок на основе поли-3-оксибутирата и его сополимеров

Для оценки биодеградации ПОБ и ПОБВ *in vivo*, пленки толщиной 40 мкм размером 15×15 мм помещали подкожно на брюшину самцам крыс линии Вистар на срок 7, 14, 30, 90 и 180 сут. Образцы ПОБВ и ПЛА использовали толщиной – 40 мкм. В эксперименте использовали ПОБ-485, ПОБ-1050 и ПОБВ-9-1010, в качестве контроля использовали ПЛА с ММ = 152 кДа. Пленки стерилизовали автоклавированием, после чего их дополнительно обрабатывали спиртом и промывали дистиллированной водой непосредственно перед подкожной имплантацией. Крыс наркотизировали тиопенталом натрия в дозе 50 мг/кг внутрибрюшинно. Имплантацию пленок осуществляли в строго асептических условиях. На брюхе удаляли шесть выщипыванием, а затем двукратно обрабатывали 70% спиртом. Затем проводили рассечение кожи в продольном направлении длиной до 1 см, затем хирургическим шпателем проводили сепарацию кожи от подлежащей подкожной клетчатки на брюшине. На приготовленный таким образом участок ткани помещали 1 имплантат пленки на 1 крысу. Фиксация пленок к тканям не проводилась. После проводили наложение швов на кожу нитью ВОЛОТЬ 4/0 и обрабатывали раны 70% спиртом и йодом, а также посыпали антисептиком. На 7, 14, 30, 90 и 180 сутки животных выводили из эксперимента. Животных вскрывали, выявляли

соединительнотканные капсулы с имплантатами пленок, извлекали их и фиксировали в заформалиновом буфере для дальнейшего гистологического исследования (Босхомджиев и др., 2010). С помощью этой методики проводили подкожную имплантацию 2D-матриксов на основе ПОБ. Гистологические исследования проводились на 7, 14 и 60 день после имплантации.

2.6.2. Изучение острой токсичности биополимерных частиц *in vivo*

Исследования проводились в соответствии с действующими методическими рекомендациями по доклиническому изучению общетоксического действия новых лекарственных средств (Хабриев, 2005).

Работа проводилась на 130 здоровых мышах-самцах линии B_6D_2F1, 60 мышах-самках линии B_6D_2F1, 60 неинбредных крысах-самцах, 60 неинбредных крысах-самках, полученных из разведения ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН.

Все животные здоровы, имели ветеринарный сертификат качества и состояния здоровья. Мышей содержали в специальных, просторных клетках по 6 или 7 особей, а крыс содержали в специальных, просторных клетках по 5 особей при температуре воздуха 20-23^{o}C и относительной влажности 60-65% в условиях естественного освещения и принудительной вентиляции на подстилке из древесных стружек, простерилизованных в сухожаровом шкафу. Для кормления животных использовали стандартный промышленный сертифицированный брикетированный корм для грызунов с установленным сроком годности, животные получали корм «ad libitum».

Сырую питьевую воду в закрытых поилках (250 мл для мышей, 500 мл для крыс) с конической пробкой из нержавеющей стали с отверстием в центре животные получали «ad libitum».

Препарат: Микрочастицы на основе ПОБ 6 кДа, загруженные ПТЛ были приготовлены по методике ультразвукового пьзоэлектрического мембранного распылительного высушивания в бескислородной атмосфере (Nano Spray Dryer B-90 Application Booklet, 2009; Heng et al., 2011) (подраздел 2.2.5.3 данного раздела). Содержание ПТЛ составляло 10.2±0.7%. Диаметр микрочастиц составлял 2,71 ± 1,01 мкм (подраздел 3.6.7.1 Раздела 6 Главы 3 «Результаты»).

Мышам БЛФП вводили однократно в дозах 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 мг/кг, или при превышении максимально возможного объема для внутрибрюшинного введения двукратно (с интервалом 2 часа), в дозах 4000, 5000, 6000 мг/кг. Крысам БЛФП вводили однократно в дозах 500, 750, 850, 1000, 1250, 1500 мг/кг, или при превышении максимально возможного объема для внутрибрюшинного введения двукратно (с интервалом 2 часа) в дозах 1750, 2000, 2500 мг/кг. БЛФП вводили мышам и крысам внутрибрюшинно в 5% концентрации (50мг/мл). В качестве растворителя использовали стерильный 0,9% раствор хлористого натрия.

В качестве положительного контроля использовали Паклитаксел-Тева серии 11G29KD концентрат для приготовления раствора для инфузий 6 мг/мл, который разводили стерильным 0,9% раствором хлористого натрия «ex tempore» до 0,5% концентрации (5 мг/мл). В качестве отрицательного контроля использовали стерильный 0,9% раствор хлористого натрия в эквиобъемах. День введения препарата принимали за 0 (фон). Срок наблюдения за животными - 30 суток.

Критерии оценки «острой» токсичности: число павших животных и сроки их гибели, клиническая картина интоксикации и патологические изменения в тканях и внутренних органах, выявляемые при аутопсии павших и выживших животных, умерщвленных в конце опыта (макроскопическая оценка). Фиксируются все патологические изменения в поведении и клиническом состоянии животных.

Для характеристики степени развития острого смертельного отравления помимо величины $ЛД_{50}$, указывающей на степень токсичности, использовались некоторые показатели, характеризующие опасность препарата в условиях введения в желудок. Это величина– «$ЛД_{84}/ЛД_{16}$», характеризующая вариабельность смертельных доз в виде отношения вероятностных параметров и величина – «S – функция угла наклона прямой смертельных доз к оси абсцисс»:

$$\frac{ЛД_{84}/ЛД_{50} + ЛД_{50}/ЛД_{16}}{2}. \quad (10)$$

Для суждения о скорости развития интоксикации определяли время гибели 50% животных ($ТЕ_{50}$). При этом также использовались результаты острого опыта.

За животными вели наблюдение в течение 2-х недель после введения, отмечая сроки гибели или выздоровления животных. Учитывали общее состояние животных, сохранение двигательных функций, аппетита, состояние шерстного покрова, дыхания, реакцию на внешние раздражители (Bonartsev et al., 2017б).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Office Excel 2003 и метода пробит-анализа (AnalystSoft Inc., BioStat – программа статистического анализа. Версия 2009.) Рассчитывали параметры, обычно используемые в токсикологии. За достоверные принимали различия при $P \leq 0,05$.

Эта работа была проведена совместно с Научно-исследовательским институтом экспериментальной диагностики и терапии опухолей Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина с научной группой под руководством проф., д.м.н. Бухмана В.М.

2.6.3. Исследование противоопухолевой эффективности биополимерных частиц *in vivo* на моделях эпителиальных опухолей

Изучение противоопухолевой эффективности проводилось в Российском онкологическом научном центре им. Н. Н. Блохина на следующих образцах:

Препарат

Микрочастицы на основе ПОБ 6 кДа, загруженные ПТЛ были приготовлены по методике ультразвукового пьзоэлектрического мембранного распылительного высушивания в бескислородной атмосфере (Nano Spray Dryer B-90 Application Booklet, 2009; Heng et al., 2011) (подраздел 2.5.3 данного раздела). Содержание ПТЛ составляло 10.2±0.7%. Диаметр микрочастиц составлял 2,71 ± 1,01 мкм (подраздел 3.6.7.1).

Способ приготовления инъекционного раствора БЛФП:

Серия стерилизована автоклавированием. Рабочий 5% раствор БЛФП получали от Заказчика в готовой смеси компонентов в замороженном состоянии. Перед введением пробирку с раствором размораживали в теплой воде и тщательно многократно встряхивали. Полученный рабочий раствор использовали, как описано выше. Затем пену гасили кратковременным встряхиванием при вертикальном положении пробирки вверх дном. Приготовленный таким образом 5% рабочий раствор БЛФП набирали в стерильный пластиковый шприц объемом 1 мл. При экспозиции инъекционного раствора >10 мин пробирку встряхивали. Для каждых 3-5 мышей использовали индивидуальные шприцы. БЛФП дозировали по объему и рассчитывали с учетом терапевтической дозы индивидуально для каждой мыши. Раствор вводили в/б однократно.

Препарат сравнения

Использован аптечный Таксол (паклитаксел) во флаконах по 30 мг («Bristol Meyers Squibb», США). Для введения мышам содержимое флакона растворяли в стерильном физиологическом растворе хлористого натрия до 0,1% концентрации (1 мг/мл). При лечении мышей паклитаксел в дозах 15 или 30 мг/кг вводили через 48 часов внутрибрюшинно однократно после трансплантации каждой использованной опухоли в одном из опытов. Оценка эффективности паклитаксела проведена аналогично исследовательскому препарату. В серии опытов использован исторический контроль эффективности.

Мыши

Для опытов использованы 100 мышей-самцов BDF1 массой тела 20-22 г, полученных из питомника лабораторных животных «Столбовая» ГУ НЦ БМТ, которых содержали в виварии ФГБУ «РОНЦ им.Н.Н.Блохина» РАМН на брикетированных кормах в конвенциональных условиях.

Перед началом экспериментов мышей делили на группы (n=10), часть из которых получала лечение БЛФП и/или паклитакселом, а одна группа не получала лечения и служила для КРО.

Опухоль - Модель внутрибрюшинной трансплантированной эпидермоидной карциноме легкого Льюис.

Штамм LLC получен из Банка опухолевых штаммов РОНЦ в ампуле в замороженном виде. Опухолевая взвесь разморожена и имплантирована в мышцы бедра мышей-самцов линии C57Bl6j (доноры) (Трещалина, 2012б).

Для получения донорского материала проведено 2 пассажа LLC при внутримышечной трансплантации 6-ти линейным мышам. Опухолевые узлы 3 пассажа от 3-х мышей дезинтегрировали в стеклянном гомогенизаторе и фильтровали через капроновый фильтр. Отфильтрованную клеточную массу разводили питательной средой 199 до концентрации 2 х 10^6 кл/мл и трансплантировали по 4 х 10^5 в 0,2 мл в брюшную полость мышам-самцам BDF1.

Опухоль - Модель внутрибрюшинных ксенографтов перевиваемого рака молочной железы человека РМЖ-1.

Использован штамм рака молочной железы человека РМЖ-1 из Коллекции РОНЦ (Трещалина, 2009). Для получения стандартного донорского материала проведено 3 пассажа опухоли при подкожной трансплантации 7-ми мышам-самкам Balb/c nude.

Для получения в/б ксенографтов опухолевые узлы 3-его пассажа от 3-х мышей дезинтегрировали в стеклянном гомогенизаторе и фильтровали через капроновый фильтр. Отфильтрованную клеточную массу разводили питательной средой 199 до концентрации 1 х 10^7 кл/мл и трансплантировали по 2 х 10^6 клеток в 0,2 мл в брюшную полость мышам (Трещалина, 2012а).

Лечение БЛФП.

БЛФП перечисленных выше серий вводили мышам через 48 часов после трансплантации LLC однократно внутрибрюшинно. При изучении терапевтического диапазона использованы дозы 150, 300, 600, 900 и 1200 мг/кг. Для оценки воспроизводимости противоопухолевого эффекта использована максимальная эффективная доза 900 мг/кг. При лечении в/б ксенографтов РМЖ-1 БЛФП в дозах 300, 600, 900, 1100 мг/кг вводили мышам внутрибрюшинно однократно через 24 часа после трансплантации.

Оценка эффективности лечения.

Проведена в сравнении с нелеченым контролем и паклитакселом с использованием стандартного критерия увеличения продолжительности жизни (УПЖ) мышей, рассчитанным по формуле УПЖ=(СПЖ опыта – СПЖ контроля)/СПЖ контроля х 100%. Минимальный критерий УПЖ$\geq$25%. Дополнительно для оценки влияния на местонораспространенный злокачественный

процесс павших животных подвергали аутопсии с визуальным контролем проявлений тотального канцероматоза париетальной и висцеральной брюшины, брыжейки и лимфатических узлов, а также накопления асцита.

Перечисленные критерии использованы при определении терапевтического диапазона доз и воспроизводимости эффективности БЛФП разных серий.

Оценка переносимости воздействия.

Выполнена по состоянию, поведению мышей, а также по наличию не характерных для данной опухоли патологических изменений внутренних органов при аутопсии павших.

Статистическая обработка результатов

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием доверительных интервалов средних сравниваемых величин по стандартному методу Стьюдента в модификации Р.Б.Стрелкова и теста Фишера. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$ (Bonartsev et al., 2017б).

Эта работа была проведена совместно с Научно-исследовательским институтом экспериментальной диагностики и терапии опухолей Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина с научными группами под руководством проф., д.м.н. Трещалиной Е.М.

2.6.4. Модель некритического костного дефекта

Оценку остеогенных свойств 2D-матриксов, 3D-матриксов и пористых микросфер на основе ПОБ производили на модели некритического дефекта бедренной кости. Проводили наркотизирование самцов крыс породы Вистар массой 300±50 г с помощью Золетила 50 (Virbac, Франция) в дозе 10 мг/кг в сочетании с Рометаром (Bioveta, Чехия) в дозе 6 мг/кг внутримышечно. Фиксировали крыс на животе на операционном столике и дожидались полного глубокого наркоза животных. В области бедренной кости, месте предполагаемого разреза, удаляли шесть выщипыванием. Проводили разрез длиной примерно 1 см. С помощью крючка и шпателя (Медтехника, РФ) проводили сепарацию тканей без разреза, нетравматично раздвигая мышцы, пока не была оголена кость. Затем с помощью гравера EHT150V (Ryobi, Япония) сверлили несквозное отверстие в диафизе кости сверлом диаметром 1,5 мм. Через просверленное отверстие внутрь кости помещали образцы 2D-матриксов и пористых микросфер. В контрольной группе имплантацию образцов в просверленное отверстие не проводили. Животных выводили из эксперимента на на 3, 7, 14, 30, 90 и 180 сутки. В каждой экспериментальной группе для каждой временной точки было не менее 3-х животных, в контрольной группе было 6 крыс.

Крысы умерщвляли внутрибрюшинном введением уретана (0,8 мл, 1 г/мл) (Химмед, Россия). Извлекали целиком всю кость, фотографировали место дефекта и фиксировали в 4% формальдегиде для дальнейших гистологических исследований.

Все манипуляции с крысами и мышами проводили в полном соответствии с этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.). с этическими принципами, установленными «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Council of Europe, 1987).

2.6.5. Модель критического костного дефекта

Для изучения регенерации костей черепа использовали модель дефект теменной кости черепа крысы критического размера. Эта модель используется для оценки эффективности и биосовместимости различных костезамещающих материалов, в том числе матриксов, функционализированных факторами роста и клетками (Schmitz and Hollinger, 1986; Bosch et al., 1998; Spicer et al., 2012). Крыс анестезировали золетилом 100 в дозе 125 мкг/кг массы тела внутрибрюшинно. Посередине сагиттального шва на теменных костях формировали круглое отверстие с помощью трепана C-reamer диаметром 8 мм и высотой 1,5 мм из набора Neobiotech SLA (Корея), избегая перфорации сагиттального венозного синуса. Затем дефект был заполнен 3D-матриксами ПОБ/АЛГ, ПОБ/ГА/АЛГ и ПОБ/ГА/АЛГ/МСК. Затем рана была послойно ушита (Volkov et al., 2020).

Эта работа была проведена совместно с доцентом ФГАОУВО «Российский университет дружбы народов» МЗ РФ Мураевым А.А.

2.6.6. Изучение скорости регенерации костного дефекта

Для оценки динамики прижизненного неоостеогенеза было проведено мечение новообразованной костной ткани с помощью 3-х маркеров (Volkov et al., 2020). Начиная с 8-ых суток всем экспериментальным крысам делали внутрибрюшные инъекции доксициклина в период начала активной минерализации остеоидов на сроках с 8-ого по 10-ые сутки после операции. Далее, на сроках с 15-ого по 17-ые крысам вводили внутрибрюшинно раствор тетрациклина, а с 22-ых по 24-ые сутки - ализарин красный С для мечения новообразованной костной ткани. Вещества-маркеры вводились в дозе 25 мг/кг массы тела. Таким образом, мечение проводилось по схеме 7–3–4–3–4–3–4 (три дня введения маркера чередуются с четырехдневным перерывом). На 28-е сутки, что соответствовало завершению первичного

остеогенеза (An and Martin, 2003), крыс умерщвляли передозировкой наркоза Золетил/Рометар. Затем свод черепа был очищали от мягких тканей, а область регенерата на всей площади извлекали с помощью хирургических цилиндрических буров и физиодиспенсера. Полученные образцы тканей фиксировали в 40% этиловом спирте в течение 24 ч. Этот метод фиксации широко используется для сохранения флуоресцентного мечения тканей и для хорошей пропитки костной ткани (Burr and Allen, 2013).

Далее образцы фиксировали в 70% этаноле в течение 24-72 часов, после чего промывали, обезвоживали и заливали в метилметакрилат Osteo-Bead (Sigma-Aldrich (Merck), Германия) по стандартной методике, рекомендованной производителем с последующей полимеризацией. Получали блоки, которые отправляли на гистологическое исследование (подраздел данного раздела 2.6.8) или исследуют с помощью компьютерной томографии (подраздел данного раздела 2.6.7). Эта работа была проведена совместно с доцентом ФГАОУВО «Российский университет дружбы народов» МЗ РФ Мураевым А.А.

2.6.7. Компьютерная томография

Полученные пластиковые блоки были исследованы на конусно-лучевом компьютерном томографе CT Point 3D Combi 500 C (Pointnix, Южная Корея) на отработанном режиме 63 кВп/7 мА. Для визуализации данных использовалось программное обеспечение Horos Project-Free DICOM Medical Image Viewer, с помощью которого оценивали область заживления костного дефекта. С помощью специального инструмента этой программы границы дефекта очерчивались, и его площадь автоматически рассчитывалась.

Площадь восстановления костного дефекта рассчитывали по формуле:

$R = (a_1 - a_2) / a_1 \times 100$, (11)

где a_1 - начальная, а a_2 - текущая площадь поверхности критического костного дефекта, соответственно (Volkov et al., 2020).

Эта работа была проведена совместно с доцентом ФГАОУВО «Российский университет дружбы народов» МЗ РФ Мураевым А.А.

2.6.8. 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 sow Jet, Швейцария), удаляли парафин, окрашивали гематоксилин – эозином

или по Папаниколау и заключали в монтирующую среду после стандартной гистологической проводки. Среды такой же толщины получали также из блоков, залитых метилметакрилатом (см. подраздел данного раздела 6.6). Полученные препараты документировали с использованием микроскопа Leica 2500 оборудованной цифровой камерой EC3. Каждый образец анализировался по меньшей мере по 8-ми изображениям (3132 x2325 пикселей) (Volkov et al., 2020).

Эта работа была проведена совместно с ст. науч. сотр. ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова» МЗ РФ Волковым А.В.

2.7. Статистический анализ

Статистическая обработка данных параметров биосинтеза полимеров, контактного угла смачивания полимеров, биосовместимости in vitro на культуре клеток и прочих данных производилась с использованием программного пакета SPSS/PC+ Statistics™ 12.1 (SPSS). В качестве статистического метода был использован однофакторный дисперсионный анализ (One-way ANOVA). Данные в таблицах и рисунках представлены в виде средних величин и стандартной ошибки среднего (M ±SD) при уровне достоверности $P < 0.05$, в подписях к рисункам и в примечании к таблицам указывается число измерений (n). Данные по физико-химическим свойствам полимеров приводятся как средние из 3-х измерений.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ[3]

Раздел 3.1. Биосинтез поли-3-оксибутирата и его сополимеров

Анализ рибосомальной 16S РНК штамма-продуцента *A. chroococcum* 7Б из нашей коллекции показал, что он относится к бактериальному виду *Azotobacter chroococcum* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/OK077566).

---

[3] Основные результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих научных статьях автора:

1. **Бонарцев А.П.**, Иорданский А.Л., Бонарцева Г.А., Босхомджиев А.П., Заиков Г.Е. Биодеградация, биосовместимость и биомедицинское применение поли(3-оксибутирата) // Пластические массы. 2010. – №3. – С. 6 – 23.
2. **Бонарцев А.П.**, Иорданский А.Л., Бонарцева Г.А., Босхомджиев А.П., Заиков Г.Е. Биодеградация и биомедицинское применение бактериального поли(3-оксибутирата) // Новое в полимерах и полимерных композитах. – 2010. – №1. – С. 17–42.
3. **Бонарцев А.П.**, Бонарцева Г.А., Шайтан К.В., Кирпичников М.П. Поли-3-оксибутират и биополимерные системы на его основе // Биомедицинская химия. – 2011. – Т. 57. – № 4. – С. 374-391.
4. **Бонарцев А.П.**, Бонарцева Г.А., Воинова В.В., Кирпичников М.П., Шайтан К.В. Лекарственные системы на основе поли-3-оксиалканоатов: их микро- и наноструктура // Вестник Российского государственного медицинского университета (рубрика «Мнения», тематический номер «Наномедицина»). – 2018. – №. 6. – С. 130–134.
5. **Бонарцев А.П.**, Яковлев С.Г., Филатова Е.В., Соболева Г.М., Махина Т.К., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В., Попов В.О., Кирпичников М.П. Пролонгированное высвобождение противоопухолевого лекарственного вещества, паклитаксела, из микросфер на основе поли-3-оксибутирата // Биомедицинская химия. – 2011. – Т. 57. – № 2. – С. 232–240.
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 // Биомедицинская химия. – 2012. – Т. 58. – №. 5. – С. 579–591.
7. Зернов А.Л., Иванов Е.А., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Самсонова О.В., Феофанов А.В., Волков А.В., Гажва Ю.В., Рябова В.М., Мураев А.А., Иванов С.Ю., Шайтан К.В., Бонарцева Г.А., **Бонарцев А.П.** Микрокапсулы из поли(3-гидроксибутирата) для пролонгированного высвобождения белка // Современные технологии в медицине. – 2015. – Т. 7. – № 4. – С. 50–57.
8. **Бонарцев А. П.**, Бонарцева Г.А., Мышкина В.Л., Воинова В.В., Махина Т.К., Жаркова И.И., Яковлев С.Г., Зернов А.Л., Иванова Э.В., Акулина Е.А., Кузнецова Е.С., Жуйков В.А., Алексеева С.Г., Подгорский В.В., Бессонов И.В., Копицына М.Н., Морозов А.С., Милановский Е.Ю., Тюгай З.Н., Быкова Г.С., Кирпичников М.П., Шайтан К.В. Биосинтез сополимера поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерат штаммом Azotobacter chroococcum 7B // Acta Naturae. – 2016. – Т. 8. – № 3(30). – С. 85–96.
9. Мураев А.А., **Бонарцев А.П.**, Гажва Ю.В., Рябова В.М., Волков А.В., Жаркова И.И., Стамболиев И.А., Кузнецова Е.С., Жуйков В.А., Мышкина В.Л., Махина Т.К., Бонарцева Г.А., Яковлев С.Г., Кудряшова К.С., Воинова В.В.; Шайтан К.В., Иванов С.Ю. Разработка и доклинические исследования ортотопических костных имплантатов на основе гибридной конструкции из поли-3-оксибутирата и альгината натрия // Современные технологии в медицине. – 2016. – Т. 8. – № 4. – С. 42–50.
10. Зернов А.Л., **Бонарцев А.П.**, Яковлев С.Г., Мышкина В.Л., Махина Т.К., Паршина Е.С., Харитонова Е.П., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В. Микрочастицы из низкомолекулярного поли(3-гидроксибутирата) для пролонгированного высвобождения паклитаксела, полученные методом пьезоэлектрического распылительного высушивания // Российские нанотехнологии. – 2017. – Т. 12. – № 3–4. – С. 84–90.
11. Жуйков В.А., **Бонарцев А.П.**, Махина Т.К., Мышкина В.Л., Воинова В.В., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В. Гидролитическая деградация поли-3-оксибутирата и его сополимера с 3-оксивалератом различной молекулярной массы in vitro // Биофизика. – 2018. – Т. 63. – № 2. – С. 249–257.
12. **Бонарцев А.П.**, Воинова В.В., Кузнецова Е.С., Жаркова И.И., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Чеснокова Д.В., Кудряшова К.С., Феофанов А.В., Шайтан К.В., Бонарцева Г.А. Адсорбция БСА пористыми матриксами на основе БиоПЭГилированного поли-3-оксибутирата // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54. – №. 4. – С. 366–374.
13. Бонарцев А.П., Воинова В.В., Бонарцева Г.А. Поли-3-оксибутират и микробиота человека (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54. – №. 6. – С. 561–584.

14. Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Решетов И.В., Шайтан К.В., Кирпичников М.П. Применение полиоксиалканоатов в медицине и природные функции поли-3-оксибутирата // Acta Naturae. – 2019. – Т. 11. – №. 41. – С. 4–16.
15. **Бонарцев А.П.**, Воинова В.В., Акулина Е.А., Дудун А.А., Жаркова И.И., Жуйков В.А., Меньших К.А., Чеснокова Д.В., Махина Т.К., Бонарцева Г.А., Парий И.О., Сурменев Р.А., Сурменева М.А. Пьезоэлектрические свойства поли-3-оксибутирата-со-3-оксивалерата-полиэтиленгликоля, полученного методом контролируемого биосинтеза // Биологический журнал: эл.научный журнал. –2019 – №10(10).
16. **Bonartsev A.P.**, Yakovlev S.G., Boskhomdzhiev A.P., Zharkova I.I., Bagrov D.V., Myshkina V.L., Mahina T.K., Charitonova E.P., Samsonova O.V., Zernov A.L., Zhuikov V.A., Efremov Yu.M., Voinova V.V., Bonartseva G.A., Shaitan K.V. The terpolymer produced by Azotobacter chroococcum 7B: effect of surface properties on cell attachment // PLoS ONE, – 2013. – V. 8. N. 2. P. e57200.
17. **Bonartsev A.P.**, Yakovlev S.G., Zharkova I.I., Boskhomdzhiev A.P., Bagrov D.V., Myshkina V.L., Makhina T.K., Kharitonova E.P., Samsonova O.V., Feofanov A.V., Voinova V.V., Zernov A.L., Efremov Yu.M., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P. Cell attachment on poly(3-hydroxybutyrate)-poly(ethylene glycol) copolymer produced by Azotobacter chroococcum 7B // BMC Biochemistry. – 2013. – V. 14. – P. 12.
18. **Bonartsev A.P.**, Zharkova I.I., Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Makhina T.K., Zernov A.L., Kudryashova K.S., Feofanov A.V., Akulina E.A., Ivanova E.V., Zhuikov V.A., Volkov A.V., Andreeva N.V., Voinova V.V., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P. Adhesion and growth of bone marrow mesenchymal stem cells on 3D scaffolds from poly(3-hydroxybutyrate)-poly(ethylene glycol) copolymer // Journal of Biomaterials and Tissue Engineering. – 2016. – V. 6. – N. 1. – P. 42–52.
19. **Bonartsev A.P.**, Zernov A.L., Yakovlev S.G., Zharkova I.I., Myshkina V.L., Mahina T.K., Bonartseva G.A., Andronova N.V., Smirnova G.B., Borisova J.A., Kalishjan M.S., Shaitan K.V., Treshalina H.M. New poly(3-hydroxybutyrate) microparticles with paclitaxel sustained release for intraperitoneal administration // Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry. – 2017. – V. 17. – N. 3. – P. 434–441.
20. **Bonartsev A.P.**, Zharkova I.I., Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Mahina T.K., Voinova V.V., Zernov A.L., Zhuikov V.A., Akoulina E.A., Ivanova E.V., Kuznetsova E.S., Shaitan K.V., Bonartseva G.A. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) copolymers by Azotobacter chroococcum 7B: a precursor feeding strategy // Preparative Biochemistry and Biotechnology. – 2017. – V. 47. – N. 2. – P. 173–184.
21. Ermakova N.P., **Bonartsev A.P.**, Zernov A.L., Konyaeva O.I., Kulbachevskaya N.Y., Merkulova I.B., Abramova T.V., Chaley V.A., Yakovlev S.G., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Bukhman V.M. Preclinical toxicity evaluation of paclitaxel biopolymer formulation // Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry. – 2017. – V. 17. – N. 15. – P. 1661–1668.
22. Zhuikov V.A., **Bonartsev A.P.**, Zharkova I. I., Bykova G.S., Taraskin N.Y., Kireynov A.V., Kopitsyna M.N., Bagrov D.V., Bonartseva G.A., Shaitan K.V. Effect of poly(ethylene glycol) on the ultrastructure and physicochemical properties of the poly(3-hydroxybutyrate) // Macromolecular Symposia. – 2017. – V. 375. – P. 1600189.
23. Zhuikov V.A., **Bonartsev A.P.**, Bagrov D.V., Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Makhina T.K., Bessonov I.V., Kopitsyna M.N., Morozov A.S., Rusakov A.A., Useinov A.S., Shaitan K.V., Bonartseva G.A. Mechanics and surface ultrastructure changes of poly(3-hydroxybutyrate) films during enzymatic degradation in pancreatic lipase solution // Molecular Crystals and Liquid Crystals. – 2017. – V. 648. – N. 1. – P. 236–243.
24. **Bonartsev A.P.**, Zharkova I.I., Voinova V.V., Kuznetsova E.S., Zhuikov V.A., Makhina T.K., Myshkina V.L., Potashnikova D.M., Chesnokova D.V., Khaydapova D.D., Bonartseva G.A., Shaitan K.V. Poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ethylene glycol) scaffolds with different microstructure: the effect on growth of mesenchymal stem cells // 3 Biotech. – 2018. – V. 8. – P. 328.
25. Zhuikov V.A., Zhuikova Y.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Rusakov A., Useinov A., Voinova V.V., Bonartseva G.A., Berlin A.A., **Bonartsev A.P.**, Iordanskii A.L. Comparative structure-property characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)s films under hydrolytic and enzymatic degradation: finding a transition point in 3-hydroxyvalerate content // Polymers (Basel). – 2020. – V. 12. – N. 3. – P. E728.
26. Volkov A.V., Muraev A.A., Zharkova I.I., Voinova V.V., Akoulina E.A., Zhuikov V.A., Khaydapova D.D., Chesnokova D.V., Menshikh K.A., Dudun A.A., Makhina T.K., Bonartseva G.A., Asfarov T.F., Stamboliev I.A., Gazhva Y.V., Ryabova V.M., Zlatev L.H., Ivanov S.Y., Shaitan K.V., **Bonartsev A.P.** Poly(3-hydroxybutyrate)/hydroxyapatite/alginate scaffolds seeded with mesenchymal stem cells enhance the regeneration of critical-sized bone defect // Materials Science and Engineering: C, Materials for biological application. – 2020. – V. 114. – P. 110991.
27. Zhuikov V.A., Akoulina E.A., Chesnokova D.V., Wenhao Y., Makhina T.K., Demyanova I.V., Zhuikova Y.V., Voinova V.V., Belishev N.V., Surmenev R.A., Surmeneva M.A., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., **Bonartsev A.P.** The growth of 3T3 fibroblasts on PHB, PLA and PHB/PLA blend films at different stages of their biodegradation in vitro // Polymers. – 2021. – V. 13. – P. 108.
28. Акулина Е.А., Демьянова И.В., Жаркова И.И., Воинова В.В., Жуйков В.А., Хайдапова Д.Д., Чеснокова Д.В., Меньших К.А., Дудун А.А., Махина Т.К., Бонарцева Г.А., Волков А.В., Асфаров Т.Ф., Иванов С.Ю., Шайтан К.В., **Бонарцев А.П.** Рост мезенхимных стволовых клеток на матриксах на основе поли-3-оксибутирата, загруженных симвастатином // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2021. – №. 1. – С. 70-76.

Используя этот штамм-продуцент в качестве экспериментального инструмента для расширения спектра получаемых полимеров различного химического строения и свойств, мы разработали экспериментальную модель с использованием предшественников для получения различных сополимеров ПОБ. Учитывая теоретическую возможность ферментов путей синтеза 3-ГБ и ПОБ, в т.ч. ПОА-полимеразы *A. chroococcum* использовать для синтеза полимеров не только мономеры 3-ГБ, но и близкие по структуре молекулы, как показано на схеме Рисунка 40 (Бонарцев и др., 2016; Bonartsev et al., 2017), мы стали добавлять в питательную среду культивируемого микроорганизма предшественники новых мономеров, а также вещества, которые могут повлиять на ММ синтезируемого полимера. В качестве предшественников мономеров новых сополимеров были использованы две основные группы веществ: карбоновые кислоты и производные этиленгликоля. Из карбоновых кислот для разработки этой экспериментальной модели были использованы следующие (в культуральную среду их вносили в виде натриевых солей): уксусная (АН); пропионовая (или пропановая) кислота (ПК), валериановая (или пентановая) кислота (ВК), 4-метилвалериановая (4-метилпентановая) (4-МВ), гексановая, гептановая, октановая и додекановая. В качестве производных этиленгликоля были использованы в экспериментальной работе следующие соединения: диэтиленгликоль (ДЭГ), триэтиленгликоль (ТЭГ), полиэтиленгликоль 200 Да (ПЭГ 200), полиэтиленгликоль 300 Да (ПЭГ 300), полиэтиленгликоль 400 Да (ПЭГ 400) и полиэтиленгликоль 1500 Да (ПЭГ 1500). Были исследованы основные параметры биотехнологического получения сополимеров: урожай биомассы, содержание полимера в клетках, ММ полимеров, молярное содержание мономера в цепи сополимера как в экспериментальной модели добавления в культуральную среду карбоновых кислот (Таблица 6), так и при добавлении производных ЭГ (Таблица 7).

В исходном состоянии выбранный нами в качестве продуцента штамм *Azotobacter chroococcum* 7Б при использовании сахарозы в качестве единственного источника углерода для биосинтеза полимеров синтезировал гомополимер ПОБ высокой молекулярной массы (Мышкина и др., 2008; Мышкина и др., 2010; Bonartsev et al., 2013a; Bonartsev et al., 2016a; Бонарцев и др., 2016; Bonartseva et al., 2003).

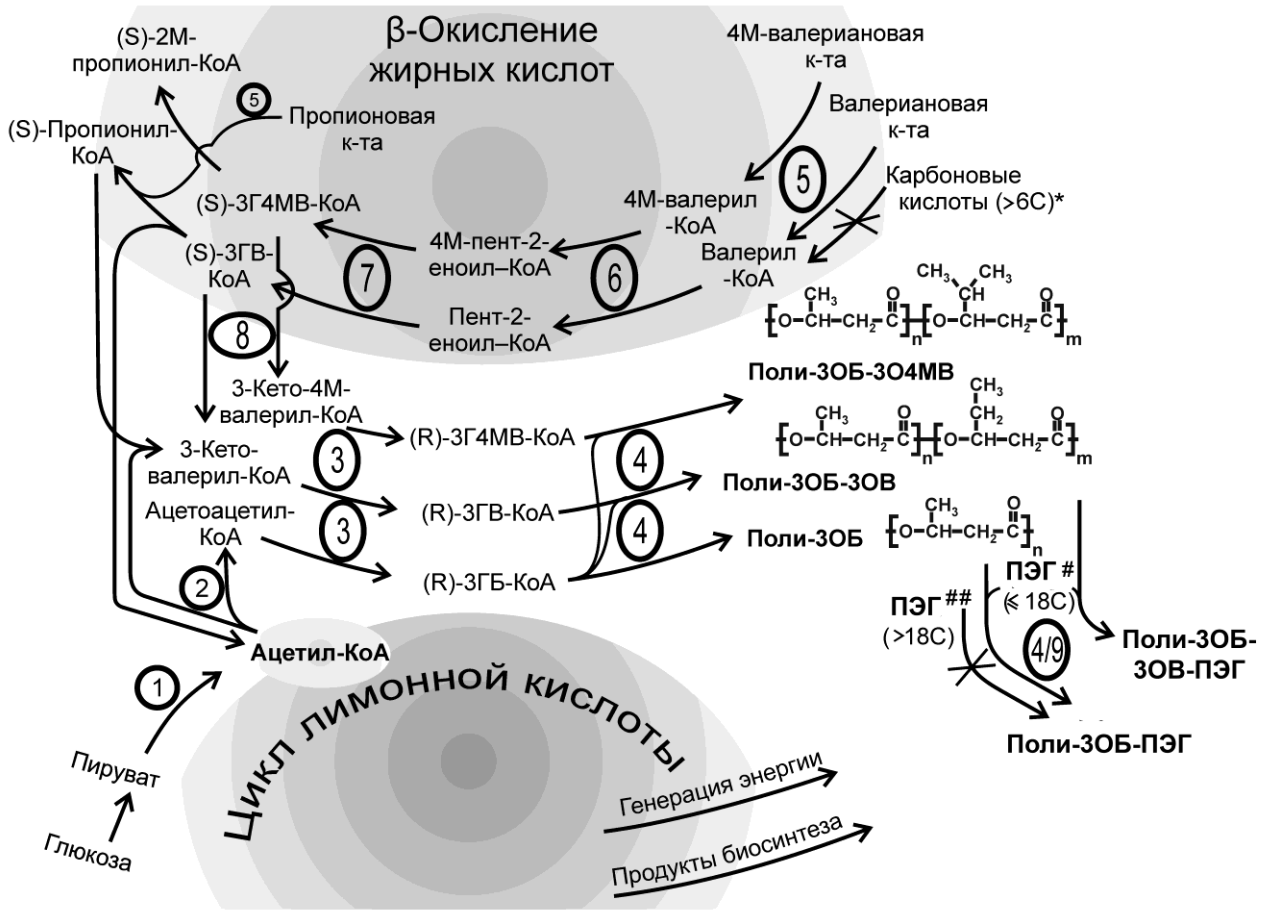


Рисунок 40. *Схема биосинтеза ПОБ и его сополимеров A. chroococcum 7Б: комплекс пируват-дегидрогеназный (1); β-кетотиолаза (2); NADPH-зависимая ацетоацетил-КоА-редуктаза (3); ПОА-полимераза (короткоцепочечных карбоновых кислот) (4); ацил-КоА-синтаза (5); ацил-КоА-дегидрогеназа (6); еноил-КоА-гидратаза (7); NADH-зависимая ацетоацетил-КоА-редуктаза (8); неферментативная нуклеофильная атака концевой гидроксильной группы ПЭГ, приводящее связыванию ПЭГ с концом растущей цепи ПОБ или ПОБВ с терминацией ее синтеза (9). Карбоновые кислоты (> 6С): гексановая кислота, гептановая кислота, октановая кислота, нонановая кислота, додекановая кислота. #ПЭГ (<18С): ДЭГ, ТЭГ, ПЭГ 200, ПЭГ 300, ПЭГ 400; ##ПЭГ (>18С): ПЭГ 1000. Сокращения на схеме: 4М – 4-метил-; 2М – 2-метил-; 3ГБ – 3-гидроксибутират-; 3ГВ – 3-гидроксивалерат-; 3Г4МВ – 3-гидрокси-4-метилвалерат; поли-3ОБ-3О4МВ – поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерат; поли-3ОБ-3ОВ – поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат; поли-3ОБ – поли-3-оксибутират; ПЭГ – полиэтиленгликоль, ДЭГ – диэтиленгликоль, ТЭГ – триэтиленгликоль, поли-3ОБ-ПЭГ - поли-3-оксибутират-полиэтиленгликоль; поли-3ОБ-3ОВ-ПЭГ - поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат-полиэтиленгликоль.*

Кривая роста *A. chroococcum* 7Б и синтез этой культурой гомополимера ПОБ культурой при росте на сахарозе приведены на Рисунке 41. Из данных на графике видно, что рост культуры *A. chroococcum* 7Б и синтез полимера в клетках происходят параллельно: логарифмический рост культуры начинается с самого начала ферментационного процесса до достижения стационарной фазы в конце культивирования, синтез ПОБ культурой начинается примерно с 10 ч после начала ферментации, отстает от накопления биомассы и достигает максимальных значений к 48 час. культивирования (Рисунок 41).

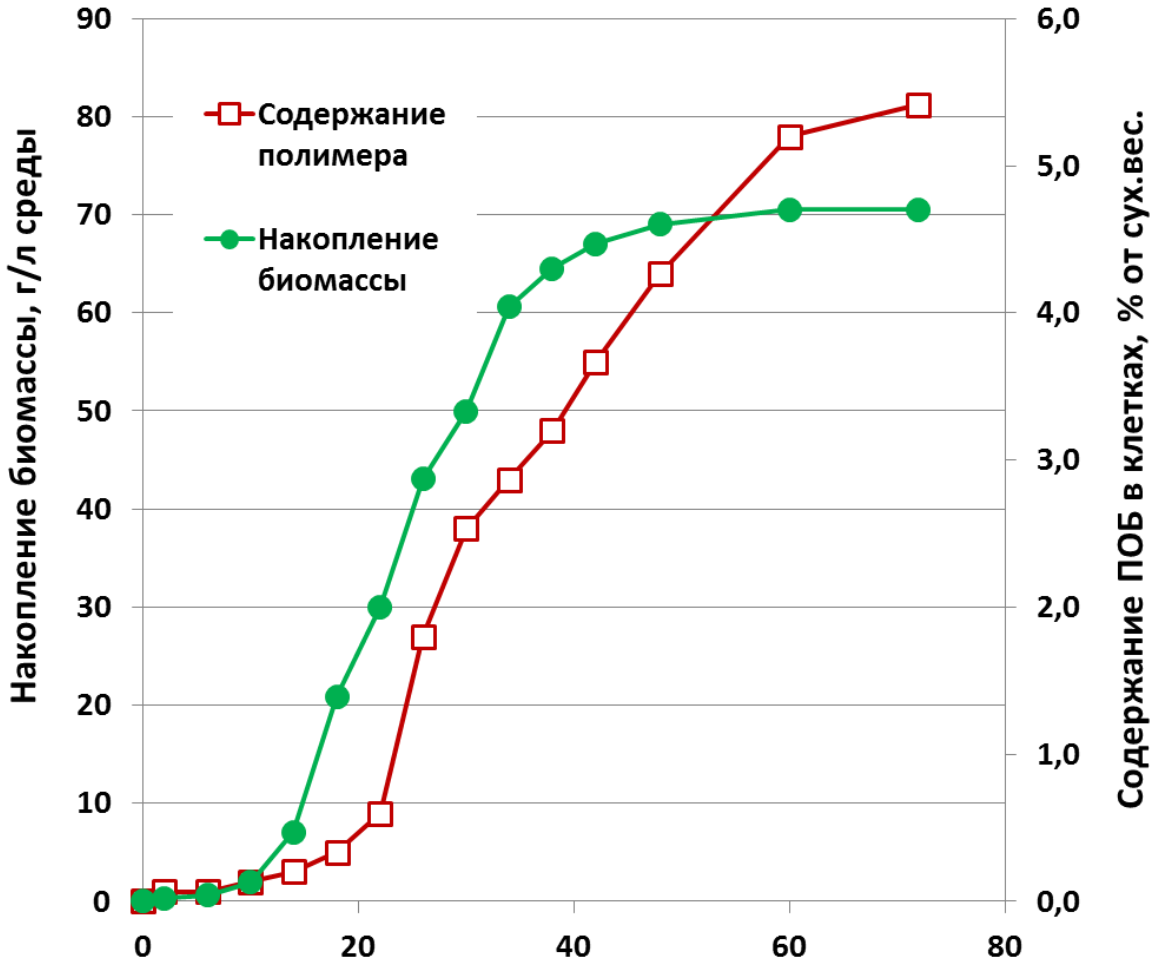


Рисунок 41. *Рост культуры Azotobacter chroococcum 7Б и синтез ПОБ.*

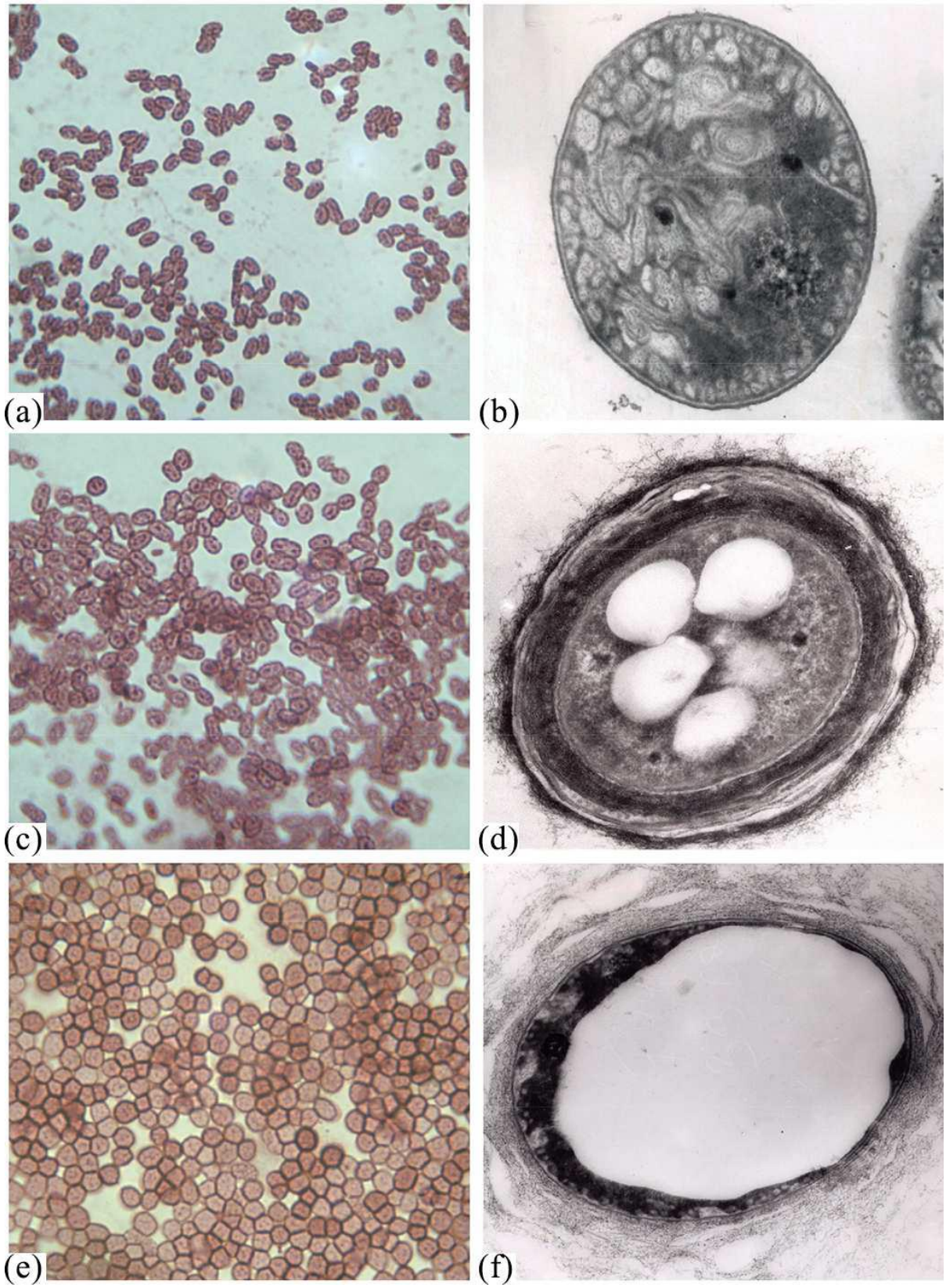


Рисунок 42. *Морфология бактериальных клеток штамма-продуцента ПОБ A. chroococcum 7Б в процессе роста в стандартных условиях: (а) сахароза, 21 час., световая микроскопия (СМ, ×900); (б) сахароза, 48 час. (СМ, ×900); (в) сахароза, 72 час. (СМ, ×900); (г) сахароза, 21 час. (ПЭМ, ×50000); (д) сахароза, 38 час. (ПЭМ, ×50000); (е) сахароза, 72 час. (ПЭМ, ×50000).*

На Рисунке 42 показана морфология бактериальных клеток штамма-продуцента ПОБ *A. chroococcum* 7Б в процессе биосинтеза полимера, внутри которых видны гранулы (или карбоносомы), содержащие ПОБ. Об особенностях морфологии бактериальных клеток штамма-продуцента будет еще сказано ниже при обсуждении изменения морфологии клеток под воздействием на них дополнительных источников углерода.

Следует отметить, что комплексные исследования по отбору высокоэффективного штамма-продуцента ПОБ *A. chroococcum* 7Б и изучению влияния условий его культивирования на биосинтез полимера были проведены ранее и детально отражены в диссертационной работе Николаевой Д.А. и ряде публикаций (Николаева, 2004; Bonartsev et al., 2007a), поэтому в данной работе мы не будем подробно освещать эти вопросы и будем использовать только один наиболее продуктивный штамм-продуцент ПОА *A. chroococcum* 7Б, хотя в нашем распоряжении находится коллекция (более 10) различных штаммов-продуцентов ПОА и альгинатов рода *Azotobacter*. В этих работах было показано, что изменение условий культивирования штамма-продуцента значительным образом влияет не только на урожай биомассы и содержание синтезированного полимера в клетках, но и на молекулярную массу гомополимера ПОБ (Мышкина и др., 2008; Bonartseva et al., 2003; Николаева, 2004). Помимо прочих факторов на молекулярную массу синтезируемого полимера влияют природа источника углерода, используемого для роста культуры и синтеза полимера, и его концентрация в культуральной среде, pH среды, уровень аэрации, температура (Мышкина и др., 2008; Bonartseva et al., 2003; Николаева, 2004). Ранее были подобраны наиболее оптимальные параметры биосинтеза ПОБ, которые позволяют синтезировать полимер с молекулярной массой до $1{,}95\times10^6$ Да. Соответственно, изменение этих параметров в какую-либо сторону, относительно экспериментально подобранных оптимальных параметров биосинтеза полимера, как правило, приводит к снижению молекулярной массы ПОБ (Мышкина и др., 2008; Bonartseva, 2003; Николаева, 2004). На другом штамме-продуценте *A. vinelandii 12* нами был проведен комплексный анализ основных параметров культивирования штамма-продуцента на биосинтез полимера. Для этого был проведен полный факторный анализ (ПФА) с использованием трех параметров 2^3: уровней концентрации сахарозы и фосфатов в культуральной среде и скорости перемешивания как уровня аэрации (кислорода), где каждый параметр был представлен на двух уровнях: верхний уровень (+), который соответствует высоким значениям концентрации и более низкий уровень (-), соответствующий низким значениям концентраций (Dudun et al., 2021). Исследование ММ синтезируемого в ходе этого эксперимента ПОБ показало, что все синтезированные полимеры обладали ММ более 1200 кДа, за исключением вариантов с низким уровнем сахарозы и фосфатов, но с высоким уровнем аэрации (C-/P-/O+) - 331 кДа и с низким уровнем сахарозы, но с высоким уровнем фосфатов и

высоким уровнем аэрации (C-/P+/O+): 49 кДа. По-видимому, сочетание высокой аэрации и низкого уровня основного источника углерода, сахарозы, в среде для синтеза высокомолекулярного ПОБ является критическим. Это также подтверждается тем фактом, что бактерии *A. vinelandii 12* переходят в стационарную фазу именно в этих вариантах эксперимента: C-/P-/O+ и C-/P+/O+ через 48 часов, а, как известно, ММ ПОБ сильно различается между экспоненциальной и стационарной фазами (Millán et al., 2016). Таким образом, в момент экспоненциального роста бактерий ММ ПОБ из-за высокой экспрессии гена *PhbC*, транслирующего ПОБ-синтазу, увеличивается, а в момент перехода бактериальных клеток в стационарную фазу происходит активация экспрессии фермента деполимеразы ПОБ (*PhbZ*), который и вызывает снижение ММ синтезируемого ПОБ (Millán et al., 2016). Таким образом, изменением условий культивирования можно добиваться синтеза полимера с сильно различающейся ММ: от 49 до 1698 кДа (Dudun et al., 2021). Однако этот способ регуляции ММ страдает некоторыми недостатками – используя этот подход довольно сложно контролировать получение полимера с относительно высоким его выходом и с заданной в относительно узких пределах молекулярной массой. Поэтому нами была выбрана иная стратегия регуляции ММ.

Результатом этих исследований явился подбор наиболее оптимальных параметров биосинтеза ПОБ также отобранном ранее наиболее эффективным штаммом-продуцентом *A. chroococcum* 7Б. Эти отобранные параметры биосинтеза полимера отражены в подразделе 2.1.4. Главы 2 «Материалы и методы исследования». Аналогично в ходе предыдущих исследований были подобраны методы выделения полимеров из бактериальной биомассы штамма-продуцента и их высокоэффективной очистки, что отражено в подразделе 2.1.6. Главы 2 «Материалы и методы исследования». Отработанная методика очистки рассчитана также для выделения полимера в случае его низкого содержания в бактериальной биомассе и при наличии различных дополнительных веществ (например, производных ЭГ, как будет показано далее) (Прудскова, 2006). Полученный с использованием разработанных методов выделения и очистки полимеры пригодны для применения в качестве биоматериалов для изготовления медицинских изделий и фармацевтических форм, что подтверждено наличием Токсикологического заключения на ПОБ медицинского применения (Токсикологическое заключение ВНИИМТ МЗ № 38899 от 10.01.2000 г.).

Поэтому в рамках настоящей работы мы сосредоточились на создании экспериментальной модели синтеза ПОБ и его сополимеров различного химического строения с использованием уже отработанной методики биосинтеза ПОБ.

Регуляция молекулярной массы полимера не ограничивается способом изменения различных параметров биосинтеза. В нашей работе было исследовано влияние некоторых веществ, добавляемых в культуральную среду штамма-продуцента, в частности, ацетата натрия

и пропиленгликоля 400 (как будет показано ниже). Данный подход, связанный с использованием определенных веществ для регуляции молекулярной массы позволяет гораздо точнее задавать молекулярную массу синтезируемого полимера при сохранении наиболее оптимальных параметров культивирования штамма-продуцента (урожая биомассы, содержания полимера в клетках, продолжительности процесса).

В качестве основного инструмента для регуляции ММ синтезируемого ПОБ нами был использован подход добавления в культуральную среду *A. chroococcum* 7Б. ацетата натрия в концентрациях 20 – 125 мМ. Это приводило к падению ММ ПОБ, которое было пропорционально концентрации вносимой в среду соли уксусной кислоты (в интервале 20 – 60 мМ) (Таблица 6). Особенностью данного метода, как можно увидеть из Таблицы 6, является то, что он позволяет регулировать в довольно широких пределах ММ синтезируемого полимера (в несколько раз). И хотя при этом наблюдается снижение продукции полимера и урожая биомассы, но в относительно небольшой мере. В данной работе проведен более полный эксперимент, который подтвердил ранее полученные данные (Николаева, 2004; Мышкина и др., 2008; Бонарцева и др., 2001а).

Механизм воздействия ацетата натрия на ММ синтезируемого полимера связан с механизмом функционирования каталитического центра фермента ПОА-полимеразы, как показано на Рисунке 43. В активном состоянии этот фермент функционирует в виде гомодимера, каждая из субъединиц которого связывает через цистеиновый остаток активированный КоА 3-гидроксибутирил-КоА, после чего происходит переброска одного 3-ГБ-КоА на другую субъединицу, что сопровождается образованием сложноэфирной связи между двумя остатками 3-ГБ. Таким образом путем перегруппировки осуществляется постепенный рост полимерной цепи каждый раз на один остаток (Bernd et al., 2001; Wodzinska et al., 1996).

Далее синтез полимера далее происходит согласно т.н. «мицеллярной модели», согласно которой гомодимеры ПОА-полимеразы, начавшие синтез ПОБ, собираются в мицеллы, состоящие из амфифильных макромолекул: димеров фермента, связанных с растущей гидрофобной цепью ПОБ. По мере синтеза ПОБ происходит образование глобулы, на поверхности которой находятся димеры ПОА-полимеразы, а внутри – аморфная матрица полимерных цепей ПОБ (Рисунок 44). Такую глобулу называют карбоносома (Jendrossek and Pfeiffer, 2014; Gerngross and Martin, 1995; Tian et al., 2005).

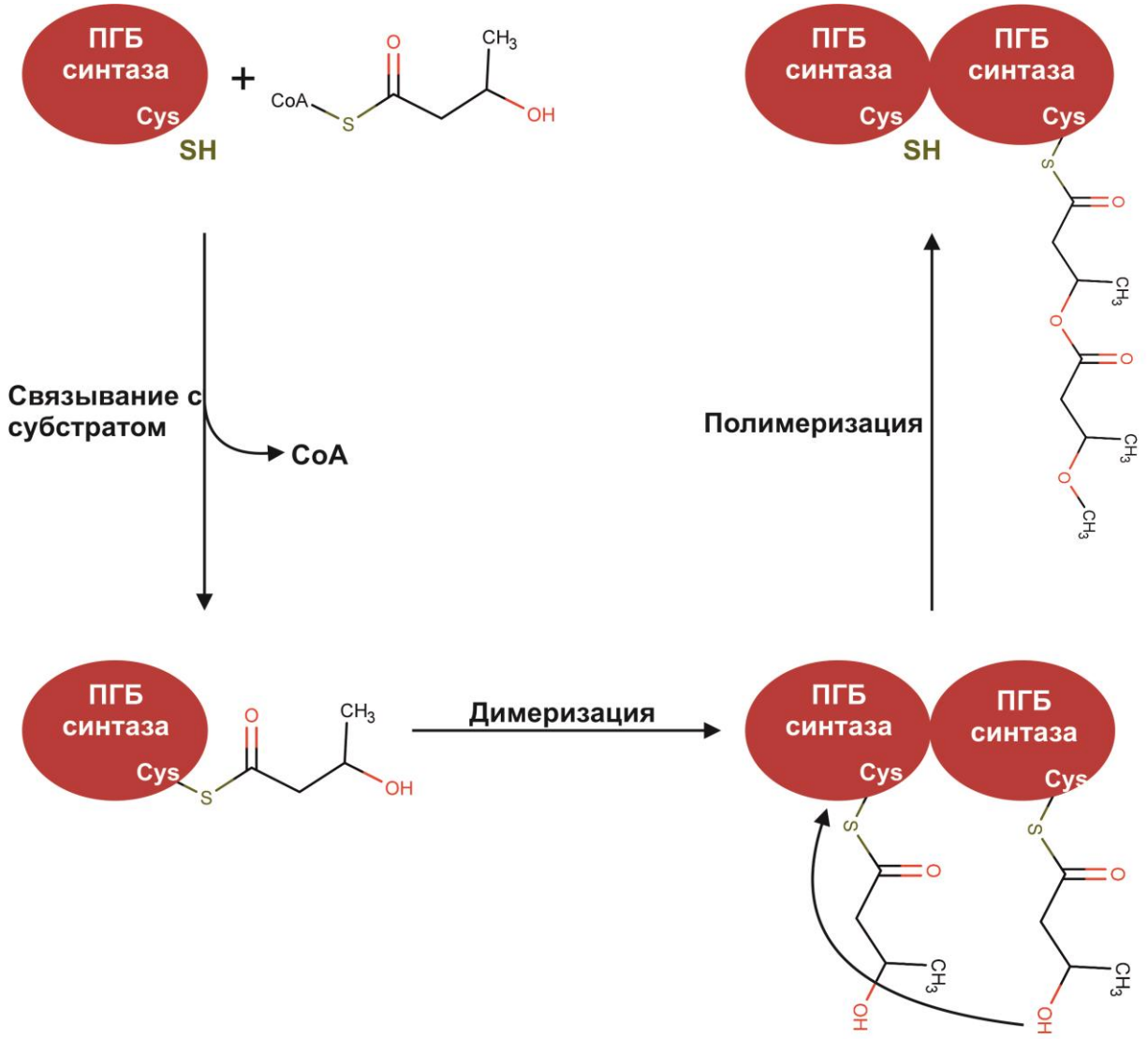


Рисунок 43. *Механизм действия фермента ПОА-полимеразы.*

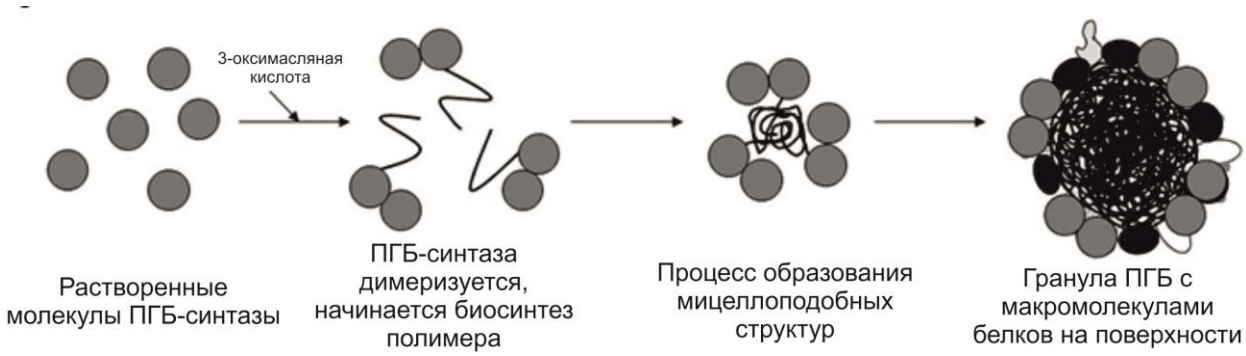


Рисунок 44. *Мицеллярная модель образования карбоносомы, в которой осуществляется синтез ПОБ.*

А снижение ММ полимера связано с тем, что при повышении концентрации ацетата натрия образуется большое число центров полимеризации, а также гомодимеров фермента с короткими цепями ПОБ, что в итоге приводит к синтезу низкомолекулярного полимера.

Таблица 6. *Результаты апробации экспериментальной модели биосинтеза сополимеров ПОБ штаммом-продуцентом A. chroococcsit 7Б с использованием карбоновых кислот в качестве предшественников мономеров синтезируемых сополимеров.*

Добавляемые в среду субстраты	Сроки добавления в среду культивирования карбоновой кислоты, часы	Урожай бактериальной биомассы, г/л среды	Содержание полимера в биомассе, % сух. веса	Молекулярная масса полимера, $\times 10^6$ Да	Содержание 3ОВ/3О4МВ в сополимере, мол. %
Сахароза, 50 мМ	-	4,7±0,6	81,2±3,1	1,63	0
С + 20 мМ АН	0	4,1±0,5	78,4±3,3	1,10	0
С + 35 мМ АН	0	3,7±0,5*	73,0±3,2*	0,49	0
С + 50 мМ АН	0	3,4±0,6	70,3±2,9	0,36	0
С + 65 мМ АН	0	3,0±0,6*	66,9±3,0*	0,26	0
С + 90 мМ АН	0	2,3±0,8*	61,2±3,4*	0,18	0
С + 125 мМ АН	0	1,5±0,7	56,8±3,3	0,11	0
С + 20 мМ ПК	12	2,2±0,7*	63,3±3,3*	0,89	2,9
С + 5 мМ ВК	12	4,4±0,9*	76,2±3,0*	1,29	2,5
С + 7,5 мМ ВК^	0	3,9±0,8*	72,1±2,8*	0,77	2,5
С + 10 мМ ВК$^{\#}$	12	4,2±0,9*	73,8±3,7*	1,42	10,7
С + 20 мМ ВК	0	3,2±1,3*	67,7±4,6*	0,85	9,0
С + 20 мМ	9	3,5±0,6*	69,8±4,1*	1,19	17,6

ВК#					
С + 20 мМ ВК	12	3,5±0,8*	70,5±3,2*	1,27	21,3
С + 10 мМ ВК + 20 мМ АН	12/0	3,6±0,9*	71,4±3,5*	0,82	5,9
С + 5 мМ ВК + 50 мМ АН	12/0	3,7±0,3	68,3±3,5	0,17	5,7
С + 10 мМ ВК+ 10 мМ АН	12/0	3,9±1,2*	72,5±4,2*	1,01	9,1
С + 15 мМ ВК + 35 мМ АН	12/0	3,1±1,3*	66,9±3,8*	0,32	9,6
С + 20 мМ ВК+ 20 мМ АН	12/0	3,4±1,1*	68,7±4,3*	0,64	17,5
С + 35 мМ ВК+ 50 мМ АН	12/0	2,6±1,4*	65,8±4,5*	0,22	17,4
С + 20 мМ 4МВК	0	2,6±1,2*	71,2±4,8*	0,62	0,04
С + 5 мМ 4МВК	12	3,7±0,8*	79,3±3,2*	1,39	0,14
С + 10 мМ 4МВК	12	3,6±0,9*	78,8±3,4*	1,34	0,23
С + 20 мМ 4МВК#	12	3,4±0,9*	76,7±3,3*	1,30	0,60
С + 35 мМ 4МВК	12	2,7±0,8*	71,4±3,5*	1,13	0,32
С + 20 мМ ГкК	12	2,7±0,7*	64,3±3,7*	1,02	0
С + 20 мМ ГпК	12	3,1±0,6*	57,0±3,7*	1,17	0
С + 20 мМ	12	2,9±0,5*	57,2±3,7*	1,21	0

ОК					
С + 20 мМ НК	12	4,1±0,7*	64,1±3,7*	1,45	0
С + 20 мМ ДК	12	1,7±0,6*	57,9±3,7*	1,07	0

* $p < 0,05$ при сравнении с группой "Сахароза", n = 8.

- для полученных согласно приведенным в данных строках Таблицы 6 условиям биосинтеза сополимеров ПОБ далее приведены экспериментальные данные на Рисунке 47.

^ - для полученных согласно приведенным в данной строке Таблицы 6 условиям биосинтеза ПОБ и его сополимеров экспериментальные данные по анализу их физико-химических свойств приведены на Рисунке 48 и далее в Таблице 10.

Штамм-продуцент *A. chroococcum* 7Б характеризуется высокой продуктивностью, неприхотливостью к условиям культивирования и биотехнологического процесса (требует только самое базовое оборудование, не требует высокоспецифических культуральных сред, газового питания, высокоточного контроля каких-то специальных параметров и т.п.), высокой продуктивностью (высокий урожай биомассы, содержание полимера в клетках и сухой биомассе до 80% и выше), высокой молекулярной массой синтезируемого полимера (более $1,9 \times 10^6$ Да). Такие характеристики штамма-продуцента крайне важны для биотехнологической продукции полимеров биомедицинского назначения в связи с необходимостью технически простой и глубокой очистки, помимо обеспечения их эффективной наработки (Бонарцев и др., 2011а, Прудскова и др., 2006). Однако у таких бактериальных продуцентов имеются ограничения в синтезе сополимеров ПОБ с длиной мономеров 3-оксикарбоновых кислот в составе сополимера более 5 атомов углерода (Pearce et al., 1994; Pettinari et al., 2001). Так, несмотря на то, что биосинтез нового сополимера ПОБ, поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерата, был показан в работах одной научной группы с использованием различных бактериальных продуцентов: *Ralstonia eutropha, Burkholderia sp., Chromobacterium sp.*, способных к биосинтезу ПОА как с короткоцепочечными, так и длинноцепочечными мономерами карбоновых кислот (Lau et al., 2011; Saika et al., 2014; Ling et al., 2011; Tanadchangsaeng et al., 2010), химическая структура этого сополимера (мономер 3-окси-4-метилвалерат имеет Y-образную R-группу) особенно интересна с точки зрения возможностей его биосинтеза именно такими бактериальными продуцентами, как *Azotobacter sp.* из-за наличия указанных ограничений.

Таблица 7. *Результаты апробации экспериментальной модели биосинтеза сополимеров ПОБ штаммом-продуцентом A. chroococcsit 7Б с использованием производных этиленгликоля в качестве предшественников мономеров синтезируемых сополимеров.*

Добавляемые в среду субстраты	Сроки добавления в среду культивирования карбоновой кислоты и/или производных ЭГ, Часы	Урожай бактериальной биомассы, г/л среды	Содержание полимера в биомассе, % сух. веса	Молекулярная масса полимера, $\times 10^6$ Да	Содержание 3ОВ в сополимере, мол. %	Содержание ЭГ в сополимере, мол. %	Молярное отношение ПЭГ/ПОБ
Сахароза, 50 мМ[#]	-/-	4,7	81,2	1,630	0	0	0
С + 150 мМ ДЭГ[*]	-/18	1,3	31,2	0,108	0	0,24	1,55
С + 150 мМ ТЭГ[*]	-/18	2,0	42,7	0,054	0	0,28	0,59
С + 150 мМ ПЭГ 200	-/18	2,2	45,2	0,035	0	0,72	0,70
С + 150 мМ ПЭГ 300[*#]	-/0	2,2±0,4	34,2±2,7	0,160	0	0,33	0,96
С + 150 мМ	-/0	1,9	31,8	0,227	0	0,19	0,81

ПЭГ 300*#							
С + 150 мМ ПЭГ 300	-/4	2,6	37,2	0,258	0	0,16	0,77
С + 150 мМ ПЭГ 300	-/12	3,6	52,4	0,218	0	0,15	0,63
С + 150 мМ ПЭГ 300	-/18	4,1	63,1	0,246	0	0,12	0,51
С + 150 мМ ПЭГ 300	-/24	4,0	62,7	0,542	0	0,03	0,13
С + 150 мМ ПЭГ 400	-/18	2,6	44,5	0,030	0	0,01	0,04
С + 150 мМ ПЭГ 1000	-/18	4,5	75,7	1,480	0	0	-
С + 20 мМ ВК + 150 мМ ПЭГ 300	12/0	2,6	49,5	0,219	4,69	0,15	0,63
С + 20 мМ ВК	12/4	3,1	53,8	0,152	5,34	0,19	0,56

+ 150 мМ ПЭГ 300							
С + 20 мМ ВК + 150 мМ ПЭГ 300	12/12	3,3	63,3	0,163	6,81	0,13	0,42
С + 20 мМ ВК + 150 мМ ПЭГ 300[*#]	12/18	3,2	66,7	0,147	7,53	0,23	0,67
С + 20 мМ ВК + 150 мМ ПЭГ 400	12/12	1,7	38,7	0,030	6,46	0,02	0,01
С + 150 мМ ППГ 400	-/12	3,3	79,8	0,621	0	0	0

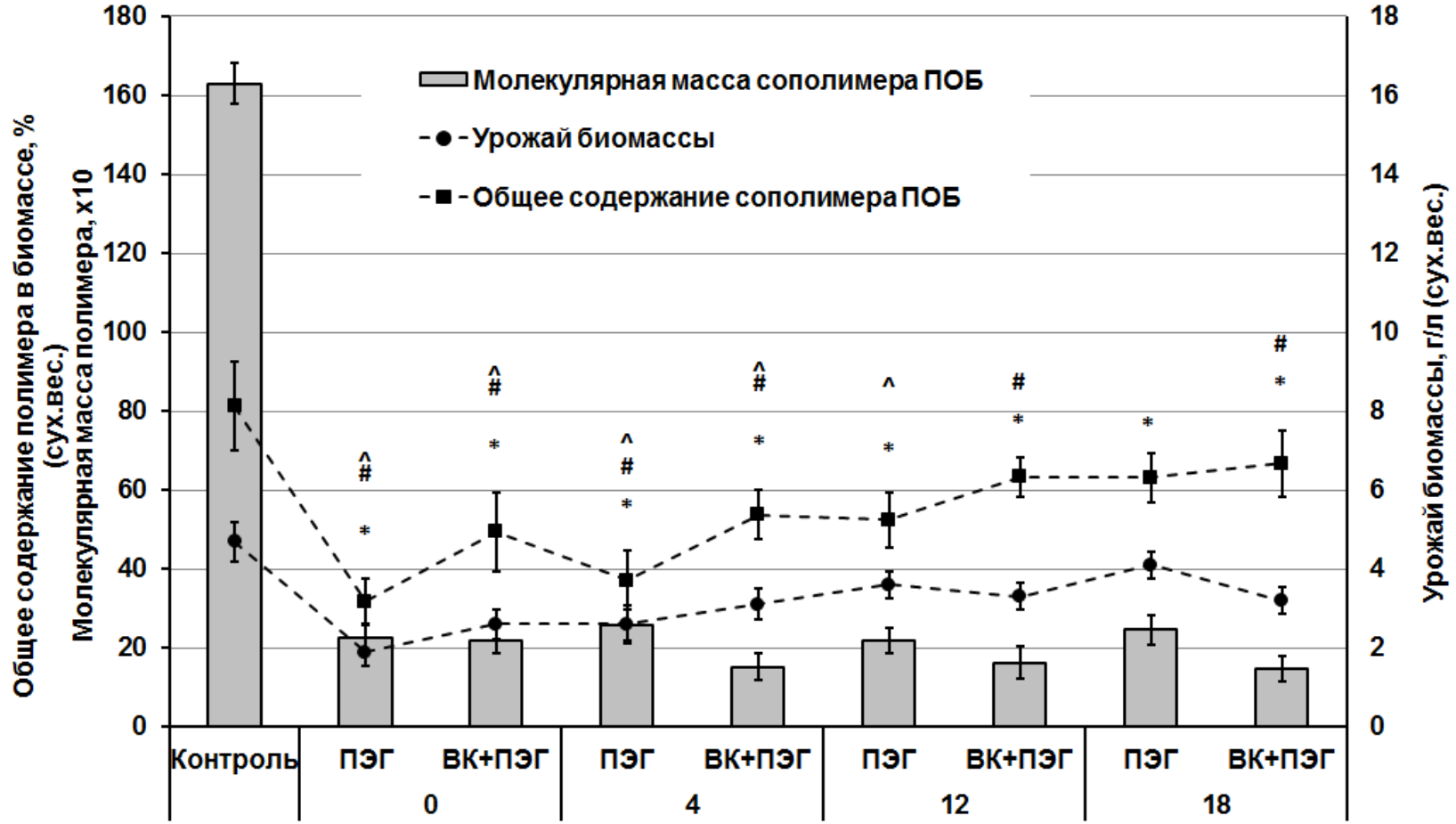


Рисунок 45. *Изменение основных параметров биотехнологического процесса (урожая бактериальной биомассы, содержания полимера в биомассе (из расчета на ее сухой вес.) и молекулярной массы синтезируемых полимеров (×10^4 Да) в ходе апробации экспериментальной модели биосинтеза сополимеров ПОБ с использованием добавления в среду культивирования штамма-продуцента A. chroococcum 7Б соли валериановой кислоты (20 мМ) и полиэтиленгликоля (150 мМ) на разных сроках после запуска биотехнологического процесса (0 – 18 часов). ^, #, * p < 0,05 содержание полимера в биомассе, выход биомассы и ММ синтезируемого полимера, соответственно, в сравнении с группой Контроль.*

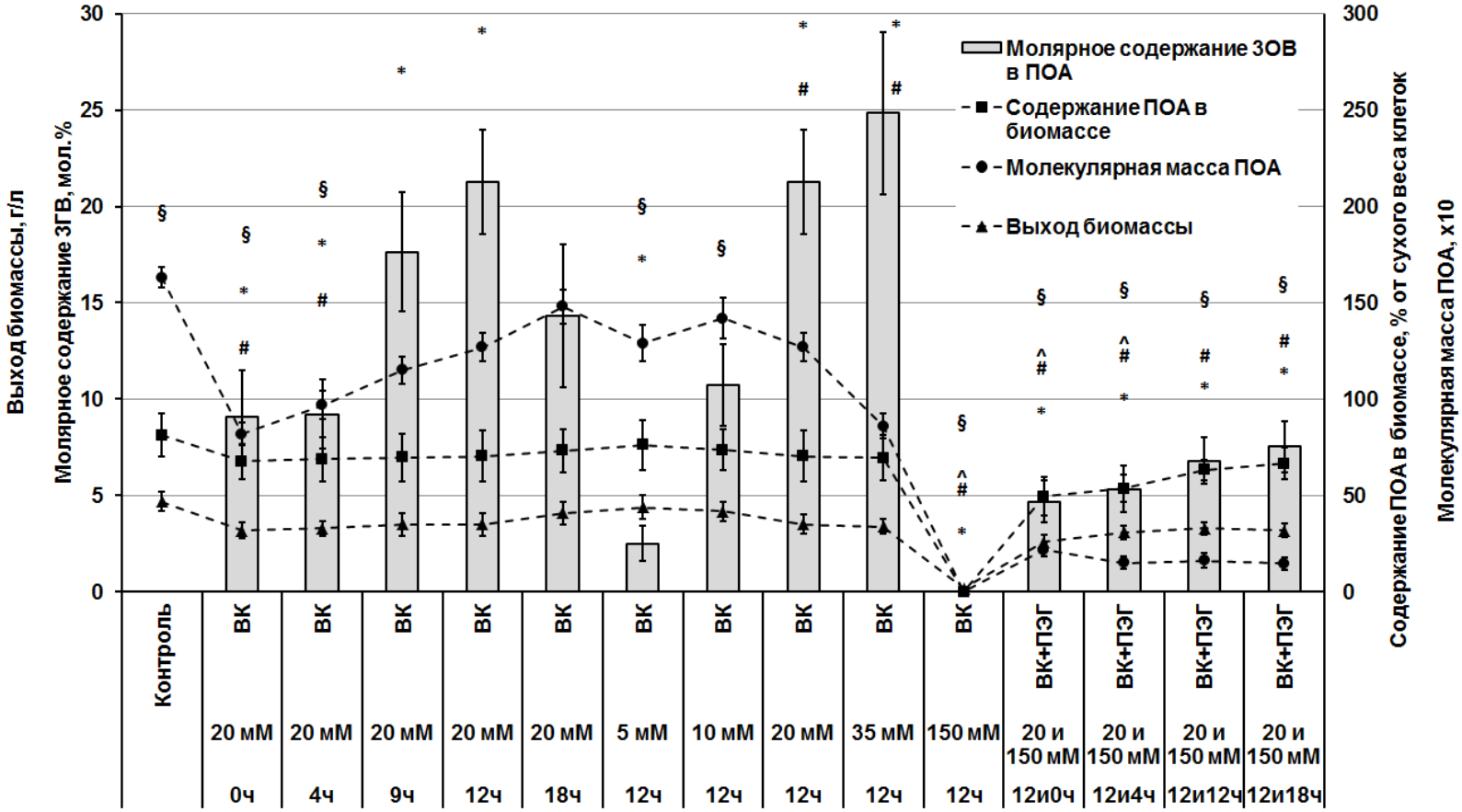
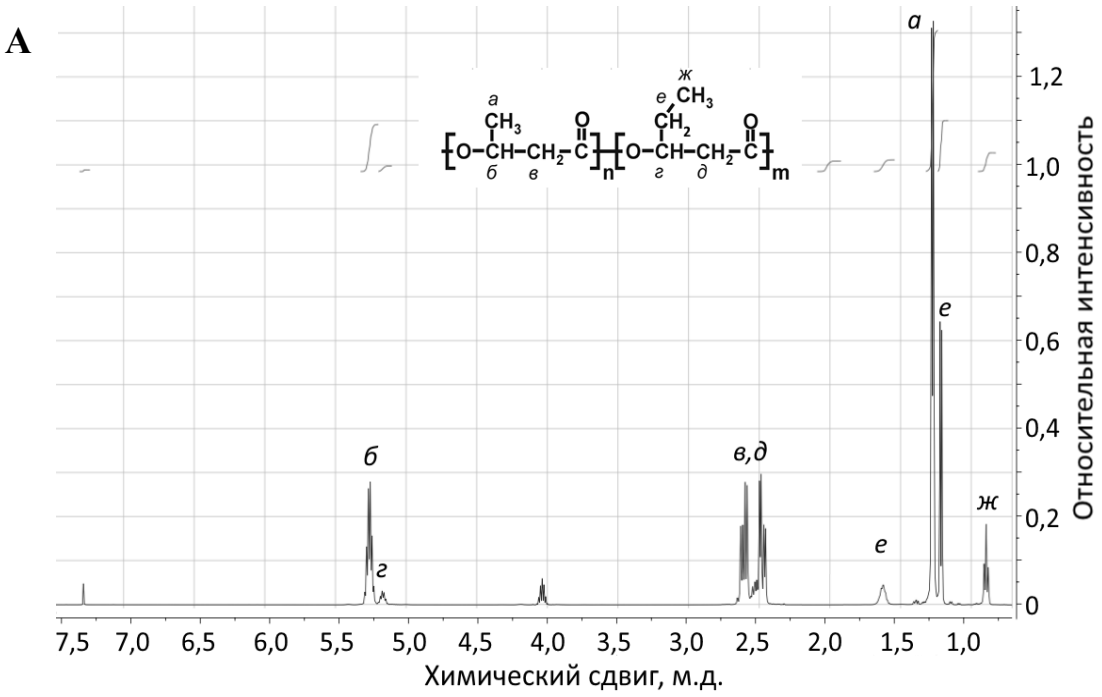


Рисунок 46. *Изменение основных параметров биотехнологического процесса (урожая бактериальной биомассы, содержания полимера в биомассе (из расчета на ее сухой вес.), молекулярной массы синтезируемых полимеров (×10^4 Да) и содержания 3ОВ в синтезируемом сополимере (мол. %) в ходе апробации экспериментальной модели биосинтеза сополимеров ПОБ с использованием добавления в среду культивирования штамма-продуцента A. chroococcsит 7Б соли валериановой кислоты (5 - 20 мМ) и полиэтиленгликоля (150 мМ) на разных сроках после запуска биотехнологического процесса (0 – 18 часов). ^, #, * p < 0,05 содержание полимера в биомассе, выход биомассы и ММ синтезируемого полимера, соответственно, в сравнении с группой Контроль; § p < 0,05 ММ синтезируемых полимеров в сравнении с ММ в группе ВК 20 мМ 12 час.*

Кроме того, *Azotobacter sp.* не может использовать в качестве единственных основных источников углерода такие дополнительные вещества как карбоновые кислоты, одноатомные спирты или полиэтиленгликоли (Shi et al., 1996а; Shi et al.,1996б), эти вещества могут выступать только в качестве потенциальных предшественников для синтеза сополимеров ПОБ (Мышкина и др., 2010; Pearce et al., 1994; Choi et al., 2004; Savenkova et al., 2000). Интересно, что в качестве таких предшественников для образования новых сополимеров ПОБ предпочтительнее использовать карбоновые кислоты и одноатомные спирты, у которых число атомов углерода нечетное (Steinbuchel and Valentin,1995; Steinbuchel et al., 1992).

Мы показали, что мономеры 3ОВ входят в качестве мономеров в состав синтезируемого сополимера ПОБВ при использовании валериановой и пропионовой кислот в качестве дополнительных источников углерода, тогда как биосинтез сополимеров при использовании гексановой, гептановой, октановой, нонановой и додекановой кислот не удалось осуществить. Включение 3ОВ в сополимер было подтверждено с помощью ^{1}Н-ЯМР по сигналу метильной группы этого мономера в области 0,89 ppm. Также было продемонстрировано, что синтезированный сополимер является мульти-блок-сополимером с вероятностным распределением блоков в полимерной цепи, так как имеет место прямая зависимость между мощностью сигнала протона β-углеродной группы эфирной связи и мощностью сигналов от метильных групп 3ОВ (0,89 ppm) и 3ОБ (1,27 ppm) (Рисунок 47) (Мышкина и др., 2010).



Б

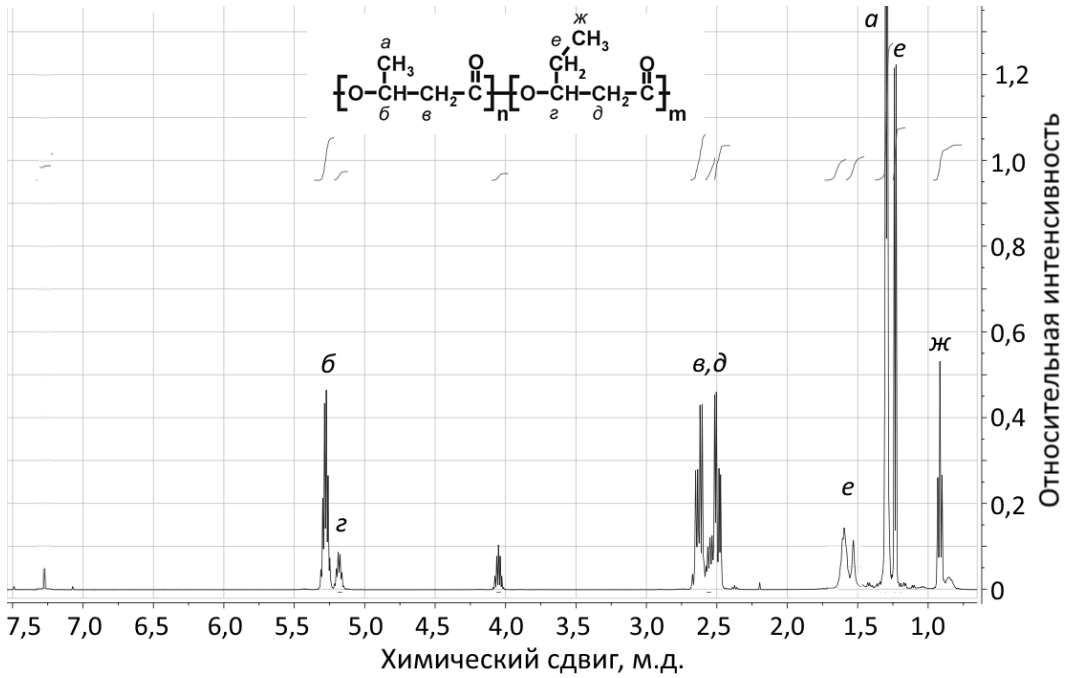


Рисунок 47. *Спектр ^{1}H ЯМР сополимера ПОБ с 3-оксивалератом в 2-х различных молярных содержании в полимерной цепи: 17,6 моль% (А) и 10,7 моль% (Б). А – поли-3-оксибутират: CH_3(s) - а, CH(b) - б, CH_2(b) - в, поли-3-оксивалерат: CH(b) - г, CH_2(b) - д, CH_2(s) - е, CH_3(s) - ж, основная полимерная цепь – b; боковые группы – s.* (*Совместно с ст.н.с. ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА В.В. Подгорским и на оборудовании центра).*

При биосинтезе сополимеров бактериями *Azotobacter sp.* включение валериановой кислоты в полимерную цепь происходит через путь β-окисления в такой последовательности: ВК → валерил-КоА → 3-кетовалерил-КоА → D-3-оксивалерил-КоА → 3ОВ. Биосинтез сополимера ПОБВ происходило также при добавлении в среду соли ПК. Метаболический путь биосинтеза ПОБВ в присутствии пропианата включает 3-кетотиолазу и процесс образования 3-кетовалерил-КоА путем конденсации пропионил-КоА с ацетил-КоА. Затем происходит восстановление кетовалерил-КоА, который превращается при этом в 3-гидроксивалерил-КоА, а последний уже служит субстратом для ПОА-полимеразы (Рисунок 40) (Madison and Huisman, 1999). Следует отметить, что имеется прямая зависимость между содержанием остатков 3ОВ в цепи синтезируемого сополимера ПОБ и концентрацией валериановой кислоты в среде культивирования штамма-продуцента, а также сроком добавления ВК в среду. Было показано, что наиболее эффективное вхождение 3ОВ в цепь сополимера происходила в случае добавления в культуральную среду ВК через 12 часов после начала биотехнологического процесса, что соответствует началу стационарной фазы накопления биомассы штамма-продуцента, и в этот же период начинает происходить интенсивный синтез ПОБ (Таблица 6;

Рисунки 41 и 46) (Мышкина и др., 2010). Во всех этих случаях в качестве основного источника углерода использовалась сахароза.

При использовании того же подхода, с помощью добавления в среду культивирования аналога валериановой кислоты – 4-метилвалериановой кислоты, мы сумели получить новый сополимер ПОБ – поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерат, что также было доказано с помощью ^{1}H-ЯМР. На спектре ^{1}H-ЯМР 4-метильная группа (е) и –СН группа (ж) мономера 3О4МВ проявляется в виде пиков, соответственно, при 0.90 ppm и 1.91 (рис. 2), тогда как у гомополимера ПОБ и сополимера ПОБВ в этой области нет сигналов. 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-4-метилвалерил-КоА → 3О4МВ в составе ПОБ4МВ (Рисунок 48). 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, при использовании других концентраций карбоновой кислоты – предшественника вхождение мономеров было гораздо ниже, тем не менее сам факт синтеза этого сополимера был подтвержден (Бонарцев и др., 2016).

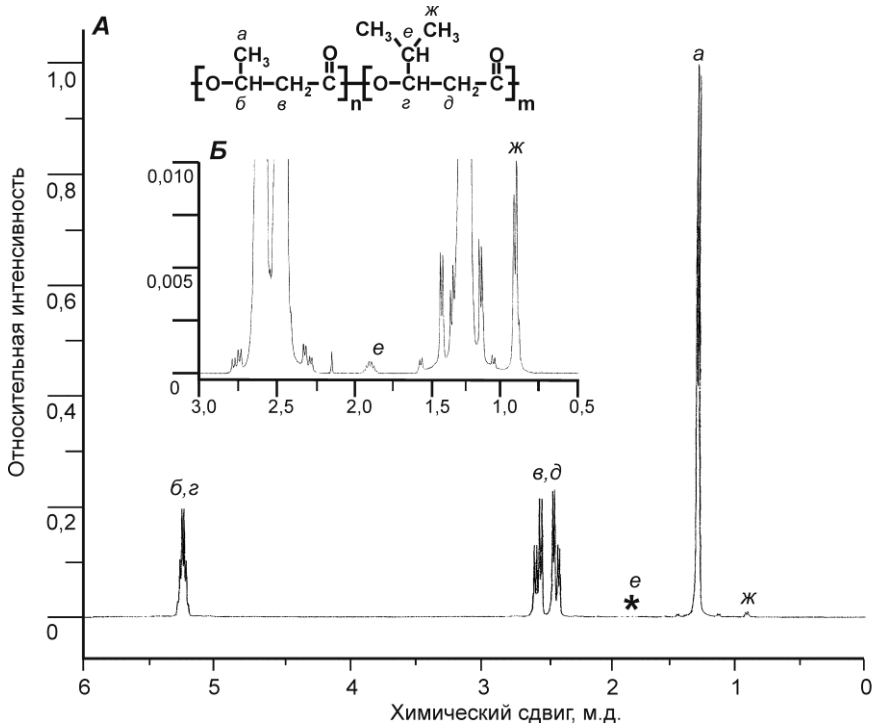


Рисунок 48. *Спектр ^{1}H-ЯМР сополимера ПОБ с 3-окси-4-метилвалератом: А – поли-3-оксибутират: CH_3(s) - а, CH(b) - б, CH_2(b) - в, поли-3-окси-4-метилвалерат: CH(b) - г, CH_2(b) - д, CH_2(s) - е, CH_3(s) - ж, основная полимерная цепь - b; боковые группы – s, * на врезке представлен увеличенный участок графика (Б).* (*Совместно с ст.н.с. ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА В.В. Подгорским и на оборудовании центра).*

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 и др., 2010).

ПОБ-синтаза, которая экспрессируется в клетках *A. chroococcum* геном *phbC* является полимеразой короткоцепочечных карбоновых кислот, таких как 3-гидроксибутират и 3-гидроксивалерат. Эта полимераза не может использовать для синтеза ПОА средне- и длинноцепочечные 3-гидроксикарбоновые кислоты, а именно кислоты, которые длиннее чем 3-гидроксивалериановая кислота (5С 3-гидроксикарбоновая кислота), т.е. 3-гидроксигексановую и 3-гидроксигептановую кислоты этот фермент не может инкорпорировать в состав растущей цепи ПОА (Pearce et al., 1994; Pettinari et al., 2001). Тем не менее, в нашей работе в качестве добавки в культуральную среду были использованы ГкК (а также ГпК, ОК, НК, ДК) в качестве контроля как изомер 4МВК, т.к. хотя и известно, что использование ГК (и других карбоновых кислот с большей длиной цепи) не приводит к синтезу *A. chroococcum* сополимера ПОБ, влияние длинноцепочечных карбоновых кислот на сам процесс биосинтеза необходимо было проконтролировать. Полученные нами данные подтверждают наличие таких ограничений по длине используемых мономеров для ПОБ-синтазы, что, по-видимому, связано со строгой специфичностью этого фермента по отношению к субстратам, используемым для синтеза полимера. Даже продемонстрированное в работе включение в состав полимера остатков 3-окси-4-метилвалерата лишь подтверждает это ограничение, т.к. несмотря на то, что 3-окси-4-метилвалерат является остатком 6С 3-гидрокси-карбоновой кислоты, его боковая группа имеет вилкообразную форму, что не приводит к увеличению длины боковой цепи. А вот линейная молекула - 3-оксигексановая кислота (6С линейная 3-оксикарбоновая кислота) уже не может быть включена ферментом в состав растущей цепи полиэфира по тем же причинам.

Интересно, что добавление в культуральную среду ВК и 4МВК вызывает небольшое снижение молекулярной массы синтезируемого полимера, что можно объяснить ингибирующим действием карбоновых кислот на процесс биосинтеза ПОА (Таблица 6) (Page and Manchak, 1995). Однако, если добавить 4МВК в культуральную среду не через 12 ч, а сразу же, то будет наблюдаться не только значительно выраженное снижение молекулярной массы полимера, но прежде всего, практически не будет происходить синтез собственно самого сополимера ПОБ4МВ. Аналогичный эффект наблюдается и при начальном добавлении ВК в культуральную среду, но в этом случае происходит синтез сополимера ПОБВ с гораздо меньшим содержанием мономеров 3ОВ. Снижение молекулярной массы происходит и при добавлении в культуральную среду длинноцепочечных карбоновых кислот, хотя синтеза

сополимера при этом вообще не происходит. Это также может быть связано с ингибирующим действием карбоновых кислот на ПОБ-синтазу, которое на ранних стадиях биосинтеза полимера приводит к снижению включения молекул-предшественников в растущую цепь сополимера, хотя теоретически, напротив, должно было бы приводить к синтезу сополимеров с большим содержанием 3ОВ и 3О4МВ.

Влияние карбоновых кислот на биосинтез полимеров подтверждается данными по росту культуры *A. chroococcum* 7Б. Полученные результаты свидетельствуют о том, что добавление в среду карбоновых кислот приводит к заметному подавлению роста клеток, снижению в них содержания полимера и, как следствие, к снижению продукции полимера, причем степень такого ингибирующего влияния на рост клеток зависит от химической природы добавки (Мышкина, 2010). В частности, если в контрольном варианте только на сахарозе урожай биомассы *A. chroococcum* 7Б составлял 4,7 г/л, то при добавлении в культуральную среду ВК в концентрации 20 и 35 мМ, урожай биомассы значительно снижался до 3,5 и 3,4 г/л, соответственно (Таблица 6, Рисунок 45). Более того, несмотря на то, что синтез сополимера при использовании в качестве дополнительных источников углерода ГкК, ГпК, ОК, НК, ДК не происходит эти карбоновые кислоты также значительно ингибируют рост клеток и продукцию полимера (Таблица 6).

Несмотря на некоторое указанное выше снижение параметров биосинтеза сополимеров ПОБВ и ПОБ4МВ следует все же отметить высокую продуктивность (выход биомассы – свыше 3.4 г/л; содержание сополимера – свыше 70%) штамма-продуцента и высокую молекулярная масса полученного сополимера (более $1{,}3\times10^6$). Так, биосинтез ПОБ4МВ был показан ранее с использованием различных бактериальных продуцентов: *Ralstonia eutropha*, *Burkholderia sp.*, *Chromobacterium sp.*, однако, содержание полимера в клетках штаммов-продуцентов редко превышал 50%, а сам биотехнологический процесс требовал высокоспецифичных технических условий, что может существенно ограничивать использование этих методик для продукции новых полимеров биомедицинского назначения. Вероятно, в связи с наличием подобных препятствий, тестирование биосовместимости синтезированных по разработанным методикам сополимеров не проводилась (Lau et al., 2011; Saika et al., 2014; Ling et al., 2011; Tanadchangsaeng et al., 2010). Поэтому использование высокопродуктивных и неприхотливых к условиям культивирования штаммов-продуцентов для получения новых сополимеров, таких как *Azotobacter chroococcum* 7В (Мышкина и др., 2008; Мышкина и др., 2010; Bonartsev et al., 2013а; Bonartsev et al., 2013б; Bonartsev et al., 2016а; Бонарцев и др., 2016), представляется особенно важным.

Данный подход показал свою эффективность и при биосинтезе новых сополимеров ПОБ с различными производными этиленгликоля, для чего в культуральную среду в концентрации 150 мМ был добавлен целый ряд этих соединений: ДЭГ, ТЭГ, ПЭГ-200, ПЭГ-300 и ПЭГ-400. Анализ синтезированных сополимеров с помощью метода ^{1}H ЯМР показал, что был осуществлен синтез нескольких новых сополимеров ПОБ: ПОБ-ДЭГ, ПОБ-ТЭГ, ПОБ-ПЭГ и ПОБВ-ПЭГ, что следовало из наличия 5-ти слабых сигналов протонов групп ЭГ в областях 3,66, 3,61, 3,70, 3,73 и 4,24 ppm (Рисунок 49А,Б,В; 50А,Б; Таблица 6). Эти характерные пики в спектральной области 3,6-3,8 ppm отсутствовали в синтезированных ПОБ и ПОБВ, если добавления производных ЭГ в культуральную среду не производилось (Мышкина и др., 2010).

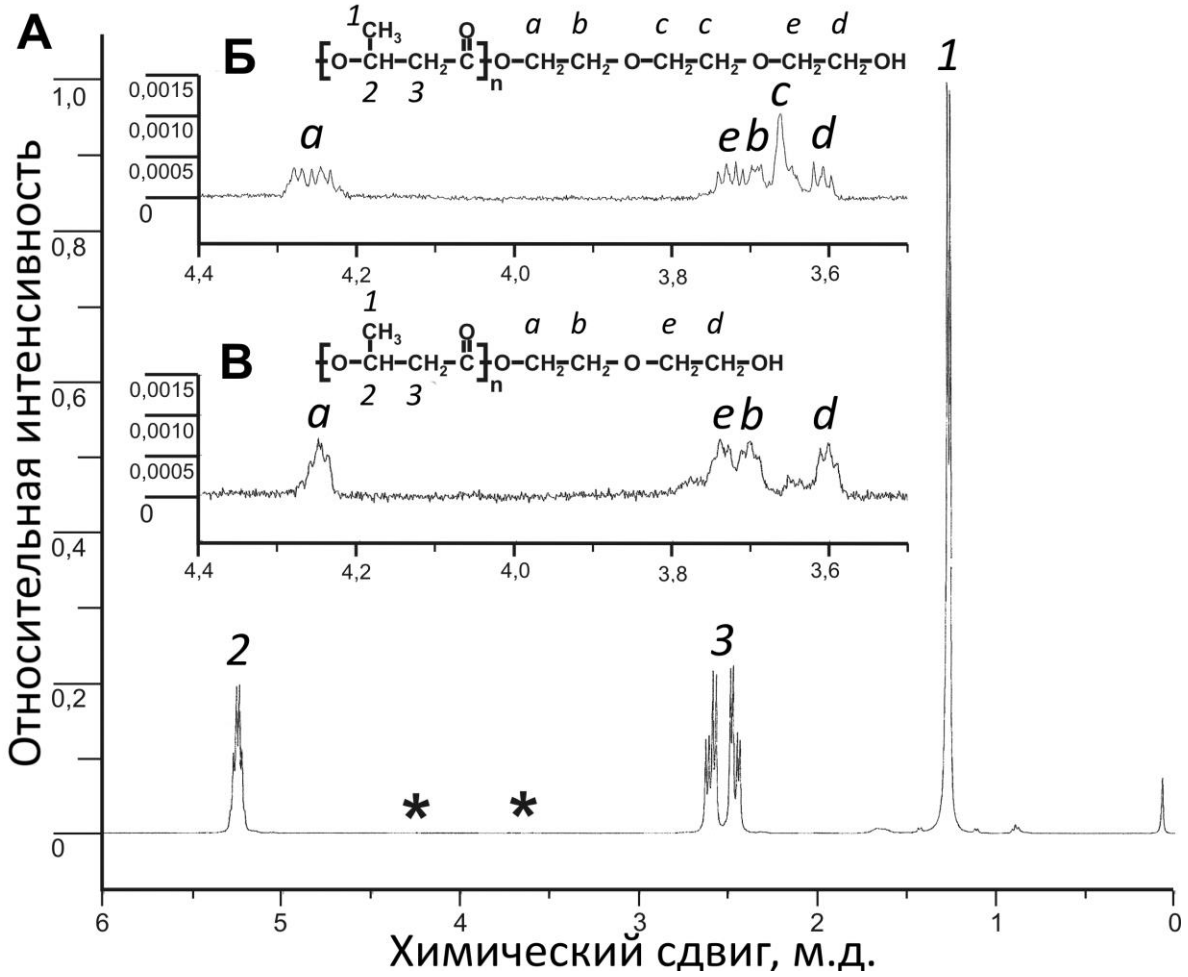


Рисунок 49. *Спектр ^{1}H-ЯМР сополимеров ПОБ с диэтиленгликолем и триэтиленгликолем. А – поли-3-оксибутират: CH_3(s) - 1, CH(b) - 2, CH_2(b) - 3. Диэтиленгликоль и триэтиленгликоль: - O–CH_2 эфирная связь (4.24 ppm) - a, CH_2 следующая группа (3.73) - b, совокупный сигнал групп центра (-O–CH_2–CH_2-) (3.66 ppm) - c, концевые группы –CH_2- (3.70 ppm) – e; –CH_2-OH (3.61 ppm) – d, соответственно, основная полимерная цепь – b, боковые группы - s,* на врезках представлены увеличенные участки графика (Б, В). (Совместно с ст.н.с. ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА В.В. Подгорским и на оборудовании центра).*

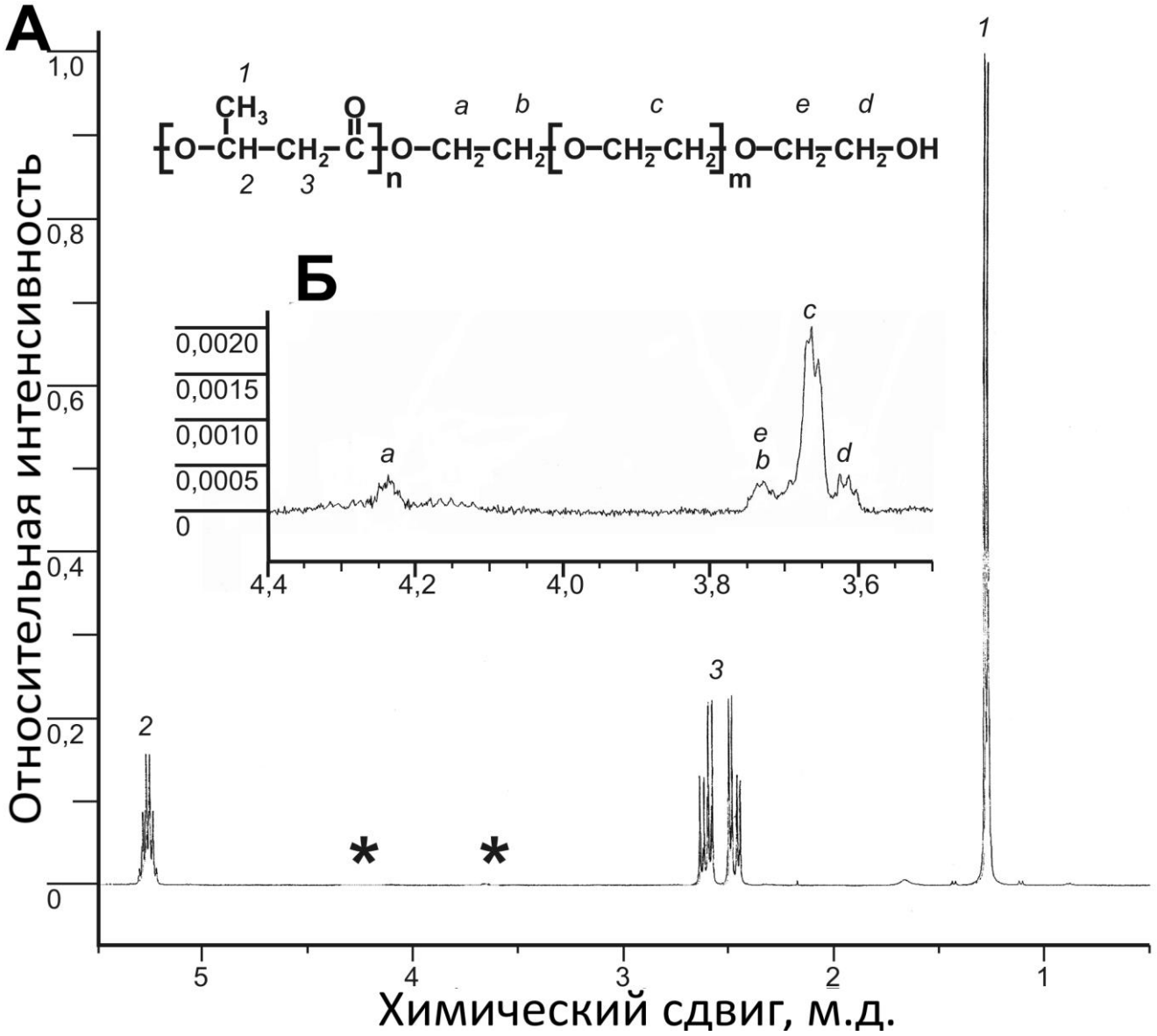


Рисунок 50. *Спектр ^{1}H-ЯМР сополимера поли-3-оксибутирата с полиэтиленгликолем (ММ = 300). А – поли-3-оксибутират: CH_3(s) - 1, CH(b) - 2, CH_2(b) - 3. Полиэтиленгликоль: -O–CH_2 эфирная связь (4.24 ppm) - a, CH_2 следующая группа (3.73) – b; совокупный сигнал групп центра (-O–CH_2–CH_2-) (3.66 ppm) - c, концевые группы –CH_2- (3.70 ppm) – e; –CH_2-OH (3.61 ppm) – d, соответственно, основная полимерная цепь – b, боковые группы - s, * на врезках представлен увеличенный участок графика (Б). (Совместно с ст.н.с. ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА В.В. Подгорским и на оборудовании центра).*

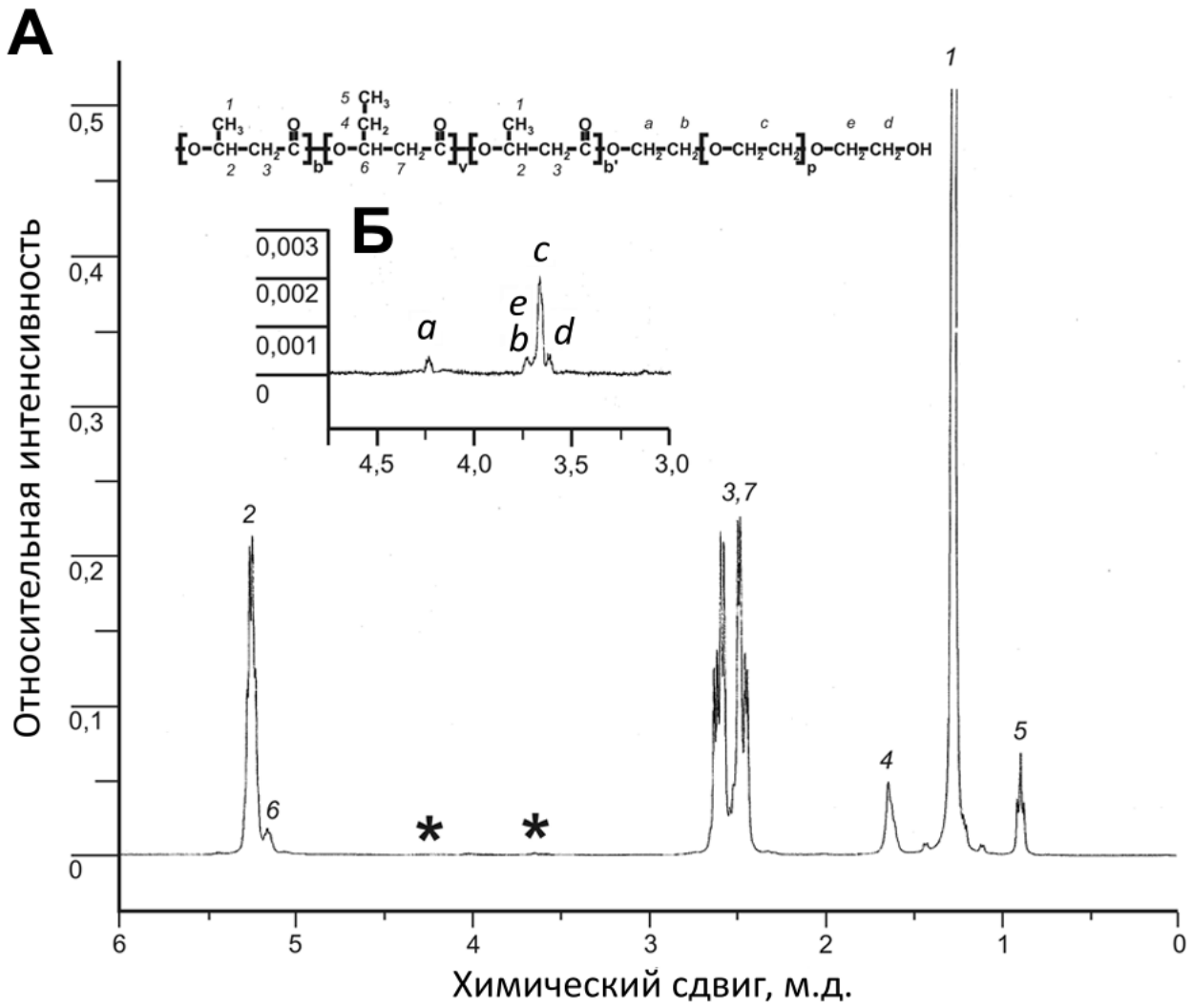


Рисунок 51. *Спектр ^{1}H ЯМР сополимера ПОБ с 3-оксивалератом и полиэтиленгликолем (ММ = 400): А – поли-3-оксибутират: CH_3(s) - 1, CH(b) - 2, CH_2(b) - 3, поли-3-оксивалерат: CH(b) - 6, CH_2(b) - 7, CH_2(s) - 4, CH_3(s) – 5. Полиэтиленгликоль: -O–CH_2 эфирная связь (4.24 ppm) - a, CH_2 следующая группа (3.73) – b; совокупный сигнал групп центра (-O–CH_2–CH_2-) (3.66 ppm) - c, концевые группы –CH_2- (3.70 ppm) – e; –CH_2-OH (3.61 ppm) – d, соответственно, основная полимерная цепь – b, боковые группы - s, * на врезках представлен увеличенный участок графика (Б). (Совместно с ст.н.с. ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА В.В. Подгорским и на оборудовании центра).*

По-видимому, этот сополимер представляет собой длинную цепь ПОБ, карбоксильный конец который связан ковалентно с полимером ПЭГ через сложноэфирную связь. Было также рассчитано максимальное вхождение мономеров ЭГ в полимерную цепь этих сополимеров ПОБ с производными ЭГ и показано, что максимальное молярное содержание ЭГ составляет 0,33

мол.% или (как было показано в другой экспериментальной серии) 0,19 мол.% в случае добавления в культуральную среду 150 мМ ПЭГ-300. Чтобы лучше представить данные и для их лучшего понимания мы ввели новый параметр: отношение числа молекул ПЭГ к числу молекул ПОБ в полимерной цепи, в которой эти полимеры связаны друг с другом - или ПОБ/ПЭГ. Соответственно, при содержании 0,33 мол.% на одну молекулу ПОБ (ММ=$1,6\times10^5$ Да) приходится 0,96 молекулы ПЭГ (ММ = 300), а при содержании 0,19 мол.% на одну молекулу ПОБ (ММ=$1,6\times10^5$ Да) приходится 0,81 молекулы ПЭГ (ММ = 300) (Bonartsev et al., 2013а; Bonartsev et al., 2013б; Bonartsev et al., 2016а).

Было замечено, что добавление ПЭГ-300 в начальный момент времени приводит к более высокому молярному содержанию ПЭГ в синтезируемом сополимере, в отличие от добавления ПЭГ-300 после 18 часов культивирования, когда цепь полимера ПОБ уже частично синтезирована – чем позже добавляли ПЭГ в культуральную среду, тем меньше было его включение в состав сополимера. Однако этот эффект не наблюдался при одновременном добавлении ПЭГ-300 и ВК (Таблица 7). Добавление всех производных ПЭГ (ДЭГ, ТЭГ, ПЭГ-200, ПЭГ-300, ПЭГ-400 в культуральную среду к среде также приводит к значительному снижению молекулярной массы полученных полимеров (Таблица 7), но влияния времени их добавления в среду на эффективность снижения молекулярной массы синтезируемых полимеров не наблюдалось. Однако совместное добавление ПЭГ-300 и ВК в культуральную среду вызывало более сильное падение молекулярной массы синтезируемого сополимера, чем в случае добавления в среду только одного ПЭГ на каждой временной точке добавления этих ингредиентов (Таблица 7, Рисунок 46). Совместное добавление ВК и ПЭГ-300 в среду вызывало также значительное падение молярного содержания 3ОВ в синтезируемом сополимере ПОБВ-ПЭГ по сравнению с содержанием 3ОВ в сополимере ПОБВ, который был получен путем добавления в среду только одной ВК в тех же условиях (20 мМ ВК на 12 час.) без использования ПЭГ (Таблица 7, Рисунок 46).

Ковалентное связывание сегментов ЭГ с цепью ПОБ было показано также при использовании в качестве предшественников для синтеза сополимеров ДЭГ и ТЭГ и для синтезированных с помощью этого способа сополимеров ПОБ-ДЭГ и ПОБ-ТЭГ (Рисунок 49 А, Б, В). Сигнал среднего участка ЭГ-мономеров ТЭГ на 3,66 ppm у ПОБ-ТЭГ был гораздо ниже совокупного сигнала среднего участка ЭГ-мономеров ПОБ-ПЭГ сополимера (Рисунок 49 Б). Пик на 3,66 ppm у ПОБ-ДЭГ вообще отсутствовал. Тогда как сигналы от других ЭГ-мономеров у ПОБ-ДЭГ и ПОБ-ПЭГ присутствовали и соответствовали сигналам ПОБ-ПЭГ, включая сигнал на 4,24 ppm ЭГ-мономера, образующего ковалентную связь с цепью ПОБ (Рисунок 50 В, Рисунок 51).

Таким образом, ПЭГ, добавленный в среду культивирования *A. chroococcum* вызывает такое воздействие на его ПОА-полимеразу, что происходит связывание ПЭГ с одним из концов, а именно с карбоксильным концом (–COOH) полимерной цепи как ПОБ, так и его сополимера с 3-оксивалератом. По-видимому, ПОА-полимераза способна как-то неспецифически связываться с этим синтетическим полимером, на что указывает возможность образования смесей полимеров ПОБ и ПЭГ, несмотря на довольно сильное различие их физико-химических свойств (Avella and Matuscelli,1988; Page and Manchak, 1995; Cheng et al., 2003), и использовать его в качестве молекулы, завершающей синтез полимерной цепи ПОБ и ПОБВ (Рисунок 52), что сопровождается падением ММ синтезированных полимеров (Shi et al., 1996b; Ashby et al., 1999). Эта способность ПЭГ была использована ранее для направленного снижения молекулярной массы ПОА для таких штаммов-продуцентов как *Cupriavidus necator* (ранее известен как *Alcaligenes eutropha* и *Ralstonia eutropha*) (Shi et al., 1996a), *Azohydromonas lata* (ранее известен как *Alcaligenes latus*) (Ashby et al., 1997; Ashby et al., 1999) и *P. oleovorans* (Ashby, 2002). При этом происходит синтез блок-сополимеров, в случае присоединения ПЭГ (а также ДЭГ и ТЭГ) к ПОБ образуются ди-блок-сополимеры, а в случае присоединения ПЭГ к ПОБВ происходит синтез три-блок-сополимера или терполимера (Рисунок 40). Эти результаты косвенно подтверждаются возможностью химического синтеза ПОА с ПЭГ (Li et al., 2005; Pan et al., 2009).

Однако, добавление ПЭГ-400 в культуральную среду приводило к сильному падению молекулярной массы синтезируемого полимера несмотря на то, что формирования сополимера ПОБ-ПЭГ не происходило (таблица 7). Это указывает на какой-то другой механизм нарушения биосинтеза ПОА, вызываемого ПЭГ. Трехкратное снижение молярного содержания 3ГВ в синтезируемом сополимере ПОБВ-ПЭГ по сравнению с ПОБВ, полученном без использования ПЭГ (Таблица 7; Рисунок 46), также может быть объяснено возможным ингибирующим влиянием ПЭГ на ПОБ-синтазу.

Интересно, что синтез сополимеров ПОА-ПЭГ зависит от длины цепи добавляемых в культуральную среду производных ПЭГ. Так, если добавление ДЭГ, ТЭГ, ПЭГ-200 и ПЭГ-300 приводит к синтезу сополимеров, то встраивания в полимерную цепь ПЭГ-400 и ПЭГ-1000 вообще практически не происходило (Таблица 7). Неспособность образования сополимеров ПОА при взаимодействии с ПЭГ-400 и ПЭГ-1000 может быть объяснено слишком большой длиной этих олигомеров ПЭГ, что может препятствовать их использованию ПОБ-полимеразой в качестве субстратов, если специфическое взаимодействие ПОБ-полимеразы с производными ПЭГ вообще имеет место. Как уже было отмечено, ПОБ-синтаза (ПОБ-полимераза) *A. chroococcum* (ген *phbC*) – это полимераза короткоцепочечных карбоновых кислот, эта

полимераза не может использовать для синтеза ПОА средне- и длинноцепочечные 3-гидроксикарбоновые кислоты (Pearce et al., 1994; Pettinari et al., 2001).

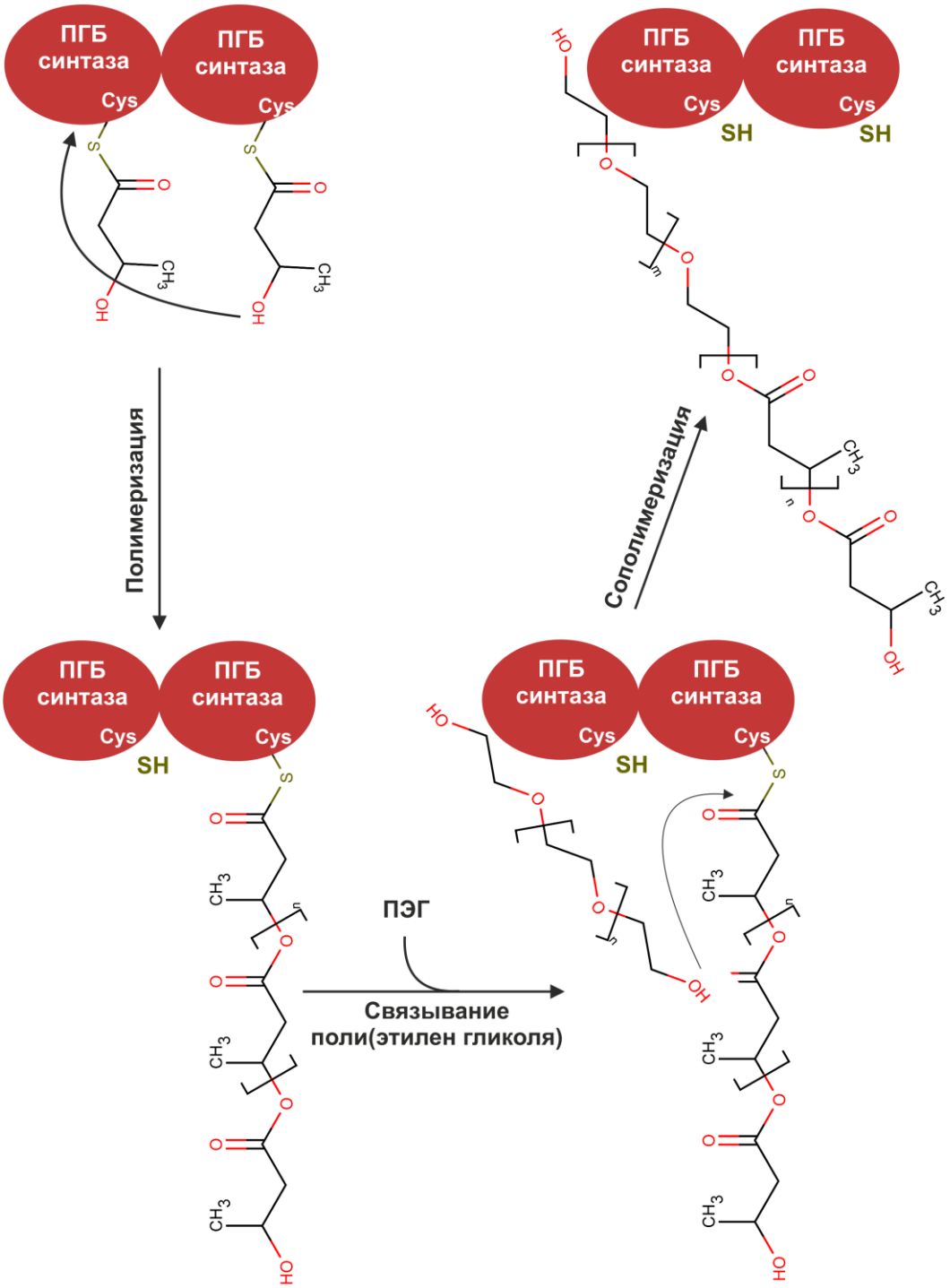


Рисунок 52. *Механизм обрыва цепи полиэтиленгликолем при осуществлении сополимеризации ПОБ с ПЭГ с участием ПОА-полимеразы.*

Возможно, такая особенность этого фермента сказывается и на синтезе сополимеров ПОА с ПЭГ – имеется ограничение связывания с цепью синтезируемого ПОА длинноцепочечных ПЭГ (с n>7) ПОБ-полимеразой (ген *phbC*) (Рисунок 40). Однако, как уже было отмечено, некоторые исследователи приводят доводы в пользу неспецифического (неферментативного) процесса формирования ПОА-ПЭГ сополимеров (Shi et al., 1996a) – в этом случае подобные ограничения могут быть связаны с какими-то конформационными особенностями молекул ПЭГ при неспецифическом образовании связи с полимерной цепью ПОА.

Тем не менее, многие данные все-таки указывают на возможность именно специфического ферментативного образования связи между полимерами ПОА и ПЭГ. Это связано с биофункциональностью как ПОБ как эндогенного полимера в организме и взаимодействием их с другими биополимерами (белками, полифосфатами, ДНК), в т.ч. с образованием ковалентных связей между ними (Boni et al., 1984; Yamazaki and Ito, 1990; Lentz and Lee, 1999; Reusch, 2013). Было показано, что имеется биохимический процесс ковалентного связывания олигомеров ПОБ с белками (Reusch, 2013), названный ПОБилированием (PHBylation) по аналогии с ПЭГилированием (PEGylation) – искусственным химическим процессом присоединения полимера ПЭГ к белкам для модификации их функциональности (Boni et al., 1984; Yamazaki and Ito, 1990; Lentz and Lee, 1999).

Образование ковалентной связи между ПОБ и ПЭГ может быть связано с некоторой схожестью ПЭГ с гидрофильными биополимерами бактериальных клеток, если не по своей химической структуре, то по своим физико-химическим свойствам. ПЭГ является нейтральным водорастворимым полиэфиром, который обладает относительно низкой токсичностью по отношению к живым клеткам и тканям организма и используется для модификации белков и фосфолипидов (образуя с ними комплексы), а также используется для стимуляции процесса слияния клеток (Boni et al., 1984; Yamazaki and Ito, 1990; Lentz and Lee, 1999). Имеется также довольно обширная научная литература на тему ковалентного связывания ПЭГ с другими биомолекулами для использования в фармацевтике и медицине. В современной фармакологии и биоинженерии ПЭГ используется для химической модификации (т.н. ПЭГилирования – англ. PEGylation) наночастиц, липосом и биофармацевтических препаратов белковой природы (например, препаратов интерферона) (Jevsevar et al., 2010; Xiao et al., 2010). На фармацевтическом рынке имеется уже целый ряд биопрепаратов – конъюгатов белков, наночастиц и липосом с ПЭГ, эффективность которых во многом обусловлена именно использованием в составе препарата ПЭГ. Так, описано получение сополимеров химически синтезируемых полиоксиалканоатов, такого как сополимер полимолочной и полигликолевой

кислот (ПМГК) с полиэтиленгликолем. В основном, сополимеризация ПМГК с ПЭГ также осуществляется с целью получения биополимерных наночастиц с гидрофильной оболочкой из ПЭГ (т.е. ПЭГилированных наночастиц), тогда как наночастицы из ПМГК слишком гидрофобны, что препятствует их применению в качестве средств доставки лекарственных веществ (Xiao et al., 2010). ПЭГилирование биодеградируемых полимеров, химически синтезируемых ПОА (например, ПМГК) используется также для улучшения биосовместимости этих полимеров. Под ПЭГилированием в данном случае понимается как ковалентное связывание ПЭГ с макромолекулами других полимеров, так и образование композитов ПОА с ПЭГ и адсорбция ПЭГ на поверхности полимеров за счет нековалентных межмолекулярных взаимодействий. Однако, результаты исследования влияния ПЭГилирования на биосовместимость ПОА часто противоречат друг другу. Так, китайскими исследователями показано значительное улучшение биосовместимости с клетками, уменьшение адгезии тромбоцитов и коагуляции крови при контакте с композитами ПОА с ПЭГ. Улучшение био- и гемосовместимости биоматериала было сопряжено с увеличением гидрофильности, диффузионных характеристик и механических свойств при образовании смесей полимеров (Cheng et al., 2003; Pan et al., 2005). Однако, в других работах приводятся данные о значительном ухудшении прикрепления и роста клеток на пленках как из сополимеров ПОА с ПЭГ, так и композитов ПОА/ПЭГ (Zanzig et al., 2003; Townsend et al., 2005; Li et al., 2011). Более того, ПЭГ используют также для модификации структуры полимерного материала ПОА, например, для увеличения пористости и шероховатости поверхности полимерных изделий из ПОА. В этом случае также данные о влиянии такой модификации ПОА на биосовместимость полимера существенно разнятся (Жаркова и др., 2012; Севастьянов и Кирпичников, 2011). Таким образом, биосовместимость сополимеров ПОА с ПЭГ, полученных путем химического синтеза может быть, как лучше, так и хуже, чем у самих ПОА. Однако практически ничего не известно об изменении биосовместимости ПОА при их биотехнологической сополимеризации с ПЭГ (Li et al., 2005; Pan et al., 2009; Zanzig et al., 2003; Townsend et al., 2005; Li et al., 2011; Жаркова и др., 2012).

Приведенные в Таблице 7 данные свидетельствуют о том, что добавление в среду любых дополнительных источников углерода, как карбоновых кислот, так и производных ПЭГ вызывает значительное подавление роста культуры, снижение содержания полимера в бактериальных клетках и, как следствие, снижение продукции полимера (Таблица 7, Рисунок 46 и 53). Этот эффект сходен с описанным выше эффектом подавлению роста культуры и снижению накопления полимера в клетках, которое вызывает добавление в культуральную среду различных карбоновых кислот (пропионовой, гексановой, гептановой и др.) и ацетата

натрия (Мышкина и др., 2010). Более того, ингибирование бактериального роста было связано не только с повышенной концентрацией добавляемого в среду предшественника мономеров, но и от его химической структуры. Так, урожай биомассы, выращенной в среде с добавленным в нее ДЭГ и ПЭГ 300 в концентрации 150 мМ, составлял 1,3 и 3,6 г/л, соответственно, тогда как добавление валерата в той же концентрации (150 мМ) (Таблица 6) вызывало полное подавление роста культуры. Урожай биомассы и содержание полимера в клетках при добавлении в среду различных производных ЭГ также значительно различались. Следует отметить, что наиболее высокие значения этих параметров наблюдались в случае добавления в среду ПЭГ 300, тогда как более короткоцепочечный ДЭГ вызывает сильное подавление роста штамма-продуцента и накопления им полимера (Таблица 7, Рисунки 46 и 53). Подавление роста штамма-продуцента и накопления им полимера при добавлении в среду ДЭГ, ТЭГ и ПЭГ-200 можно также объяснить ингибирующим влиянием на синтез полимера ПОБ-синтазой.

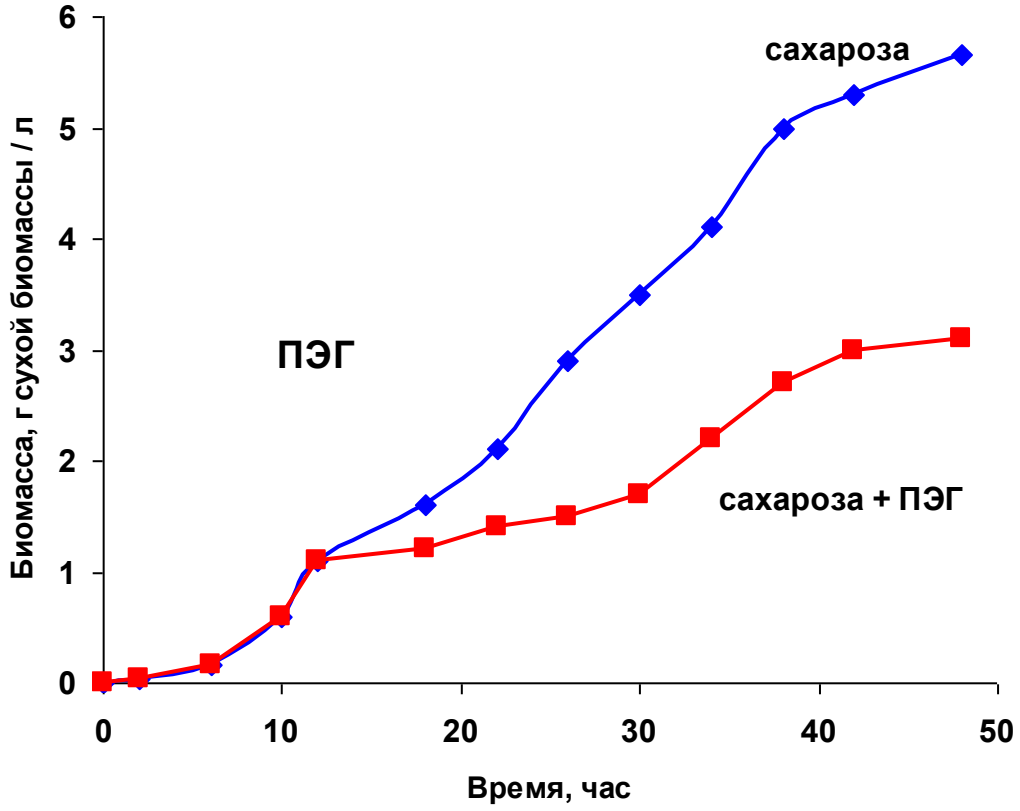


Рисунок 53. *Бактериальный рост A. chroococcum 7Б в культуральной среде, в которую была добавлена только сахароза в концентрации 20 мМ (сахароза) и дополнительно к сахарозе добавлен полиэтиленгликоль (сахароза + ПЭГ) в концентрации 150 мМ на 12-ый час после начала биотехнологического процесса.*

Особое внимание следует обратить на то, что параметры биосинтеза полимера сильно зависели от времени добавления валерата и ПЭГ в культуральную среду. Так, начальное добавление ПЭГ 300 в среду (т.е. вместе с сахарозой) вызывало двукратное падение урожая биомассы и содержания полимера в клетках по сравнению с вариантом, когда ПЭГ добавляли в среду через 18 часов после начала культивирования (Таблица 7, Рисунок 46) (Bonartsev et al., 2013а; Bonartsev et al., 2013б; Bonartsev et al., 2016а). Т.е. чем раньше добавляли ПЭГ в среду, тем больше он подавлял рост и биосинтез полимера, что также, по-видимому, связано с ингибирующим влиянием ПЭГ на метаболизм штамма-продуцента, в т.ч. биосинтез им полимера. Такой же эффект наблюдался и при совместном добавлении в среду ПЭГ и ВК: чем раньше добавляли ПЭГ, тем меньше был урожай биомассы и продукция полимера (Таблица 7, Рисунок 46). Использование совместного добавления в среду валерата и ПЭГ выявило также и другую интересную зависимость. Совместное добавление ВК и ПЭГ-300 вызывало меньшее подавление роста культуры, чем только добавление ПЭГ-300, через одно и то же время после начала ферментационного процесса (Таблица 7, Рисунок 46). Этот на первый взгляд парадоксальный эффект может быть связан с различной природой добавляемых веществ. Так, ВК как карбоновая кислота является источником углерода и может быть вовлечена помимо биосинтеза сополимера ПОБВ и в другие метаболические процессы, например, в пути генерации энергии или синтеза других биомолекул (Рисунок 40), тогда как ПЭГ едва ли может быть использован в каких-либо значимых путях метаболизма в бактериальной клетке. Поэтому под давлением ингибирующего влияния ПЭГ на метаболизм бактериальной клетке добавление ВК могло частично восстановить урожай биомассы и продукцию полимера, поскольку 20 мМ ВК, добавленный в культуральную среду на 12 час. ферментации, вероятно, используется для синтеза сополимера лишь в совсем небольшом количестве, тогда как столь значительное его содержание в среде может быть солидной прибавкой к 50 мМ сахарозы именно в качестве основного источника углерода и энергии. Однако, в отсутствии ингибирующего влияния ПЭГ этот эффект может не проявляться и, напротив, уже превалирует ингибирующий эффект самой ВК на рост штамма-продуцента и биосинтез им полимера (Bonartsev et al., 2016а).

Интересен эффект, который оказывал на синтез ПОБ добавление в культуральную среду другого синтетического полимера – полипропиленгликоля. Оказалось, что его добавление не приводит к синтезу сополимера ПОБ с ППГ, как в случае с ПЭГ (Bonartsev et al., 2017), а приводит только к снижению ММ синтезируемого ПОБ, в результате чего его можно использовать в качестве регулятора ММ ПОБ и его сополимеров (Simon-Colin et al., 2009). Вероятно, такой эффект связан с тем, что ПОА-полимераза не может использовать ППГ (в

отличие от ПЭГ) в качестве субстрата для ковалентной сшивки с карбоксильным концом полимерной цепи ПОБ (Bernd et al., 2001; Wodzinska et al., 1996).

Однако полимер с ММ менее 100 кДа с помощью биосинтеза нельзя получить даже при использовании вышеописанных методов добавления различных веществ. Прежде всего, это связано с тем, что сильное снижение ММ такими способами сопровождается также и резким подавлением синтеза полимера и продукции биомассы. Поэтому для дальнейшего снижения ММ полимера используют методы полимерной химии. Наиболее эффективным из этих методов является кислый гидролиз ПОБ и его сополимеров, которые являются полиэфирами (Yu and Marchessault, 2000).

Добавление в культуральную среду карбоновых кислот также вызывает изменение морфологии бактериальных клеток. Для лучшего понимания этого эффекта необходимо сначала кратко описать морфологические особенности культуры *A. chroococcum* (Рисунок 42). Для *A. chroococcum* характерна высокая склонность к плеоморфизму клеток, клетки бактерий этого вида могут существовать в различных морфологических формах, таких как, например, гигантские раздутые клетки. Было показано, что появление морфологически различающихся форм культур *Azotobacter* зависят от состава культуральной среды. Изменение состава среды и условий культивирования может приводить к изменению фаз развития и морфологии клеток бактерий *Azotobacter* (Eisenstark et al., 1950; Vela and Rosenthal, 1972). На ранних стадиях созревания размер клеток варьирует в пределах 2,0 – 7,0 мкм × 1,0 – 2,5 мкм (Рисунок 42 А, Г). В отдельных случаях длина клеток достигает 10-12 мкм. Размножение происходит простым делением с образованием поперечных перегородок, а иногда наблюдается сужение. Молодые клетки *Azotobacter* подвижны и обладают жгутиками. В молодых бактериальных клетках цитоплазма мелкозернистая. В ходе своего роста клетки теряют свою подвижность, укорачиваются, и становятся по своей форме почти кокковидными, в цитоплазме появляются зерна, которые резко преломляют свет при наблюдении под световым микроскопом (Рисунок 42 Б, Д). В особых условиях биосинтеза и накопления полимера гранулы, содержащие ПОБ или его сополимеры могут занимать большую часть цитоплазмы (для штамма-продуцента *A. chroococcum* 7Б – до 85%), а клеточные органеллы и биоструктуры вытесняются в тонкий периферийный слой цитоплазмы, примыкающий к клеточной мембране (Рисунок 42 В, Е).

В связи с отмеченной выше высокой склонности клеток *A. chroococcum* к плеоморфизму влияние карбоновых кислот и производных ПЭГ на морфологию клеток проявляется довольно четко (Рисунок 54).

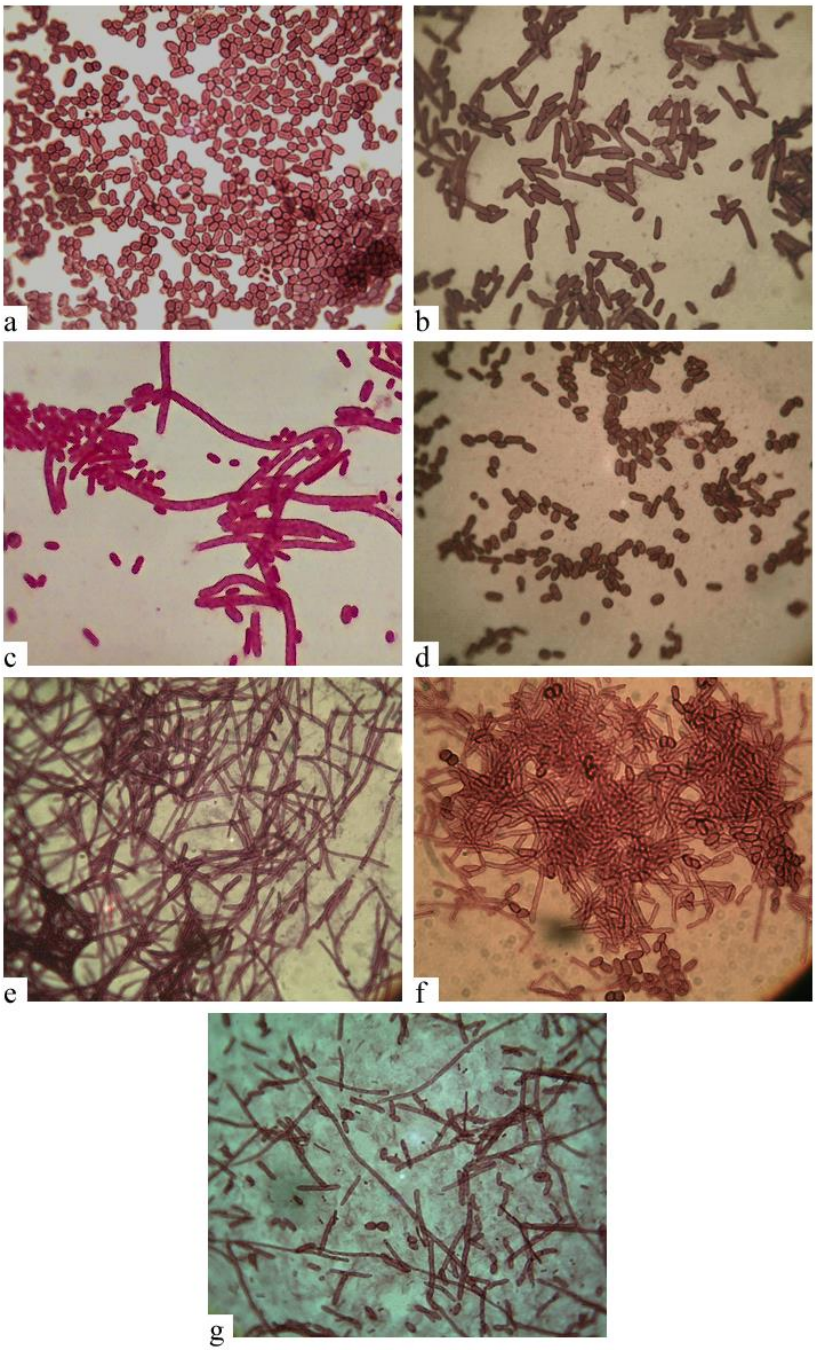


Рисунок 54. *Влияние карбоновых кислот и ПЭГ, добавленных в культуральную среду, на морфологию бактериальных клеток штамма-продуцента A. chroococcum 7Б (световая микроскопия, × 900): (A) сахароза + 5 мМ ВК (добавка через 12 час. после начала ферментации), на 72-ой час; (Б) сахароза + 35 мМ ВК (добавка через 12 час.), на 72-ой час; (c) сахароза + 20 мМ октановой кислоты (добавка через 12 час.), на 72-ой час; (d) сахароза + 20 мМ 4МВК (добавка через 12 час.), на 72-ой час; (e) сахароза + 150 мМ ПЭГ 300 (добавка сразу), на 72-ой час; (f) сахароза + 150 мМ ПЭГ 300 (добавка через 12 час.), на 72-ой час; (g) сахароза + 20 мМ ВК (добавка через 12 час.) + 150 мМ ПЭГ 300 (добавка через 18 час.), на 72-ой час.*

Так, если при добавлении низких концентраций (5 мМ) валериановой кислоты морфология клеток почти не изменялась, тогда как добавление ВК в относительно высоких концентрациях (20 мМ) приводило к выраженному изменению клеточной морфологии – коккоидные клетки (Рисунок 54 А) трансформировались в бациллярные формы (Рисунок 54 Б). Добавление 20 мМ ОК приводило даже к возникновению нитеобразных клеток, хотя коккоидные и бациллярные формы также присутствовали (Рисунок 54 В). Добавление ПЭГ в среду приводило к появлению длинных нитевидных клеток (Рисунок 54 Е) или смеси клеток с различной морфологией: нитевидных и коккообразных (Рисунок 54 Д, Е, Ж). Такое действие на морфологию бактериальных клеток карбоновых кислот и производных ПЭГ подобно хорошо известному эффекту различных стресс-индуцирующих веществ (кислот, щелочей, пептона) на форму клеток (Eisenstark et al., 1950; Vela and Rosenthal, 1972).

Однако для целей настоящего исследования требуется получение ПОБ с ММ значительно ниже 100 кДа, который биотехнологическим путем получить не представляется возможным. С этой целью нами был разработан химический метод снижения ММ ПОБ и его сополимеров. Для снижения ММ был использован гидролиз соляной кислотой раствора полимера в хлороформе. На Рисунке 55 показан процесс постепенного снижения ММ ПОБ с ММ = 255 кДа в ходе его гидролиза соляной кислотой в течение 75-ти часов.

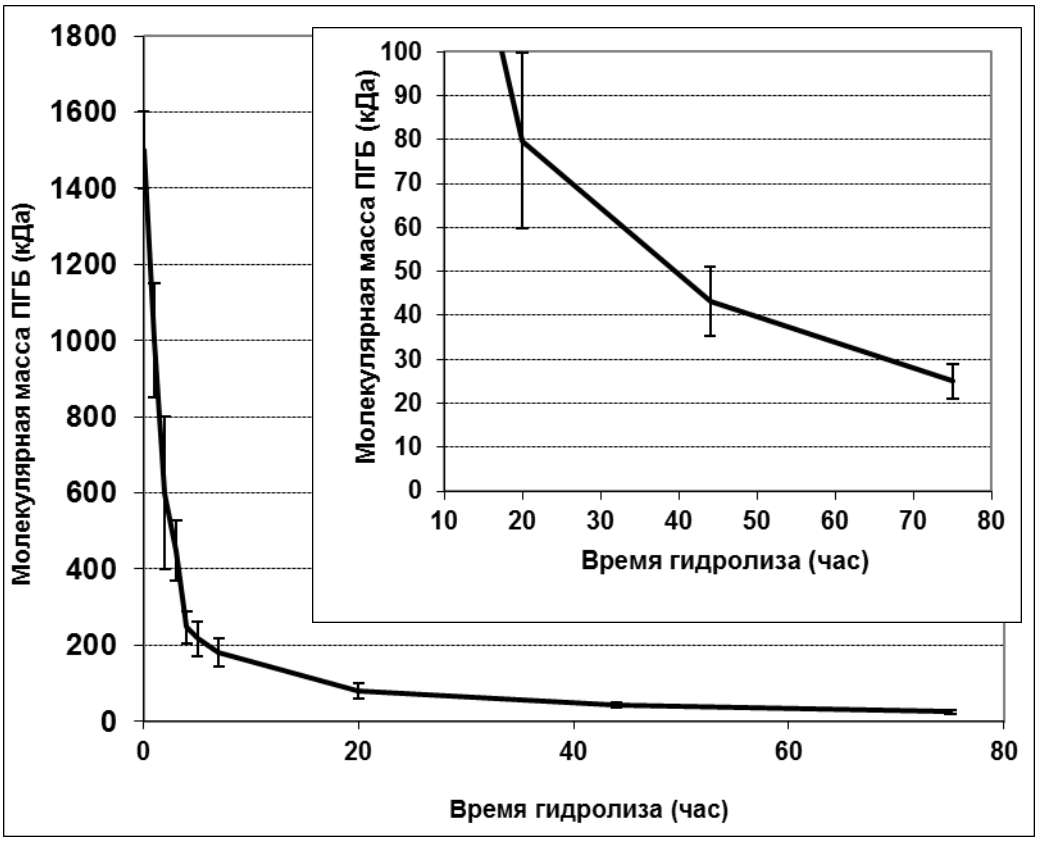


Рисунок 55. *Снижение ММ ПОБ в ходе кислотного гидролиза в растворе хлороформа (начальный участок времени процесса показан на отдельной вкладке).*

Гидролиз был завершен путем нейтрализации хлороформного раствора полимера гидроксидом натрия. Наблюдаемая нами высокая скорость снижения ММ ПОБ с вязана с тем, что в растворе сложноэфирные связи полимера находятся в открытом состоянии, а не упакованы в кристаллические структуры как в твердом состоянии (Zhuikov et al., 2020). С помощью этого метода были получены низкомолекулярные ПОБ с ММ = 25 кДа или ПОБ-25 и с ММ = 6 кДа или ПОБ-6, которые затем были использованы для изготовления полимерных микрочастиц.

Методом ИК-спектроскопии было показано, что у более низкомолекулярного ПОБ увеличивается число карбоксильных концевых групп (проявление полосы с максимумом при 3240 $см^{-1}$), что может вызывать увеличение гидрофильности полимера (Рисунок 56). Действительно, расчет интенсивности сигнала при 3240 $см^{-1}$ показал, что у низкомолекулярного ПОБ-25 она составляет 1,21 усл.ед., что значительно выше, чем у ПОБ со средней ММ = 255 кДа – 0,87 усл.ед.

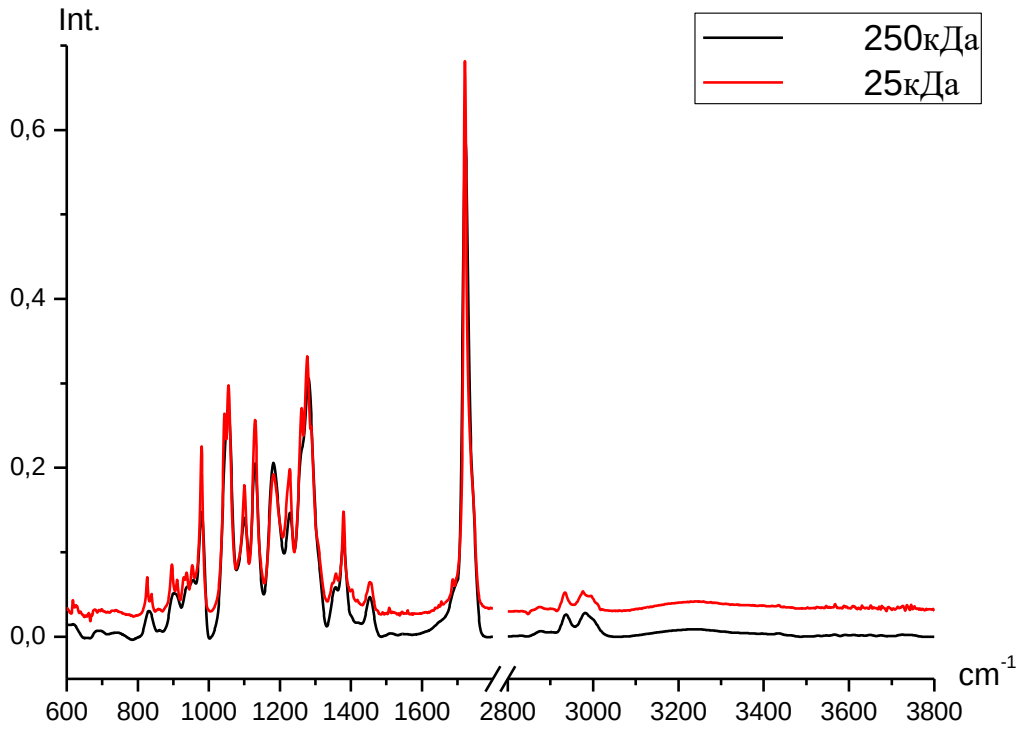


***Рисунок 55**. Сравнение ИК-спектров образцов ПОБ разной ММ (Совместно с проф. ИНХС РАН Бондаренко Г.Н. и на оборудовании Института).*

Таким образом, нами была разработана экспериментальная модель контролируемого биосинтеза ПОБ и его сополимеров с заданным мономерным составом и молекулярной массой, что позволяет получать полимерные материалы с достаточно широким спектром физико-

химических свойств, т.е. это биотехнологическая модель регуляции надмолекулярной структуры и физико-химических свойств природных биополимеров. Экспериментальная модель была разработана на основе технологии контролируемого биосинтеза ПОБ и его сополимеров штаммом-продуцентом *Azotobacter chroococcum* 7Б при применении подхода добавления в культуральную среду предшественников мономеров новых сополимеров ПОБ и регуляторов его ММ. Метод позволяет регулировать молекулярную массу синтезируемых полимеров (от $0{,}11\times10^6$ до $1{,}63\times10^6$ Да), получать сополимеры ПОБВ с различным молярным содержанием 3-оксивалерата (от 2,5 до 21,3 моль%) с заданной молекулярной массой (от $0{,}17\times10^6$ до $1{,}42\times10^6$ Да) и сополимеры с 3-окси-4-метилвалератом. Разработана модификация метода – синтез сополимеров ПОБ с синтетическими ди-, три- и полиэтиленгликолями – биоПЭГилирование, в результате чего получены новые ди-блок сополимеры ПОБ: ПОБ-ДЭГ, ПОБ-ТЭГ, ПОБ-ПЭГ 200, ПОБ-ПЭГ 300, ПОБВ-ПЭГ 300; максимальное содержание полиэтиленгликоля было в ПОБ-ПЭГ 300 и составляло 0,33 моль%. Было также показано, что использование дополнительных источников углерода, карбоновых кислот и производных ЭГ, вызывало ингибирование роста клеток, снижение выхода полимера, падение молекулярной массы полимера, уменьшение содержания 3-гидроксивалерата в полученном сополимере ПОБВ-ПЭГ и изменение морфологии бактериальных клеток, что зависело от природы полученного сополимера, природы добавляемого в культуральную среду предшественника (карбоновых кислот или производных ПЭГ) и времени их добавления. Наблюдаемые зависимости могут быть связаны с различными ролями, которые карбоновые кислоты и производные ЭГ играют в метаболизме бактериальной клетки (Bonartsev et al., 2013а; Bonartsev et al., 2013б; Bonartsev et al., 2016а). Разработан метод выделения ПОБ и его сополимеров из бактериальной биомассы и его очистки, позволяющий получать полимеры химической чистоты до 99,5% (вес.). Разработка этой модели позволила получить экспериментальную серию полимеров (19 партий) с различным мономерным составом и молекулярной массой для всех других экспериментальных моделей системы и позволяет при необходимости получать полимеры с заданными характеристиками для последующих исследований. Разработанный нами биосинтез ПОБ и его сополимеров лежит в основе данной работы и позволяет провести все прочие исследования. Общая схема экспериментальной модели биотехнологического получения ПОБ и его сополимеров, разработанной нами на основании результатов, изложенных в Разделе 3.1, представлена на Рисунке 56.

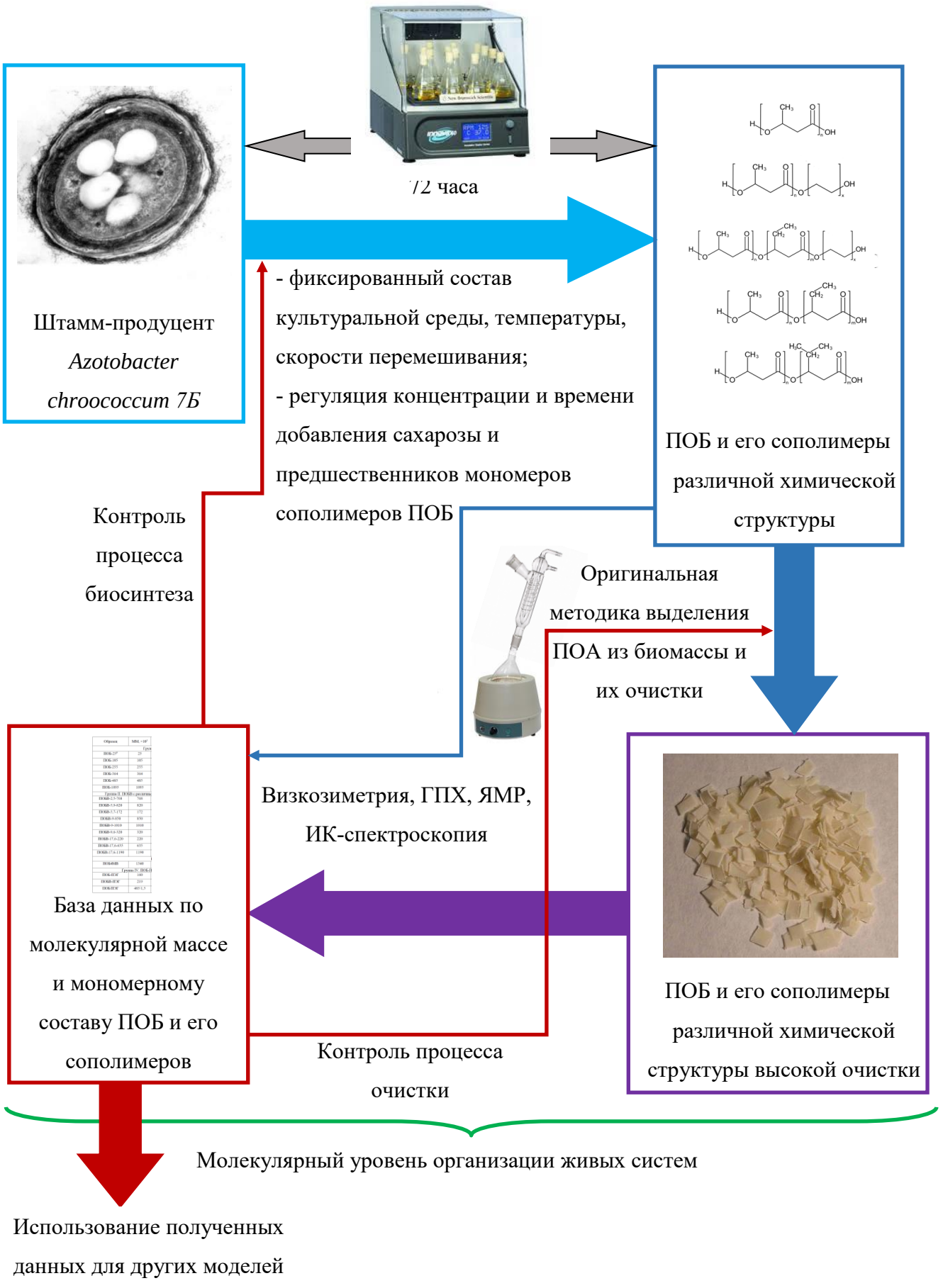


Рисунок 56. *Схема экспериментальной модели биотехнологического получения ПОБ и его сополимеров.*

Согласно представленной схемы основным экспериментальным инструментом и объектом модели является штамм-продуцент *A. chroococcum 7Б*. Основными входными параметрами модели являются концентрации сахарозы и дополнительных веществ (АН, солей карбоновых кислот, производных ЭГ) в культуральной среде. Основными выходными параметрами модели являются молекулярная масса синтезируемых полимеров и содержание мономеров в полимерной цепи. Соответственно, используемые методики – это методы биотехнологического получения полимеров, методы определения их молекулярной массы и мономерного состава: культивирование штамма-продуцента, биосинтез полимеров, выделение и очистка, ЯМР, ГПХ, вискозиметрия. Уровень происходящих процессов с точки зрения организации живого – молекулярный, т.к. происходит ферментативное превращение карбоновых кислот в их 3-гидроксипроизводные, а также образование связей между остатками 3-гидроксибутирата и остатков этих 3-гидроксикарбоновых кислот или производных этиленгликоля (которые не претерпевают до этого химическое превращение). Временной масштаб экспериментальной модели составляет 72 часа. Основная задача экспериментальной модели – получение партий ПОБ и его сополимеров с заданным мономерным составом и молекулярной массой для проведения всех последующих экспериментальных исследований. Моделируемый идеальный биообъект модели - запасающие биополимеры бактерий с расширенным спектром химического строения.

Результаты разработки вышеописанной экспериментальной модели биосинтеза сополимеров ПОБ приведены в следующих публикациях (Мышкина и др., 2008; Мышкина и др., 2010; Bonartsev et al., 2013а; Bonartsev et al., 2013б; Bonartsev et al., 2016а; Бонарцев и др., 2016; Bonartsev et al., 2017).

Раздел 3.2. Исследование микро- и ультраструктуры поли-3-оксибутирата и его сополимеров

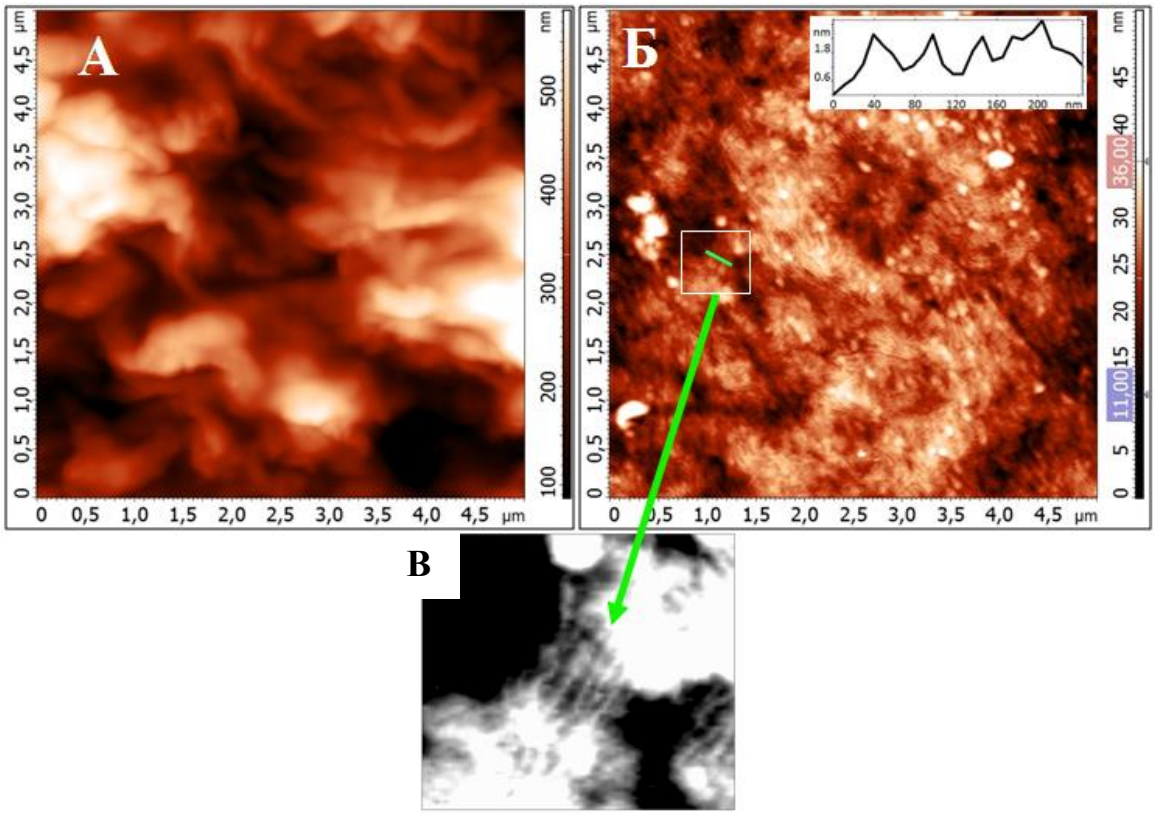
3.2.1. Исследование морфологии поверхности макроскопических пленок

На первом этапе нами были получены макроскопические пленки из ПОБ и исследована морфология их поверхности. Пленки были получены высаживанием из раствора в хлороформе на стеклянной поверхностью, поэтому после высаживания полимерной пленки, одна ее сторона прилегала к стеклу, а другая высыхала при контакте с воздухом. С этим связано различие в параметре шероховатости этих двух сторон макроскопической пленки из ПОБ. При использовании ПОБ с ММ = 355 кДа средняя шероховатость (R_a) поверхности пленки, прилежащей к стеклу, составила 6 ±1 нм, а средняя шероховатость поверхности, обращенной к воздуху составила 92 ±3 нм. Такое различие в шероховатости поверхности макроскопических пленок, приготовленных путем высаживания из раствора на гладкой поверхности, описано и в других работах, например, для пленок из поливинилового спирта (Jayasekara et al., 2004).

На Рисунке 57А видно, что поверхность, кристаллизующаяся на воздухе, имеет шероховатую структуру с многочисленными порами, глубиной 500-700 нм. Поверхность покрыта переплетающимися выступами шириной 200-400 нм и длиной 1-2,5 мкм, которые, возможно представляют собой кристаллические области. Как показано на изображении Рисунке 57Б, противоположная сторона пленки, которая контактировала со стеклом, характеризуется незначительной текстурностью и мелкими порами (размером до 100 нм). При большем увеличении в некоторых местах также видны стеки кристаллитов полимера с шириной около 100 нм и длиной 500-800 нм. Анализ шероховатости различных поверхностей одной и той же пленки показывает, что средняя и среднеквадратичная шероховатости поверхностей пленки, обращенных к воздуху и стеклу, отличаются почти на порядок.

По-видимому, различия характеристик поверхностей связаны с условиями десорбции растворителя во время его испарения при высаживании пленки из раствора полимера на стеклянную поверхность. Во время испарения хлороформа с открытой поверхности потоки растворителя формируют дополнительные каналы (т. е. поры), которые остаются после затвердевания и кристаллизации пленки. В то же время, морфология ПОБ на противоположной поверхности гораздо менее подвержена воздействию транспорта растворителя и преимущественно обусловлена поверхностной энергетикой (поверхностным натяжением) на границе стекло-полимер и зависит от условий их взаимодействия (Босхомджиев и др., 2009). Соответственно, морфология, размер пор и шероховатость поверхности, обращенной к воздуху, определяются в основном условиями испарения растворителя, такими как температура,

скорость испарения хлороформа, скоростью формирования кристаллических областей, препятствующих диффузии хлороформа в полимере. Напротив, при фиксированном химическом составе стеклянной подложки и неизменном химическом составе полимера энергетика поверхности стекло-полимер будет менее зависима от вышеприведенных факторов. Таким образом, морфология обращенной к стеклу «гладкой» стороны пленки в большей степени отражает структурные изменения, происходящие с полимером на наноразмерном уровне, и зависящие от его физико-химических свойств.



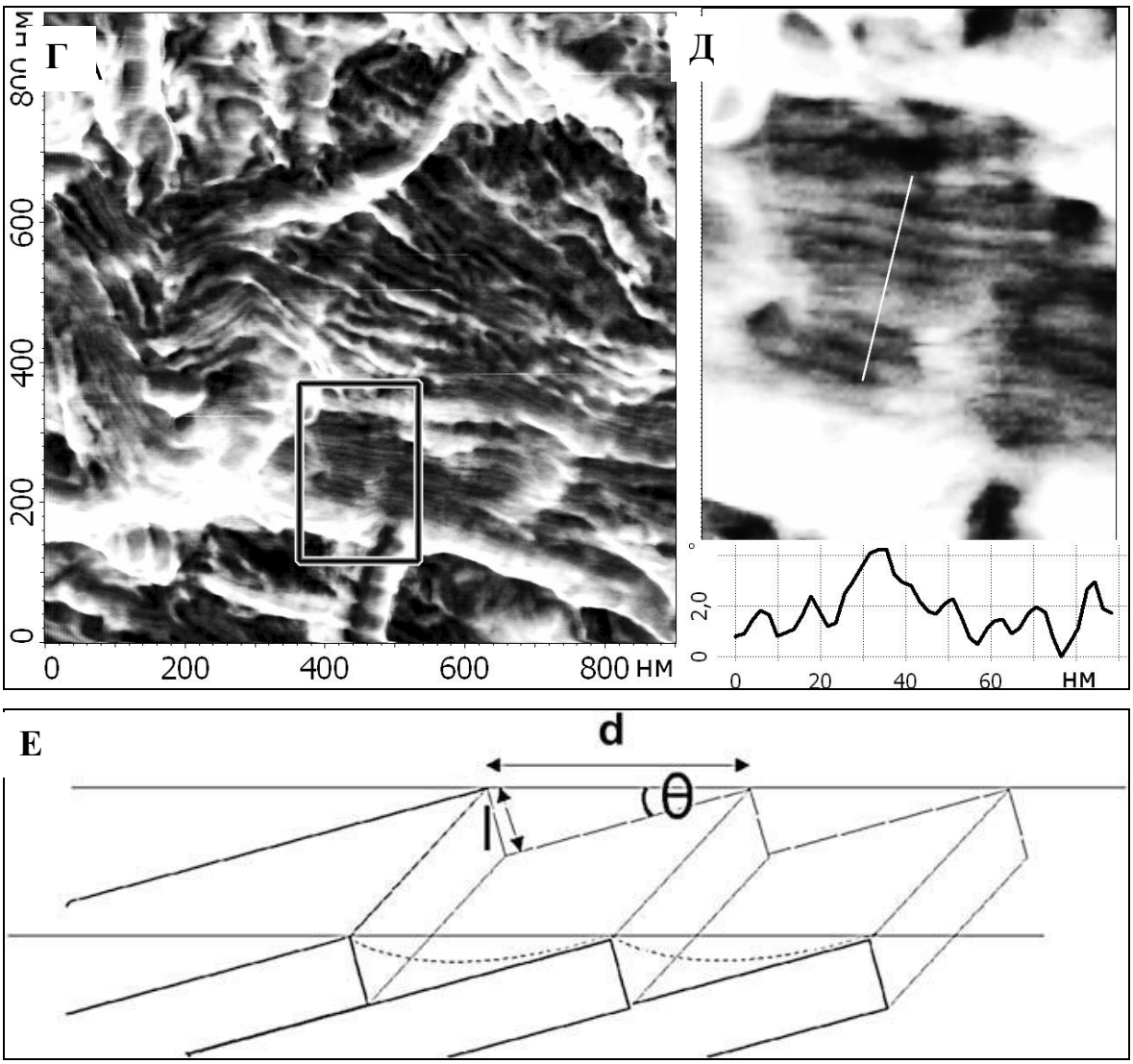


Рисунок 57. *Изображения атомно-силовой микроскопии поверхностей пленки ПОБ (ММ = 355 кДа), обращенных к воздуху (А) и стеклу (Б), соответственно. На изображении Б выделен участок стопки ламелей, через который проведена зеленая линия, а внизу показан график сечения по этой линии (В). Черно-белое изображение в фазовом контрасте пленки ПОБ также с выявленным участком стопки ламелей (Г), через который проведена линия и представлен график сечения по этой линии (Д). Схема расположения ламелей под углом θ к поверхности (Farrance et al., 2009) (Е). (Совместно с научной группой в.н.с. кафедры биоинженерии Багрова Д.М.).*

На Рисунке 57Б представлено изображение стопки ламелей. Они выглядят как параллельные полосы шириной от 11 до 40 нм. Особенно хорошо стопки ламелей выявляются на изображениях АСМ в фазовом контрасте (Рисунок 57Г), что может объясняться разницей в механических свойствах ламелей и окружающего их полимерного материала. В статье (Capitan, 2004) толщина ламелей, измеренная малоугловым рентгеновским рассеиванием в аналогичных

пленках ПОБ, равна 6,4 нм. Это различие в толщине ламелей, можно объяснить тем, что плоскости ламелей могут располагаться под различными углами к поверхности пленки (Рисунок 57Е). На Рисунке 57Б помимо ламелей можно также увидеть и округлые образования шириной 86±9 и высотой 11±2 нм, которые являются по-видимому дефектами формирования полимера на стекле.

Как видно из изображений АСМ на Рисунке 58 структура поверхности макроскопических пленок ПОБ и его сополимеров ПОБВ и ПОБ-ПЭГ не имеет существенных видимых различий, но расчет средней шероховатости показал, что этот показатель для поверхности пленки, обращенной к воздуху, был значительно снижен у сополимеров ПОБ, ПОБВ и ПОБ-ПЭГ по сравнению с ПОБ. А вот у композита ПОБ/ПЭГ были значительно повышены значения средней шероховатости для обеих сторон пленок (Таблица 8).

Таблица 8. *Значения средней шероховатости для двух разных поверхностей макроскопических пленок из ПОБ и его сополимеров.*

Полимеры	Поверхность пленки, обращенная к стеклу, (R_a, нм ±SD)	Поверхность пленки, обращенная к воздуху (R_a, нм ±SD)	Средний размер пор на поверхности пленки, обращенной к стеклу (μм ±SD)
ПОБ-355	6,0 ±1,0	92 ±3	0,9 ±0,3
ПОБВ-9	9,4 ±1,5	93 ±21	0,8 ±0,3
ПОБ-ПЭГ	6,6 ±1,4	114 ±23	0,7 ±0,3
ПОБ/ПЭГ	53,5 ±6,3	185 ±31	0,7 ±0,2

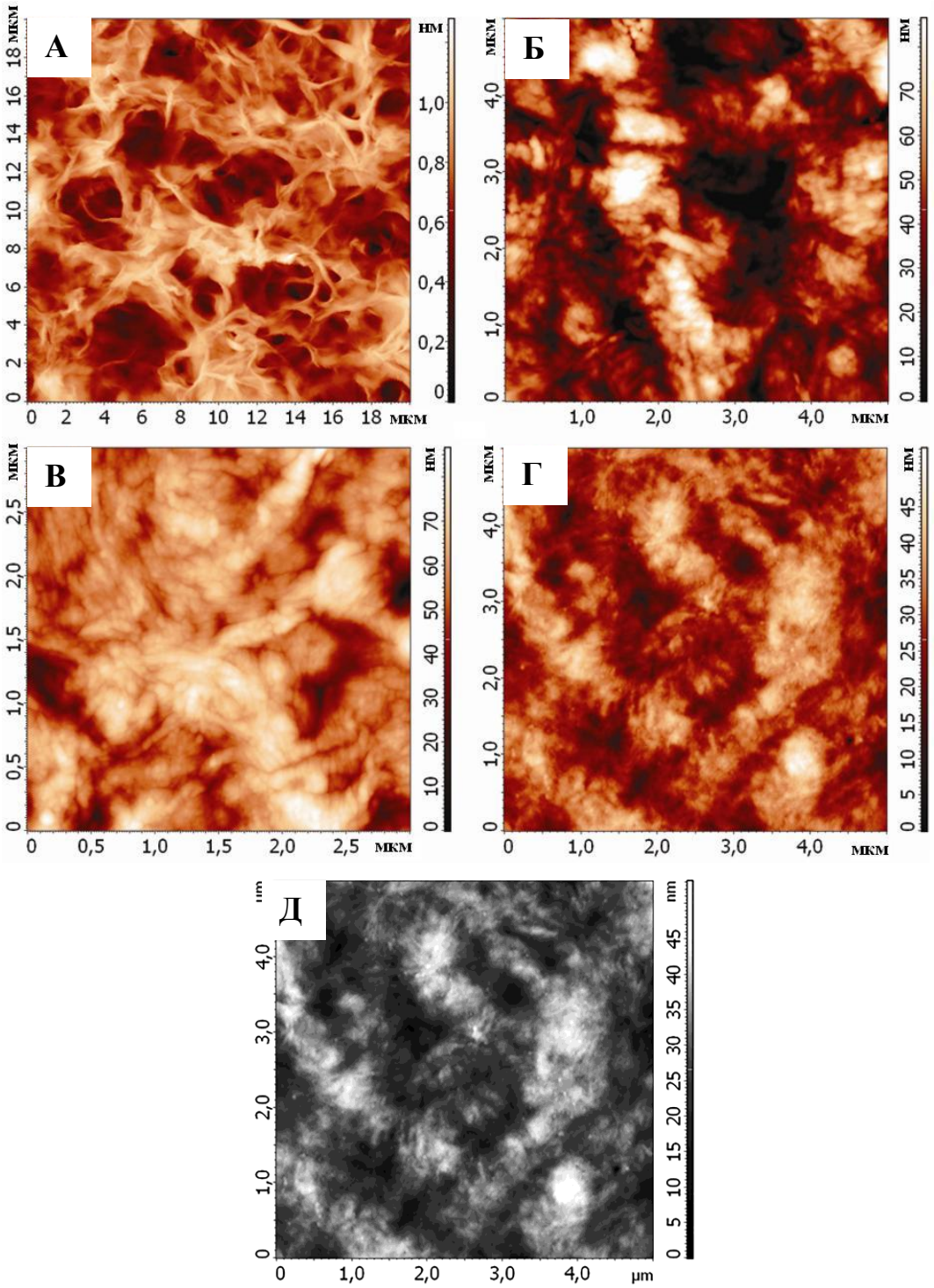


Рисунок 58. *Изображения АСМ поверхностей пленок из ПОБ и его сополимеров: пленка из ПОБ, поверхность, обращенная к воздуху (А), пленка из ПОБ, поверхность, обращенная к стеклу (Б), пленка из ПОБВ, поверхность, обращенная к стеклу (В), пленка из ПОБ-ПЭГ, поверхность, обращенная к стеклу (Г), пленка из композита ПОБ/ПЭГ, поверхность, обращенная к стеклу (Д). (Выполнено совместно с научной группой в.н.с. кафедры биоинженерии Багрова Д.М.)*

Вероятно, эти различия связаны с тем, что супрамолекулярная структура ПОБ и его сополимеров зависит от их физико-химических свойств. В дальнейшем это различие в ультраструктуре полимеров будет более подробно исследовано на примере ультратонких пленок из ПОБ и его сополимеров.

2.2. Исследование ультратонких пленок из ПОБ и его сополимеров

Изучение процесса кристаллизации аморфной компоненты ПОА позволит лучше понять структурные различия гомополимера ПОБ и его сополимеров, а также механизм деградации полимеров. Процесс кристаллизации полимеров принято изучать, используя в качестве объектов ультратонкие пленки. Ультратонкие пленки изготавливаются методом спин-коатинга (spin-coating), заключающимся в том, что раствор полимера в маленьком объеме (~50 мкл) наносится на вращающуюся подложку, при этом, происходит быстрое испарение растворителя и полимер переходит в метастабильное состояние.

В качестве подложки для получения ультратонких пленок мы выбрали гладкие сколы слюды именно из-за уникальной способности этого материала формировать атомарно-гладкие участки поверхности. Стекло для этих целей является гораздо худшим материалом, т.к. показано, что стеклянная поверхность замедляет процесс кристаллизации полимеров (Capitan et al., 2004)

Для исследования кристаллических структур с методической точки зрения наибольшее значение имеет количество полимера, наносимого на подложку. Если нанести слишком мало полимера, то на подложки практически ничего не будет видно (Рисунок 59).

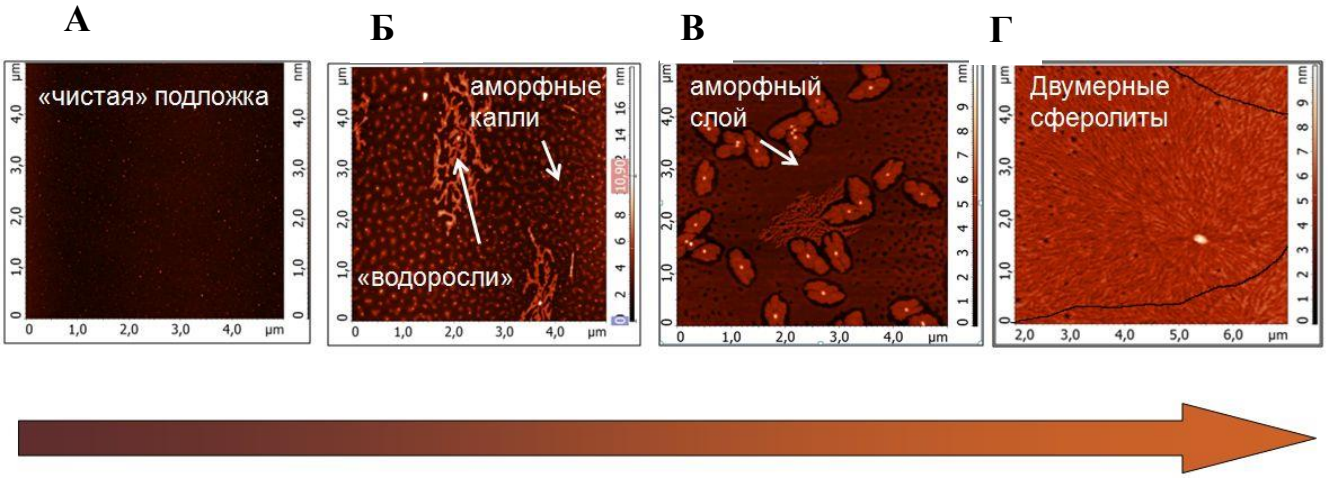


Рисунок 59. *АСМ изображения кристаллических структур ПОБ при повышении концентрации полимера, наносимого на поверхность слюды. (Выполнено совместно с научной группой в.н.с. кафедры биоинженерии Багрова Д.М.).*

Но если нанести полимер в высокой концентрации, то вся подложка будет покрыта полимером, и он будет представлен в основном т.н. двумерными сферолитами (Ramanathan and Darling, 2011), как можно видеть на АСМ изображении на Рисунке 59 Г, где черные линии ограничивают три области двумерных сферолитов и в виде яркой точки виден центр одной из них. Для наших целей в этом эксперименте нам в наибольшей мере интересны изображения на Рисунке 59 Б и В, когда слюдяная поверхность не покрыта еще полностью полимером, в этих условиях можно добиться того, что на подложке будут присутствовать одновременно как кристаллическая фаза, так и аморфная фаза полимера.

Кристаллические структуры в ультратонких пленках представлены двумя основными типами: водорослевоподобной формы и равномерно распределёнными на плоскости сферолитами, т.н. двумерными сферолитами. При примерно одинаковой высоте над поверхностью подложки, равной 4,5 нм основное отличие между этими структурами состоит в том, что для двумерных сферолитов рост кристаллической фазы происходит равномерно во все стороны, а для водорослевых структур – неравномерно (Рисунок 59).

Аморфная фаза также выявляется методом АСМ в ультратонких пленках ПОБ и видна в форме капель, высота которых над слюдяной подложкой примерно одинаковая и не превышает 3 нм (Рисунок 60). Имеется, по-видимому, различие в механических свойствах аморфной и кристаллической компонентами ультратонкой пленки ПОБ, из-за чего в режиме фазового контраста особенно хорошо проявляется разница между двумя этими фазами (Jiang et al., 2003).

Согласно литературным данным те кристаллические структуры, которые мы наблюдаем в ультратонких пленках ПОБ, т.е. водорослевоподобные структуры (в англоязычной терминологии - seaweed-like crystals) и двумерные сферолиты, соответствуют кристаллическим структурам, которые образуются в ультратонких пленках из других полимеров: ПМК, полистирола, полиэтиленоксида (Liu and Chen, 2010).

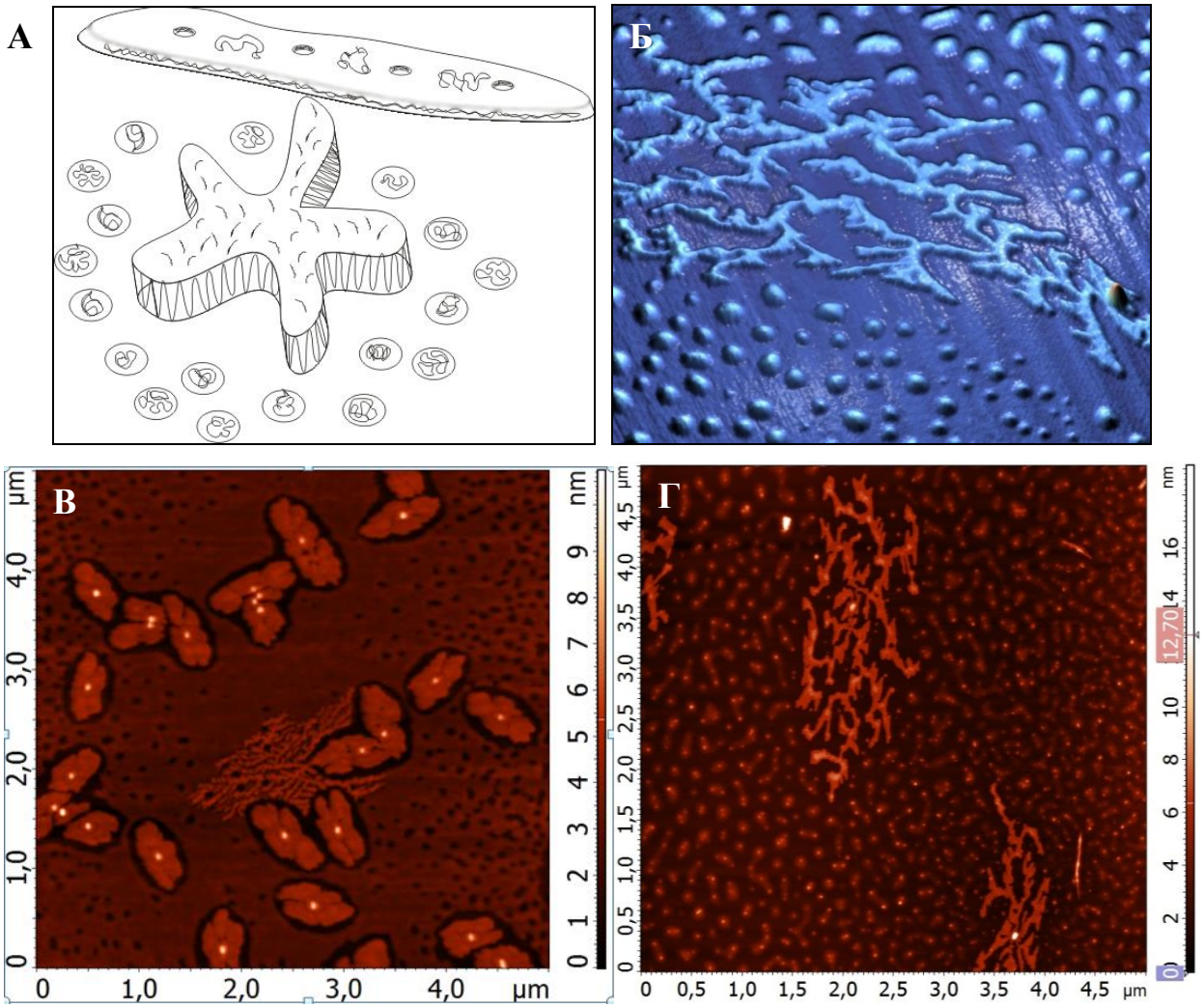


Рисунок 60. *Схематическое изображение кристаллической структуры ПОБ (в центре) и аморфной фазы (в виде капель) (А), фазовое изображение АСМ кристаллической и аморфной фаз полимера на поверхности слюды в ультратонких пленках (Б), изображение АСМ аморфной фазы и двумерных сферолитов с центрами кристаллизации, а также участка растущей водорослевоподобной кристаллической структуры между ними (В), изображение АСМ водорослевоподобной структуры ультратонкой пленки ПОБ (Г). (Выполнено совместно с научной группой в.н.с. кафедры биоинженерии Багрова Д.М.).*

Теперь рассмотрим, как происходит процесс кристаллизации в ультратонких пленках ПОБ. Ранее было показано, что процесс кристаллизации полимера в ультратонких пленках зависит прежде всего от следующих факторов: структуры подложки (Xu et al., 2004) и температуры (Di Lorenzo et al., 2001). Мы наблюдали самопроизвольный процесс кристаллизации при комнатной температуре в ультратонких пленках ПОБ при условии непосредственного контакта кристаллической и аморфной фаз (Рисунок 61).

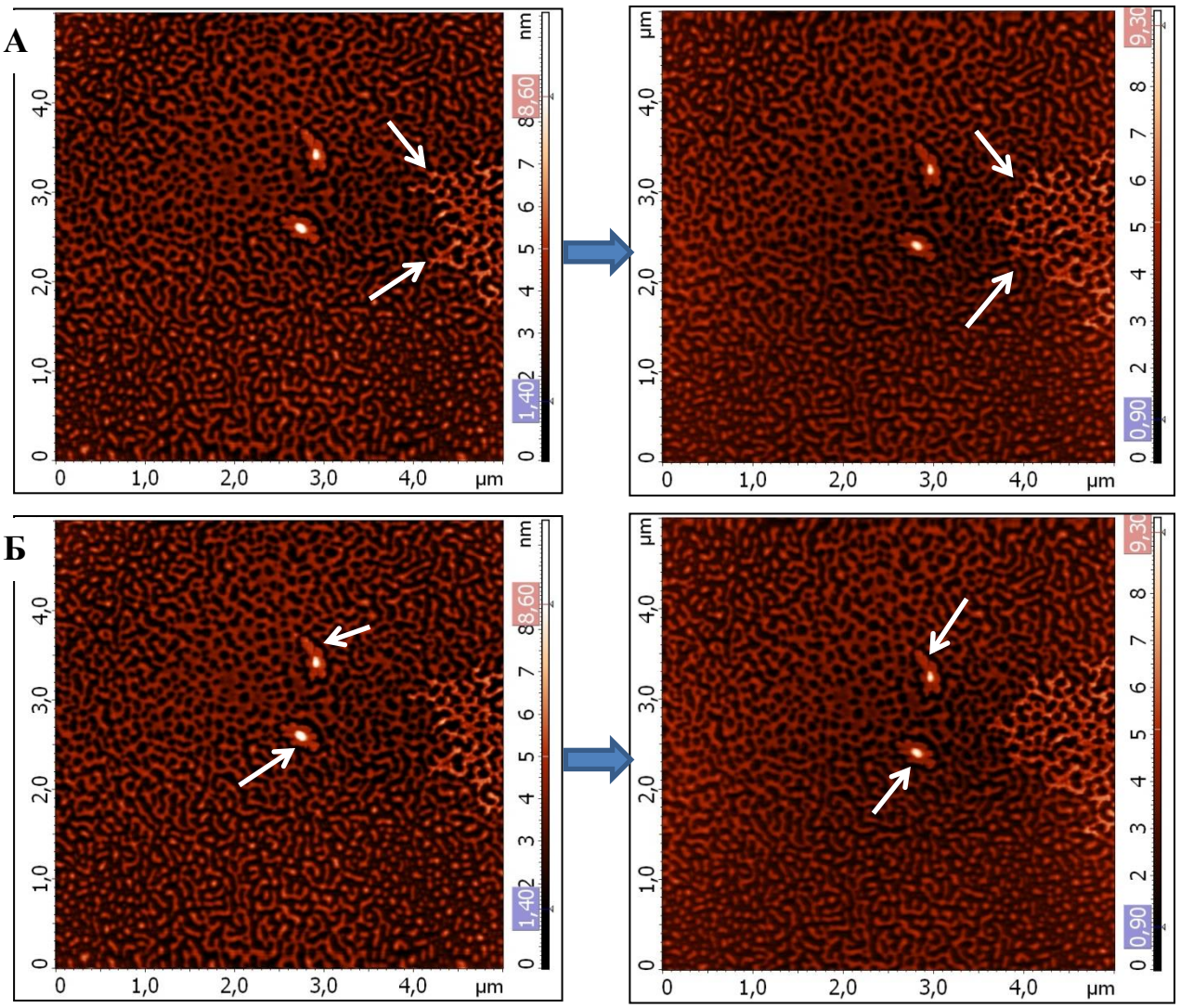


Рисунок 61. *Топографическое изображение АСМ ультратонкой пленки ПОБ на слюде: формирование кристаллических структур, стрелками показана граница фронта их роста (А); показано отсутствие формирования кристаллических структур на подложке только с аморфной фазой, без контакта с кристаллической, показано стрелками (Б). (Выполнено совместно с научной группой в.н.с. кафедры биоинженерии Багрова Д.М.).*

Рассчитанная нами скорость кристаллизации при комнатной температуре составила 1 ±0,1 нм/сек, что равно скорости кристаллизации в ультратонких пленках сополимера ПОБГк, хотя и при температуре 75 °С и на стеклянной поверхности (Xu et al., 2004).

Давайте теперь рассмотрим процесс кристаллизации в ультратонких пленках ПОБ более подробно. На Рисунке 62 показано изображением АСМ ультратонкой пленки ПОБ, в которой присутствует как водорослеподобная кристаллическая структура в центре, так и аморфная фаза в виде множества капель.

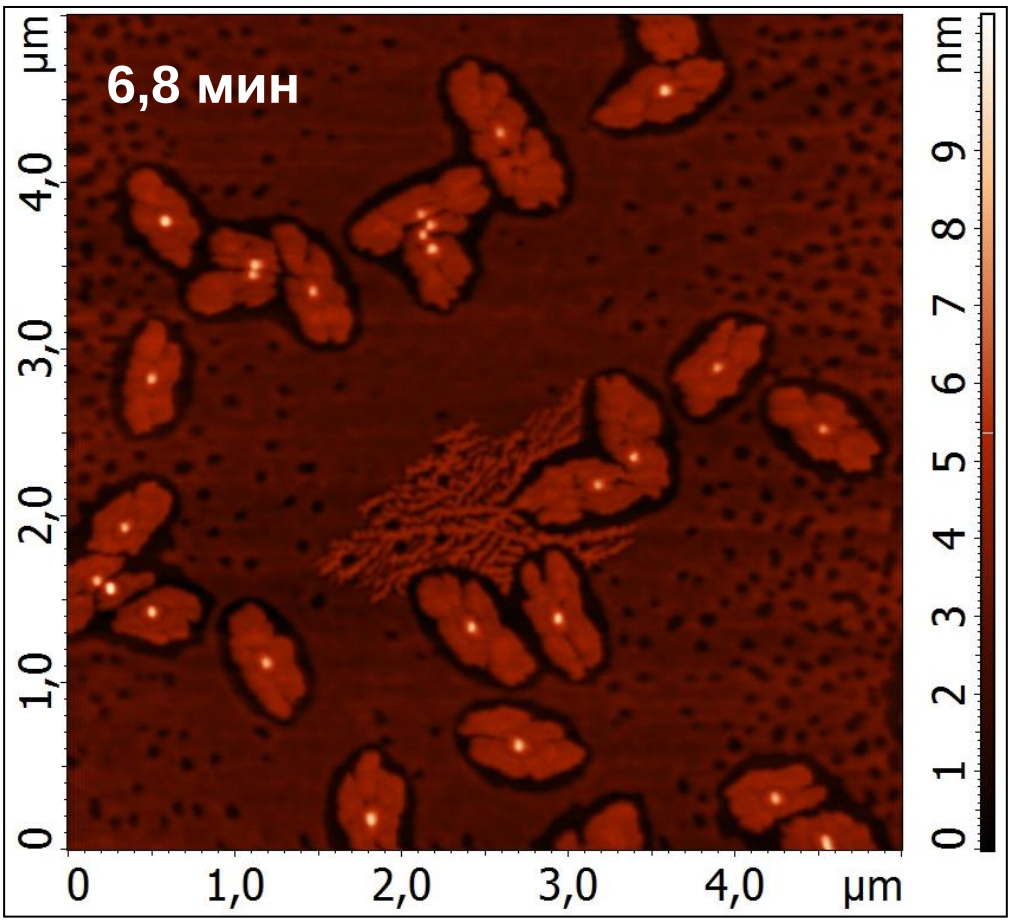


Рисунок 62. *Процесс кристаллизации в ультратонкой пленке ПОБ, представленной аморфной фазой в виде сплошного слоя капель, начальная стадия (6,8 мин), изображения АСМ. (Выполнено совместно с научной группой в.н.с. кафедры биоинженерии Багрова Д.М.).*

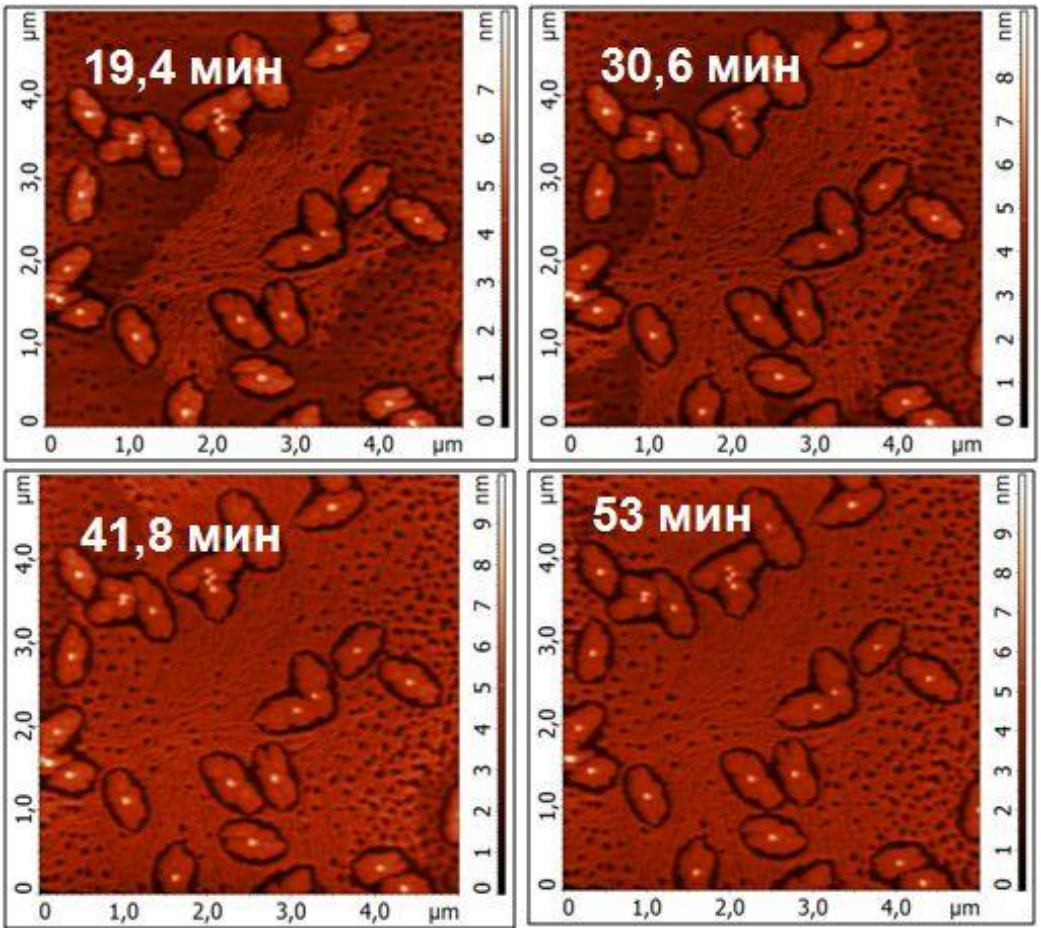


Рисунок 63. *Процесс кристаллизации в ультратонкой пленке ПОБ, представленной аморфной фазой в виде сплошного слоя капель во времени (значения времени приведены в правом верхнем углу каждого изображения) при комнатной температуре, изображения АСМ. (Выполнено совместно с научной группой в.н.с. кафедры биоинженерии Багрова Д.М.).*

На Рисунке 63 показано, что весь процесс спонтанной кристаллизации при комнатной температуре занял около 1 часа, рост кристаллических структур начался из центра и распространился по всей поверхности слюды, при этом двумерные сферолиты не выступили в качестве центров кристаллизации, т.к. не имели непосредственного контакта с компонентами (каплями) аморфной фазы.

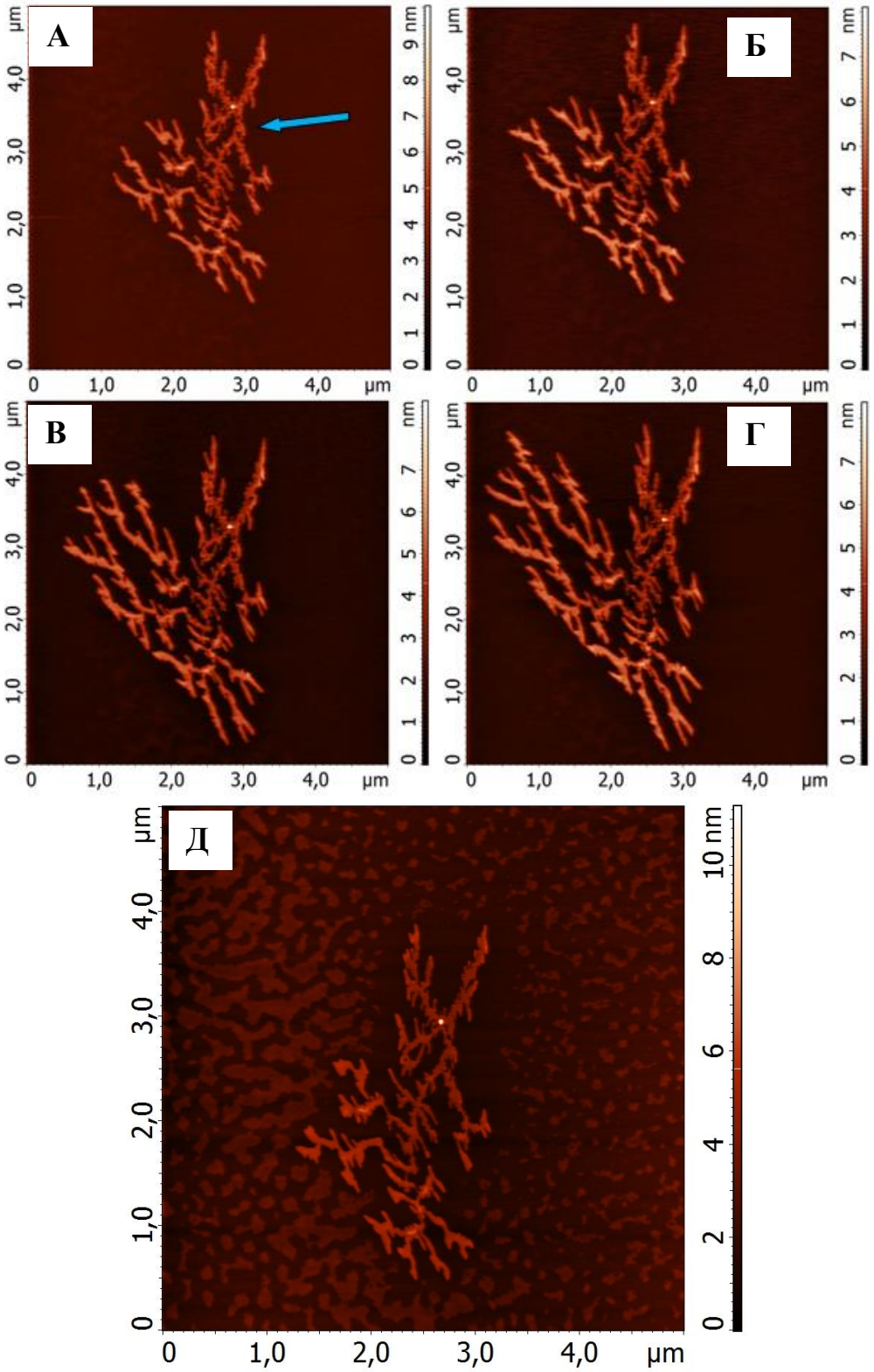
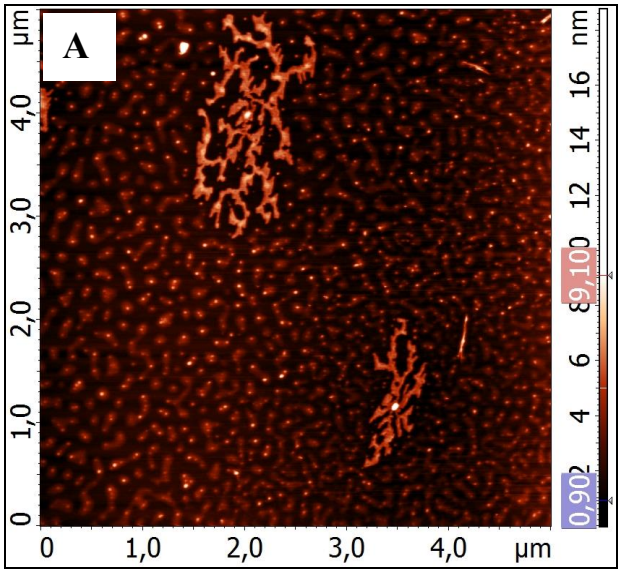


Рисунок 64. *Серия топографических изображений АСМ роста кристаллической структуры в ультратонкой пленке ПОБ на слюде при температуре 85°С: 5,6 мин (А); 17,4 мин (Б); 39,9 мин (В); 56,7 мин (Г); до нагревания (Д). (Выполнено совместно с научной группой в.н.с. кафедры биоинженерии Багрова Д.М.).*

При более высокой температуре (85 °C) появляется возможность наблюдать процесс перехода аморфных структур в кристаллические, условия при этом подбирали эмпирическим путем. Удалось получить серию изображений АСМ с последовательным процессом формирования и роста водорослевоподобной кристаллической структуры из аморфной фазы с течением времени (Рисунки 64 и 65). Видно, что рост кристаллической структуры в ультратонкой пленки происходит в основном в одном направлении, а именно, вверх и влево (Рисунок 64 Б-Д), что вероятно связано с наличием в этой области доступной для кристаллизации аморфной фазы, тогда как в другой области (в правой части изображения), по-видимому, имеется достаточно большое расстояние между краем водорослевоподобной структуры (около 0,4 ±0,1 мкм) и компонентами аморфной фазы, благодаря чему роста в этом направлении не происходит (показано стрелкой на Рисунке 65А). Следует отметить, что высота кристаллических структур даже при росте оставалась постоянной - 4,5 ±0,5 нм, что может свидетельствовать о расположении ламелей параллельно плоскости подложки, что согласно литературным данным типично для многих полимеров в ультратонких пленках (Liu and Chen, 2010). Однако иногда наблюдается явление роста кристаллических структур как бы в высоту, как, например, можно увидеть на Рисунке 65 (отмечено стрелками), процесс роста высоты кристалла происходит со скоростью 0,05 нм/мин, причем одновременно происходит еще и поворот роста кристаллической структуры вбок и продолжение ее формирования уже в этом направлении. Подобное явление изменение ориентации роста кристаллических структур было описано в ультратонких пленках из ПОБГк (Xu et al., 2004).



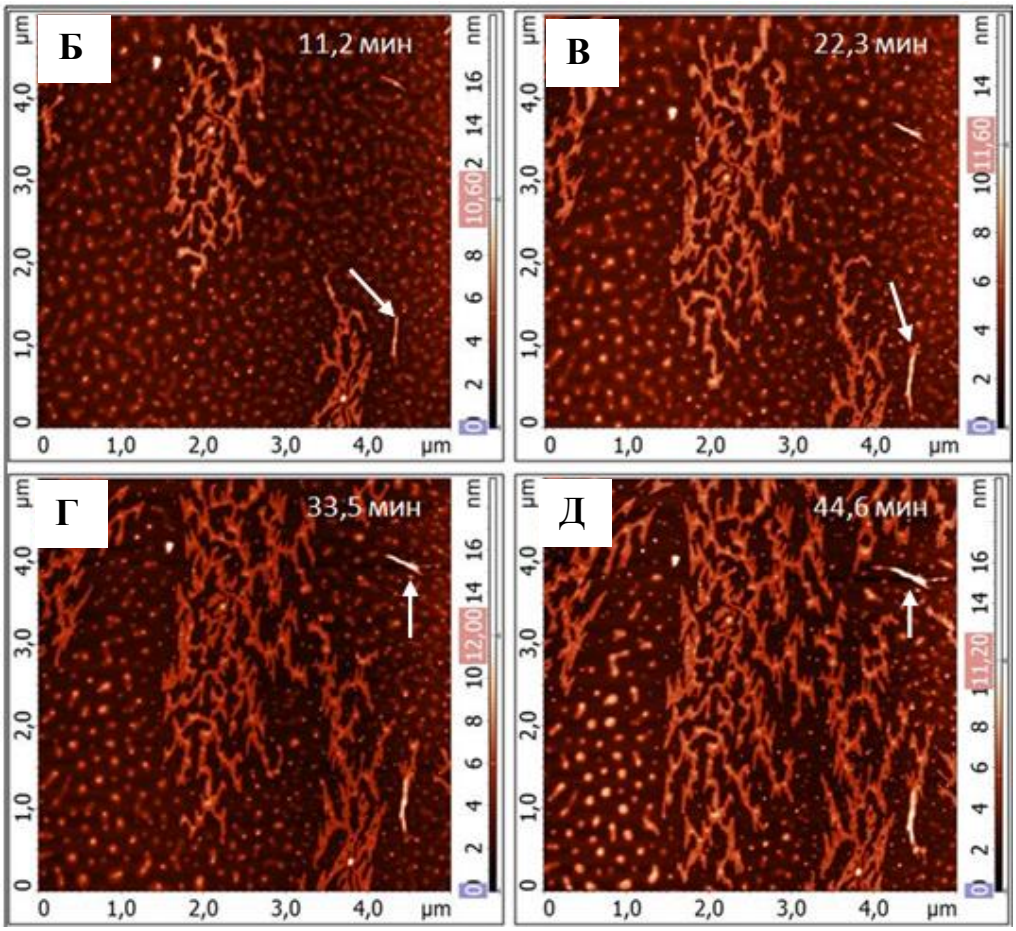


Рисунок 65. *Серия топографических изображений АСМ роста кристаллической структуры в ультратонкой пленке ПОБ на слюде при температуре 85°С: 0 мин (А), 11,2 мин (Б); 22,3 мин (В); 33,5 мин (Г); 44,6 мин (Д). Стрелками указан рост ламели с ориентацией «на ребре» (Выполнено совместно с научной группой в.н.с. кафедры биоинженерии Багрова Д.М.).*

Теперь можно рассмотреть, каким образом происходит формирование кристаллических структур у сополимера ПОБ-ПЭГ, полученного в ходе биотехнологического ПЭГилирования ПОБ. Для сравнения был использован также композит ПОБ/ПЭГ. На изображениях АСМ Рисунка 66 показана структура ультратонких пленок из ПОБ и ПЭГ по отдельности, видно, что они сильно различаются по своей морфологии.

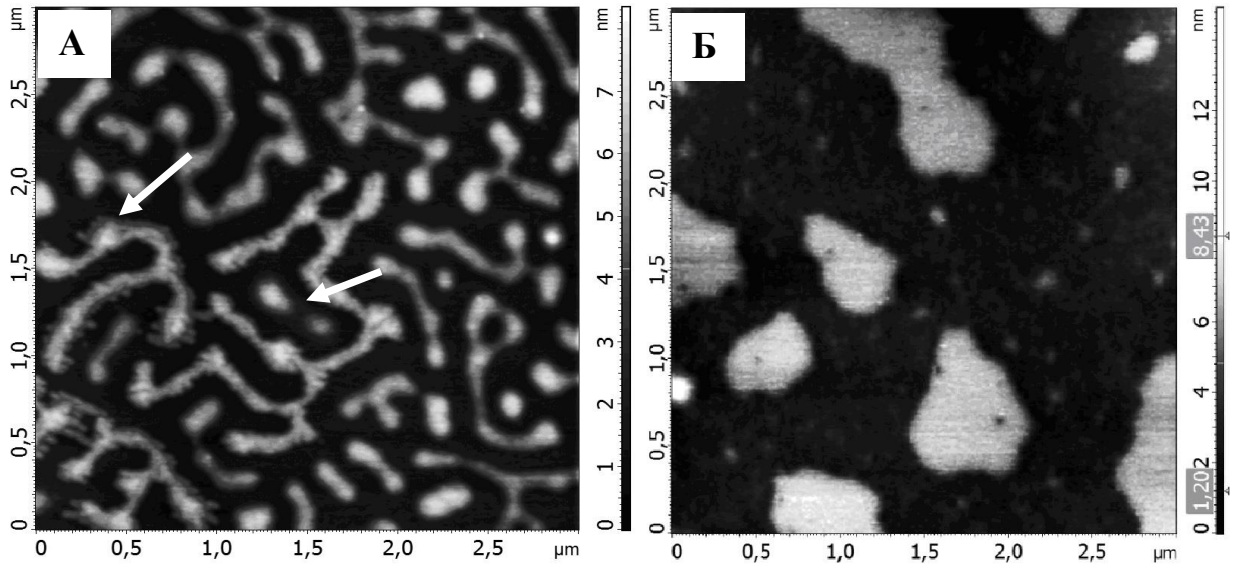


Рисунок 66. *Изображения АСМ ультратонких пленок из ПОБ (А) и ПЭГ (Б) (стрелками показаны кристаллические структуры ПОБ). (Выполнено совместно с научной группой в.н.с. кафедры биоинженерии Багрова Д.М.).*

Видно, что ПОБ формирует аморфные структуры высотой 4,1 ±0,7 нм, а также кристаллические структуры, отмеченные стрелками, тогда как ПЭГ в ультратонких пленках образует только аморфные структуры высотой 4,4 ±0,5 нм. Если же рассматривать изображения ультратонких пленок, то видна существенная разница между морфологией ПОБ, с одной стороны, и его сополимера ПОБ-ПЭГ и композита ПОБ/ПЭГ, с другой стороны. На изображениях ультратонких пленок ПОБ-ПЭГ и ПОБ/ПЭГ видны нитеобразные структуры (Рисунок 67)., которые можно интерпретировать как отдельные ламели, если сравнивать с литературными данными (Рисунок 68) (Chan and Li, 2005) и структурами, которые мы наблюдали на поверхности макроскопических пленок (Рисунок 57).

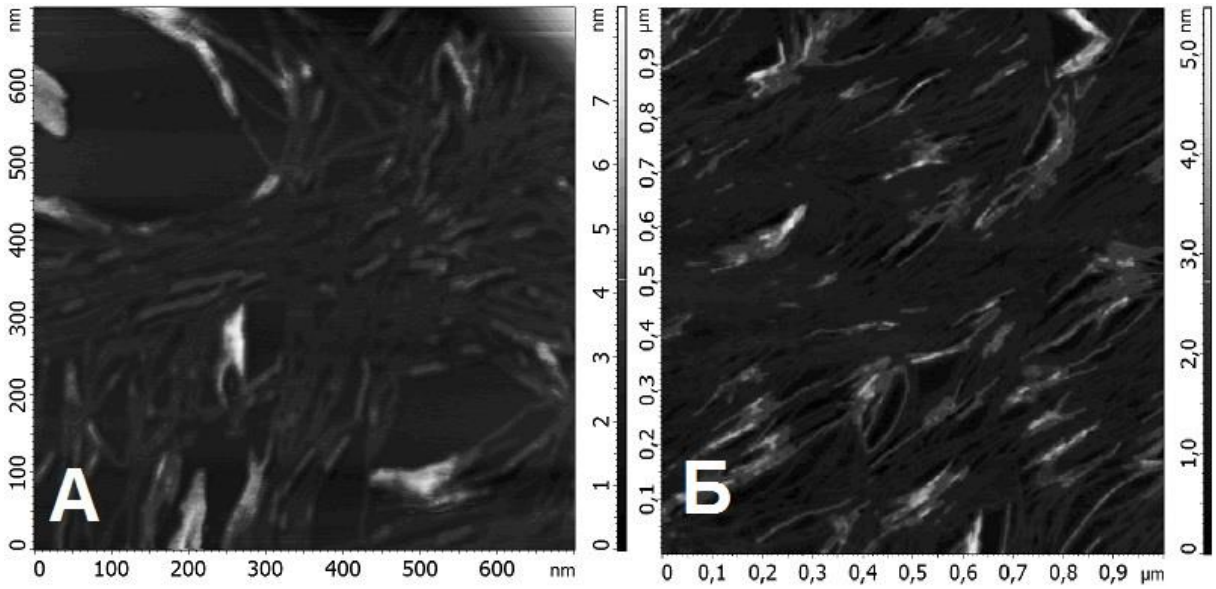


Рисунок 67. *Изображения АСМ ультратонких пленок сополимера ПОБ-ПЭГ (А) и композита ПОБ/ПЭГ (Б). (Выполнено совместно с научной группой в.н.с. кафедры биоинженерии Багрова Д.М.).*

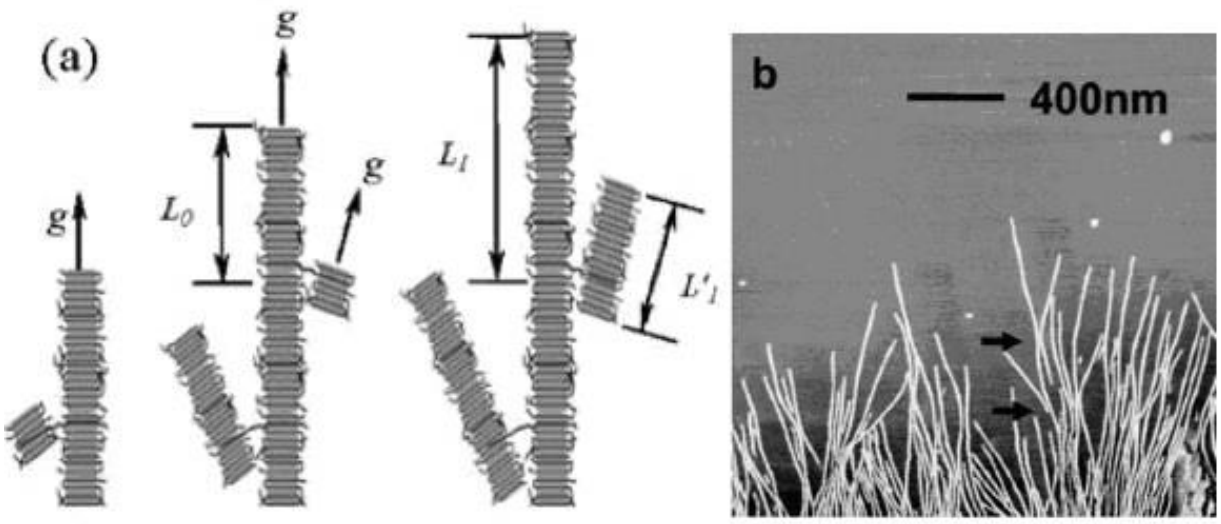


Рисунок 68. *Изображение ультратонких пленок поли(бисфенол А-со-декана) (Chan and Li, 2005).*

На Рисунке 67 видно, что нитеподобные структуры лежат как в один слой (тогда их высота составляет 0,7±0,1 нм), так и в два слоя (тогда их высота составляет 1,5±0,3 нм). В ультратонкой пленке композита ПОБ/ПЭГ были обнаружены процессы перестройки ламелей, характерные для пептидов (Li et al., 2009).

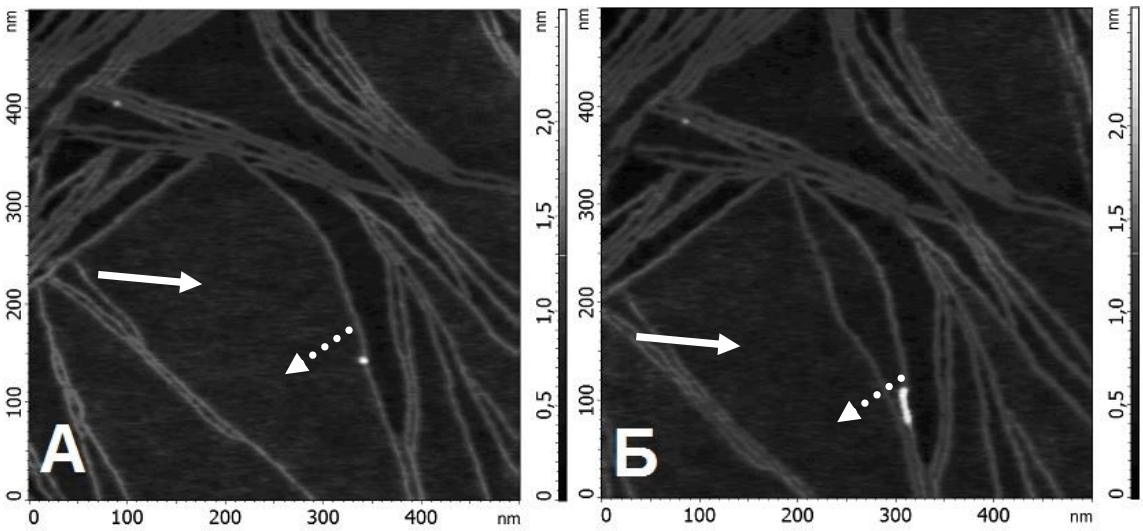


Рисунок 69. *Процесс перестроения ламелей в ультратонкой пленке из композита ПОБ/ПЭГ на слюде: 0 мин (А), 4 мин (Б). Перемещение и сборка ламели указана сплошной стрелкой, а удвоение ламеллярного слоя – пунктирной стрелкой. (Выполнено совместно с научной группой в.н.с. кафедры биоинженерии Багрова Д.М.).*

На Рисунке 69 видно, что имеет место перемещение и сборка новых ламелей в ультратонких пленках из композита ПОБ/ПЭГ, причем толщина видимых на изображениях АСМ нитей (1±0,1 и 1,6±0,1 нм) соответствует 2-х и 3-х кратным величинам диаметра полимерных цепей (0,5±0,1 нм) (Bagrov et al., 2011).

Таким образом, у биоПЭГилированного ПОБ (как и у композита ПОБ/ПЭГ) структура ультратонких пленок значительно отличается по сравнению с ультратонкими пленками из гомополимера ПОБ, на них выявлены отдельные протяженные монослойные ламели высотой 0,7±0,1 нм. Вероятно, это связано с влиянием полимерных молекул ПЭГ на процессы формирования кристаллических структур у ПОБ, в результате чего вместо плоскостных водорослевоподобных структур и двумерных сферолитов образуются протяженные одиночные ламели. И хотя на поверхности макроскопических пленок не удалось показать такое различие в наноструктуре ПОБ и ПОБ-ПЭГ, это не исключает влияние биоПЭГилирования ПОБ на формирование надмолекулярных структур и на этом уровне, просто метод АСМ не позволяет их выявить на обычных, а не ультратонких пленках.

Таким образом, природный поли-3-оксибутират, будучи частично кристаллическим биополимером, обладает способностью образовывать различные, часто довольно сложные надмолекулярные структуры: ламели и кристаллические наноструктуры из них более высокого порядка, такие как двумерные сплошные и разветвленные водорослевидные сферолиты. Общая

схема структурной организации частично-кристаллического ПОБ и его сополимеров приведена на Рисунке 70 (Iwata et al., 1997).

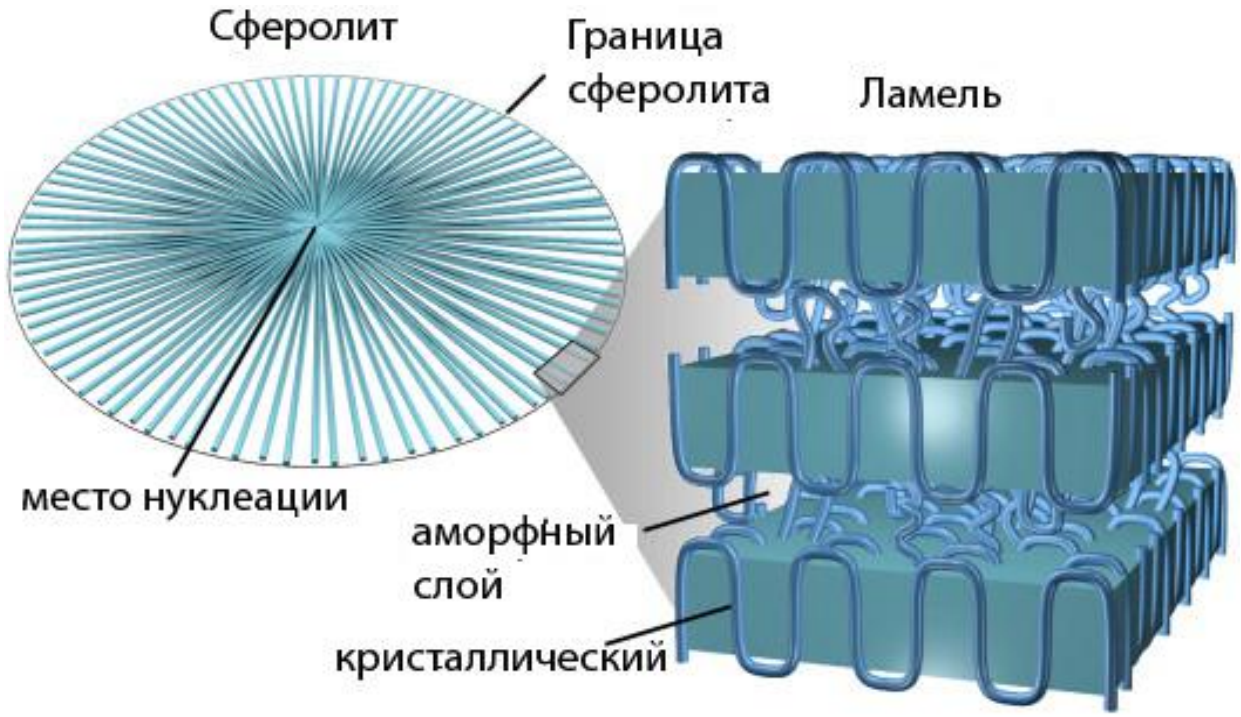


Рисунок 70. *Общая схема структурной организации полимерной матрицы ПОА (Iwata et al., 1997).*

Между тем, показано, что в карбоносомах бактерий запасной высокомолекулярный ПОБ пребывает не в кристаллическом, а аморфном состоянии (Barnard and Sanders, 1989). Этим объясняются значительные различия в скорости биодеградации между образцами полимера, полученного способом осаждения или формования из раствора, и полученного методом литья или экструзии из расплава (Бонарцев и др., 2011). Существует гипотеза, согласно которой пластифицирующие влияние, благодаря которому поддерживается аморфная структура ПОБ в карбоносоме, выполняет вода, а также специальные белки, заякоревающие полимерные цепи ПОБ и не дающие им сформироваться в кристаллические структуры (Barnard and Sanders, 1989; Harrison et al., 1992). Было сделано предположение, что благодаря молекулам воды формируются водородные связи между карбонильными группами полиэфирных цепей и, таким образом, образуется что-то вроде сшивок между соседними полимерными цепями. Такая молекулярная организация может объяснить мобильное аморфное состояние ПОБ *in vivo*. Поэтому удаление воды из нативных ПОБ-гранул и приводит к тому, что полимерные цепи образуют ламеллярно-кристаллическую структуру (Lauzier et al., 1992). Образцы полимера, высаженные из раствора, т.е. те образцы, которые мы исследовали в данной работе, обладают наноструктурой, способствующей при помещении их в водную среду диффузии воды в толщу

полимерной матрицы, пластифицируя тем самым полимер подобно тому (правда, в очень малой степени), как это происходит в ПОА-гранулах бактерий. С другой стороны, столь специфическая структура ПОБ, даже при поддержании аморфного состояния полимера в гранулах бактерий, препятствует гидролитической деструкции полимера той самой водой, которая его в этих гранулах пластифицирует (Iordanskii et al., 2006; Zhuikov et al., 2017a; Zhuikov et al., 2017б; Zhuikov et al., 2017в).

Следует отметить, что для природных запасных биополимеров подобная надмолекулярная укладка полимерной цепи играет важную роль. Примером может служить гликоген, являющийся запасным полисахаридом у животных (в т.ч. у человека) и бактерий. Химическое строение полисахарида амилозы, формирующей гликоген и крахмал, которая состоит тоже из одинаковых стереоизомеров остатков глюкозы, соединенных α1,4-гликозидной связью, способствует укладке этого биополимера в плотную спираль (6 остатков в одном ее витке) (Рисунок 71), что способствует плотной укладке этого запасного вещества в специальных гранулах в цитоплазме клетки. У гликозилированных же белков и липидов наноструктура олигосахаридов, присоединенных к ним, играет ключевую роль для распознавания их специальными белками (например, внутриклеточными лектинами или белковыми рецепторами иммунных клеток или бактерий) и, соответственно, служит в качестве сигнальной субъединицы этой биомолекулы, определяющей физиологическую функцию всего конъюгата. Существует даже такое понятие, как «сахарный код», т.е. олигосахариды различной структуры служат в качестве информационных молекул, наподобие полинуклеотидов и белков (Nelson and Cox, 2008). Каким образом это может относиться к ПОБ, мы рассмотрим немного позже.

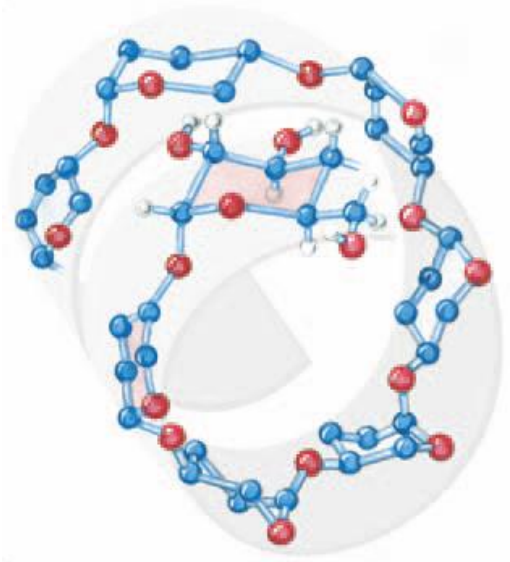


Рисунок 71. *Модель пространственной структуры амилозы (Nelson and Cox, 2008).*

Наноструктуры в виде спирали были показаны и для так называемого комплексообразующего олигомерного ПОБ (кПОБ или cPHB в англоязычной литературе), имеющегося не только у бактерий, но и у животных, в т.ч. у человека, в норме в различных тканях.

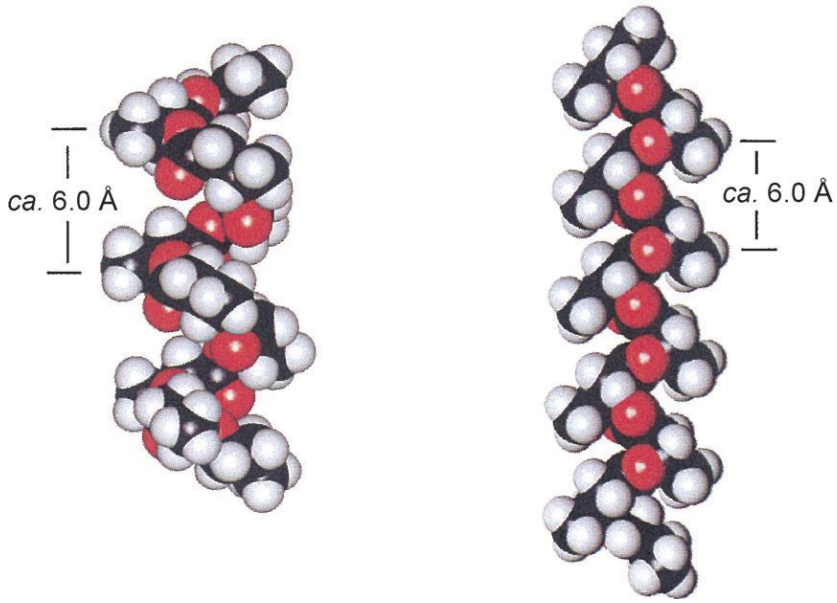


Рисунок 72. *Две различные спиральные структуры кПОБ, подтвержденные экспериментально: левозакрученная спираль из 21 остатка 3-оксибутирата в одном ее витке, уложенная в плотные ламели (справа); свободная правозакрученная спираль из 31 остатка 3-оксибутирата в одном ее витке.*

Эти исследователи предполагают, что подобная наноструктура играет ключевое значение для физиологической роли кПОБ, в т.ч. для его возможной сигнальной роли (Reusch, 2012).

Таким образом, наноструктура ПОБ, используемого для изготовления имплантируемых изделий или матриксов для тканевой инженерии, может активным образом влиять на клетки, участвующие в формировании тканевой реакции на имплантируемый материал или регенерации той или иной ткани, или на рост и физиологическое состояние клеток, культивируемых на полимерных матриксах. Изменение же наноструктуры, наблюдаемое нами при биотехнологической денатурации с помощью биоПЭГилирования также может приводить к изменению клеточной и тканевой реакции на биополимер.

Раздел 3.3. Исследование физико-химических свойств поли-3-оксибутирата и его сополимеров

Физико-химические свойства (физико-термические, механические и гидрофильность) синтезированных ПОБ с различной ММ и его сополимеров: ПОБВ с различной ММ и различным содержанием 3ОВ, сополимера ПОБ с 4М3ОВ, а также сополимеров ПОБ-ПЭГ и ПОБВ-ПЭГ, были исследованы методами вискозиметрии, дифференциальной сканирующей калориметрии, наноиндентирования (и в ряде случаев на разрывной машине) и измерения контактного угла смачивания. Далее приведены примеры измерения отдельных параметров при помощи этих методов.

Методом ДСК были измерены такие показатели физико-термических свойств биополимеров, как температуры плавления (начальная и пиковая) и кристаллизации полимеров, а по площади пика плавления (первого цикла) полимеров рассчитана их кристалличность. На Рисунке 73 представлен типичная термограмма ДСК сополимера ПОБВ-17,6-220 (обозначения полимеров будут даны в Таблице 10) двух циклов нагрева (красная и фиолетовая линии) и охлаждения образца (синяя и голубая линии, соответственно). На графике видны пики плавления образцов в области температур 160-180 ºС (на кривых нагрева) и пики кристаллизации образцов полимеров в области температур 50-100 ºС (на кривых охлаждения), что типично для частично кристаллического полимера. Видно, что пики температуры плавления гомополимеров ПОБ, так и их сополимеров имели раздвоенный вид (Рисунок 73). К сожалению, нам не удалось определить температуру стеклования полимеров, но по литературным данным она составляет примерно от 2 до 4 ºС (Finelli et al., 1997).

Таким образом, термофизические свойства ПОБ, показанные методом ДСК, свидетельствуют о том, что ПОБ является частично кристаллическим полимером, что подтверждает данные, полученные в Разделе 3.2 по исследованию кристаллических структур в макроскопических и ультратонких пленках этого полимера. Частично-кристаллическое строение полимерной матрицы определяет и многие другие его физико-химические свойства, прежде всего, механические, а также способность к биодеградации и биосовместимость полимеров.

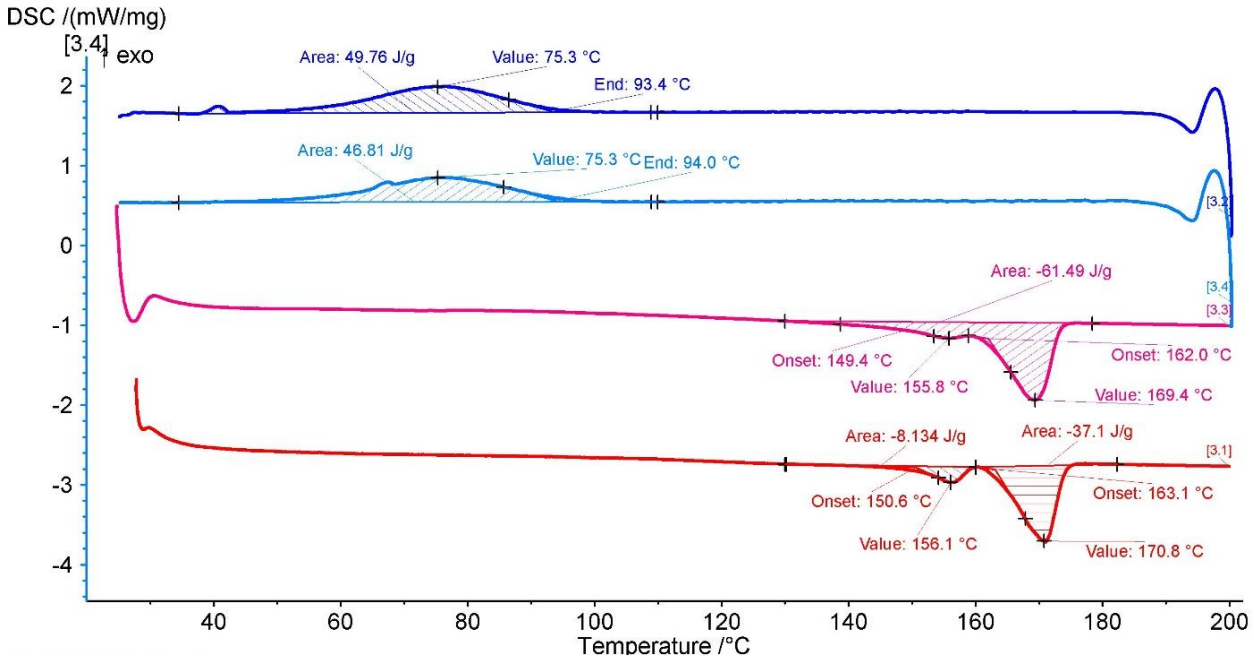


Рисунок 73. *Пример кривых 2-х циклов нагрева (красная и фиолетовая линии) и охлаждения (синяя и голубая линии) термограммы ДСК для сополимера ПОБВ-17,6%-200. (Выполнено совместно с лабораторией химической термодинамики на Химическом факультете МГУ, на оборудовании ЦКП МГУ (оператор н.с. Быков М.А.)).*

Повышенная степень кристалличности, которая имеет место для ПОБ, приводит к тому, что этот полимер обладает повышенной хрупкостью, т.к. способность к деформации полимера определяют аморфные области полимерной матрицы. Высоко-кристаллическая матрица полимера и ее кристаллические структуры (ламели, сферолиты) затрудняют движение длинных полимерных молекул ПОБ, причем, не только в кристаллической компоненте, но и в аморфной фазе, т.к. играют роль физических сшивок. Такой малой подвижностью полимерных цепей ПОБ и его сополимеров, по-видимому, и можно объяснить столь большой разрыв, на десятки градусов, между пиками плавления и кристаллизации полимеров, а также от значений температуры стеклования, т.е. переход полимера из стеклообразного состояния в высокоэластичное происходит очень плавно и выражен слабо (Finelli et al., 1997). Другой требующий объяснения феномен, который можно увидеть на термограммах ДСК ПОБ и его сополимеров – это расщепление эндотермического пика плавления. Такое расщепление эндотермы плавления, вероятно, связано с наличием в кристаллической фазе кристаллических образований, например, сферолитов, с разными размерами, формой и структурой, которые образуются при формировании пленки из раствора, т.е. выраженная гетерогенность компоненты ПОБ проявляется даже при столь высоких температурах. Причем, из-за малой плотности точек роста кристаллической фазы в полимерной матрице ПОБ происходит, как

правило, образование относительно крупных сферолитов, максимальная скорость роста которых наблюдается при 90 °C. Было показано, что у ПОБ есть пик плавления в области более низких температур, образующийся из-за плавления фракции кристаллических структур меньшей плотности и меньших размеров. И этот пик исчезает, если кристаллизация ПОБ осуществляется из расплава до достижения температуры кристаллизации (Yoon et al., 1998). На нашем примере термограммы ДСК также можно заметить, что при 2-ом цикле нагрева 1-ый пик плавления полимера в области температур примерно от 150 до 160 ºC, который при 1-ом цикле нагрева был практически отделен от основного пика плавления при 160-175 ºC, становится меньше и сливается с основным пиком плавления полимера, т.е. на образование пика плавления ПОБ могут влиять, например, процессы рекристаллизация полимера во время нагрева (Yoon et al., 1998). Тем не менее, следует учитывать, что процессы плавления и кристаллизации ПОБ отстоят друг от друга практически на 100 °C, что опять-таки указывает на высокую жесткость полимерных цепей ПОБ (персистентная длина для ПОБ равна 3 нм) (Beaucage et al., 1997).

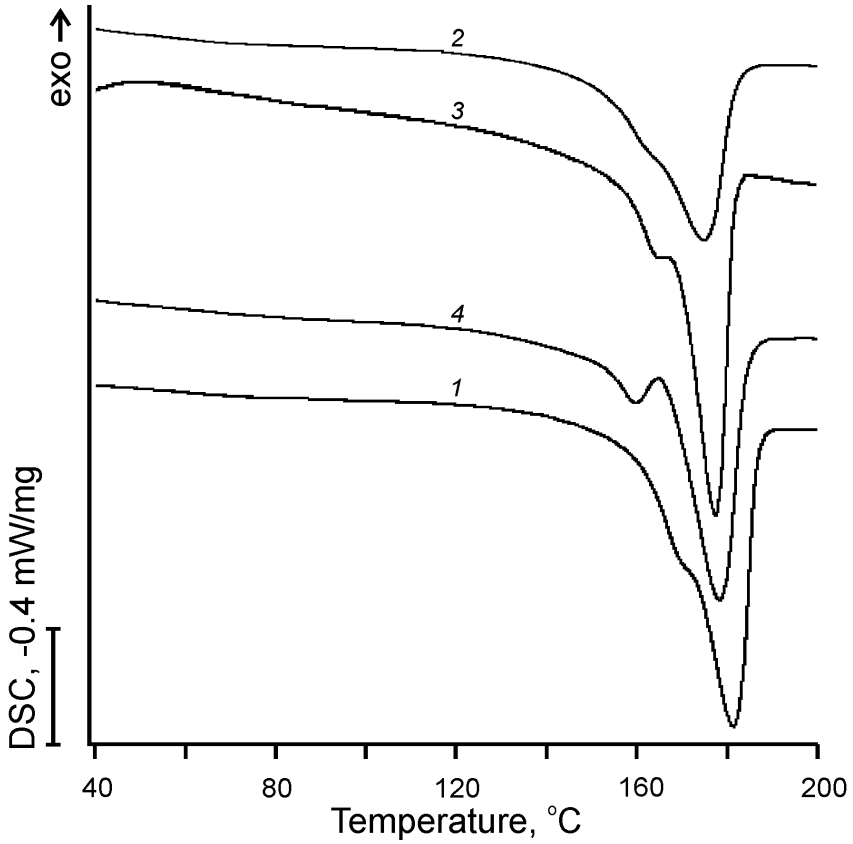
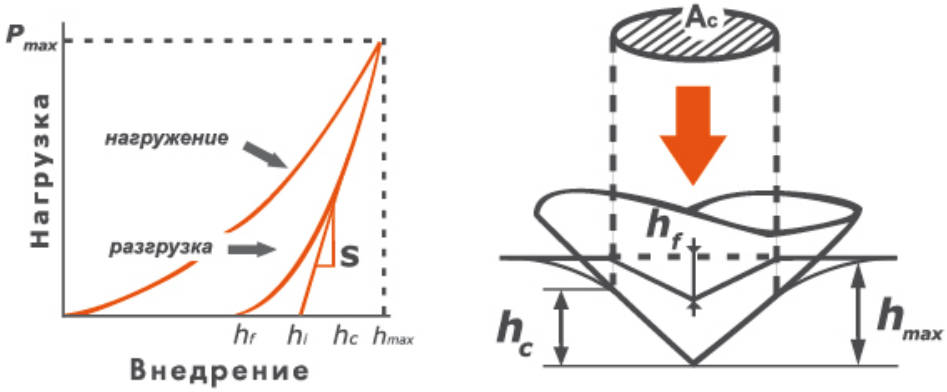


Рисунок 74. *ДСК термограммы, полученные методом биотехнологического ПЭГилирования полимеров: ПОБ гомополимер (1), ПОБВ (2), ПОБ-ПЭГ (3), ПОБВ-ПЭГ (4). (Выполнено совместно с лабораторией химической термодинамики на Химическом факультете МГУ, на оборудовании ЦКП МГУ (оператор н.с. Быков М.А.).*

На Рисунке 74 представлены в сравнении термограммы ДСК первых циклов нагрева гомополимера ПОБ (ММ = $2{,}6\times10^5$) и его сополимеров ПОБВ (5,7моль% ЗОВ, ММ = $1{,}7\times10^5$), ПОБ-ПЭГ (ММ = $1{,}6\times10^5$) и ПОБВ-ПЭГ (ММ = $1{,}5\times10^5$). Из термограммы ДСК сополимеров ПОБВ и ПОБ-ПЭГ видно, что происходит сразу несколько изменений кривой. Во-первых, происходит уменьшение площади пика плавления, т.е. снижение степени кристалличности у сополимеров. Во-вторых, имеет место снижение температуры плавления. В-третьих, не наблюдается выраженного, как в случае ПОБ расщепления пика плавления, что говорит о более организованной укладке полимерных цепей у сополимеров ПОБВ и ПОБ-ПЭГ.

На Рисунке 75 представлен исходный график наноиндентирования пленки ПОБ. На графике можно увидеть кривые загрузки и разгрузки, то есть начало движения индентора и возвращение его на исходное место. По этим кривым определяют параметры, которые потом будут использоваться в расчете модуля Юнга полимера.

А



Б

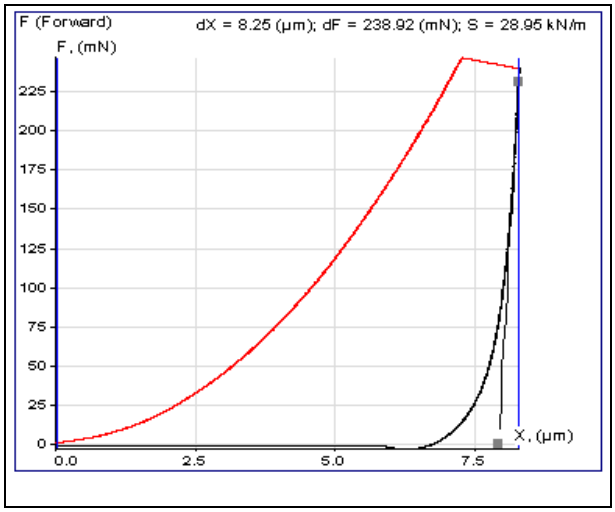


Рисунок 75. *А - Принцип расчета параметров механических свойств полимерных пленок, измеренных с помощью метода наноиндентирования (объяснения см. в разделе Методика). Б - График зависимости приложенной силы от глубины проникновения зонда-индентора при наноиндентировании образца пленки ПОБ-364.*

На Рисунке 76 представлен исходный график измерения контактного угла смачивания водой образца пленки ПОБВ-2,5%-768 во времени. Для расчета контактного угла рассчитывается среднее значение этого параметра примерно за 2 с измерения, т.к. ранее было показано, что этого времени достаточно для стабилизации этого показателя.

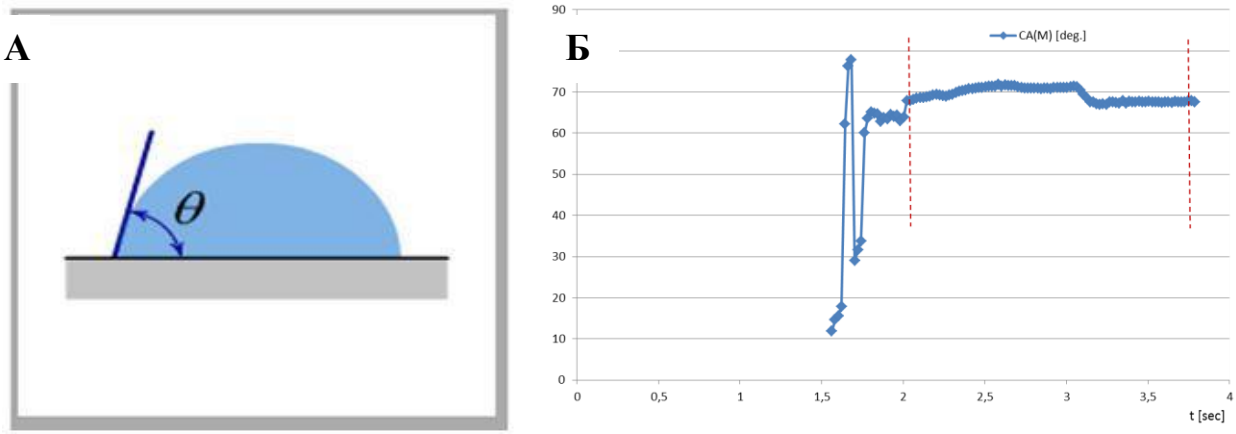


Рисунок 76. *Схема измерения контактного угла смачивания полимерной пленки водой (А) и исходный график изменения контактного угла смачивания водой пленки ПОБВ-2,5-768 во времени, используемый для расчета этого параметра (Б). (Совместно с лабораторией физики и технологии почв кафедры физики и мелиорации почв факультета почвоведения МГУ (ст.науч.сотр. Быкова Г.С., доцент Милановский Е.Ю., ст.науч.сотр. Тюгай З.Н.) и на оборудовании ЦКП МГУ).*

В Таблице 9 приведены данные исследования физико-химических свойств пленок ПОБ и его сополимеров, исследованные этими методами. Из этой таблицы видно, что полученные биополимеры можно условно разделить на насколько групп по таким характеристикам, как, мономерный состав (гомополимер ПОБ или различные сополимеры), для ПОБВ – молярное содержание 3ОВ, наличие ПЭГ в составе цепи и молекулярная масса. Группа I – это ПОБ различной ММ, группа II – ПОБВ с различным содержанием 3ОВ и различной ММ, группа III – ПОБ4МВ и группа IV – сополимеры ПОБ с ПЭГ и ПОБВ с ПЭГ.

Таблица 9. *Физико-химические свойства пленок ПОА.*

Образец	ММ, $\times 10^3$	T_c,°C	T_m,°C	E, ГПа	X_c, %	Контактный угол, ° ^
Группа I. ПОБ различной ММ						
ПОБ-25#	25	-	142/159	-	66	50
ПОБ-105	105	74	152/168	2,2	66	59
ПОБ-255	255	-	161/181	1,5*	68	61
ПОБ-364	364	87	159/176	2	65	60

ПОБ-485	485	-	156/178	1,7*	63	63
ПОБ-1095	1095	80	154/170	2,2	63	59
Группа II. ПОБВ с различным молярным содержанием 3ОВ и различной ММ						
ПОБВ-2,5-768	768	88	157/170	1,3	60	66
ПОБВ-5,9-820	820	81	155/167	0,9*	51	65
ПОБВ-5,7-172	172	-	151/175	0,8	50	70
ПОБВ-9-850	850	77	151/165	1,3	47	70
ПОБВ-9-1010	1010	70	155/166	1,0	44	64
ПОБВ-9,6-320	320	60	134/149	1,4	41	68
ПОБВ-17,6-220	220	75	149/162	1,2	42	67
ПОБВ-17,6-635	635	74	151/166	0,7	41	63
ПОБВ-17,6-1190	1190	69	154/169	0,4	34	62
Группа III. ПОБ4МВ						
ПОБ4МВ	1340	73	145/157	1,3	49	63
Группа IV. ПОБ-ПЭГ, ПОБВ-ПЭГ и композит ПОБ/ПЭГ						
ПОБ-ПЭГ	160	-	157/178	0,8*	59	52
ПОБВ-ПЭГ	219	75	153/175	2,0	60	63
ПОБ/ПЭГ	485/1,5	-	159/172	0,4*	56	49

получен методом кислотного гидролиза из высокомолекулярного полимера;

** измерения модуля Юнга проведены с помощью разрывной машины;*

^значения контактных углов измерялись на гладкой стороне пленок.

(Выполнено совместно с лабораторией химической термодинамики на Химическом факультете МГУ (оператор н.с. Быков М.А.) и с лабораторией физики и технологии почв кафедры физики и мелиорации почв факультета почвоведения МГУ (ст.науч.сотр. Быкова Г.С., доцент Милановский Е.Ю., ст.науч.сотр. Тюгай З.Н.), на оборудовании ЦКП МГУ.

Введение 3ОВ, 4М3ОВ и ПЭГ в полимерную цепь ПОБ приводит к значительным изменениям физико-химических характеристик полученных сополимеров по сравнению с гомополимером ПОБ. Анализ данных Таблицы 9 показывает, что степень кристалличности сополимеров ПОБВ ниже, чем у гомополимера ПОБ, причем, наблюдается обратная линейная зависимость между степенью кристалличности биополимера и молярным содержанием 3ОВ в его составе, как это видно на диаграмме Рисунка 77.

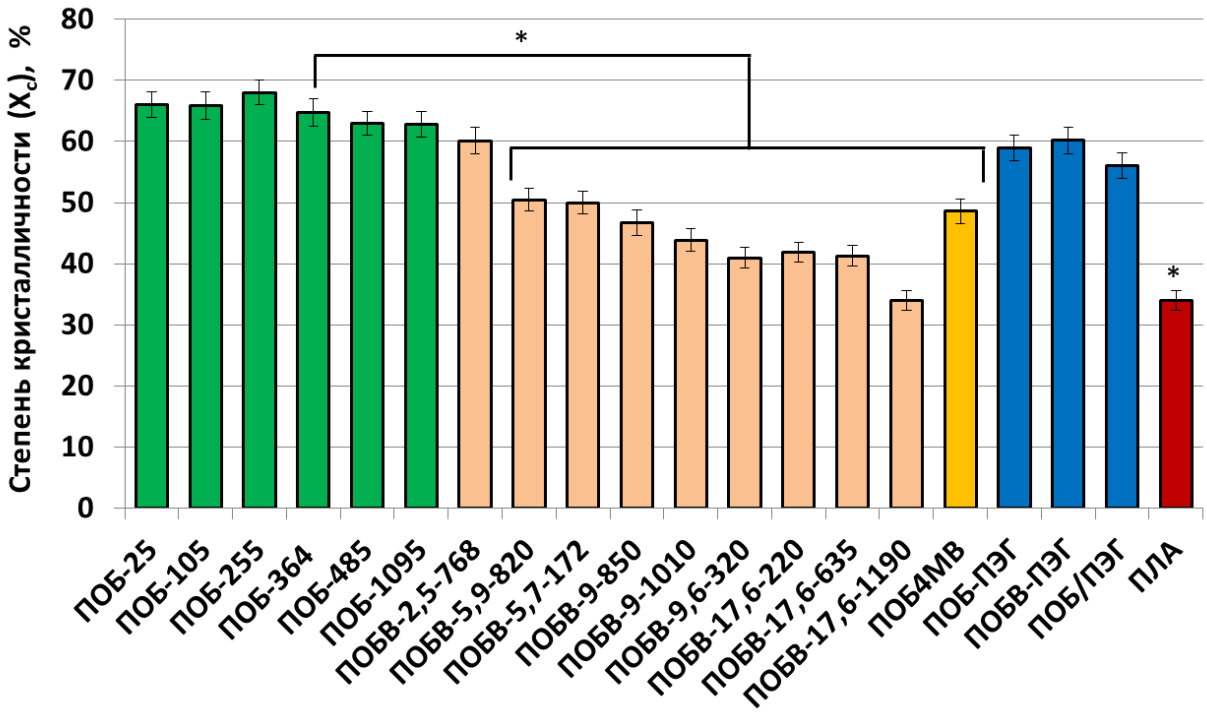


Рисунок 77. *Степень кристалличности пленок из ПОА. * p <0,05 степени кристалличности исследуемых полимеров в сравнении с этим параметром у ПОБ-364.*

Следует отметить, что кристалличность падает почти в два раза с 63% до 34% при повышении молярного содержания 3ОВ от 0 до 17,6%, хотя следует учитывать влияние ММ на степень кристалличности, так как хотя все эти полимеры являются высокомолекулярными, их ММ отличается (Рисунок 78А). Другие исследователи также наблюдали уменьшение степени кристалличности у ПОБВ при повышении молярного содержания 3ОВ в сополимере (Choi et al., 2004; Engelberg and Kohn, 1991; Savenkova et al., 2000; Han et al., 2015). Если же рассматривать зависимость степени кристалличности от молекулярной массы полимеров, то в случае гомополимера ПОБ ее практически не наблюдается, т.е. при увеличении ММ степень кристалличности ПОБ почти не изменяется, но в случае ПОБВ (примерно 17,5 моль%) не очень выраженная зависимость имеется (Рисунок 78Б). Причем, даже небольшое присутствие 3ОВ сказывается на способности полимера образовывать ламели. Эти данные согласуются с данными, описанными в литературе (Sudesh et al., 2000). Интересно, что кристалличность ПОБ4МВ (49%) с содержанием 3О4МВ всего лишь 0,6 моль% почти соответствует и даже немного меньше кристалличности ПОБВ (51%), содержащего 5,9 моль%. Т.е. наблюдается десятикратная разница во влиянии мономеров 3ОВ и 3О4МВ на кристалличность их сополимеров с ПОБ. Это может быть связано с Y-образной структурой боковой алкановой

группы –CH(CH_3)CH_3 у 3ОВ4МВ по сравнению с обычной линейной структурой боковой группы 3ОВ: -$CH_2CH_2CH_3$.

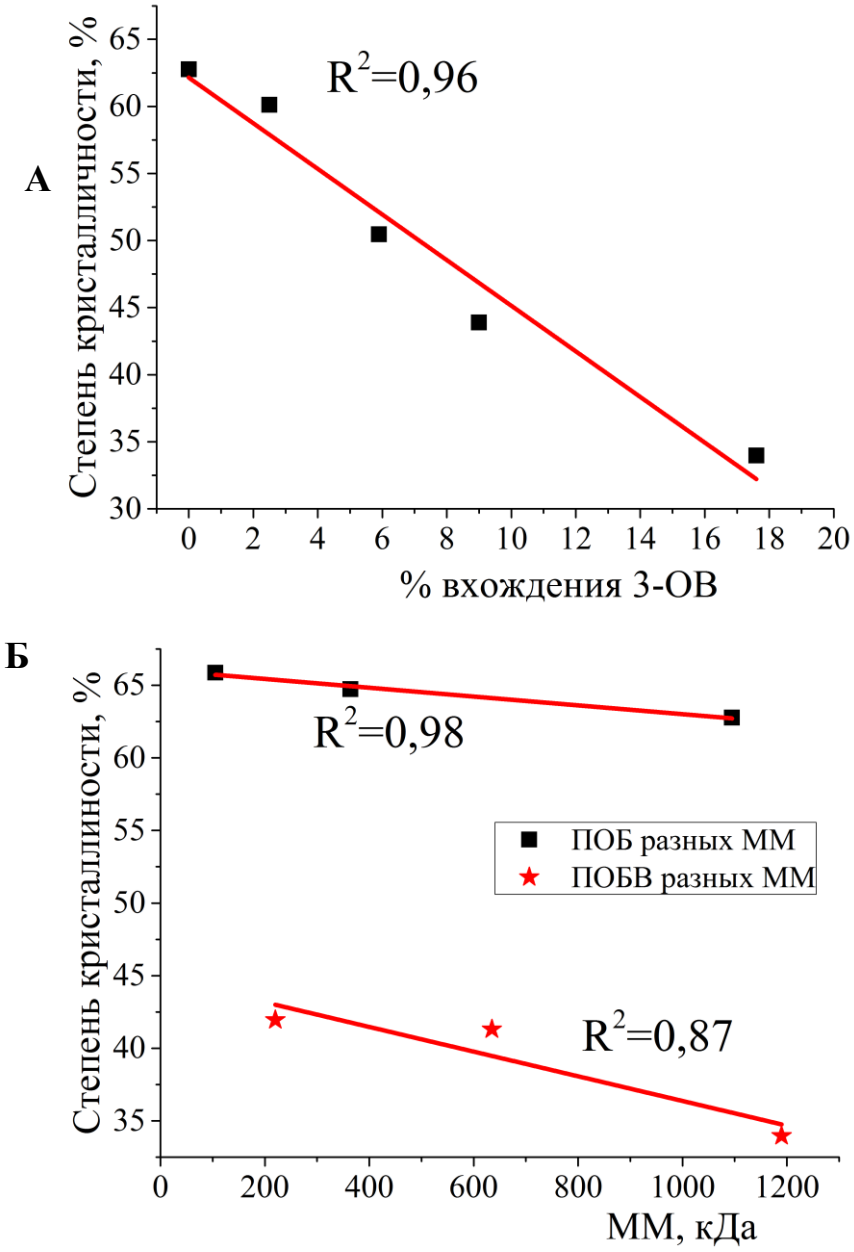


Рисунок 78. *Зависимость степени кристалличности (X_c, %) ПОБ и ПОБВ от молярного содержания 3ОВ в составе высокомолекулярных полимеров (А) и от молекулярной массы ПОБ и ПОБВ с содержанием 3ОВ около 17,5 моль% (Б). R^2 – квадрат коэффициента корреляции между данными и их аппроксимацией по линейной функции.*

Y-образная структура боковой группы мономера 3О4МВ сополимера ПОБ4МВ приводит к гораздо более значительному изменению укладки полимерных цепей и нарушению кристаллической структуры полимера, чем линейная боковая группы у ПОБВ. К сожалению, с помощью наших биотехнологических методов нам не удалось получить сополимер ПОБ4МВ с

большим содержанием 3О4МВ, поэтому мы не можем проанализировать влияние большего содержания этого мономера на физико-химические свойства полимера. Сополимер ПОБ-ПЭГ также обладает немного меньшей степенью кристалличности, чем гомополимер ПОБ со сходной ММ (105 или 255 кДа) и его кристалличность даже ниже, чем у высокомолекулярных ПОБ (Таблица 9). Между тем, у сополимера ПОБВ-ПЭГ кристалличность значительно выше, чем у ПОБВ с близким содержанием 3ОВ в сополимере (5,9 моль%), но эти различия вполне быть связаны со значительным различием в ММ полимеров (820 и 219 кДа, соответственно), ведь, как было уже показано выше, у сополимеров ПОБВ снижение ММ приводит к повышению степени их кристалличности (Рисунок 78Б). Поэтому, к сожалению, в случае терполимера ПОБВ-ПЭГ интерпретировать данные гораздо сложнее, чем в случае двойного блок-сополимера ПОБ-ПЭГ из-за необходимости учитывать влияние не только ПЭГ, но и 3ОВ на физико-химические свойства сополимера.

Таким образом, хотя и молярное содержание звеньев ЭГ в биоПЭГилированном сополимере ПОБ-ПЭГ составляет лишь максимум 0,33 мол.%, его термофизические свойства изменились значительно, что указывает на способность гидрофильного терминального ПЭГ изменять конформацию гидрофобных цепей ПОБ в достаточной мере, чтобы изменить такие важные физико-термические параметры, как температура плавления и степень кристалличности непропорционально сильно по отношению к малому молярному содержанию ПЭГ.

Важно отметить, что степень кристалличности связана с такой важнейшей биологической характеристикой ПОБ и его сополимеров, как биосовместимость (Zheng et al., 2005; Qu et al., 2006; Wang et al., 2010; Müller et al., 2016; Park and Cima, 1996; Nieminen et al., 2008). Это связано, по-видимому, с тем, что с кристаллическими наноструктурами (см. Раздел 3.2) на поверхности полимерных изделий, могут взаимодействовать белки межклеточной жидкости и плазмы крови, в т.ч. с антитела, белки системы комплемента и свертываемости крови, эти структуры могут распознаваться клетками иммунной системы (макрофагами, нейтрофилами, лимфоцитами), и они могут влиять на прикрепление и рост клеток (фибробластов, остеобластов, МСК и др.) на поверхности полимеров. По другим данным, тканевая реакция на имплантацию аморфных и кристаллических полимеров на ранних стадиях существенно не отличалась (Gutwald et al., 1994). Помимо этого, степень кристалличности определяет скорость биодеградации полимера, т.к. аморфная компонента полимерной матрицы подвергается ферментативному разложению с 20 раз большей скоростью, чем кристаллическая компонента полимерной матрицы (Overgaard et al., 1999).

По другим параметрам физико-термических свойств полимеров какой-то выраженной зависимости при достаточно больших различиях не наблюдается: температура плавления

(начальная и пиковая) находится в пределах от 134 до 161 ºС и от 149 до 181 ºС, соответственно; пиковая температура кристаллизации находится в пределах от 60 до 87 ºС.

Отдельно следует сказать о том, как меняются физико-термические свойства при добавлении ПЭГ к ПОБ в качестве композитной добавки. Интересно, что в композите ПОБ/ПЭГ при столь значительном содержании ПЭГ, как 30 вес.%, изменения физико-термических свойств по сравнению с гомополимером ПОБ в целом примерно такие же, как в случае сополимера ПОБ-ПЭГ: небольшое (до 56%) уменьшение степени кристалличности и тоже небольшое снижение температуры плавления, хотя в случае композита мы наблюдаем не 1 или 2 пика плавления, а 3, первый из которых имеет максимум при 44 ˚С, что соответствует температуре плавления ПЭГ = 44˚С (Pielichowski and Flejtuch, 2002), а два других в области 165-175 ºС – расщепленный пик плавления ПОБ.

Кристалличность ПОБ и его сополимера ПОБВ была также исследована методом широкоуглового рентгеноструктурного анализа. Дифрактограммы гомополимера ПОБ (ММ = $1{,}10 \times 10^6$) и его сополимера ПОБВ (5,9 моль% 3ОВ, ММ = $0{,}82 \times 10^6$) приведена на Рисунке 79. Значения степени кристалличности, рассчитанные по этим данным, составляют для этих выбранных нами полимеров: для ПОБ – 75% и для ПОБВ – 61%. Видно, что высота пиков и площадь под ними у сополимера ПГБВ меньше по сравнению с ПОБ, что указывает на меньшую кристалличность сополимера, что согласуется с данными полученными методом ДСК. Но при сравнении этих результатов с данными, полученными методом ДСК, видно, что абсолютные значения по методу рентгеноструктурного анализа выше примерно на 19% значений по методу ДСК, хотя соотношение параметров X_c между ПОБ и ПОБВ практически такое же. Это объясняется особенностями данного метода при исследовании с помощью него полимерных пленок. Ранее было показано, что рентгенограммы, снятые при падении рентгеновского пучка перпендикулярно плоскости пленок ПОБ обоих типов, содержат сплошные концентрические дифракционные линии. Это свидетельствуют о том, что кристаллиты в полимерных пленках имеют в основном ориентацию, обладающую цилиндрической симметрией относительно оси, перпендикулярной плоскости мембран (так называемая аксиальная текстура кристаллической фазы). Причем, общее содержание "ориентированных" кристаллитов в текстурированных пленках ПОБ достигает 66%. Кроме ориентации, кристаллиты в полимерных пленках также значительно упорядочены в направлении нормали к плоскости пленки полимера, образуя области-стопки, в которых они “сложены” друг на друга своими широкими гранями. Кристаллиты в таких “стопках” ориентированы осями *c* вдоль нормали к плоскости пленки. В том же направлении ориентированы и полимерные цепи в кристаллитах (т.н. складчатая конформация) (Кривандин

и др., 1997). Возможно, что такая текстура является следствием процесса эпитаксиальной кристаллизации, при которой для высокомолекулярных соединений часто наблюдается рост ориентированных кристаллитов (Мойся, 1978).

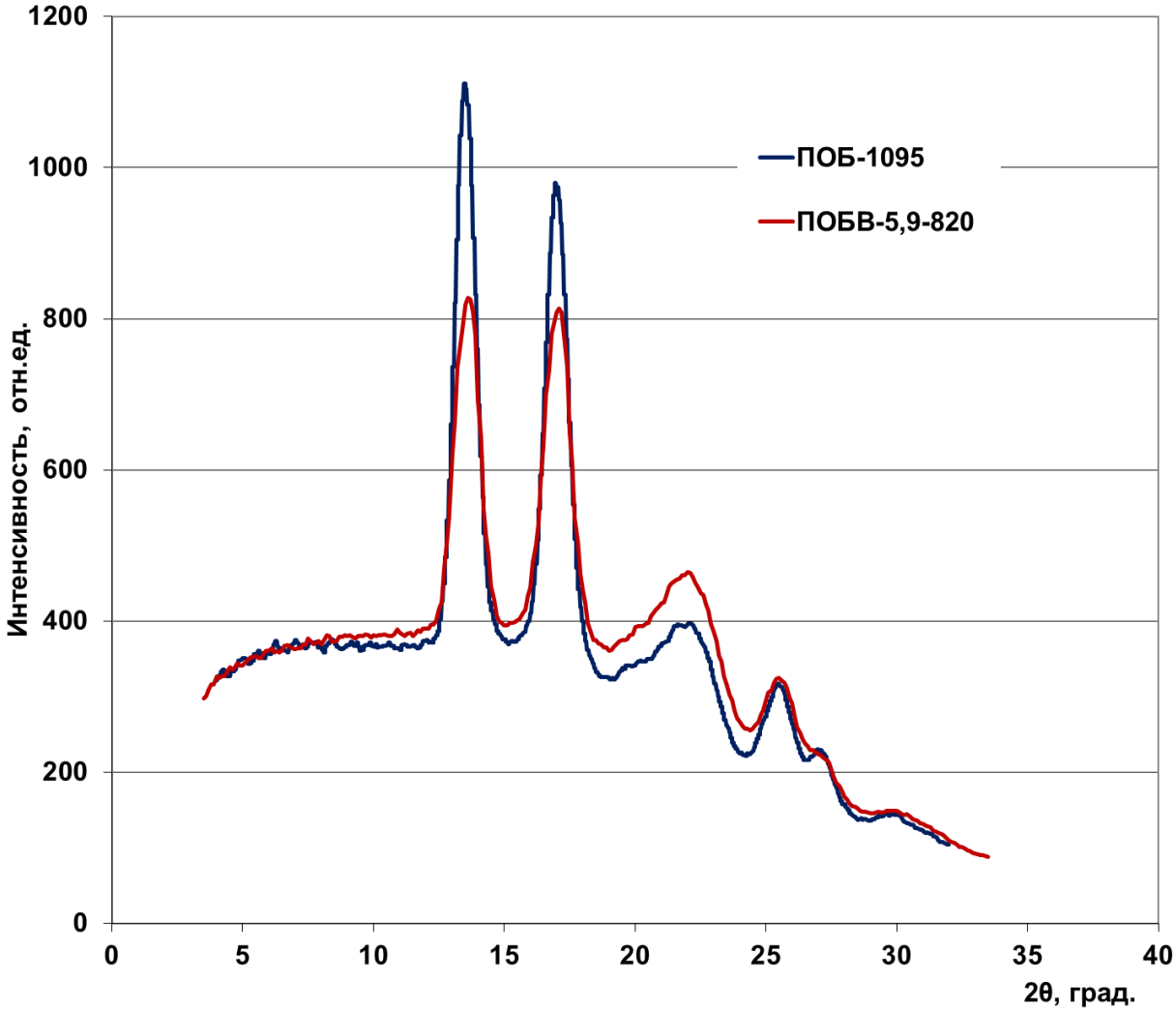


Рисунок 79. *Дифрактограммы ПОБ (ММ = 1,10×10^6) и его сополимера ПОБВ (5,9 моль% ЗОВ, ММ = 0,82×10^6), полученные методом широкоуглового рентгеноструктурного анализа. (выполнено совместно с Ребровым Александром Васильевичем, вед. науч.сотр. Института нефтехимического синтеза им. А.В.Топчиева РАН).*

Данные рентгеноструктурного анализа хорошо согласуются с результатами, полученными нами по исследованию морфологии макроскопических и ультратонких пленок (см. Раздел 3.2). Однако при использовании этого метода для анализа физико-химических свойств полимера в виде пленок есть и существенные недостатки. Дело в том, что данный метод дает сильно различающиеся результаты для полимерных образцов различной формы, например, для пленок и порошка, что связано как раз с их рентгеновским облучением под

определенным углом. Поэтому причина расхождений в данных полученных с помощью рентгеноструктурного анализа и ДСК могут быть связаны не со свойствами полимера, а с геометрическими особенностями анализируемых пленок. К сожалению, учитывая, что в нашей работе проводилось исследование биодеградации полимерных пленок, в ходе которых они подвергались частичному разрушению, метод рентгеноструктурного анализа не может быть применим для наших целей. Поэтому основной массив данных по кристалличности полимеров был получен нами с использованием данных, полученных методом ДСК.

Увеличение молярного содержания 3ОВ в ПОБВ приводит также и к изменению механических свойств полимеров, в частности, их жесткости. На диаграмме Рисунка 80 и в Таблице 9 показан модуль Юнга анализируемых пленок ПОА.

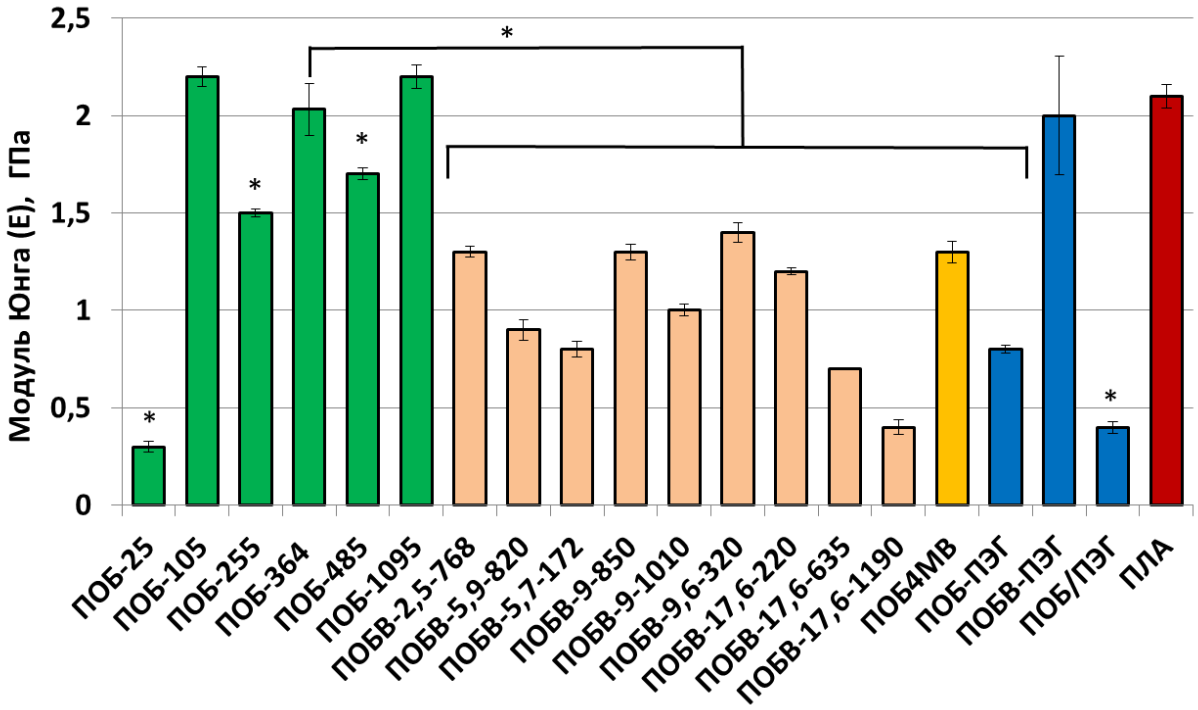


Рисунок 80. *Модуль Юнга пленок из ПОБ и его сополимеров. * p <0,05 модуля Юнга исследуемых полимеров в сравнении с этим параметром у ПОБ-364. (Совместно с Отделом исследования физико-механических свойств ФГБНУ ТИСНУМ, научной группой под руководством в.н.с., к.ф.-м.н. В.Н. Решетова и в.н.с., к.ф.-м.н. А.С. Усеинова).*

Видно, что он изменяется в широких пределах от 0,4 до 2,2 ГПа. Если сравнивать эти значения с механическими параметрами тканей и органов человека, то они (учитывая, что измерения сделаны методом наноиндентации) примерно соответствуют модулю Юнга хряща и губчатой кости (Makuch and Skalski, 2018; McKee et al., 2011).

На Рисунке 81 видно, что модуль Юнга полимерных пленок ПОБ и ПОБВ обратно пропорционален содержанию 3ОВ в полимере, т.е. включение в полимерную цепь ПОБ мономеров 3ОВ снижает жесткость гомополимера. Причем, с увеличением содержания 3ОВ до 17,6 моль% модуль Юнга снижается более чем в 5 раз.

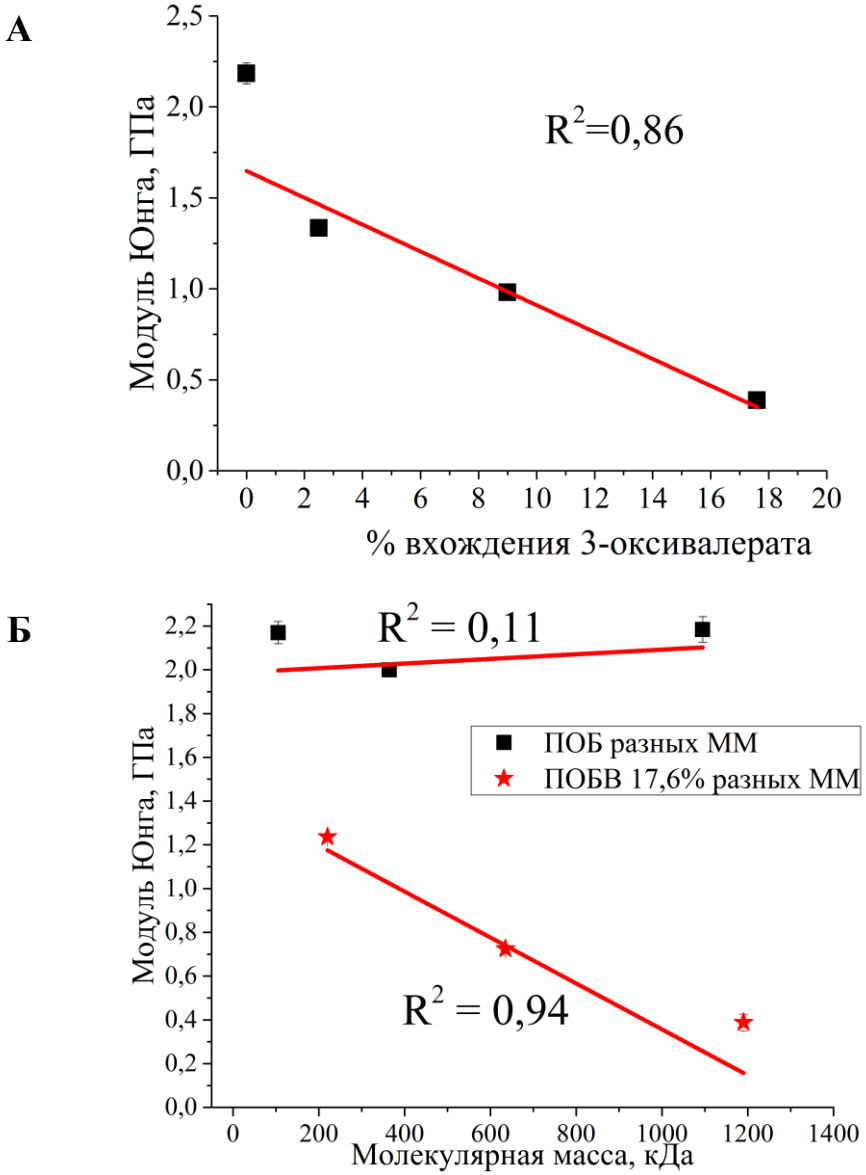


Рисунок 81. *Зависимость модуля Юнга, измеренного методом наноиндентирования, ПОБ и ПОБВ от молярного содержания 3ОВ в составе высокомолекулярных полимеров (А) и от молекулярной массы ПОБ и ПОБВ с содержанием 3ОВ около 17,5 моль%, соответственно (Б). R^2 – квадрат коэффициента корреляции между данными и их аппроксимацией по линейной функции.*

Зависимость жесткости полимеров от их молекулярной массы более сложная и интересная. Наблюдается значительное различие между гомополимером ПОБ и сополимером

ПОБВ. В случае ПОБ жесткость полимера практически не изменяется с ростом его ММ. И совсем другая ситуация наблюдается в случае сополимера ПОБВ, содержащего около 17,5 моль% 3ОВ. Здесь также наблюдается выраженная обратно пропорциональная зависимость модуля Юнга теперь уже от молекулярной массы ПОБВ: происходит падение жесткости полимера в 3 раза при росте его ММ в 5 раз. Полученные нами результаты довольно хорошо согласуются с данными, полученными другими исследователями (Engelberg and Kohn, 1991; Savenkova et al., 2000; McChalicher and Srienc, 2007; Han, 2015; Avella et al., 2000). Тем не менее, хотя в научной литературе также показано, что повышение содержания 3ОВ в составе сополимера ПОБВ приводит к снижению его кристалличности, но по абсолютным показателям модуля Юнга наблюдается достаточно сильные расхождения. Это может объясняться тем, что образцы полимерных пленок могли быть получены разными методами, использовался полимер разной степени очистки, использовались различные методы измерения в разных условиях (Бонарцев и др., 2011). Выше нами было показано, что мономеры 3ОВ с более длинными боковыми группами влияют на степень кристалличности ПОБВ, дестабилизируя ламеллярную укладку цепей полимера и приводя к увеличению аморфной компоненты полимера. Вероятно, это же является и причиной снижения жесткости полимера, т.е. жесткость полимера зависит от его кристалличности. Для проверки этой гипотезы мы построили график зависимости модуля Юнга всех исследуемых полимеров от степени их кристалличности, представленный на Рисунке 82. Из этого графика видно, что, хотя и с не очень хорошей степенью корреляции, но наблюдается прямая линейная зависимость между этими показателями. Влияние кристалличности ПОА на механические свойства этих полимеров было показано ранее, что подтверждает полученные нами результаты, т.е. для ПОА именно их кристаллическая структура с ламеллярной укладкой полимерных цепей определяет механические свойства этих полимеров, прежде всего, их жесткость и пластичность (Barham et al., 1984; El-Hadi et al., 2002).

В этой связи следует снова обратить внимание на модуль Юнга сополимера ПОБ4МВ. Снова можно заметить, что почти двукратное падение модуля Юнга у этого полимера по сравнению с гомополимером ПОБ практически такое же, как у сополимеров ПОБВ с молярным содержанием 3ОВ от 2,5 до 9 моль%, тогда как содержание мономеров 3О4МВ в цепи сополимера составляет всего 0,6%. Это также можно объяснить тем, что мономеры 3О4МВ с Y-образными боковыми группами вызывают гораздо большую дестабилизацию кристаллической структуры полимера, чем линейные боковые группы мономеров 3ОВ в сополимере ПОБВ, что и влечет за собой столь же значительное изменение их механических свойств.

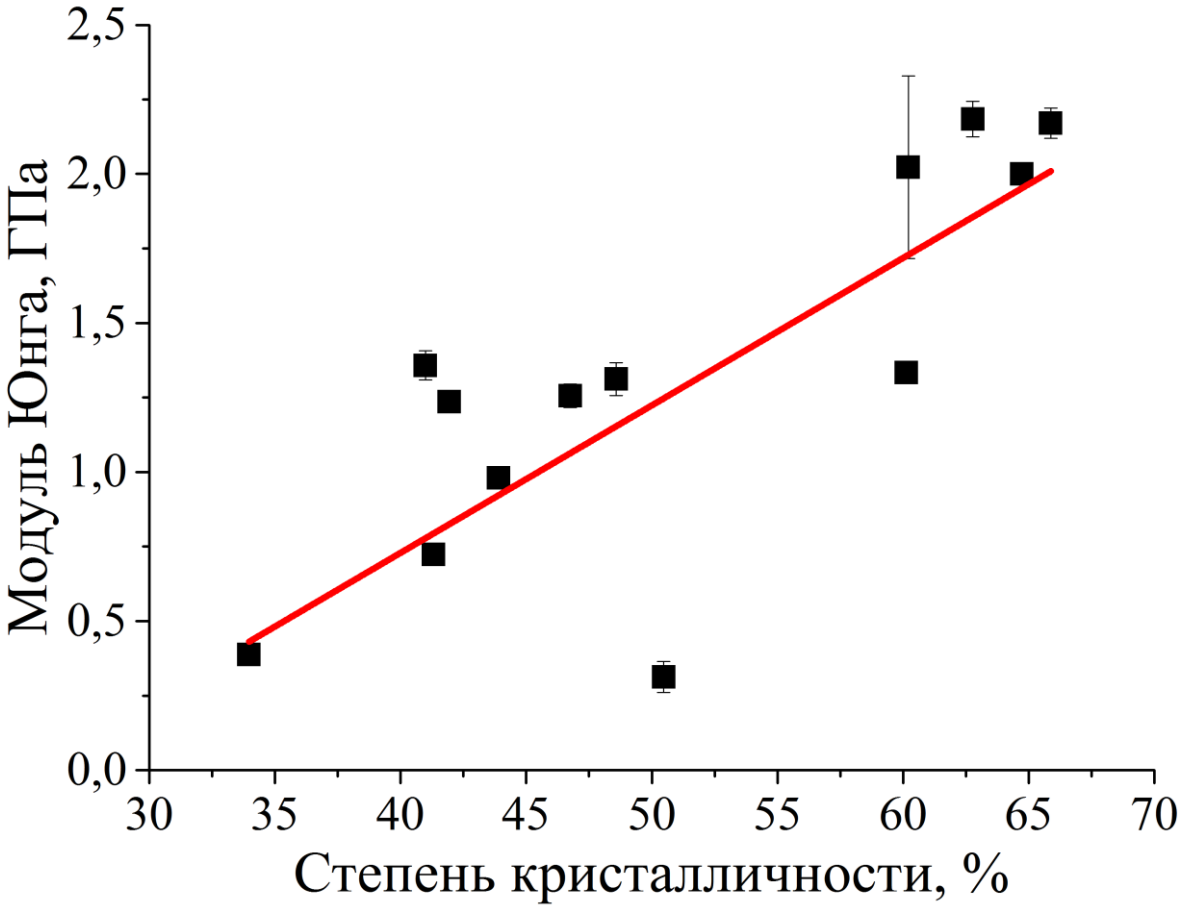


Рисунок 82. *Зависимость модуля Юнга, измеренного методом наноиндентирования, ПОБ и ПОБВ от степени кристалличности этих полимеров. R^2 – квадрат коэффициента корреляции между данными и их аппроксимацией по линейной функции.*

Мы также провели исследование физико-химических свойств ряда полимеров и композита ПОБ с ПЭГ при помощи стандартного теста на разрывной машине. Характеристические кривые этого испытания для гомополимера ПОБ с ММ 485 кДа приведены на Рисунке 83.

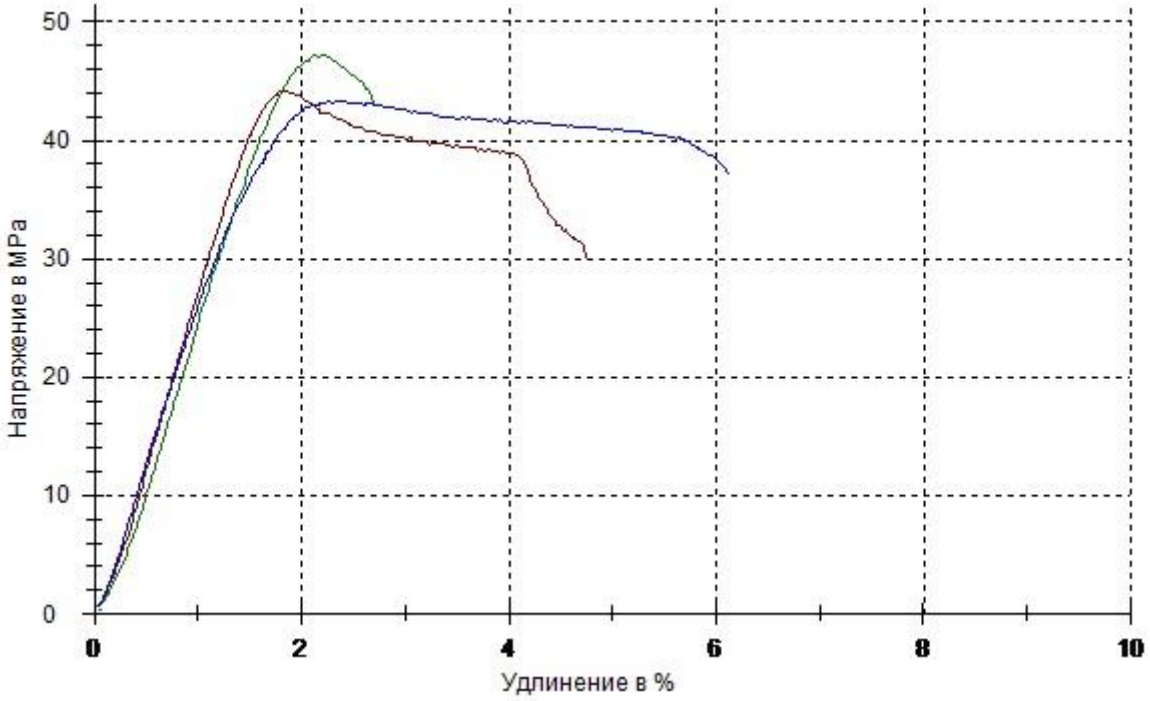


Рисунок 83. *Кривые изменения напряжения при растяжении с помощью разрывной машины полимерной пленки из ПОБ-485 (Совместно с Лабораторией химии и технологии материалов для сердечно-сосудистой хирургии НМИЦ сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева МЗ РФ, руководителем лаборатории проф. Новиковой С.П.).*

У гомополимера ПОБ модуль Юнга составляет около 1,46 ГПа, что несколько меньше данных, полученных методом наноиндентации (Таблица 10). Это, скорее всего, связано существенным различием этих методов, прежде всего, в том, что тест на разрывной машине дает интегративные механические свойства всей полимерной макропленки, а метод наноиндентации – локальную механику маленького участка пленки, к тому же, в первом случае производит растяжение всей пленки, а при наноиндентации – вдавливание зонда-индентора на небольшую глубину. Соответственно, на механические свойства при исследовании материала на разрывной машине влияет качество изготовления пленки, чем и может объясняться меньшие значения модуля Юнга, тогда как данные, полученные методом наноиндентирования в гораздо меньшей степени искажаются из-за подобных эффектов, не связанных со свойствами самого материала, и поэтому в большей степени подходит для исследования свойств самого полимерного материала.

Таблица 10. *Данные по основным механическим параметрам ПОБ и его сополимеров, которые были получены с помощью разрывной машины.*

	Максимальное напряжение, Н	Относительное удлинение, ε_R, %	Модуль Юнга, Е, ГПа
ПОБ-485	44,9 ±2,0	4,5 ±1,7	1,46 ±0,16
ПОБВ-5,9-820	30,3 ±1,5	54,1 ±5,4	0,92 ±0,15
ПОБВ-17,6-635	13,6 ±1,0	376,2 ±16,4	0,47 ±0,13
ПОБ4МВ	37,4 ±1,8	4,9 ±1,4	1,04 ±0,17
ПОБ/ПЭГ	14,1 ±1,2	7,9 ±2,0	0,42 ±0,15
ПОБ-ПЭГ	36,4 ±1,1	1,6 ±0,3	0,76 ±0,20

(Совместно с Лабораторией химии и технологии материалов для сердечно-сосудистой хирургии НМИЦ сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева МЗ РФ, руководителем лаборатории проф. Новиковой С.П.).

Из Таблицы 10 видно, что механические свойства биоПЭГилированного ПОБ значительно отличаются от свойств ПОБ: модуль Юнга снижен в 2 раза, а относительное удлинение – почти в 3 раза, что свидетельствует снова о непропорционально большом влиянии, располагающегося на конце полимерной цепи ПОБ небольшого фрагмента полимерной цепи ПЭГ на структуру полимера. В случае же композита ПОБ/ПЭГ происходило, напротив, повышение эластичности полимерного материала, что, вероятно, связано с пластифицирующем влиянии ПЭГ (Chan et al., 2012; Parra et al., 2006).

Сополимеризация с другими полимерами также оказывает влияние и на его гидрофобность. Гомополимеры ПОБ различной молекулярной массы (от $0{,}1\times10^6$ до $1{,}1\times10^6$) имеют значения контактного угла смачивания водой (при анализе гладкой стороны полимерной пленки) от 59° до 63°, при этом на данном интервале зависимости гидрофильности поверхности полимеров от ММ не наблюдается (Рисунок 84, Таблица 9).

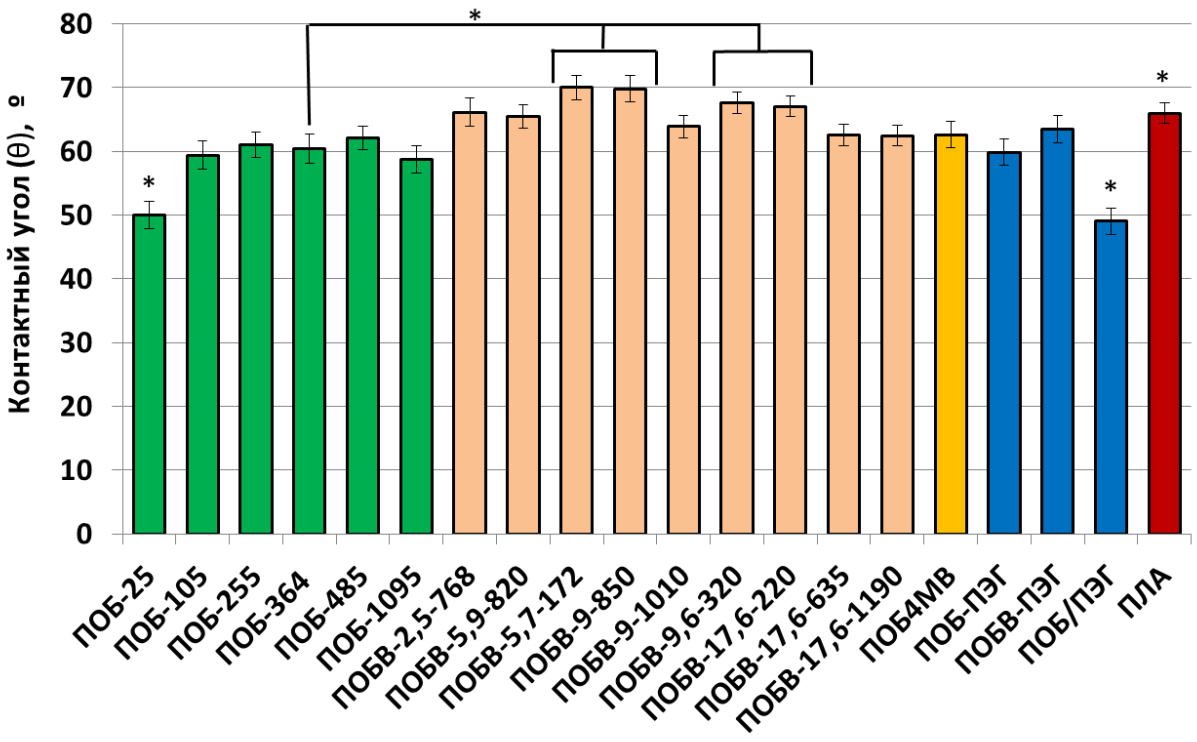


Рисунок 84. *Различная гидрофильность поверхности плёнок из ПОБ и его сополимеров по параметру контактного угла смачивания водой. * p <0,05 контактного угла смачивания водой пленок исследуемых полимеров в сравнении с этим параметром у ПОБ-364.*

И только при снижении ММ ПОБ до максимально низких значений (ММ = $2{,}5\times10^4$) эта зависимость проявляется, т.к. ПОБ-25 имеет большую гидрофильность поверхности. У сополимера ПОБВ-9-850 контактный угол смачивания равен 70°, что говорит о том, что при наличии ЗОВ в составе сополимера ПОБВ приводит к увеличению его гидрофобности.

В целом гидрофильность поверхности пленок исследуемых полимеров лежит как раз в интервале контактного угла смачивания водой от примерно 50º до 70º, который наиболее благоприятен для прикрепления и пролиферации культивируемых на полимерных поверхностях клеток различных типов: фибробластов мыши NIH/3T3 (50-60º), клеток остеосаркомы человека MG63 (64º), МСК человека и мыши (46-73º) (Dowling et al., 2010; Kim et al., 2007; Hao et al., 2014).

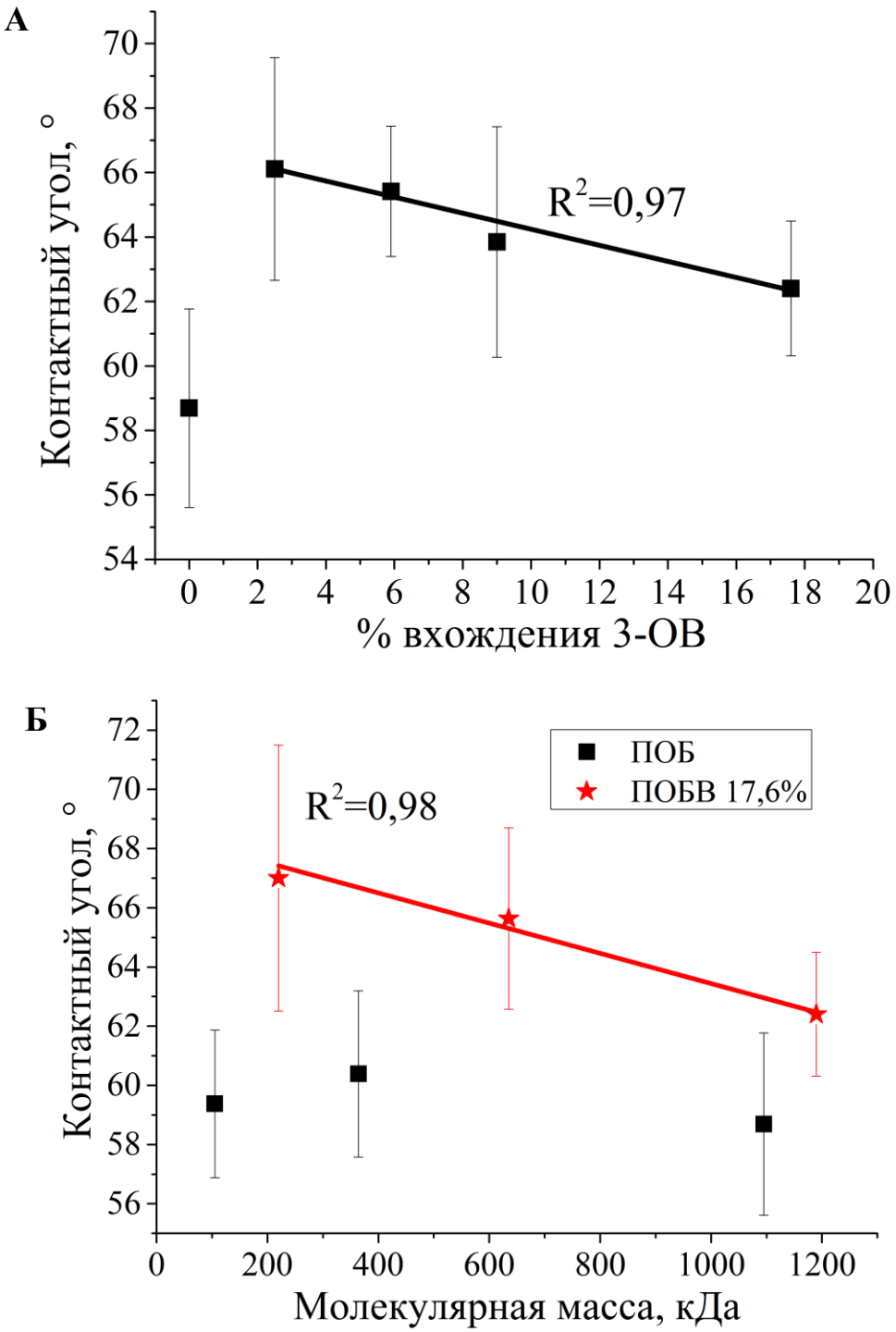


Рисунок 85. *Зависимость контактного угла смачивания водой ПОБ и ПОБВ от молярного содержания ЗОВ в составе высокомолекулярных полимеров (А) и от молекулярной массы ПОБ и ПОБВ с содержанием ЗОВ около 17,5 моль%, соответственно (Б).* R^2 *– квадрат коэффициента корреляции между данными и их аппроксимацией по линейной функции.*

Интересно, что у высокомолекулярных сополимеров ПОБВ наблюдается обратно-пропорциональная зависимость между содержанием 3ОВ в составе ПОБВ и контактным углом смачивания водой, т.е. при увеличении содержания 3ОВ возрастает гидрофильность поверхности полимеров, хотя гидрофильность гомополимера ПОБ все равно остается выше, чем у всех сополимеров (Рисунок 85). Также выявлена линейная зависимость между ММ полимера и его гидрофильностью у сополимеров ПОБВ с максимальным содержанием 3ОВ (около 17,5%) (Рисунок 85). Вероятно, наблюдаемый в целом более высокий уровень гидрофильности поверхности сополимеров ПОБВ может быть связан с диффузией воды в полимерную матрицу через ее аморфную фазу, а дальнейшее небольшое снижение гидрофильности поверхности сополимеров ПОБВ с увеличением молярного содержания 3ОВ может быть связана с увеличением доли боковых более длинных гидрофобных этильных групп по отношению к гидрофильным концевым карбоксильным группам полимера (Choi et al., 2004; Asrar and Gruys, 2002; Qu et al., 2006).

В Таблице 11 даны основные параметры гидрофильности ПОБ и его сополимеров: контактный угол смачивания водой, уровень водопоглощения, а также рассчитанные по данным контактного угла смачивания с другими жидкостями (ДЭГ, ТЭГ, ПЭГ 300) параметры общей свободной поверхностной энергии (СПЭ), ее дисперсной и полярной компоненты.

Из Таблицы 11 следует, что у биоПЭГилированного ПОБ значительно изменяются свойства гидрофильности полимера, что выразилось, прежде всего, в одновременно резком увеличении (в 4 раза) полярной компоненты при таком же падении (в 4 раза) дисперсной компоненты свободной энергии и общем повышении гидрофильности полимера. Вероятно, это снова связано со значительным непропорциональным воздействии звеньев ЭГ на структуру полимерной матрицы ПОБ, вероятно, не только из-за увеличения количества полярных атомов (кислорода), но и из-за изменения конформации полимерных цепей что могло привести к изменению распределения на поверхности полимерной пленки концевых полярных групп, а также ультраструктуры полимерной матрицы, что могло привести к изменению ее диффузионных свойств.

Следует отметить, что относительная гидрофобность ПОБ является его природным свойством, т.к. ПОБ является запасным веществом в бактериальной клетке, и его гидрофобность, как и в случае липидов, позволяет его накапливать изолированно в специальных гранулах. ПОБ и его сополимеры с другими 3-оксиалканоатами представляют собой идеальный резервный материал, т.к. благодаря гидрофобности и высокому молекулярному весу не вызывают увеличения осмотического давления в клетке (Dawes and Senior, 1973).

Таблица 11. *Свойства поверхности (контактный угол смачивания водой, свободная поверхностная энергия) полимерных пленок из ПОБ и его сополимеров (ПОБВ, ПОБ4МВ, ПОБ-ПЭГ, ПОБВ-ПЭГ) и композита ПОБ/ПЭГ.*

Образцы полимеров	Контактный угол смачивания водой (θ,°)		Общая СПЭ (γ_s, мДж/м^2)	СПЭ, дисперсная компонента (γ_s^d, мДж/м^2)	СПЭ, полярная компонента (γ_s^p, мДж/м^2)	Водопоглощение, (вес/вес, %)
	Поверхность пленки, обращенная к стеклу	Поверхность пленки, обращенная к воздуху	Поверхность пленки, обращенная к стеклу			
ПОБ-485	63,4 ±3,5	71,1 ±4,3	41,1	29,8	11,3	0,9
ПОБВ-5,7-172	70,2 ±2,1	77,7 ±2,6	45,2	17,7	27,5	2,8
ПОБ4МВ	75.1 ±1.1	83,4 ±1.9	33,7	20,2	13,5	3,3
ПОБ-ПЭГ	52,3 ±7,5	62,9 ±6,5	49,7	7,5	42,2	9,2
ПОБВ-ПЭГ	61.4 ±2.5	70,8 ±3.3	43,8	30.7	13.1	4,1
ПОБ/ПЭГ	49,7 ±1,9	68,3 ±3,0	58,6	6,5	52,1	28,6

(Совместно с лабораторией физики и технологии почв кафедры физики и мелиорации почв факультета почвоведения МГУ (ст.науч.сотр. Быкова Г.С., доцент Милановский Е.Ю., ст.науч.сотр. Тюгай З.Н.) и на оборудовании ЦКП МГУ).

С помощью метода ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованиями был также проведен анализ гидрофильных взаимодействий в полимерной матрице сополимеров ПОБ-ПЭГ и ПОБВ-ПЭГ полученного методом биотехнологического ПЭГилирования, в сравнении с исходными гомополимерами ПОБ различной ММ: 25 и 250 кДа. Вследствие чрезвычайно малых размеров, большого коэффициента диффузии ($D_W \approx 10^{-5}$ см^2/сек), а также высокой полярности, молекула воды может рассматриваться как специфический полярный зонд, чрезвычайно чувствительный к структурной организации полимера на молекулярном, кристаллическом и супрамолекулярном уровнях. Как уже было показано ранее (Раздел 3.1) данные ИК-спектроскопии ПОБ с низкой молекулярной массой (25 кДа) указывают на увеличение количества гидроксильных групп (Рисунок 55). Если рассматривать подробнее различные части ИК-спектра, то также видно, что у низкомолекулярного ПОБ появляются новые полосы 1043 см$^{-1}$ и 1261 см$^{-1}$ от С–ОН и С(О)–ОН групп, соответственно (Рисунок 86), а полоса, указывающая на группу С=О оказывается

смещена в более длинноволновую область, что указывает на увеличение числа концевых карбоксильных групп.

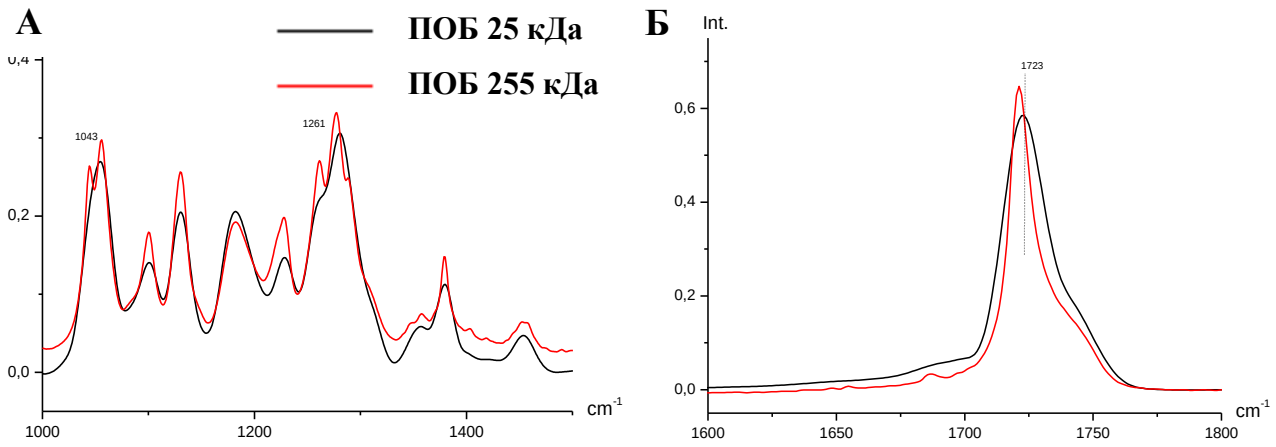


Рисунок 86. *Сравнение ИК-спектров ПОБ со средней ММ (255 кДа) и низкой ММ (25 кДа) в областях поглощения связей С-О (А) и С=О (Б). (Совместно с проф. ИНХС РАН Бондаренко Г.Н. и на оборудовании Института).*

Теперь рассмотрим, к каким изменениям в межмолекулярном взаимодействии ПОБ приводит его биоПЭГилирование. На Рисунке 87 приведено сравнение спектров образцов сополимеров ПОБ-ПЭГ и ПОБВ-ПЭГ со спектром гомополимера ПОБ-250 и самого ПЭГ. Качественно спектры всех трех образцов идентичны и не имеют спектральных проявлений ПЭГ. Однако, детализация отнормированных спектров в области поглощения связей -CH (Рисунок 87) показывает, что полоса валентных колебаний связей -CH_2 в спектре ПЭГ –2875 $см^{-1}$ проявляется в спектрах образцов ПОБ-ПЭГ и ПОБВ-ПЭГ.

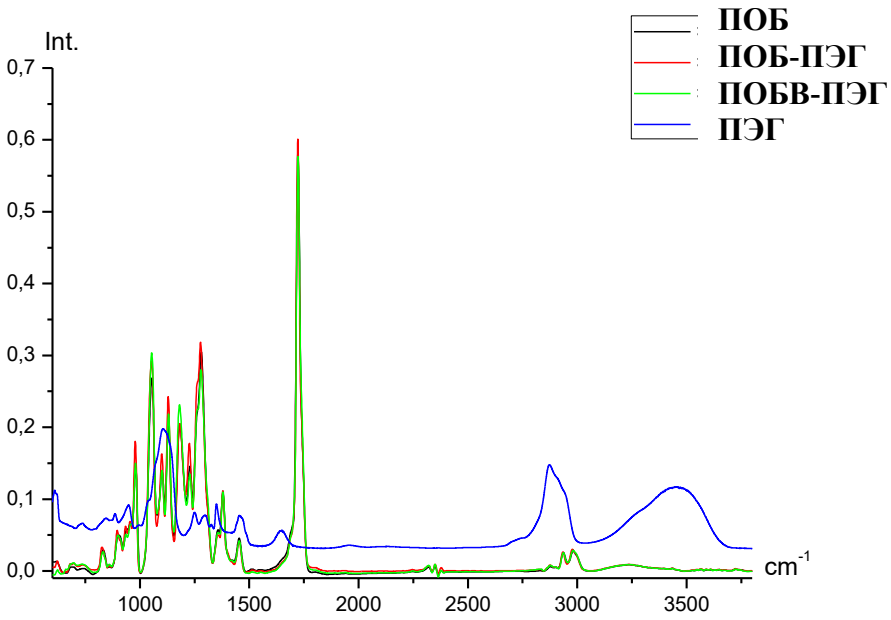


Рисунок 87*. Отнормированные ИК-спектры образцов ПОБ, ПОБ-ПЭГ, ПОБВ-ПЭГ в сравнении со спектром ПЭГ. (Совместно с проф. ИНХС РАН Бондаренко Г.Н. и на оборудовании Института)*

Об этом же свидетельствует увеличение интенсивности полос 1129 и 1000 $см^{-1}$ в спектрах образцов ПОБ-ПЭГ и ПОБВ-ПЭГ по сравнению со спектром образца ПОБ, поскольку именно в этой области лежит очень интенсивная полоса 1107 $см^{-1}$ С-О связей в спектре ПЭГ. Т.е. очень небольшое количество ПЭГ (в пределах 1 %) присутствует в образцах ПОБ-ПЭГ и ПОБВ-ПЭГ. Однако, -ОН связи от ПЭГ в спектрах этих образцов не проявляются (Рисунок 88Б).

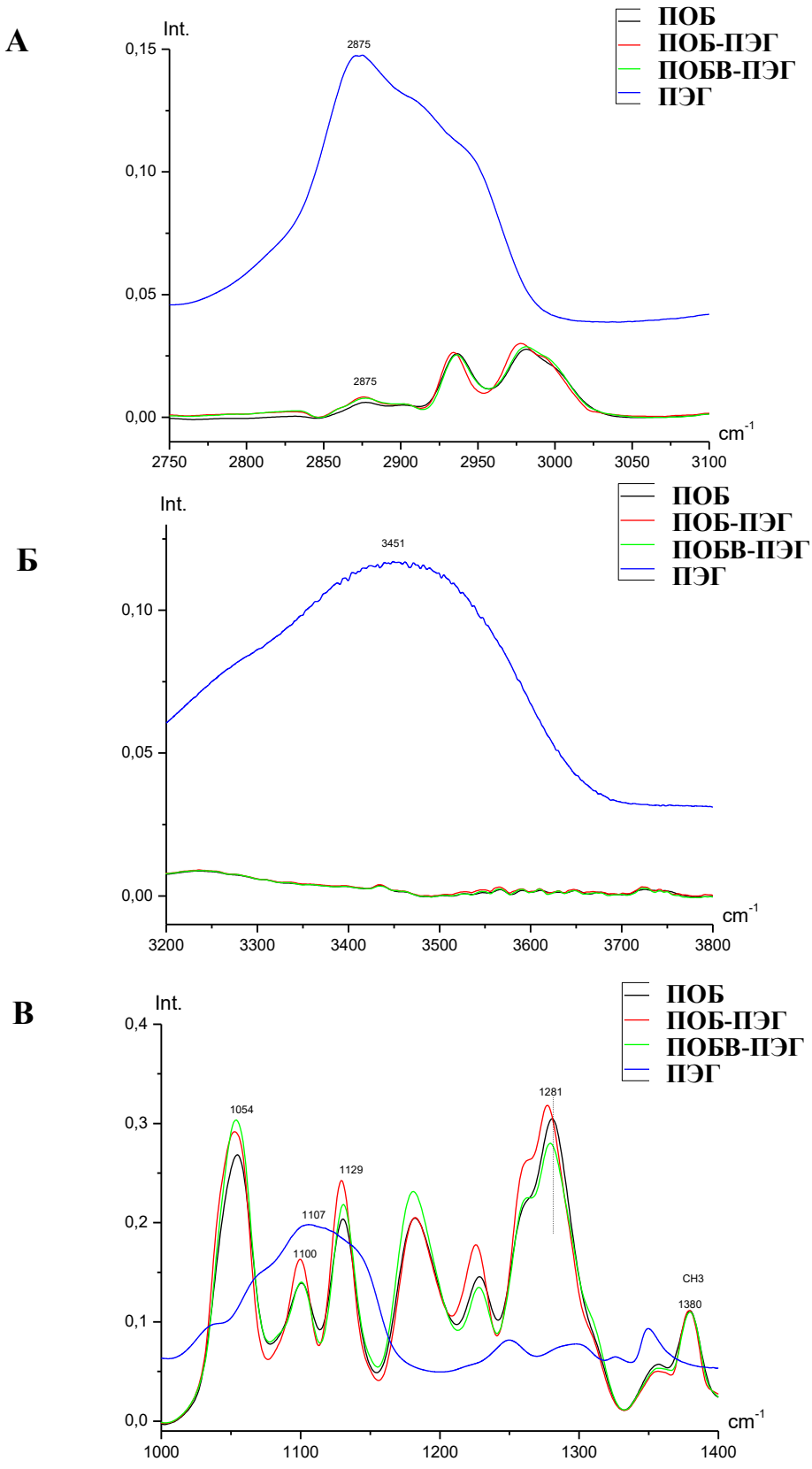


Рисунок 88. *Отнормированные спектры образцов ПОБ, ПОБ-ПЭГ, ПОБВ-ПЭГ в сравнении со спектром ПЭГ в области поглощения связей –CH (А), –OH (Б) и C=O (В). (Совместно с проф. ИНХС РАН Бондаренко Г.Н. и на оборудовании Института).*

Это, скорее всего, может быть связано с тем, что вошедший в полимер в ничтожно малых количествах ПЭГ ассоциируется через –ОН группы водородными связями с кислородными атомами ПОБ. На это указывают сдвиги и изменения интенсивностей полос от С–О связей ПОБ (Рисунок 88 В). В результате такой ассоциации полосы от –ОН групп ПЭГ сильно уширятся и перестанут проявляться в спектре.

Анализ ИК-спектров ПОБ-ПЭГ не исключает возможность образования циклических структур, где вода встраивается в фрагмент макромолекулы полиэфира, образуя систему водородных связей. Молекулы воды, включенные в циклические структуры прочно иммобилизованы вблизи функциональных групп сополимера системой водородных связей и не принимают участие в диффузионном переносе, также как не способны участвовать в дейтериевом обмене даже при повышенных температурах (до 60 °С). Образование сетки водородных связей в матрице ПЭГилированных полимеров способствует более совершенной ориентации кристаллитов и, следовательно, к возрастанию термостабильности сополимеров.

Лишь в нескольких работах приводятся данные о химическом ПЭГилировании ПОА. Методом электроформования были получены композиты ПОБВ (12% ОВ, ММ 690000) и высокомолекулярного ПЭГ – полиэтиленоксида (ПЭО) (ММ 100000 Да) с различным соотношением компонентов: 80:20, 70:30, 50:50, вес.%, соответственно. Показано, что полученные электроформованные маты из композитов ПОБВ/ПЭО построены из тонких полимерных нитей, случайно ориентированных, равномерно распределенных и без грушевидных дефектов с микроструктурой, сильно зависящей от полимерного состава композита. Морфология и физико-химические свойства композиционных электроформованных матов свидетельствует об их преимущественно двухкомпонентной организации, т.е. ПОБВ и ПЭО в композите остаются в основном в несмешанном состоянии, хотя в какой-то степени смешение все-таки происходит. Так, если маты из самого ПОБВ и композита ПОБВ/ПЭО 80:20 состоят из нитей примерно одного диаметра (2.6±0.6 мкм), а маты из ПОЭ состоят из нитей субмикронного размера (0.24±0.04 мкм), то диаметр нитей матов из других композитов ПОБВ/ПЭГ носит бимодальный характер распределения. Более высокая шероховатость поверхности нитей из композитов ПОБВ/ПЭО по сравнению с нитями матов из ПОБВ и ПЭО и выраженно текстурированная структура нитей из композита ПОБВ/ПЭО 50:50 также может свидетельствовать о двухкомпонентной организации композитов (Bianco et al., 2013).

Был получен три-блок сополимер из ПОБ бактериального происхождения и функциализированного мПЭГ-СООН (ММ = 4900 Да). Для этого был сначала из высокомолекулярного природного ПОБ получен низкомолекулярный ПОБ-диол (ММ = 2300 Да) методом трансэтерификации со спиртами, после чего ПЭГ, функционализированных

карбоксильной группой, был присоединен к обоим концам ПОБ-диол. Был также получен конъюгат полученного три-блок-сополимера с флуорофором индоцианином зеленым. Затем были получены мицеллы из смеси синтезированного три-блок-сополимера ПЭО-ПОБ-ПЭО (и его конъюгата с флюорофором) и плюроника F-127 (PEO100-PPO65-PEO100, ММ = 12600). Показано, что полученные мицеллы из ПЭО-ПОБ-ПЭО и его смесей с плюроником F-127 стабильны и образуют нитевидные структуры, что, как предполагают авторы, связано с кристаллической структурой ПОБ. Получение мицелл из смеси конъюгата сополимера с флюорофором и плюроника стабилизировало в растворе также конъюгированный к сополимеру флюорофор (Kim et al., 2012). Т.е. химический синтез сополимера низкомолекулярного ПОБ с высокомолекулярным ПЭГ кардинальным образом изменило свойства полимера, создав амфифильный (преимущественно гидрофильный) полимер, способный в растворе образовывать мицеллы, хотя склонность ПОБ к образованию кристаллических надмолекулярных структур, тем не менее, сохранилась.

Методами химического синтеза из поли-3-оксибутирата-ко-4-оксибутирата (ПОБ4ОБ) (10 мол.% 4ОБ) бактериального происхождения и ПЭГ 400 были получены 2 серии сополимеров ПОБ4ОБ и ПЭГ: чередующиеся (альтернативные) сополимеры и случайно-распределенные блок-сополимеры с соотношением ПОА и ПЭГ примерно 50:50 и молекулярной массой от 21 до 54 кДа. Химический синтез был осуществлен через промежуточное получение предшественника полимера - низкомолекулярного ПОБ4ОБ-диола ($ММ_{мол.}$ = 900) и с использованием связующих агентов. Исследование морфологии поверхности полимерных пленок сополимеров методом СЭМ показало, что чередующиеся ПОБ4ОБ-ПЭГ демонстрируют регулярную микроструктуру, зависимую от длины цепи сополимера, с участками в форме цветка (Li et al., 2012).

Этой же научной группой на основе ПОБ4ОБ с различным молярным содержанием 4ОБ (5%, 10%, 20%) был осуществлен синтез чередующихся сополимеров ПОА с ППГ-ПЭГ-ППГ (750-1200-750) с различной длиной сегмента ПОА. Химический синтез был также осуществлен через промежуточное получение предшественника –низкомолекулярного ПОБ4ОБ-диола ($ММ_{мол.}$ = от 1700 до 5700) и с использованием связующих агентов (Li et al., 2011).

Этой же научной группой на основе ПОБГк (молярное содержание 3ОГк 12%, ММ = 352 кДа) был осуществлен синтез блок-сополимера ПОА с ПЭГ (3400 и 2000) с различным соотношением полимерных сегментов и молекулярной массой. Химический синтез был проведен в расплаве полимерных компонентов через предварительное получение промежуточного предшественника полимера – низкомолекулярного ПОБГк-диола ($ММ_{мол.}$ = 2400 и 5500) и с использованием связующих агентов (Li et al., 2009).

Рассмотрев гидрологические и механические свойства ПОБ и его сополимеров, мы снова должны возвратиться к проблеме организации его частично кристаллической структуры. Хотя в цели настоящего исследования это не входило и было исследовано ранее, следует отметить, что кристалличность ПОБ, полученного из расплава и ПОБ, высаженного из раствора, например, в хлороформе, различаются значительным образом. Нагревание, а тем более, плавление полимера вызывают повышение степени его кристалличности, иногда до свыше 85% (Aoyagia et al., 2003). Между тем, в естественном состоянии в бактериях ПОБ находится в ПОБ-содержащих гранулах не в кристаллическом, а в аморфном состоянии (Barnard and Sanders, 1989). Было показано, что аморфное состояние поддерживается в значительной мере за счет пластифицирующей роли воды, которая в небольших количествах (5-10%) присутствует в нативных гранулах ПОБ (Barnard and Sanders, 1989; Harrison et al., 1992). Удаление воды из таких нативных ПОА-гранул приводит к тому, что полимерные цепи образуют ламеллярно-кристаллическую структуру (Lauzier et al., 1992). Предположительно, мобильное аморфное состояние ПОБ *in vivo* поддерживается благодаря формированию молекулами воды водородных связей между карбонильными группами полиэфирных цепей и образованию благодаря этому сшивок между соседними полимерными цепями, препятствующими их укладке в ламеллярные структуры. Но подобная пластифицирующая способность воды проявляется и для полимерных изделий (тех же пленок), высаженных из раствора, т.е. имеющих не очень высокую степень кристалличности. Образцы полимера, высаженные из раствора, обладают наноструктурой, способствующей при помещении их в водную среду диффузии воды в толщу полимерной матрицы, пластифицируя тем самым полимер подобно тому (правда, в очень малой степени), как это происходит в ПОА-гранулах бактерий, что будет показано нами далее в Разделе 3.4 (Iordanskii et al., 2006; Zhuikov et al., 2017а; Zhuikov et al., 2017б; Zhuikov et al., 2017в). Пластифицирующий эффект воды был показан и другими исследователями. Так, инкубация ПОБ в воде в течение 7 сут. приводит к снижению жесткости полимера и повышению его пластичности (Kehail et al., 2017).

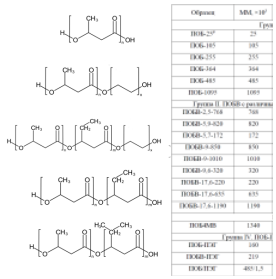
Таким образом, анализ физико-химических свойств биоПЭГилированных сополимеров ПОБ и ПОБВ показал, что при очень низком молярном содержании ЭГ (например, 0,33% у ПОБ-ПЭГ) у этих полимеров происходит непропорционально большое изменение всех основных физико-химических свойств: термофизических, механических и гидрофильности, что как было показано ранее сопровождается значительным изменением структуры полимерной матрицы этого сополимера. Для сополимера ПОБВ-ПЭГ эти различия не столь выражены, что, вероятно, связано как с меньшим содержанием ПЭГ, так и значительным влиянием на физико-химические свойства мономеров 3ОВ.

Как объект для дальнейших исследований биотехнологической сополимеризации ПОБ на его биологические свойства сополимер ПОБ-ПЭГ нам интересен по нескольким причинам. Во-первых, как результат самого метода биоПЭГилирования, где в качестве модифицирующего природный полимер ПОБ, в отличие от использования карбоновых кислот, был выбран синтетический полимер ПЭГ. Т.е. в данном случае речь идет о биотехнологической денатурализации природного биополимера, что является довольно оригинальным инструментом для проведения комплексного исследования влияния подобной денатурализации на свойства биополимера, прежде всего, его биосовместимости и биологической активности. Особенно актуальным этот выбор становится после выяснения показанного в этом разделе непропорционально значительного влияния биоПЭГилирования на физико-химические свойства ПОБ. Кроме того, ПОБ-ПЭГ из всех рассматриваемых полимеров обладает наибольшей гидрофильностью.

Следует отметить, что увеличение гидрофильности может положительно сказаться на росте клеток на таких поверхностях, так как клетки предпочитают более гидрофильные поверхности (Altankov et al., 1996; Hezi-Yamit et al., 2009; Jacobs et al., 2013; Valamehr et al., 2008). По другим данным, гидрофильность поверхности биоматериалов не влияет существенным образом на его биосовместимость, а основное влияние оказывает химический состав материала (Eriksson et al., 2004; Lavenus et al., 2011). Существует также теория, согласно которой гидрофильность полимерной поверхности, если ее оценивать по контактному углу смачивания водой, имеет определенные пределы, внутри которых прикрепление и рост клеток благоприятны. Если же поверхность полимера обладает данным параметром за этими пределами (выше их или ниже), то прикрепление и рост клеток резко снижается, и при этом уже не зависит от гидрологических свойств полимера. В связи с этим, для проведения биологических исследований нами был выбран сополимер ПОБ-ПЭГ.

Таким образом, результаты, описанные в Разделах 3.2 и 3.3 позволили создать экспериментальную модель исследования взаимосвязи надмолекулярной структуры полимера с его физико-химическими свойствами (Рисунок 89). Основным объектом изучения модели является полимерные стандартные и ультратонкие пленки из синтезированного ПОБ и его сополимеров с заданными свойствами. Основными входными параметрами модели являются молекулярная масса синтезируемых полимеров и содержание мономеров в полимерной цепи. Основными выходными параметрами модели являются параметры морфологии поверхности (в т.ч. надмолекулярных структур), термофизические свойства (степень кристалличности, температура плавления), механические свойства (модуль Юнга, удлинение на разрыв), гидрофильность (контактный угол смачивания, водопоглощение).

Данные экспериментальной модели биотехнологического получения ПОБ и его сополимеров



Образец	ММ, ×10³
Группа I. ПОБ различной ММ	
ПОБ-25*	25
ПОБ-105	105
ПОБ-255	255
ПОБ-364	364
ПОБ-485	485
ПОБ-1095	1095
Группа II. ПОБ с различным молярным содержанием ЗОВ и различной ММ	
ПОБВ-2,5-768	768
ПОБВ-5,9-820	820
ПОБВ-5,7-172	172
ПОБВ-9-850	850
ПОБВ-9-1010	1010
ПОБВ-9,6-320	320
ПОБВ-17,6-220	220
ПОБВ-17,6-635	635
ПОБВ-17,6-1190	1190
ПОБ4МВ	1340
Группа IV. ПОБ-ПЭГ, ПОБВ-ПЭГ и композит ПОБ-ПЭГ	
ПОБ-ПЭГ	160
ПОБВ-ПЭГ	219
ПОБ/ПЭГ	485/1,5

ПОБ и его сополимеры различной ММ и мономерного состава

метод высаживания полимерных пленок из раствора, спин-коатинг



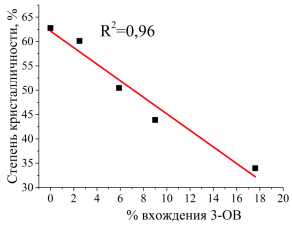
Стандартные и ультратонкие пленки

АСМ, СЭМ, ДСК, наноиндентация, измерение контактного угола смачивания водой и водопоглощения

Образец	ММ, ×10³	T_c, °C	T_m, °C	E, ГПа	X_c, %	Контактный угол, °
Группа I. ПОБ различной ММ						
ПОБ-25*	25	-	142/159	-	66	50
ПОБ-105	105	74	152/168	2,2	66	59
ПОБ-255	255	-	161/181	1,5*	68	61
ПОБ-364	364	87	159/176	2	65	60
ПОБ-485	485	-	156/178	1,7*	63	63
ПОБ-1095	1095	80	154/170	2,2	63	59
Группа II. ПОБВ с различным молярным содержанием ЗОВ и различной ММ						
ПОБВ-2,5-768	768	88	157/170	1,3	60	66
ПОБВ-5,9-820	820	81	155/167	0,9*	51	65
ПОБВ-5,7-172	172	-	151/175	0,8	50	70
ПОБВ-9-850	850	77	151/165	1,3	47	70
ПОБВ-9-1010	1010	70	155/166	1,0	44	64
ПОБВ-9,6-320	320	60	134/149	1,4	41	68
ПОБВ-17,6-220	220	75	149/162	1,2	42	67
ПОБВ-17,6-635	635	74	151/166	0,7	41	63
ПОБВ-17,6-1190	1190	69	154/169	0,4	34	62
Группа III. ПОБ4МВ						
ПОБ4МВ	1340	73	145/157	1,3	49	63
Группа IV. ПОБ-ПЭГ, ПОБВ-ПЭГ и композит ПОБ-ПЭГ						
ПОБ-ПЭГ	160	-	157/178	0,8*	59	52
ПОБВ-ПЭГ	219	75	153/175	2,0	60	63
ПОБ/ПЭГ	485/1,5	-	159/172	0,4*	56	49

База данных по параметрам морфологии и физико-химическим свойствам стандартных образцов ПОБ и его сополимеров

Математическая обработка базы данных



Закономерности взаимосвязи надмолекулярной структуры полимера с его физико-химическими свойствами

Надмолекулярный уровень организации живых систем

Использование полученных данных для других моделей

Рисунок 89. *Схема экспериментальной модели исследования взаимосвязи надмолекулярной структуры полимера с его физико-химическими свойствами.*

Используемые методики: метод высаживания полимерных пленок из раствора, спин-коатинг, АСМ, СЭМ, ДСК, наноиндентация, контактный угол смачивания водой, водопоглощение. Уровень происходящих процессов с точки зрения организации живого – надмолекулярный. Временной масштаб экспериментальной модели отсутствует – условия статические. Основная задача экспериментальной модели – установление закономерностей взаимосвязи молекулярной структуры, надмолекулярной структуры и физико-химических свойств ПОБ и его сополимеров. Моделируемый идеальный биообъект модели - частично-кристаллические биополимеры.

Анализ кристалличности поли-3-оксибутирата является основной задачей для этой модели, т.к. кристалличность этого полимера определяет все прочие его свойства. ПОБ, будучи частично кристаллическим биополимером, обладает способностью образовывать различные надмолекулярные структуры: ламели (в виде параллельных полос шириной от 11 до 40 нм) в стандартных пленках и кристаллические наноструктуры из них более высокого порядка, такие как двумерные сплошные и разветвленные водорослевидные сферолиты (высотой 4,5±0,5 нм) в ультратонких пленках. Сополимер ПОБ-ПЭГ, полученный методом биоПЭГилирования, менее склонен к образованию кристаллических наноструктур, его кристаллическая компонента проявлялась также в виде отдельных протяженных ламелей (от 0,7±0,1 до 1,5±0,3 нм высотой). Степень кристалличности ПОБ не зависит от его молекулярной массы, тогда как степень кристалличности сополимера ПОБВ линейно зависит как от молярного содержания 3-оксивалерата в сополимере, так и от молекулярной массы полимера. Модуль Юнга ПОБ также не зависит от его молекулярной массы, тогда как модуль Юнга сополимера ПОБВ обратно пропорционален молярному содержанию 3-оксивалерата в сополимере и его молекулярной массе. Гидрофильность поверхности (по контактному углу смачивания водой) ПОБ также не зависит от его молекулярной массы, тогда как гидрофильность поверхности сополимера ПОБВ прямо пропорциональна молярному содержанию 3-оксивалерата в сополимере и его молекулярной массе. Сополимер ПОБ-ПЭГ, полученный методом биоПЭГилирования, содержащий лишь 0,33 моль% звеньев этиленгликоля, значительно отличается от гомополимера по своим физико-химическим свойствам: обладает меньшей кристалличностью, меньшей жесткостью и пластичностью, большей гидрофильностью. Эта экспериментальная модель позволяет прогнозировать физико-химические свойства полученных полимеров для их использования на более высоких уровнях экспериментального исследования.

Раздел 3.4. Исследование биодеградации ПОБ и его сополимеров *in vitro*

3.4.1. Изменение массы пленок ПОБ и его сополимеров в процессе их биодеградации *in vitro*

Биодеградация ПОА происходит в результате сочетания гидролитического и ферментативного процессов разложения полимера. Это приводит к изменению массы образцов и их физико-химических свойств (Hocking et al., 1996; Ray and Okamoto, 2003; Khanna and Srivastava, 2005; Rasal et al., 2010; Zhuikov et al., 2020). Для проведения этого исследования были разработаны модели гидролитической и ферментативной деградации *in vitro*. В качестве фермента мы использовали липазу поджелудочной железы как один из важнейших ферментов, участвующих в разложении ПОА в тканях человеческого тела. В ходе разработки ферментативной деградации, был проведен, в частности, подбор концентрации панкреатической липазы в буферном растворе и подобраны временные точки для расчета кинетики изменения молекулярной массы полимеров (Zhuikov et al., 2020).

Внешний вид пленок из ПОБ и его сополимеров в ходе гидролитической и ферментативной деградации in vitro в течение 6-ти месяцев практически не изменился за исключением только полимера с минимальной ММ, который был использован в этом исследовании – ПОБ-105, пленки из которого через 6 месяцев гидролитической и ферментативной деградации распались на несколько частей.

В эксперименте по сравнению кинетики гидролитической и ферментативной деградации ПОБ (ПОБ-255), ПЛА и их композита ПОБ/ПЛА (50:50) (Рисунок 90) наибольшая потеря массы пленок ПОБ и ПЛА происходила в течение первой недели, после чего изменение массы пленок выходило на плато, тогда как масса композитных пленок из ПОБ/ПЛА уменьшалась постепенно в течение 1,5 месяцев. Было показано, что масса пленок из ПЛА и ПОБ/ПЛА при ферментативной деградации падала в большей степени, чем в условиях неферментативной гидролитической деградации. Однако, в случае ПОБ потеря массы для обоих типов деградации была примерно одинаковой. Примечательно, что масса пленок из ПОБ/ПЛА упала гораздо более значительно по сравнению со всеми полимерными пленками (до 35%) после ферментативной деградации в течение 1,5 месяцев, хотя на других промежуточных временных точках падение массы ПЛА было более значительным. Значительно большая потеря массы ПЛА по сравнению с ПОБ при гидролитической деградации соответствует литературным данным, согласно которым ПЛА гораздо более чувствителен к гидролитическому расщеплению (Tokiwa et al., 1977; Koyama et al., 1995)

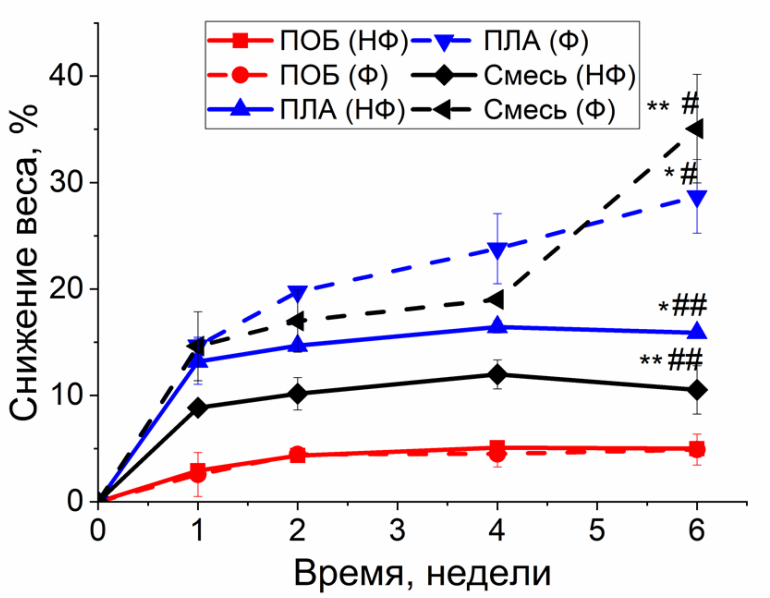


Рисунок 90. *Динамика изменения массы полимерных пленок из композита ПОБ/ПЛА в сравнении с ПОБ (ММ = 255 кДа) и ПЛА в ходе гидролитической неферментативной (НФ) и ферментативной (Ф) деградации in vitro. * p < 0,05 ПЛА (Ф) в сравнении с ПЛА (НФ); ** p < 0,05 ПОБ/ПЛА (Ф) по сравнению с ПОБ/ПЛА (НФ); # p < 0,05 ПЛА (Ф) и ПОБ/ПЛА (Ф) в сравнении с ПОБ (Ф); ## p < 0.05 ПЛА (НФ) и ПОБ/ПЛА (НФ) в сравнении с ПОБ (НФ).*

Анализ кинетических кривых деградации (Рисунок 91) показал, что как при инкубации в буферном растворе без добавления в него фермента, так и в буферном растворе с панкреатической липазой масса всех исследуемых образцов полимерных пленок уменьшалась на несколько процентов в течение уже первой недели. Однако затем изменения массы пленок (за исключением нескольких образцов) практически не происходило – их масса не уменьшилась более чем на 8% от исходной массы, что указывает на довольно медленную гидролитическую и ферментативную деградацию *in vitro*. Масса пленок ПОА, инкубируемых в буферном растворе как без липазы, так и с липазой, не изменялась значительно даже через 180 дней. Самая большая потеря (примерно 8–10%) массы пленок наблюдалось для низкомолекулярного ПОБ-105 и высокомолекулярных сополимеров ПОБВ-17,6%-1190 и ПОБВ-9%-1010. Кинетика изменения массы пленок из других полимеров, например, ПОБ-255 и ПОБ-ПЭГ, значительно не различалась. Другие исследователи также отмечали небольшое падение массы полимерных пленок при их инкубации в буферном растворе при 37°C (Han et al., 2017). По-видимому, потеря массы полимерных пленок в начальный период времени связан с высвобождением низкомолекулярных его фракций (в т.ч. олигомеров) из аморфной фазы полимерной матрицы, а в дальнейшем уже потеря массы пленок происходит собственно за счет расщепления полимерных цепей (Zhuikov et al., 2021).

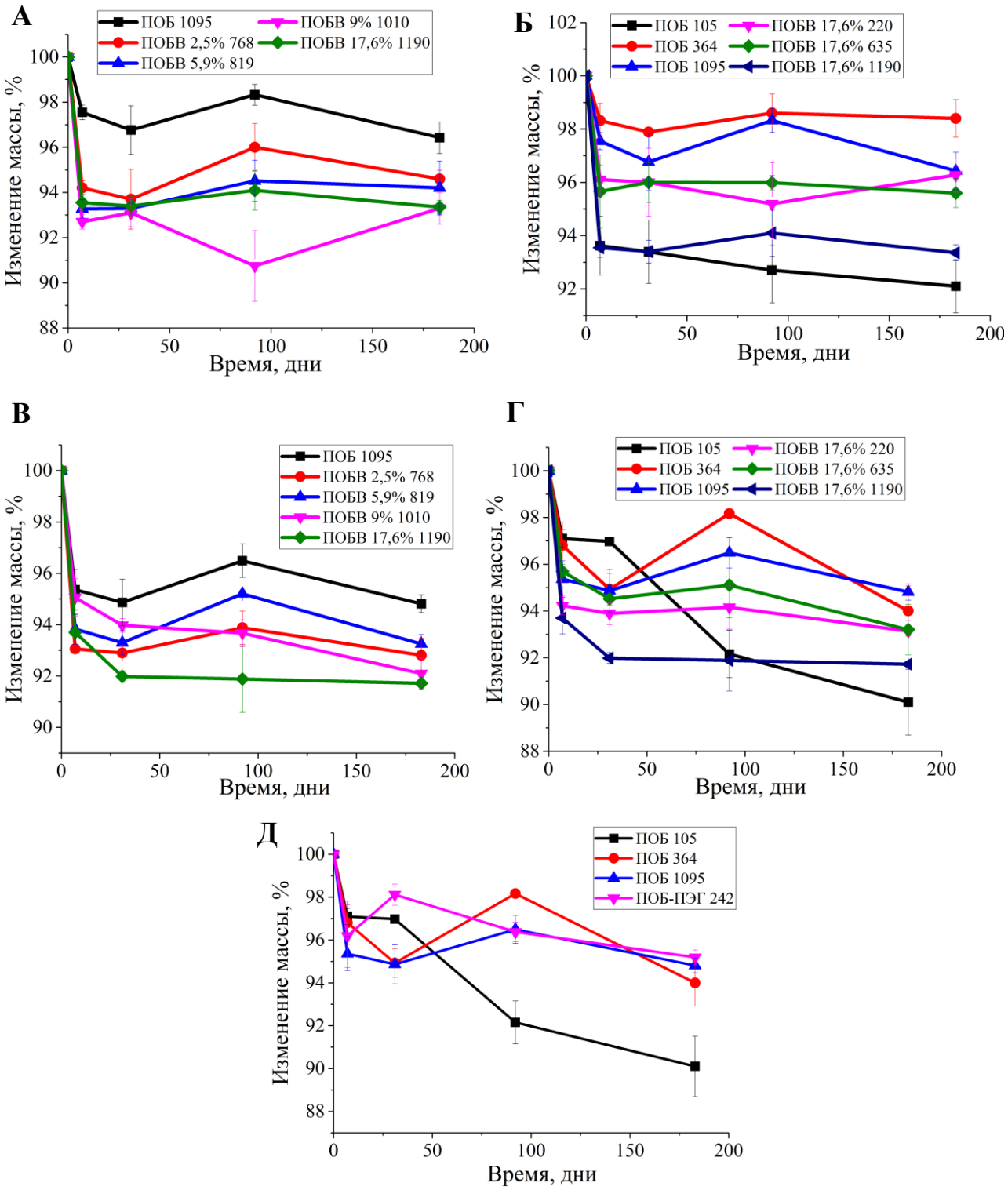


Рисунок 91. *Динамика изменения массы полимерных пленок из высокомолекулярных ПОБ и его сополимера ПОБВ с различным содержанием 3-ОВ (А, В), ПОБ и ПОБВ (с 17,6% содержанием 3-ОВ) с различной ММ (Б, Г), сополимера ПОБ-ПЭГ в сравнении с ПОБ с различной ММ (Д) и композита ПОБ/ПЛА в сравнении с ПОБ (ММ = 255 кДа) и ПЛА в ходе гидролитической (А, Б) и ферментативной (В, Г, Д) деградации in vitro.*

В течение первой недели наблюдалась наибольшая потеря массы всех образцов полимерных пленок, независимо от присутствия липазы в растворе. Чтобы определить природу потери массы полимеров, были исследованы продукты разложения полимерных пленок в деионизованной воде с использованием метода динамического светорассеяния. Согласно данным измерений в первую неделю, частицы продуктов разложения полимерных пленок было трудно обнаружить в воде из-за их низкой концентрации (особенно для ПЛА) (Рисунок 92А,Б,В). Следует отметить, что низкая концентрация продуктов разложения может снизить точность измерения их размера. Наибольшая концентрация достигается только у ПОБ, что соответствует нашим результатам, что объясняет наибольшее падения молекулярной массы ПОБ за первую неделю гидролитической деградации пленок из ПОБ (см. ниже). Тем не менее, для образца пленок ПОБ можно было увидеть один относительно узкий пик при 205 нм, образец пленок ПЛА имел два пика, тогда как образец пленок из композита ПОБ/ПЛА обладал широким пиком с относительно большой долей крупных частиц, что согласуется с данными о потере массы полимеров в первую неделю их неферментативной деградации. В дополнительном эксперименте было показано, что за три дня инкубации пленок ПОБ в воде обнаруживаются частицы размером 75-200 нм. Размер частиц в 200 нм близок тому, что были обнаружены после первой недели инкубации ПОБ – 205 нм. За такое время полимеры такого химического строения не успевают подвергнуться процессу разложения из-за своей гидрофобности, поэтому наиболее верное объяснению данного факта заключается в вымывании олигомеров и несвязанного полимера из объема полимерной матрицы пленки.

Однако, через 2 недели инкубации полимерных пленок в воде появляется возможность детектировать наночастицы более надежно, т.к. значительно возросшая их концентрация в воде позволяла это делать.

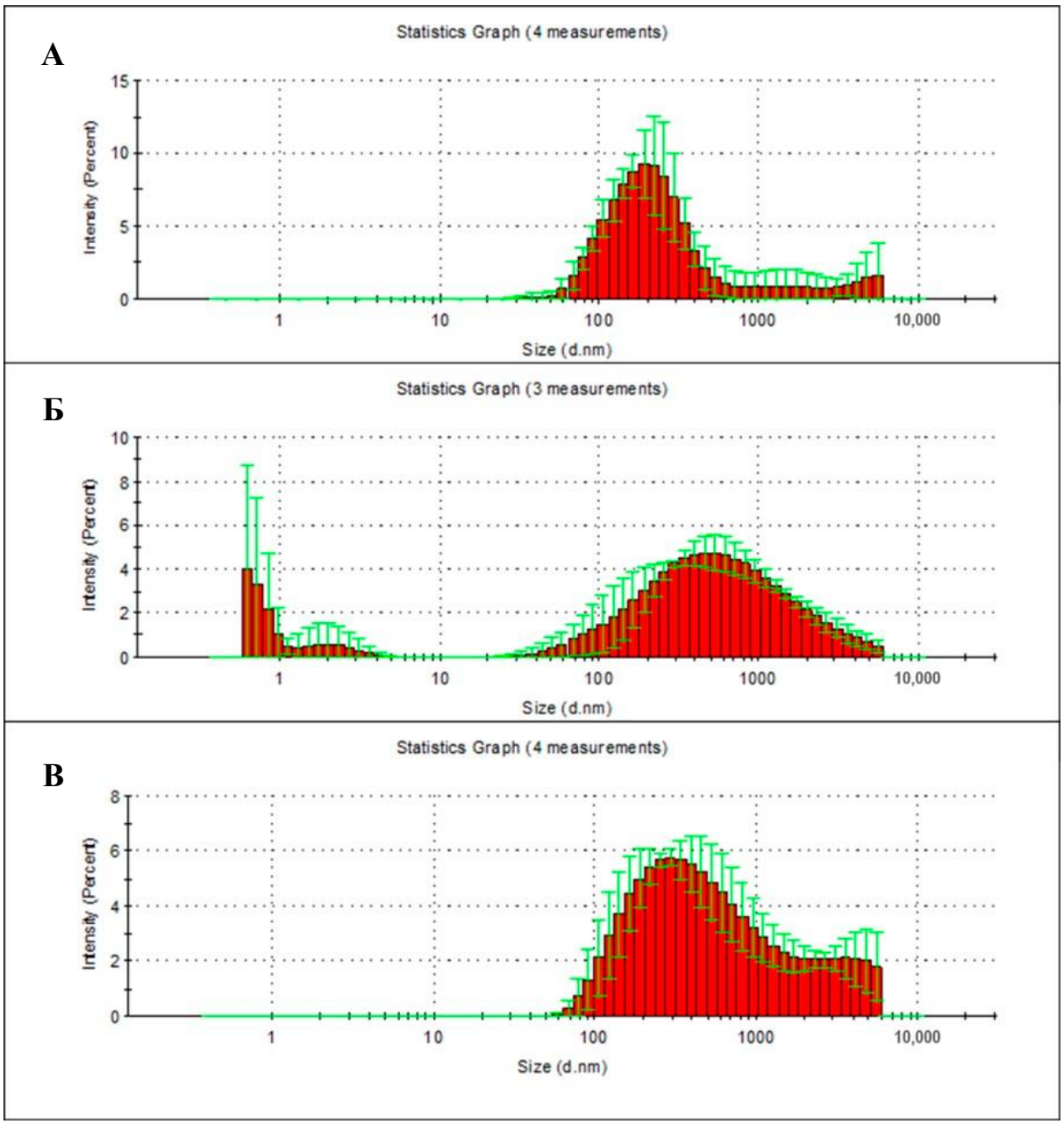


Рисунок 92. *Распределение по размерам продуктов гидролитической деградации пленок из ПОБ (А), ПЛА (Б) и ПОБ/ПЛА (В) после инкубации в деионизованной воде в течение одной недели. Данные представлены в формате среднее ±SD. (Выполнено совместно с ст.науч.сотр. кафедры биофизики Паршиной Евгенией Юрьевной на оборудовании ЦКП МГУ).*

На второй неделе наблюдались четкие пики продуктов разложения ПОБ в виде полимерных частиц с относительно широким распределением по их диаметру и со следующими максимумами диаметра: 3, 10, 340 и 5500 нм (предел измеренных значений); для ПЛА: 0,9, 300 и 5500 нм (предел измеренных значений); и для композита ПОБ/ПЛА: 4,1, 340–530 и 5500 нм (предел измеренных значений) (Рисунок 93А,Б,В).

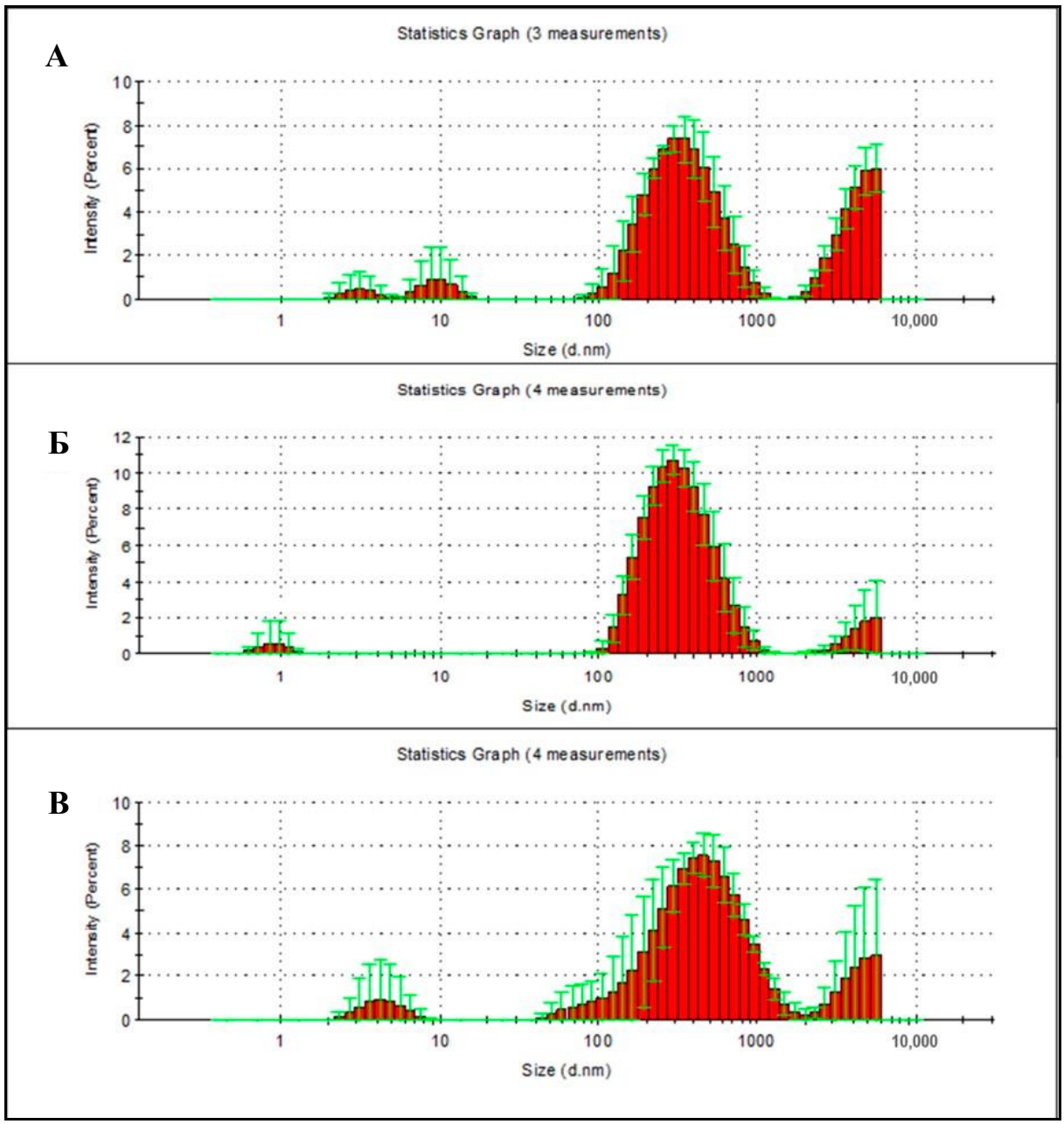


Рисунок 93. *Распределение по размерам продуктов гидролитической деградации пленок из ПОБ (А), ПЛА (Б) и ПОБ/ПЛА (В) после инкубации в деионизованной воде в течение 2-х недель. Данные представлены в формате среднее ±SD.* (*Выполнено совместно с ст.науч.сотр. кафедры биофизики Паршиной Е.Ю. на оборудовании ЦКП МГУ).*

Наибольшие концентрации соответствуют частицам размером 340 нм для ПОБ, 300 нм для ПЛА и 340-530 нм для композита ПОБ/ПЛА. В течение двух недель инкубации полимер начинает частично гидролизоваться, поэтому фракция частиц увеличивается и появляются частицы с пиком диаметра около 10 нм. Крупные же частицы, более 5500 нм, являются артефактом недостаточно качественного центрифугирования, а также той начальной фракцией полимера, из которой образуются более мелкие наночастицы.

3.4.2. Изменение молекулярной массы пленок ПОБ и его сополимеров в процессе их биодеградации *in vitro*

Молекулярная масса - одно из ключевых свойств полимеров. Уменьшение молекулярной массы является одним из наиболее значимых параметров, характеризующих процесс деградации полимера. Значение молекулярной массы природных ПОА может быть запрограммирована в ходе контролируемого бактериального биосинтеза и путем химической обработки полученного полимера (Khandal et al., 2015). Изменению молекулярной массы при биодеградации полимеров уделяется столь значительное внимание, поскольку она сильно влияет на другие физико-химические параметры полимеров (Khandal et al., 2015; Sudesh et al., 2000). Кроме того, изменение значений ММ является наиболее показательным параметром процесса биодеградации. Уменьшение ММ в первую очередь отражает процесс расщепления полимерной цепи и потому ММ наиболее чувствительна к процессу биодеградации полимера. Было показано, что при незначительном изменении массы образцов ММ претерпевало гораздо более существенные изменения. Особенности кинетики изменения ММ при биодеградации позволяют определить по механизму какого типа протекает этот процесс: по неавтокаталитическому или автокаталитическому (Lyu and Untereker, 2009; Weir et al., 2004).

При сравнении деградации ПОБ, ПЛА и их композита ПОБ/ПЛА можно заметить, что ММ уменьшилась для всех трех образцов полимерных пленок полимер в ходе как ферментативной, так и не ферментативной деградации (Рисунок 94). По сравнению с неферментативной гидролитической деградацией все три образца полимерных пленок продемонстрировали более значительную потерю ММ при инкубации в буферном растворе с липазой. Наибольшая потеря ММ при ферментативной деградации наблюдается у ПОБ - 45%, ПЛА - 41%, а пленки из композита ПОБ/ПЛА демонстрирует наименьшую потерю ММ - 36%. Также можно отметить, что ПОБ имеет самую высокую начальную молекулярную массу (255 кДа), в то время как ПЛА и смесь имеют меньшие начальные значения молекулярной массы. Несмотря на то, что ММ ПОБ резко снизилась в течение первых 3 недель, значительных изменений ММ в последние две недели разложения не наблюдались. Уменьшение ММ в смеси ПОБ/ПЛА было более равномерным. Хотя исходная ММ полилактида была меньше, чем у ПОБ, снижение его ММ было более значительным – до 54% (от исходной ММ) после 1,5 месяцев деградации, что соответствует данным, полученным другими исследователями (Abdelwahab et al., 2012; Zhang and Thomas, 2011). Как и в случае с потерей массы пленок, полученные нами данные соответствуют литературным данным о гораздо большей скорости гидролитической деградации ПЛА по сравнению с ПОБ и его сополимерами. Такая высокая скорость деградации медицинских изделий из ПЛА и его сополимеров приводит к накоплению

продуктов деградации ПЛА – молочной кислоты, которая локально закисляет водную среду вокруг изделия и приводит к развитию цитотоксического эффекта *in vitro* или хронической воспалительной реакции *in vivo* (Майбородин и др., 2013; Agrawal et al., 1997; Ignatius and Claes, 1996; Vacanti et al., 2012; Solheim et al., 2000; Böstman et al., 2000; Lickorish et al., 2004; Khouw et al., 1998; Su et al., 2005; Ceonzo et al., 2006; Kim et al., 2007; Taylor et al., 1994; Rihova, 1996; Stevanovic, 2011).

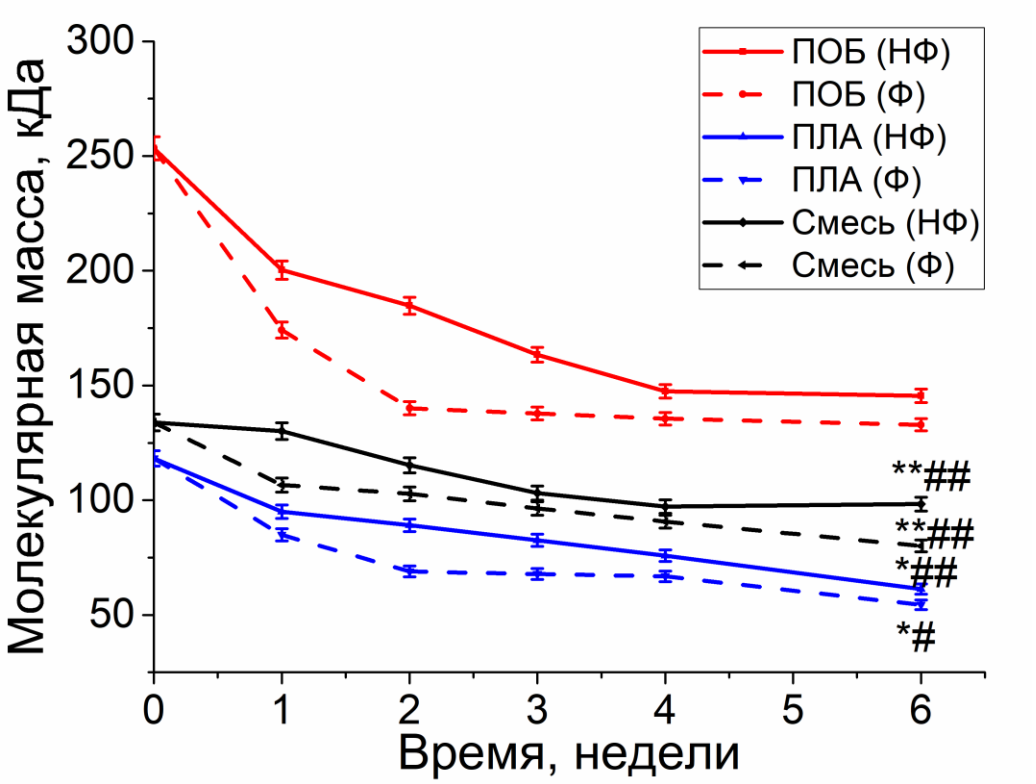


Рисунок 94. *Снижение молекулярной массы полимеров ПОБ, ПЛА и ПОБ/ПЛА в процессе ферментативной (Ф) и неферментативной (НФ) деградации. * ПЛА (Ф) по сравнению с ПЛА (НФ), $p < 0,05$; ** ПОБ/ПЛА (Ф) по сравнению с ПОБ/ПЛА (НФ), $p < 0,05$; # ПЛА (Ф) и ПОБ/ПЛА (Ф) по сравнению с ПОБ (Ф), $p < 0,05$; ## ПЛА (НФ) и ПОБ/ПЛА (НФ) по сравнению с ПОБ (НФ), $p < 0,05$.*

Большая потеря ММ при ферментативной деградации по сравнению с гидролитической (без добавления липазы) для всех исследуемых полимеров можно объяснить действием липазы, ускоряющей деградацию за счет неспецифического расщепления им сложноэфирных связей в ПОБ и ПЛА, что подтверждается литературными данными о том, что такие ферменты как липазы способны разрушать полимерные цепи ПОА (Tokiwa and Suzuki, 1981; Numata et al., 2009).

Далее нами был проведен эксперимент по исследованию гидролитической и ферментативной деградации пленок из ПОБ с различной ММ и его сополимеров в течение 6 месяцев и, т.к. исследуемые полимеры обладали сильно различающейся ММ, то далее мы будем рассматривать относительное изменение этого параметра в ходе деградации. В качестве примера на Рисунке 95 приведен общий график изменения ММ всех исследованных нами образцов ПОБ и его сополимеров в ходе ферментативной деградации в течение 6-ти месяцев.

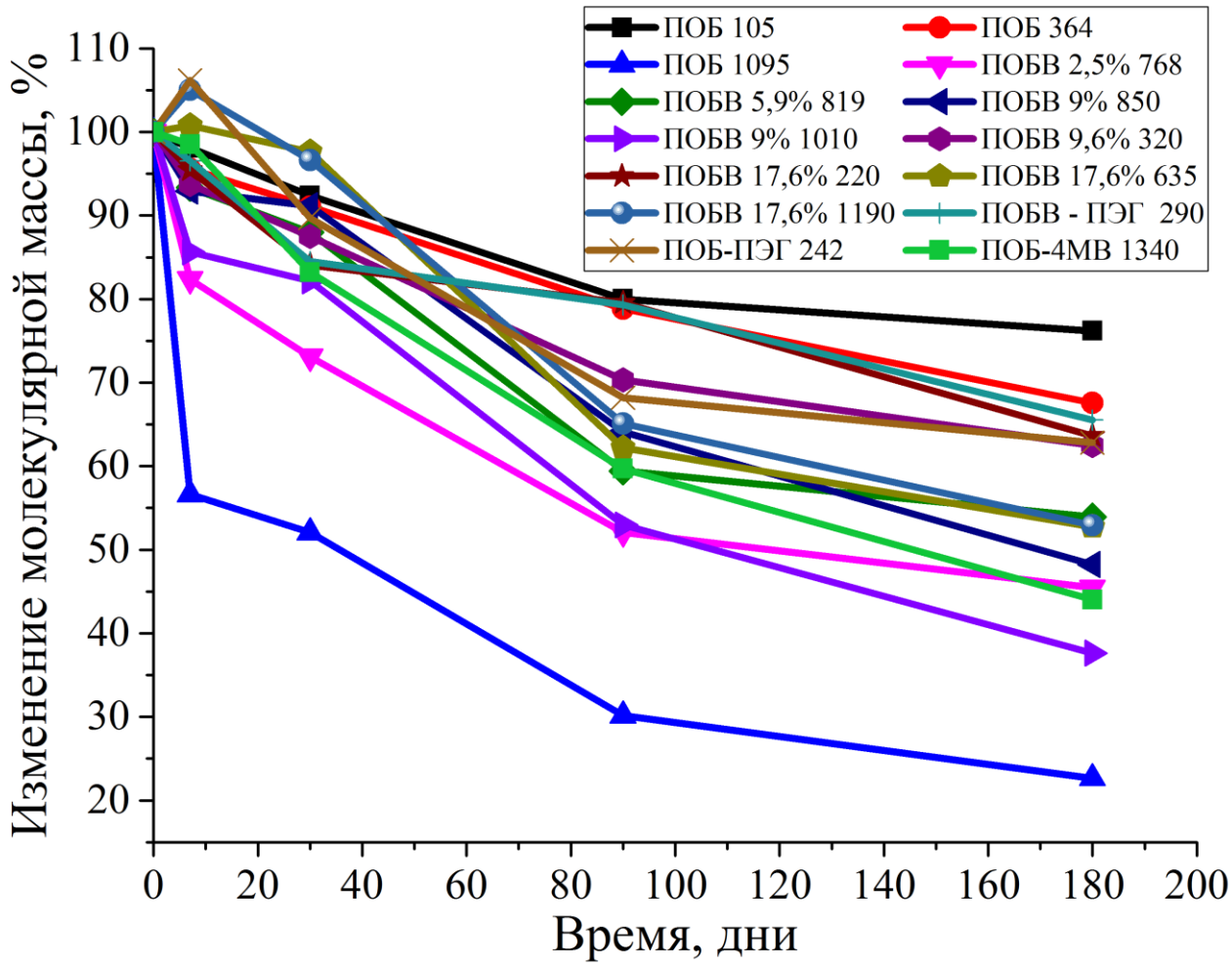


Рисунок 95. *Изменение ММ ПОБ и различных его сополимеров при ферментативной деградации in vitro в течение 6-ти месяцев.*

Видно, что для всех образцов полимеров наблюдается снижение их ММ, но кинетика изменения ММ довольно сильно различается для разных полимеров.

Чтобы проанализировать кинетику изменения ММ полимеров мы построили графики для высокомолекулярных ПОБ и ПОБВ с различным молярным содержанием 3-ОВ (Рисунок 96).

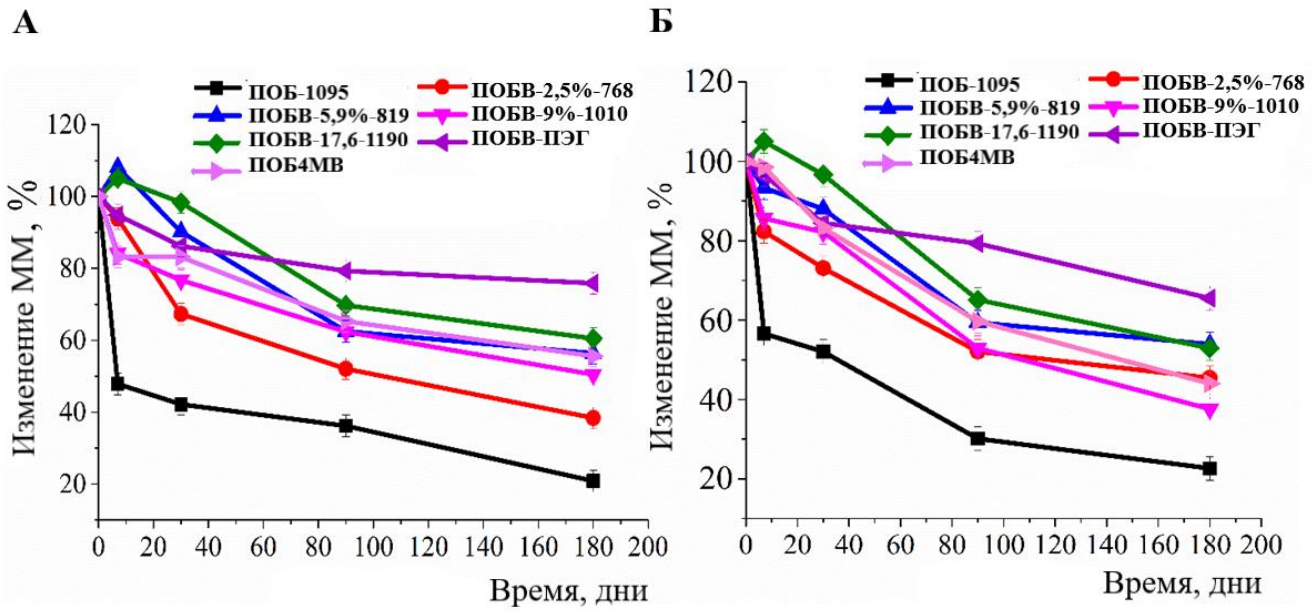


Рисунок 96. *Изменение молекулярной массы высокомолекулярных ПОБ, ПГБВ (с разным молярным содержанием 3-ОВ), а также ПОБ4МВ и ПОБВ-ПЭГ в процессе гидролитической (А) и ферментативной деструкции (Б) in vitro пленок из этих полимеров в течение 6-ти месяцев.*

Как видно из данных, представленных на этом графике (Рисунок 96) в течение 6-ти месяцев инкубации в буферном растворе без добавления липазы и в присутствии фермента наибольшая потеря ММ наблюдается для образца пленок ПОБ-1095 – до 80% исходной ММ, значительно уменьшается ММ и у сополимеров ПОБВ-2,5%-768 и ПОБВ-9%-1010. Для остальных образцов полимерных пленок снижение ММ также наблюдалось, но зависимости ее кинетики от молярного содержания 3-ОВ не было обнаружено. При этом два полимеры из этой группы (ПОБВ-17,6%-1190 и ПОБВ-5,9%-819) в первую неделю увеличили значения ММ, что может быть связано с вымыванием низкомолекулярной фракции полимера, присутствующего в полимерной матрице изначально.

На Рисунке 97 отдельно приведена кинетика изменения ММ биоПЭГилированного ПОБ в процессе его биодеградации in vitro в сравнении с ПОБ различной ММ. Видно, что для ПОБ-ПЭГ также характерно повышение ММ за первую неделю биодеградации, что, вероятно, связано с вымыванием олигомеров, после чего происходит медленное падение ММ, немного более выраженное, чем у ПОБ со сравнимыми ММ, но намного меньшее, чем у высокомолекулярного гомополимера.

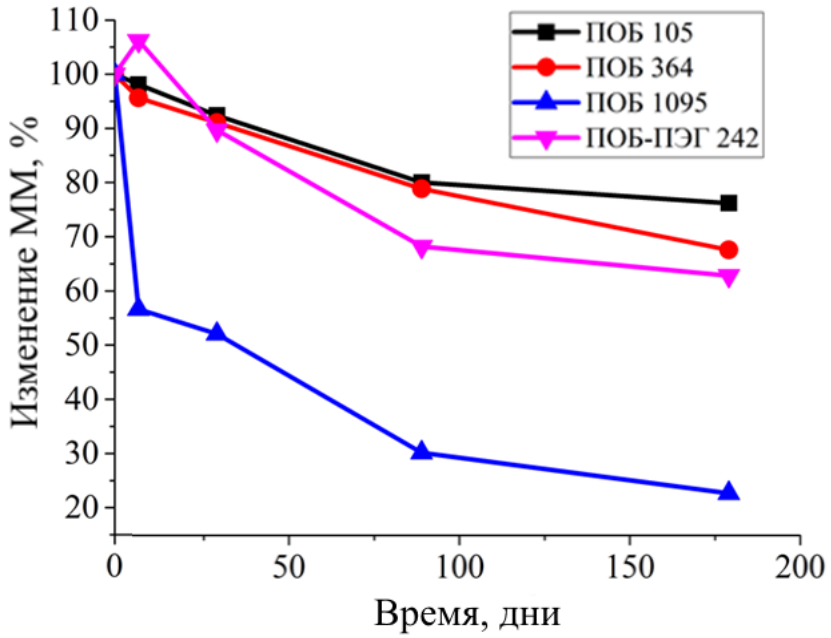


Рисунок 97. *Кинетика изменения молекулярной массы ПОБ-ПЭГ в сравнении с ПОБ с различной ММ при ферментативной деградации in vitro в течение 6-ти месяцев.*

Математическая обработка данных по кинетике снижения молекулярной массы полимеров позволяет раскрыть в той или иной мере механизм деградации изучаемого полимера. Для анализа кривых снижения ММ нами были использованы математические модели деградации частично кристаллических полимеров (Pan et al., 2015; Weir et al., 2004б). Для этого экспериментальные данные изменения ММ помещали на графики зависимости 1/ММ и ln(ММ) от времени деградации, что позволяет проанализировать их соответствие некаталитическому (для ферментативной деградации мы будем использовать термин – неавтокаталитическая, т.к. все эти процессы в этом случае осуществляются за счет катализа ферментом липазой) и автокаталитическому механизму гидролитической деградации, соответственно (Pan et al., 2015; Weir et al., 2004a) (Рисунок 98). При этом, неавтокаталитическая модель является кинетической моделью нулевого порядка, а автокаталитическая – кинетической моделью первого порядка (см. подраздел 1.4.1, формулы 1 и 4, соответственно). Таким образом, эти математические модели позволят ответить на вопрос, имеется или отсутствует вклад автокатализа в процесс гидролитической и ферментативной деградации *in vitro*. На Рисунке 98 показана аппроксимация кривых изменения ММ ПОБ и ПОБВ с различной ММ и молярным содержанием 3-ОВ, а также ПОБ-ПЭГ в ходе гидролитической и ферментативной деградации линейными функциями согласно неавтокаталитической и автокаталитической моделям.

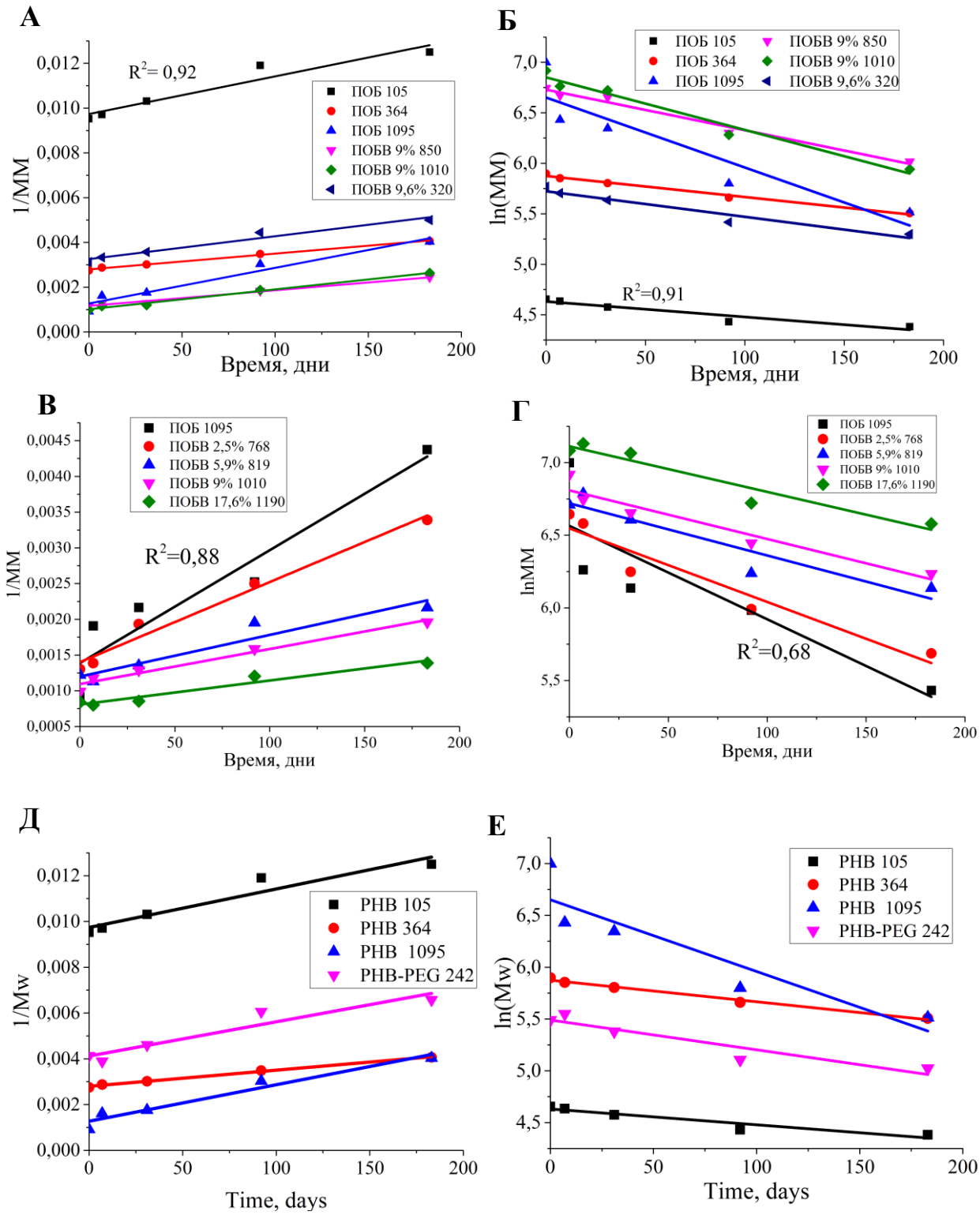


Рисунок 98. *Применение математических моделей неавтокаталитической (А, В, Д) и автокаталитической (Б, Г, Е) деградации полимеров для анализа экспериментальных данных по падению ММ пленок ПОБ и ПОБВ с различной ММ (А, Б), высокомолекулярных ПОБ и ПОБВ с различным молярным содержанием 3-ОВ (В, Г) и ПОБ-ПЭГ в сравнении с ПОБ (Д, Е) при ферментативной деградации in vitro.*

Интересно, что на графиках Рисунка 98В,Г видно, что аппроксимированные прямые расположены по отношению друг к другу и имеют все более увеличивающийся наклон в строгом соответствии с молярным содержанием 3-ОВ: от сополимера ПОБВ с наибольшим содержанием 3-ОВ (17,6 мол.%) до гомополимера ПОБ (0 мол.%) для неавтокаталитической (Рисунок 98В) и, напротив, от ПОБ до ПОБВ-17,6% - для автокаталитической модели (Рисунок 98Г) деградации. Более того, если рассчитать тангенсы углов наклона прямых для неавтокаталитической модели (Рисунок 98В) и представить их на отдельном графике как функцию от содержания 3-ОВ, то мы получим следующую ломаную прямую (Рисунок 99).

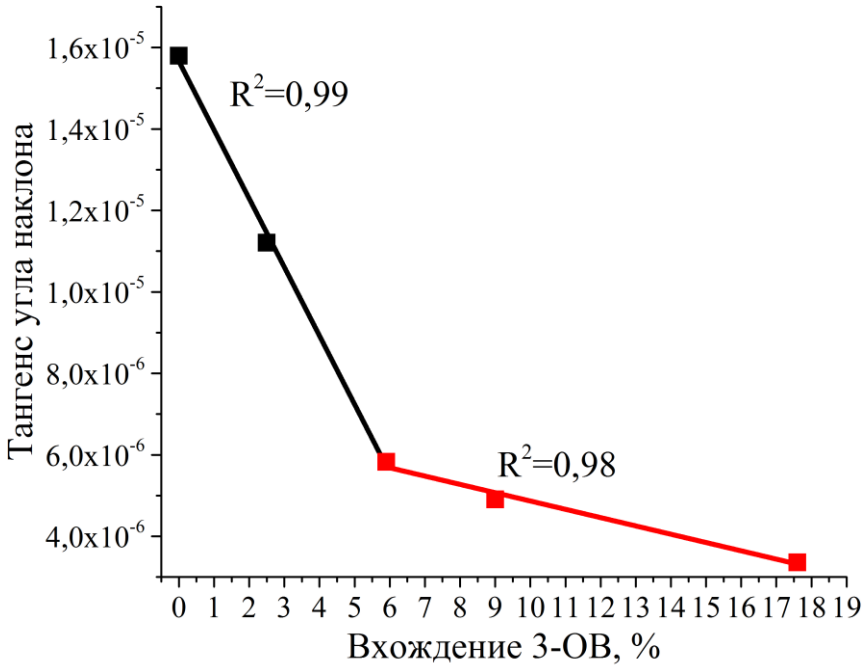


Рисунок 99. *Зависимость значений тангенса угла наклона прямых аппроксимации падения ММ по неавтокаталитической модели при гидролитической деградации высокомолекулярных ПОБ и ПОБВ от молярного содержания 3-ОВ в полимерной цепи ПОБ(В).*

Как видно на Рисунке 99, полученная ломаная прямая имеет точку перегиба, которая соответствует 5,9 моль% содержания 3-ОВ в ПОБВ (Zhuikov et al., 2020). Это значение, найденное нами из вышеприведенных расчетов, очень важно для других исследований, описанных далее.

Используя автокаталитическую модель, мы провели также анализ гидролитической и ферментативной деградации композита ПОБ/ПЛА в сравнении с его компонентами - ПОБ и ПЛА при гораздо меньших сроках проведения эксперимента – за 1,5 месяца и еженедельной регистрацией данных по изменению ММ (Рисунок 100).

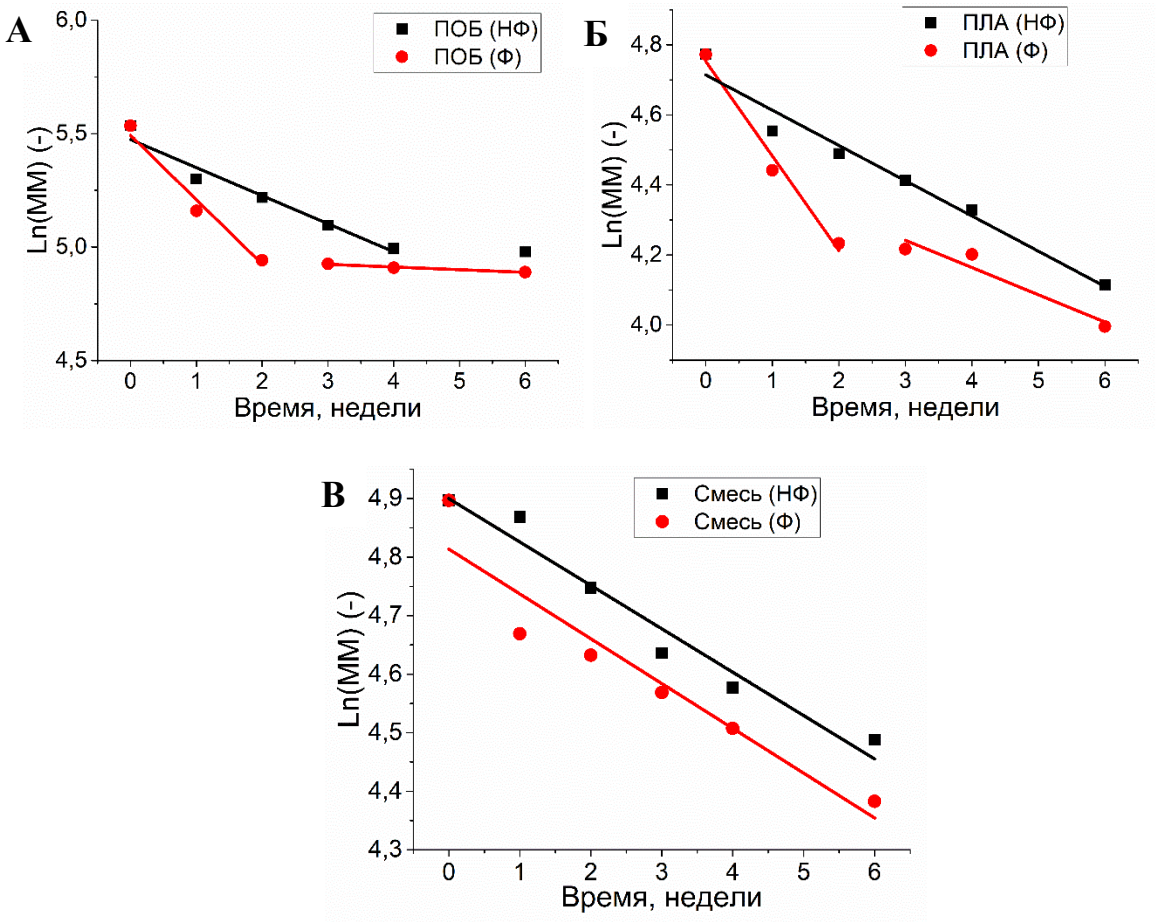


Рисунок 100. *Применение автокаталитической модели деградации полимеров для анализа экспериментальных данных по гидролитической неферментативной (НФ) и ферментативной (Ф) деградации пленок из композита ПОБ/ПЛА (В) в сравнении с ПОБ (А) и ПЛА (Б).*

Для построенных нами прямых аппроксимации данных были получены параметры кинетической модели (Таблица 12).

Таблица 12. *Параметры кинетической модели деградации и коэффициенты корреляции (R^2) ПОБ, ПЛА и ПОБ/ПЛА при гидролитической и ферментативной деградации.*

Образец	**Гидролитическая деградация**		**Ферментативная деградация**	
	k_D (неделя$^{-1}$)	R^2	k_D (неделя$^{-1}$)	R^2
ПОБ	0,12±0,01	0,96	0,28±0,046 0,01±0,002*	0,97 0,98
ПЛА	0,1±0,009	0,97	0,26±0,035 0,07±0,02*	0,98 0,93
ПОБ/ПЛА	0,07±0,01	0,97	0,07±0,007	0,96

* 2 участка кривых с разными скоростями разложения. Объяснения в тексте.

Значения, указанные в Таблице 12, показывают гораздо более высокую кинетику деградации полимеров, чем ранее опубликованные данные по деградации ПОБ в аналогичной среде (Kovalcik et al., 2020). С использованием такого дизайна эксперимента удалось увидеть двухэтапную картину изменения ММ в ферментативной (но не гидролитической) деградации пленок из ПОБ и ПЛА на ранних сроках наблюдения (до 1,5 мес.). Для пленок из ПОБ и ПЛА в буферном растворе с липазой наблюдалась схожая кинетика деградации: в обоих случаях наибольшее снижение ММ наблюдалось в течение первых 2-х недель инкубации при близких значения K_D для обоих полимеров, тогда как в последующие 4 недели скорость разложения снизилась в несколько раз. В случае же инкубации пленок ПОБ и ПЛА в буферном растворе без липазы процесс снижения ММ нельзя было разделить на этапы по скорости разложения полимеров. В экспериментах с длительными сроками деградации полимеров (до 6 месяцев) это явление не удалось выявить, по-видимому, из-за более редкой фиксации данных по изменению ММ на ранних сроках деградации (только 2 временные точки - 1 неделя и 1 месяц).

Полученные данные указывают также на различную кинетику деградацию гомополимеров ПОБ и ПЛА и их композита. Это может быть объяснено наличием аморфной компоненты в частично кристаллических полимерах. Ранее было показано, что аморфная компонента разлагается гораздо быстрее, чем кристаллическая (Sudesh et al., 2000). Однако, кинетика деградации ПОБ/ПЛА оставалась линейной в течение всего эксперимента как в буферном растворе в присутствии липазы, так и без нее. Такое поведение полимерной системы можно объяснить взаимодействием ПОБ и ПЛА между собой в композите. Скорость деградации композита примерно в 4 раза меньше, чем у гомополимеров на первой стадии. Значение k_D композита близко к значениям k_D ПЛА на втором этапе деградации. Это может означать, что разложение ПЛА вносит наибольший вклад в скорость деградации композита. Такое плавное снижение молекулярной массы полимеров свидетельствует о том, что при изготовлении изделия из смеси полимеров предсказать скорость деградации будет проще.

В дополнение к разработанным гидролитической и ферментативной моделям нами была разработана также и модель клеточной деградации, т.е. изучение влияния культивирования клеток на полимерных пленках на их биодеградацию. Для этой модели мы использовали стандартную линию фибробластов мыши 3T3 и проводили их культивирование на полимерных пленках в стандартных условиях *in vitro* (см. подраздел 2.5.2) в течение 1-ой, 2-х и 3-х недель.

Для изучения влияния культивируемых на поверхности пленок из ПОБ, ПЛА и композита ПОБ/ПЛА клеток на деградацию этих полимеров была исследована ММ на каждой временной точке. Результаты показали, что ММ всех полимеров уменьшалась при культивировании клеток на пленках. Падение ММ гомополимеров ПОБ и ПЛА происходило

нелинейно. В первую неделю наблюдалось более сильное снижение ММ для ПЛА – на 31%, для ПОБ — на 17%, а для композита ПОБ/ПЛА – только на 6,5% (Рисунок 101).

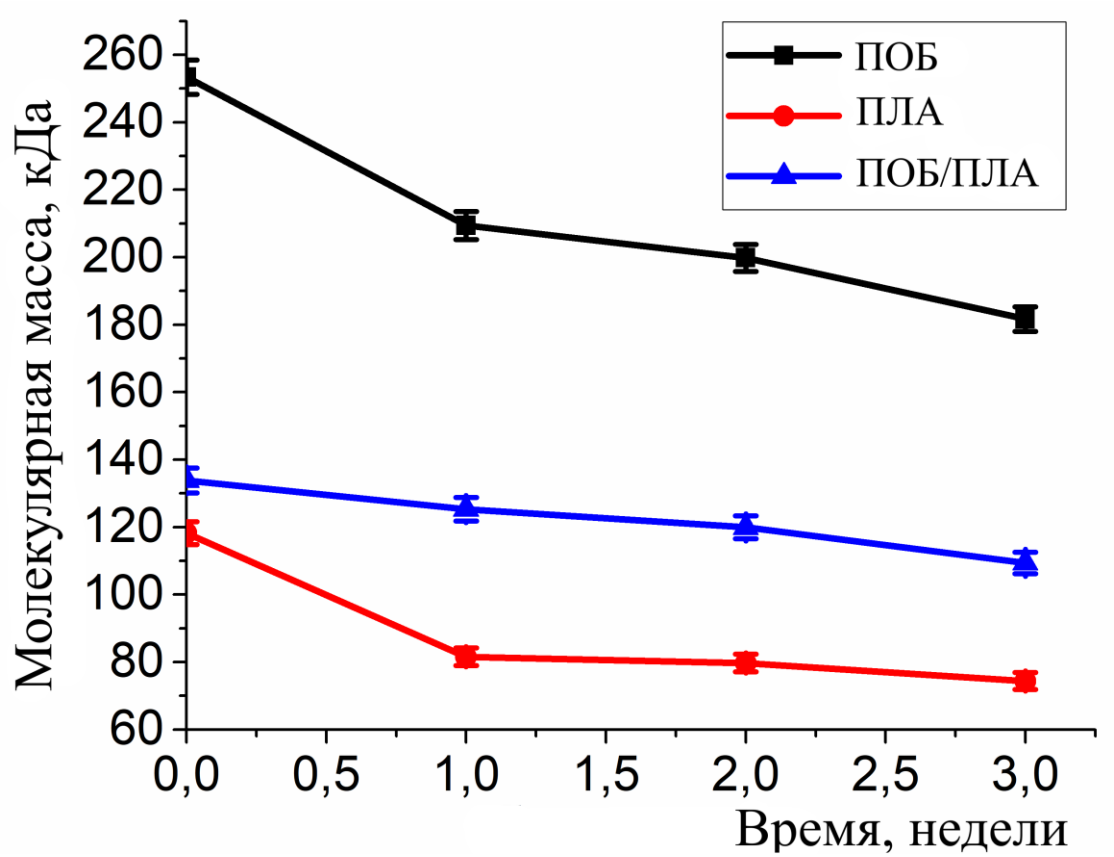


Рисунок 101. *Изменение ММ полимеров в ходе культивирования клеток линии 3T3 in vitro на поверхности пленок из ПОБ, ПЛА и композита ПОБ/ПЛА.*

Применение кинетической модели первого порядка по наблюдаемому экспоненциальному уменьшению молекулярной массы во времени дало значение k_D = 0,104 ±0,02 нед.$^{-1}$ для ПОБ, 0,1412 ±0,055 нед.$^{-1}$ для ПЛА и 0,065 ±0,064 нед$^{-1}$ для композита ПОБ/ПЛА для модели клеточной деградации *in vitro*. При этом k_D кинетики биодеградации ПОБ и ПЛА была сходной, тогда как k_D композита ПОБ/ПЛА была значительно ниже по сравнению с коэффициентами для этих двух гомополимеров. Значения k_D для ПОБ и ПЛА были ближе к значениям k_D при неферментативной гидролитической деградации, чем при ферментативной деградации (Таблица 12). Примечательно, что k_D композита ПОБ/ПЛА была практически одинаковой для всех моделей деградации.

Также был оценен вклад автокатализа (Таблица 13) в процесс деградации пленок из ПОБ, ПЛА и ПОБ/ПЛА. Высокие коэффициенты корреляции для неавтокаталитической и автокаталитической моделей соответствуют полимерам ПОБ и ПОБ/ПЛА. Это свидетельствует об ускорении процесса деградации из-за значительного вклада автокатализа расщепления

полимеров. При клеточной деградации ПЛА автокатализ, согласно коэффициентам, не наблюдался (0,85 для неавтокаталитической и 0,74 для автокаталитической модели).

Таблица 13. *Оценка вклада процесса автокатализа в скорость деградации пленок из ПОБ, ПЛА и композита ПОБ/ПЛА.*

Модель деградации	**Образец**	**R^2 для неавтокаталитической модели**	**R^2 для автокаталитической модели**
Гидролитическая неферментативная	ПОБ	0,91	0,85
	ПЛА	0,97	0,97
	ПОБ/ПЛА	0,87	0,84
Ферментативная	ПОБ	0,76	0,61
	ПЛА	0,90	0,83
	ПОБ/ПЛА	0,94	0,91
Клеточная	ПОБ	0,95	0,93
	ПЛА	0,85	0,74
	ПОБ/ПЛА	0,97	0,98

В ходе дальнейшего анализа экспериментальных данных, было рассчитано соответствие кривых изменения ММ в ходе деградации по экспериментальным данным той или иной математической модели деградации с помощью статистических коэффициентов корреляции для всех полимеров в ходе длительного эксперимента (до 6 месяцев). В Таблице 14 приведены значения коэффициентов корреляции для ферментативной деградации исследуемых нами полимеров.

Согласно приведенным в таблице данным можно сделать вывод о том, что для большинства полимеров изменение их ММ аппроксимируются одновременно по неавтокаталитической и автокаталитической моделям деградации, так как им соответствуют наибольшие значения R^2 (выше 95% - выделены жирным), т.е. ферментативная деградация ПОА происходит одновременно посредством этих двух механизмов, что было продемонстрировано ранее для ПОА (Han et al., 2017). Для меньшей части полимеров (ПОБ-105, ПОБ-255, ПОБВ-2,5%-768, ПОБВ-5,9%-820, ПОБВ-17,6%-220, ПОБ-ПЭГ, ПЛА, ПОБ/ПЛА), напротив, характерны низкие или недостаточно высокие значения коэффициентов корреляции, но тоже одновременно для обоих типов моделей. Близкие значения коэффициентов корреляции для автокаталитической и неавтокаталитическая модели говорят о том, что выделить отдельно вклад автокатализа не представляется возможным. Деградация по обоим механизмам, автокаталитическому и неавтокаталитическому, была показана другими исследователями для частично кристаллических полимеров (Weir et al., 2004).

Таблица 14. *Статистические коэффициенты корреляции, рассчитанные при аппроксимации экспериментальных данных снижения ММ исследуемых ПОА при инкубации пленок из них в буферном растворе с липазой с прямыми, построенными по моделям неавтокаталитического и автокаталитического механизма деградации полимеров.*

Образец	R^2 (неавтокаталитическая модель)	R^2 (автокаталитическая модель)
ПОБ-105	0,92	0,91
ПОБ-255*	0,76	0,61
ПОБ-364	**0,99**	**0,99**
ПОБ-1095	**0,95**	0,83
ПОБВ-2,5-768	0,93	0,88
ПОБВ-5,9-820	0,92	0,90
ПОБВ-9-850	**0,99**	**0,98**
ПОБВ-9-1010	**0,99**	**0,97**
ПОБВ-9,6-320	**0,96**	**0,95**
ПОБВ-17,6-220	0,94	0,92
ПОБВ-17,6-635	**0,97**	**0,95**
ПОБВ-17,6-1190	**0,96**	**0,95**
ПОБВ-ПЭГ	**0,99**	**0,98**
ПОБ-ПЭГ	0,91	0,89
ПОБ-4МВ	**0,99**	**0,98**
ПЛА*	0,90	0,83
ПОБ/ПЛА*	0,94	0,91

* длительность эксперимента – 1,5 месяца.

И только ПОБ-1095 подвергается ферментативной деградации преимущественно по неавтокаталитическому механизму, что, вероятно, связано и с наибольшей потерей ММ у высокомолекулярного полимера. БиоПЭГилированный ПОБ в этом отношении больше похож на низкомолекулярный ПОБ-105, чем на гомополимеры с большей ММ: ПОБ-364 и ПОБ-1095, но в целом по механизму деградации не является каким-то исключительным случаем, хотя кинетика изменения его ММ не очень хорошо аппроксимируется как по модели неавтокаталитической, так и по модели автокаталитической деградации (R^2 = 0,91 и 0,89, соответственно). Из литературы известно, что химическая конъюгация ПОБВ и ПОБ4ОБ с ПЭГ 2000 приводила к многократному снижению скорости ферментативной деградации наночастиц

(диаметром 100-160 нм) (Shah et al., 2010), но в случае биоПЭГилированного ПОБ выраженного эффекта замедления скорости ферментативной деградации не наблюдается.

Для сравнения, при гидролитической деструкции автокатализ свойственен только для 3-х полимеров (одновременно при 8-ми полимерах по неавтокаталитическому механизму). А при воздействии липазы, уже 11 полимеров подвергаются деструкции по данному механизму (одновременно при 9-ти полимерах по неавтокаталитическому механизму) (Zhuikov et al., 2020). Вероятно, здесь также можно видеть влияние панкреатической липазы, которая, как и должно быть свойственно ферменту, способна активировать автокатализ при гидролитическом расщеплении полимерной цепи, что привело к увеличению скорости деструкции по сравнению с неферментативной гидролитической деструкцией. Напротив, для ПЛА автокаталитический процесс можно выделить в буферном растворе, тогда как при ферментативной деградации он не наблюдается. Отсутствие процесса автокатализа при ферментативном разложении ПЛА можно объяснить более высокой скоростью разложения, при которой вклад автокатализа невозможно оценить.

Таким образом, наблюдаемые нами изменения ММ в процессе гидролитической и ферментативной деградации можно объяснить следующим образом. При изготовлении полимерной пленки в объеме полимерной матрицы и на поверхности пленки имеются короткоцепочечные фрагменты полимера, относительно хорошо растворимые в воде. При измерении исходной ММ полимеров эти короткоцепочечные фрагменты влияет на среднюю молекулярную массу. При дальнейшем помещении полимерных пленок в водную среду эти фрагменты растворяются и вымываются из полимерной пленки уже в самый начальный период времени. Это приводит к незначительному увеличению ММ для некоторых полимеров через неделю инкубации в водной среде. А вот в дальнейшем изменение ММ происходит уже за счет гидролитического или ферментативного расщепления полимера.

Следует отметить, что наибольшая потеря ММ наблюдается у высокомолекулярных полимеров. Объяснить это можно тем, что длинные полимерные цепи могут быть менее склонны к образованию кристаллических структур ПОА и в полимерах с высокой ММ может быть большая доля аморфной фазы. Соответственно, сложноэфирные связи между мономерами в таких цепях оказываются более уязвимыми для их атаки молекулами воды, что приводит к их гидролитическому расщеплению. Это соответствует данным, полученным другими исследователями деградации ПОА (Han et al., 2017; Freier et al., 2002; Kanmani et al., 2016; Pan, 2015). Показано также, что в аморфной фазе ПОА подвергается гидролитическому расщеплению со скоростью в 20 раз более высокой, чем в кристаллическом состоянии, таком как ламели (Sudesh et al., 2000).

Наблюдаемое нами для всех исследуемых полимеров большое (по сравнению с потерей массы полимерных пленок) снижение ММ в процессе ферментативной деградации в течение 6-ти месяцев свидетельствует о том, что деградация этих полимеров происходит преимущественно в объеме полимерной матрицы, а не на поверхности. Было показано, что неспецифические эстеразы, такие как панкреатическая липаза осуществляют деградацию ПОА в объеме полимерной матрицы, тогда как специфические ПОА-деполимеразы расщепляют полимер путем поверхностной эрозии (Doi et al., 1990; Koyama and Doi, 1995).

3.4.3. Изменение морфологии поверхности пленок ПОБ при деградации

Для анализа механизма деградации исследуемых полимеров было проведено исследование изменения нано- и микроструктуры поверхности полимерных пленок из ПОБ (ПОБ-364) в ходе их ферментативной деградации *in vitro*. Результаты этих исследований представлены в виде пары изображений АСМ в режиме фазового контраста: поверхности пленки из ПОБ до инкубации в буферном растворе с липазой и после воздействия липазы (Рисунок 102). Важно отметить, что это в точности один и тот же участок поверхности одной и той же пленки.

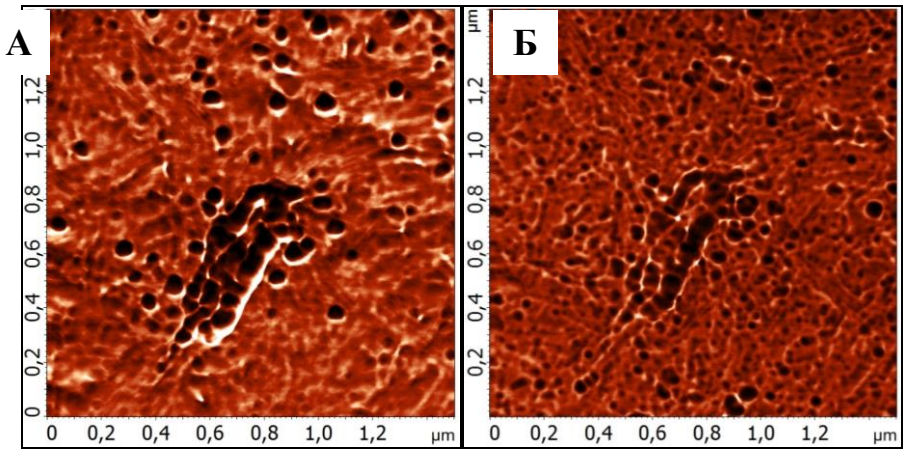
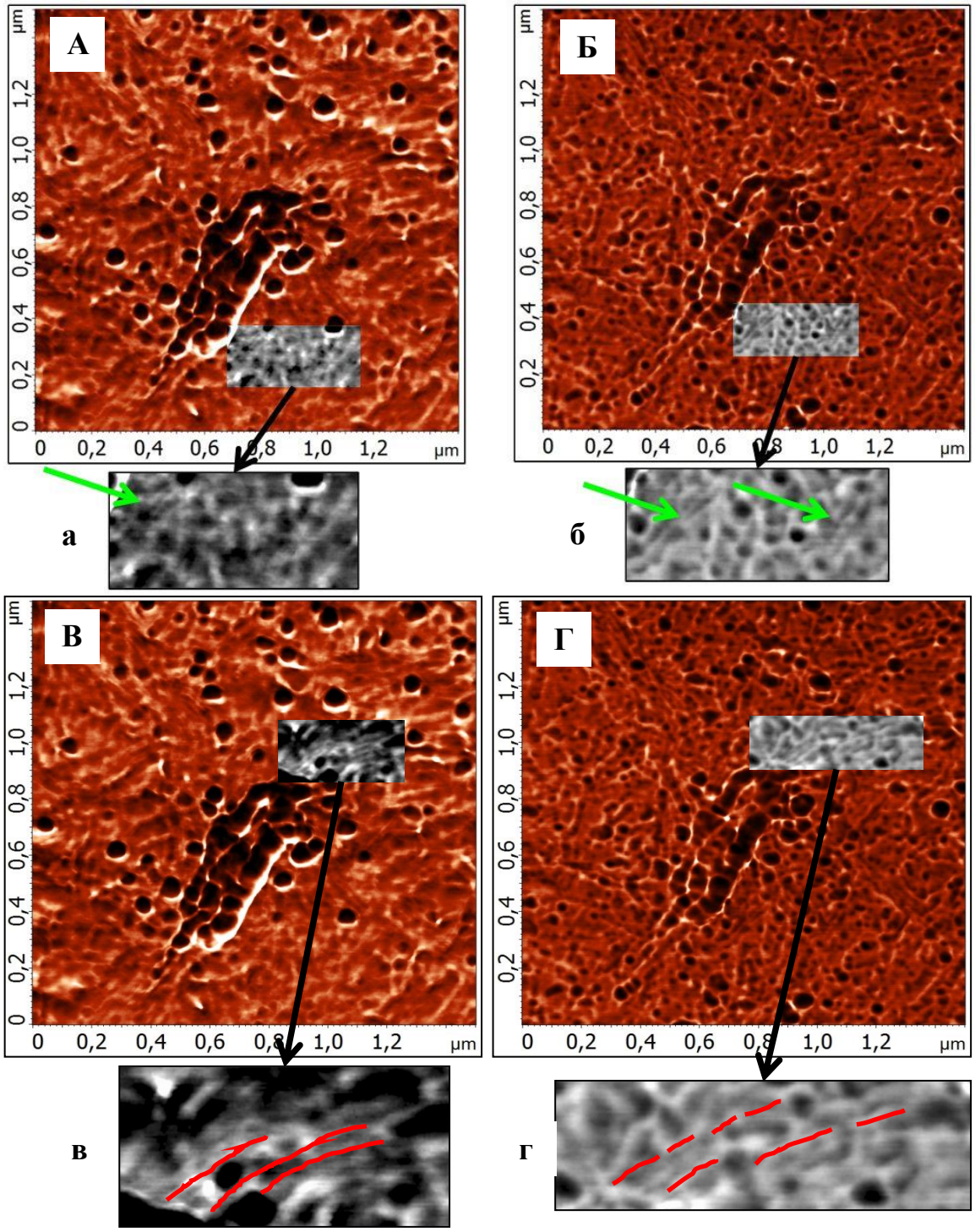


Рисунок 102. *Изображение АСМ в фазовом режиме поверхности пленки из ПОБ-364 до инкубации (А) в буферном растворе с панкреатической липазой и после воздействия фермента (Б) в течение 21-х суток при 37 °С. (Совместно с научной группой в.н.с. кафедры биоинженерии Багрова Д.М.)*

На этих изображениях на наноразмерном уровне был проведен поиск характерных для частично кристаллического ПОБ кристаллических структур (ламелей, сферолитов) (Holmes, 1988) для анализа тех изменений, которые могли произойти с ними в результате воздействия липазы, т.к. известно, что кристалличность значительным образом влияет на скорость ферментативной деградации ПОА (Kumagai and Doi, 1992; Tokiwa and Calabia, 2004); важно также выяснить роль поверхностной эрозии ПОБ в ходе его деградации.


А
Б
В
Г
а
б
в
г
0 0,2 0,4 0,6 0,8 1,0 1,2 µm

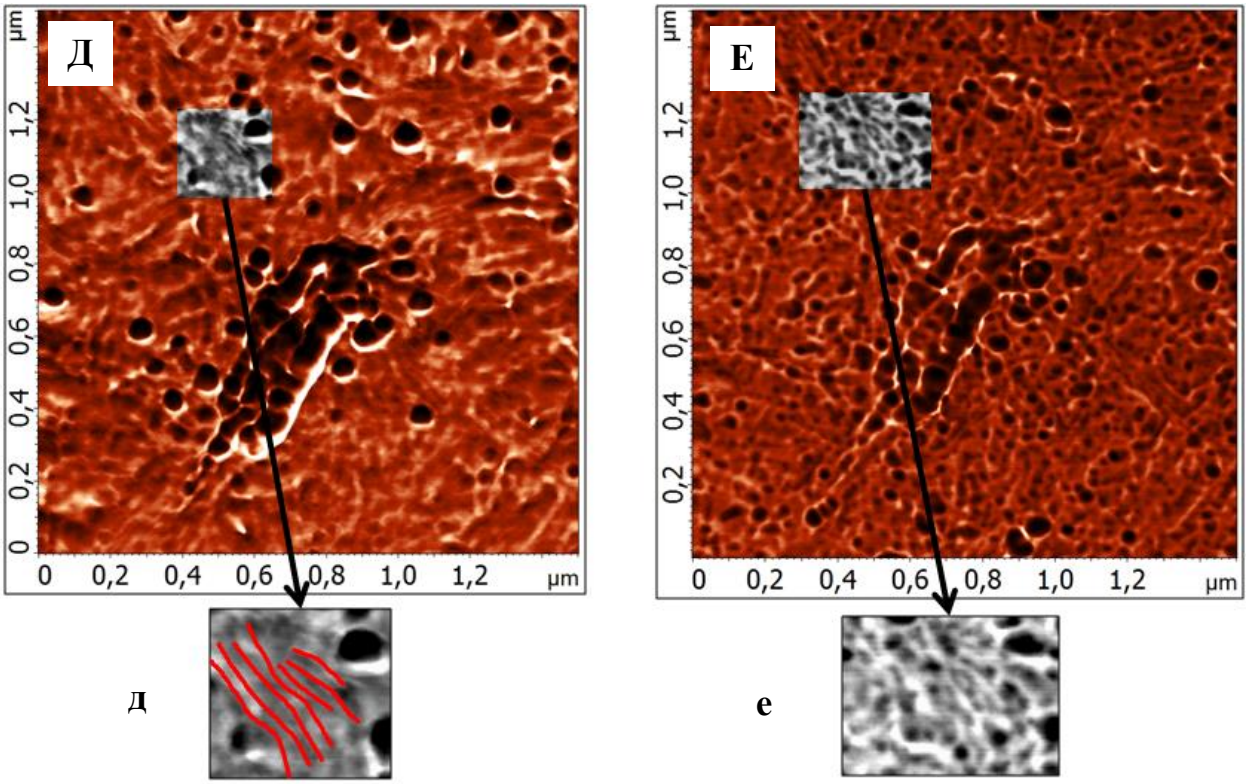


Рисунок 103. *Изображение АСМ в фазовом режиме поверхности пленки из ПОБ до инкубации (А) в буферном растворе с панкреатической липазой и после воздействия фермента (Б) в течение 21-х суток при 37 °С с различными отдельно выделенными участками, на которых можно наблюдать: появление новых ламелей (А, Б и соответствующие увеличенные области внизу (а, б), отмеченные черными стрелками, ламели показаны зелеными стрелками); фрагментацию ламелей (В, Г и соответствующие увеличенные области внизу (в, г), отмеченные черными стрелками, ламели контрастированы красными линиями); исчезновение ламелей (Д, Е и соответствующие увеличенные области внизу (д, е), отмеченные черными стрелками, ламели контрастированы красными линиями). (Совместно с научной группой в.н.с. кафедры биоинженерии Багрова Д.М.).*

На Рисунке 103 показаны основные наблюдаемые нами три процесса изменения морфологии надмолекулярных кристаллических структур, расположенных на поверхности полимерной пленки из ПОБ, в ходе ферментативной деградации *in vitro* под воздействием панкреатической липазы: исчезновение ламелей, фрагментация ламелей и появление новых ламелей. Структуры, идентифицированные нами как ламеллярная укладка цепей ПОБ, видны на изображениях АСМ как темные линии разной длины (см. подраздел 3.2.1, Рисунок 57).

Появление новых ламелей (Рисунок 103Б(б)) после инкубации в буферном растворе с липазой можно объяснить тем, что ламеллярные структуры, лежащие близко к поверхности пленки, покрыты полимером в аморфном состоянии (Farrance et al., 2009), и этот слой

подвергается расщеплению липазой, в результате чего обнажаются гораздо более устойчивые к действию фермента кристаллические структуры ПОБ – ламели. Фрагментацию ламелей в ходе ферментативной деградации (исходная их длина составляла 300 ±20 нм (Рисунок 103В(в), а стала – 80 ±10 нм Рисунок 103Г(г)) можно объяснить тем, что липаза воздействует на имеющиеся в ламеллярных структурах области дефектов, расщепляя в них локально полимерные цепи, что приводит к разрушению маленького участка кристаллической структуры, видимое на изображениях АСМ как распад протяженной ламели на более короткие отрезки. Похожие изменения морфологии поверхности пленок из ПОБ наблюдались при воздействии на них бактериальной ПОА-деполимеразой *A. faecalis* T1 (Murase et al., 2001). Наблюдаемое нами исчезновение ламелей (большее число видимых ламелей, располагающихся в стопке из 7-ми штук (Рисунок 103Д(д)), на поверхности необработанной липазой пленки исчезли, а остальные сильно фрагментировались после инкубации с ферментом (Рисунок 103Е(е)) в результате длительного воздействия липазы на пленку из ПОБ в водной среде может объясняться тем, что в ламелях имеется гораздо большее количество дефектов, что позволяет ферменту полностью разрушить эти кристаллические структуры.

Таким образом, наряду с данными по высвобождению нано- и микрочастиц из низкомолекулярного ПОБ и его олигомеров (см. подраздел 3.4.1, Рисунки 92 и 93) и по падению молекулярной массы полимеров (Рисунки 95, 96, 97) эти данные по изменению морфологии поверхности полимерных пленок свидетельствуют о том, что деградация ПОБ, и, вероятно, всех его сополимеров, происходит одновременно и в объеме полимера, и по механизму эрозии полимерной поверхности.

4.4. Изменение степени кристалличности пленок ПОБ и его сополимеров в процессе их биодеградации *in vitro*

При сравнении графиков на Рисунке 104А,Б видно, что в начальный период времени кинетика изменения степени кристалличности в буферном растворе без липазы и с липазой сходны. В обоих случаях в срок до одного месяца наблюдалось значительное изменение степени кристалличности. Прежде чем описывать изменение степени кристалличности в ходе деградации полимеров, следует напомнить, что степень кристалличности ПОБВ обратно пропорциональна молярному содержанию 3-ОВ в сополимере (Рисунок 78А), что связано с тем, что наличие более длинных боковых алкановых групп (CH_2-CH_3) в 3-ОВ невыгодно энергетически для упорядоченной укладки полимерной цепи полимера (Orts et al., 1991).

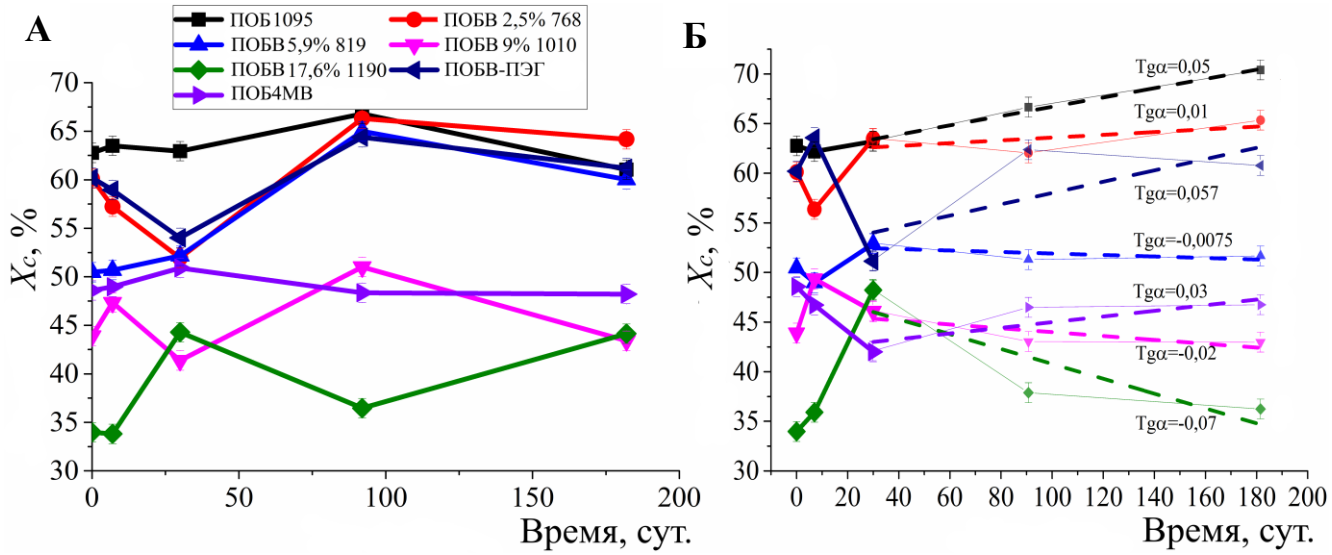


Рисунок 104. *Изменение степени кристалличности ПОБ, ПОБВ с разным молярным содержанием 3-ОВ, ПОБ4МВ, ПОБВ-ПЭГ в процессе гидролитической (А) и ферментативной деградации (Б) пленок из этих полимеров в течение 6-ти месяцев. (Выполнено совместно с лабораторией химической термодинамики на Химическом факультете МГУ, на оборудовании ЦКП МГУ (оператор н.с. Быков М.А.)).*

На Рисунке 104А видно, что в ходе гидролитической деградации пленок ПОБ и его сополимеров, инкубируемых в фосфатном буфере без липазы в течение 6 мес., степень кристалличности (значительно различающаяся исходно) изменялась волнообразно. Однако при инкубации пленок полимеров в буферном растворе с добавлением панкреатической липазы была обнаружена иная зависимость изменения степени кристалличности во времени. В отличие от гидролитической деструкции, волнообразного изменения кристалличности не происходило (Рисунок 104Б) – этот показатель плавно повышался, выходил на плато или плавно снижался. Вероятно, это может быть связано с тем, что липаза в первую неделю уже расщепила большую часть аморфного полимера в полимерной матрице пленок и уже не влияет так сильно на процесс деградации, поэтому мы видим сглаженные графики, где отсутствуют резкие изменения степени кристалличности, которые наблюдались при гидролитической деструкции (Zhuikov et al., 2020). При более внимательном рассмотрении прослеживается четкая тенденция различия характера изменения степени кристалличности в зависимости от молярного содержания 3-ОВ в гомополимерной цепи ПОБВ. Так, в процессе деградации в течение 6-ти месяцев кристалличность ПОБ-1095 увеличилась, тогда как кристалличность ПОБВ-17,6%-1090, напротив, снижалась. Если аппроксимировать поздний период изменения степени кристалличности линейной функцией, то становится видно, что изменяется угол наклона этих

прямых – значения tg(α) на Рисунке 104Б. Более того, наклон прямых также изменялся в зависимости от молярного содержания 3-ОВ. Для более четкого выявления этой закономерности и для того, чтобы рассчитать молярное содержание 3-ОВ в полимерной цепи ПОБВ, которое начинает оказывать такое влияние на структурно-механические свойства всего полимера, приводящее к различному характеру разложения полимера, мы построили график зависимости тангенса угла наклона прямых, по которым были аппроксимированы данные на графике Рисунка 104Б, от молярного содержания 3-ОВ в сополимере ПОБВ (в т.ч. 0 мол.% в ПОБ). На этом графике (Рисунок 105) видно, что после инкубации в буферном растворе с липазой степень кристалличности к 6-му месяцу ферментативной деградации снижалась, если процентное содержание 3-ОВ в ПОБВ превышало 5,7 мол.%. Т.е. это такое значение молярного содержания 3-ОВ, которое таким образом влияет на конформацию полимера, что приводит к обращению кинетики изменения степени кристалличности ПОА в ходе его ферментативной деградации – с увеличения степени кристалличности к ее уменьшению, и, наоборот (Рисунок 105).

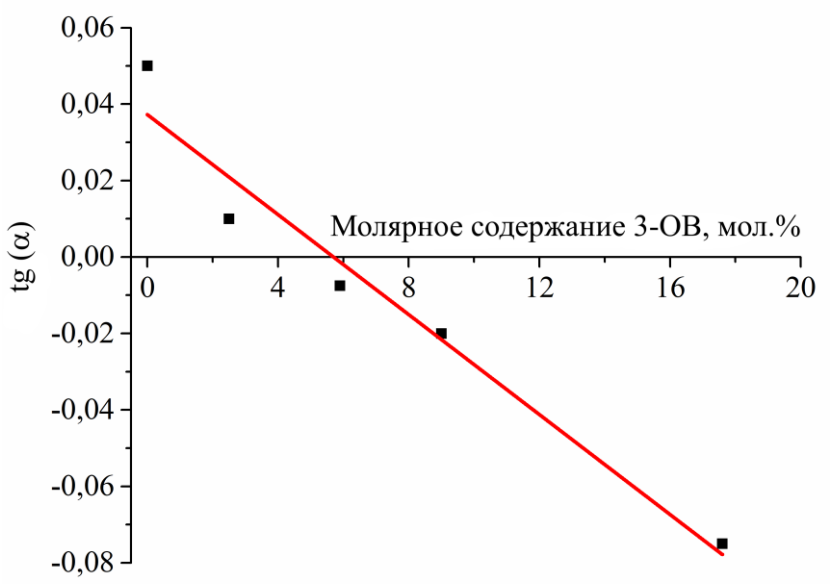


Рисунок 105. *График зависимости тангенса угла наклона прямых, по которым были аппроксимированы данные по изменению степени кристалличности в ходе ферментативной деградации (см. Рисунок 104Б) от молярного содержания 3-ОВ в сополимере ПОБВ.*

Интересно, что это значение очень близко к значению 5,9% молярного содержания 3-ОВ в ПОБВ, полученному ранее как точки перелома падения молекулярной массы полимеров при исследовании их гидролитической деструкции (Zhuikov et al., 2020). Поэтому, возможно, содержание 3-оксивалерата у ПОБВ в 5,7-5,9% является той границей фазового перехода

структурно-физических свойств всего полимера, при пересечении которой меняется закономерность кинетики изменения физико-химических свойств ПОБВ в процессе его биодеградации и, возможно, и при других процессах. Вероятно, наличие более длинного бокового радикала в сополимере ПОБВ приводит к тому, что молекулам воды труднее гидролизовать сложноэфирные связи. И эти стерические затруднения начинают действовать на весь полимер именно тогда, когда содержание 3-ОВ становится больше 5,9 мол.%. В дальнейшем учет этого фактора может помочь более корректно рассчитывать скорость деградации медицинских материалов на основе ПОБ и других природных и синтетических ПОА.

Рассмотрим теперь, а как изменяется степень кристалличности биоПЭГилированного ПОБ в сравнении с ПОБ различной ММ (Рисунок 106).

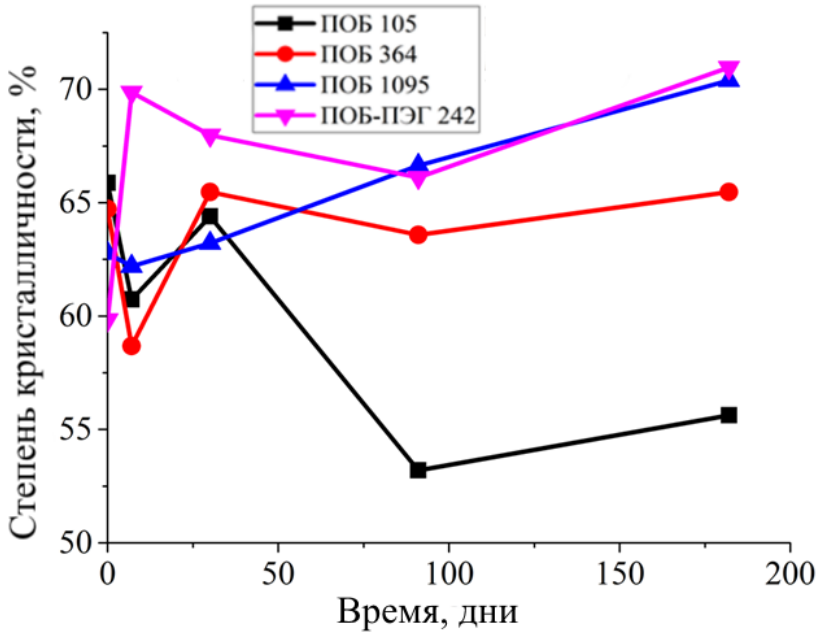


Рисунок 106. *Кинетика изменения степени кристалличности ПОБ-ПЭГ в сравнении с ПОБ разной ММ в фосфатном буфере, содержащем панкреатическую липазу, в течение 6 месяцев. (Выполнено совместно с лабораторией химической термодинамики на Химическом факультете МГУ, на оборудовании ЦКП МГУ (оператор н.с. Быков М.А.)).*

Из графиков видно, что через неделю инкубации в присутствии липазы у биоПЭГилированного ПОБ происходит резкий рост степени кристалличности (более чем на 10%), тогда как у ПОБ различной ММ наблюдается, напротив, падение этого показателя на различную величину. Такой эффект похож на рост степени кристалличности у многих сополимеров ПОБВ с разным содержанием 3-ОВ и у ПОБ4МВ, хотя величина этого роста не

столь велика. Как уже было отмечено выше, это подобное повышение степени кристалличности в начальный период может быть связано с рекристаллизацией аморфных областей в полимерной матрице, присутствие которых в большем объеме было вызвано «расшатывающим» влиянием боковых групп 3-оксивалерата и 4-метил-3-оксивалерата или концевых групп ПЭГ на укладку цепей сополимеров, путем разрыва цепи в этом начальном периоде (Рисунок 106). Подобное же явление описано и в литературе (Han et al., 2015). Причем, в случае ПОБ-ПЭГ этот процесс сопровождается также, вероятно, и отрывом самих концевых групп ПЭГ от сополимера. Большая величина изменения степени кристалличности у ПОБ-ПЭГ связана с тем, что ПЭГ обладает совсем другой молекулярной структурой и физико-химическими свойствами, а потому отщепление самого ПЭГ, отщепление олигомеров ПОБ-ПЭГ от длинноцепочечного ПОБ или высвобождение длинных цепей ПОБ от ПОБ-ПЭГ приводит к столь выраженному процессу восстановления высококристаллической структуры полимера. Это предположение подтверждается также и тем, что далее в течение 6 месяцев биодеградация ПОБ-ПЭГ in vitro протекает практически с той же кинетикой, что и ПОБ-364 с наиболее близкой ПОБ-ПЭГ молекулярной массой. Т.е. в какой-то момент, вероятно, уже на самых ранних стадиях инкубации ПОБ-ПЭГ просто превращается в ПОБ, в результате чего происходит изменение укладки его полимерных цепей, свойственное ПОБ, после чего ферментативная деградация этого полимера практически не отличается от деградации исходных образцов ПОБ со схожей молекулярной массой. По этой же причине и кинетика изменения ММ ПОБ-ПЭГ на протяжении 6 мес. также мало отличается от кинетики изменения ММ у ПОБ-364 и ПОБ-105 (Рисунок 106) за исключением опять самого начального периода, где наблюдается парадоксальное небольшое повышение ММ (имеющееся из всех других полимеров еще только у наиболее высокомолекулярного и с наибольшим содержанием 3-ОВ ПОБВ-17,6%-1190 (Рисунок 104)), которое может быть связано с более интенсивным, чем у других полимеров вымыванием олигомеров из высокомолекулярного полимера. Таким образом, в ходе биодеградации биоПЭГилированного ПОБ восстанавливаются исходная структура и свойства самого ПОБ.

Если рассматривать изменение степени кристалличности в композите ПОБ/ПЛА в сравнении с ПОБ и ПЛА, то также наблюдается довольно значительные изменения степени кристалличности полимеров. После 6-ти недель инкубации полимерных пленок в буферном растворе без липазы степень кристалличности ПОБ немного снизилась (58,6% по сравнению со исходной – 63%), в то время как после ферментативной деградации кристалличность, напротив, немного выросла (до 64%). Кристалличность пленок из ПЛА снизилась с 34% до 29% как после ферментативной, так и после неферментативной деградации. Однако, для композита ПОБ/ПЛА

наблюдалась иная картина. Стоит отметить, что степень кристалличности ПОБ в композите исходно меньшая, чем в пленках гомополимера ПОБ – 46,7% против 63%. Кроме того, степень кристалличности ПОБ в композите выросла, как под действием липазы, так и в ее отсутствии. Однако, при ферментативной деградации рост кристалличности был больше – до 66,3% против 52,1% при гидролитической. Изменение степени кристалличности ПЛА как компонента композита носило иной характер. После гидролитической деградации степень кристалличности увеличилась, тогда как после ферментативной деградации, напротив, снизилась (Zhuikov, 2021).

Изменение механических свойств сополимеров в результате деградации измеряли методом наноиндентирования. Следует отметить, что модуль Юнга гомополимера ПОБ (2,2 ±0,06 ГПа) до разложения был выше, чем у сополимеров (~1 ГПа). Это связано с тем, что сополимеры обладают меньшей степенью кристалличности, а, следовательно, и жесткостью. В течение первой недели модуль Юнга всех полимеров резко увеличился. Наибольшее значение модуля Юнга наблюдалось для ПОБ-1095. За 1 месяц модуль Юнга ПОБ увеличился до 4,7 ±0,1 ГПа и оставался на этом уровне в течение всего эксперимента (6 месяцев). И только пленки из низкомолекулярного ПОБ (105 кДа) полностью теряют прочность и распадаются к 6-ому месяцу гидролитической и ферментативной деградации. Модуль Юнга сополимеров ПОБВ также увеличивался в течение первой недели и в дальнейшем существенно не менялся. Однако жесткость сополимеров все же меньше, чем у гомополимера, для сравнения, модуль Юнга ПГБВ-17,6%-1190 при 6-месячной деградации составил 2,2 ±0,07 ГПа, что вдвое меньше модуля Юнга гомополимеров. Отсутствие снижения массы полимерных пленок и повышение модуля Юнга, вероятно, за счет процесса вторичной кристаллизации полимеров (Pan, 2015), а также благодаря вымыванию аморфного компонента полимера позволяют сделать вывод о том, что изделия на основе ПОБ и его сополимеров в ходе эксплуатации в течение длительного времени сохранят свои структурные и механические свойства и будут выполнять свою функцию. (Zhuikov et al., 2020).

Баланс между гидрофобностью и гидрофильностью поверхности является одной из основных характеристик, указывающих на биосовместимость поверхности. Биосовместимость является одним из важнейших свойств полимеров, которые можно использовать в медицине, поэтому степень гидрофильности поверхности полимера влияет на рост клеток. В процессе биодеградации краевой угол между стандартной каплей воды и поверхностью полимерной пленки уменьшился, что свидетельствует об уменьшении степени гидрофобности сополимеров. В целом при деградации краевой угол для всех сополимеров, инкубированных в буферном растворе с липазой, уменьшился в среднем на 23% по сравнению с 17% при гидролитической

деградации (Zhuikov et al., 2020), что, вероятно можно объяснить происходящей эрозией поверхности полимерных пленок с экспозицией на поверхности концевых карбоксильных групп ПОБ и ПОБВ, образовавшихся в результате расщепления полимера.

На основании полученных результатов нами предложена модель процессов ферментативной деградации ПОБ и его сополимеров, схематически изображенный на Рисунке 107).

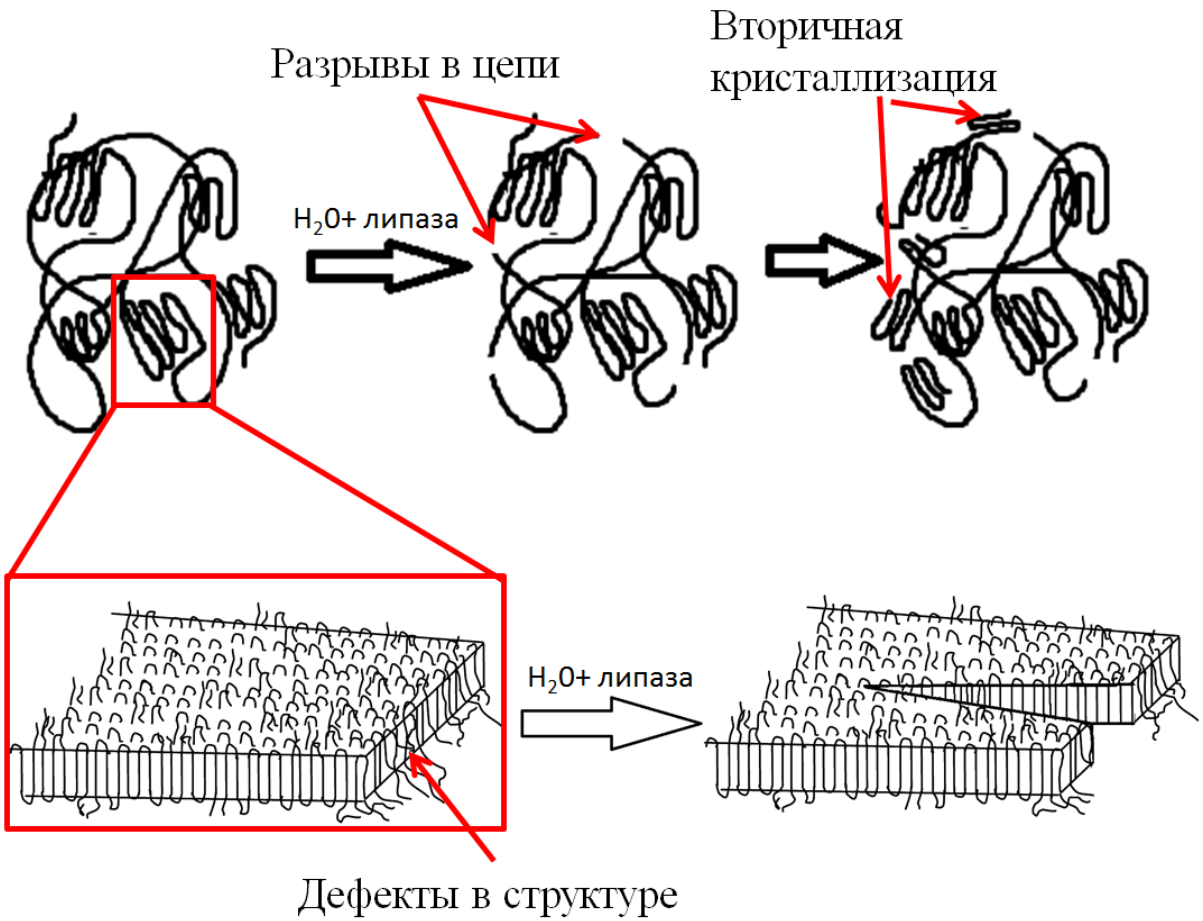


Рисунок 107. *Концептуальная модель деградации ПОБ и его сополимеров в присутствии липазы.*

Имеется ряд статей (Miroiu et al., 2015; Han et al., 2015; Pan, 2015), в которых описана гидролитическая деструкция полимеров в присутствии различных агентов, среди этих работ имеются и такие, в которых также наблюдали волнообразное изменение степени кристалличности в ходе деградации (Han et al., 2015; Pan, 2015), но в этих работах не было приведено объяснений механизмов такого явления. Мы предполагаем, что наблюдаемые нами изменения кристалличности ПОБ и его сополимеров в ходе деградации и различие в характере этих изменений связаны с процессами кристаллизации и рекристаллизации ПОА. Это означает следующее. При деградации аморфная составляющая полимерной матрицы ПОА разлагается

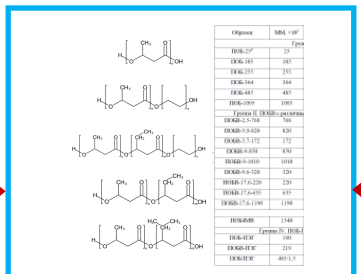
быстрее, чем кристаллическая в 20 раз (Sudesh et al., 2000). Это приводит к увеличению степени кристалличности полимера. Тем не менее, гидролиз происходит неспецифически, то есть расщепляется и полимер, находящийся в кристаллическом состоянии. При разложении кристаллической фазы ПОА (ламелей) образуется аморфная составляющая – переплетения полимерных цепей, что приводит к уменьшению степени кристалличности. Далее происходит расщепление полимера в аморфном состоянии и происходит вторичная его кристаллизация, что опять же приводит к повышению степени кристалличности. Такой процесс будет иметь волнообразный вид, что мы и показали в нашей работе. Меньшие же колебания степени кристалличности при ферментативной деградации связаны, вероятно, с более интенсивным разложением аморфной фазы полимерной матрицы, в результате чего начинают проявляться долговременные тенденции разложения кристаллической фазы, имеющие выраженные закономерности, связанные с химической структурой полимера – молярным содержанием 3-ОВ в сополимерах ПОБВ и граничным значением в 5,7-5,9 мол.%, при переходе через который меняется закономерность кинетики изменения физико-химических свойств ПОБВ в процессе его биодеградации (Рисунки 99 и 105) (Zhuikov et al., 2020).

Следует отметить, что способность ПОБ к биодеградации как одно из главных свойств этого биополимера продиктовано его природными свойствами как запасающего вещества у бактерий многих видов (Jendrossek and Handrick, 2002). Свойства этого биополимера должны позволять ферментным системам в бактериальной клетке относительно легко его утилизировать для дальнейшего использования клеткой в качестве источника энергии и углерода. Непосредственно с этим связана и устойчивость ПОБ к гидролитической деструкции (Zhuikov et al., 2020). Подверженность этого запасного вещества быстрой гидролитической деструкции крайне нежелательна, т.к. внутри клетки жидкая среда. Соответственно, подверженный легкому гидролитическому расщеплению полимер не будет стабилен или для обеспечения его стабильности потребуются особые усилия, затраты энергии и механизмы, такой полимер нельзя будет контролируемо синтезировать и контролируемо утилизировать. Вероятно, с этим связано то, что в процессе эволюции в качестве запасного биополимера бактерий был отобран именно поли-3-оксибутират и другие поли-3-оксиалканоаты, а не подверженные гораздо более быстрой гидролитической деструкции поли-2-оксиалканоаты (ПМК, ПГК и их сополимеры), синтез и накопление которых в бактериальной клетке также возможен (Park et al., 2013; Jung and Lee, 2011). Подверженность ПОБ и его сополимеров к неспецифической ферментативной деструкции панкреатической липазой (а также другими эстеразами) связано с его контролируемой биодеструкцией специализированными ПОА-деполимеразами в природе (Jendrossek and Handrick, 2002). Причем, надмолекулярная частично-

кристаллическая структура этого биополимера, по-видимому, во многом и определяет кинетику его биодеградации, в том числе задавая закономерность и механизм, по которым биодеградация полимера происходит. Т.е. химическая структура ПОБ и его надмолекулярная структура эволюционно предназначена для контролируемой биодеградации этого полимера, а любое изменение этой структуры, даже довольно незначительное, приводит к кратко- или долговременному нарушению закономерности и механизма этой биодеградации.

Таким образом, на основании результатов, изложенных в Разделе 3.4, нами была создана экспериментальная модель исследования гидролитической, ферментативной и клеточной деградации полимеров *in vitro*. Основным объектом изучения модели является полимерные стандартные пленки из синтезированного ПОБ и его сополимеров с заданными свойствами (а также другие изделия: 2D-и 3D-матриксы, микрочастицы). Основными входными параметрами модели являются молекулярная масса синтезируемых полимеров и содержание мономеров в полимерной цепи. Основными выходными параметрами модели являются параметры морфологии поверхности (в т.ч. надмолекулярных структур) во времени, кинетика изменения массы, ММ, термофизических свойств (степень кристалличности), механических свойств (модуль Юнга), гидрофильности (контактный угол смачивания) полимеров. Для обеспечения функционирования экспериментальной модели используются следующие методики: метод высаживания полимерных пленок из раствора, АСМ, СЭМ, ДСК, наноиндентация, контактный угол смачивания водой, водопоглощение, измерение активности ферментов, культивирование клеток на поверхности полимерных пленок. Для обработки экспериментальных данных используются методы математического моделирования. Уровень происходящих процессов с точки зрения организации живого – надмолекулярный. Основная задача экспериментальной модели – установление закономерностей кинетики изменения физико-химических свойств ПОБ и его сополимеров в процессе их биодеградации in vitro. Моделируемый идеальный биообъект модели – полимерное медицинское изделие, имплантированное в живую ткань человека. Временной масштаб экспериментальной модели – до 180 суток, что соответствует продолжительности эксплуатации изделий из ПОБ и его сополимеров в моделях более высокого уровня – на лабораторных животных in vivo. Схема созданной модели приведена на Рисунке 108.

Данные экспериментальной модели биотехнологического получения ПОБ и его сополимеров



ПОБ и его сополимеры различной ММ и мономерного состава

Данные экспериментальной модели исследования взаимосвязи надмолекулярной структуры полимера с его физико-химическими свойствами

Метод высаживания полимерных пленок из раствора



Стандартные пленки, (другие изделия: 2D-и 3D-матриксы, микрочастицы)

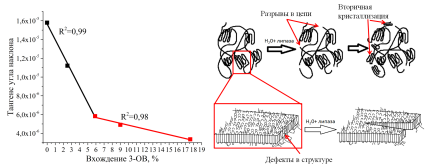
180 сут.

Методики гидролитической, ферментативной и клеточной деградации полимеров *in vitro*



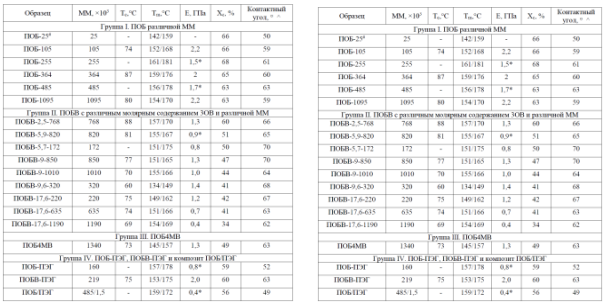
Стандартные образцы на разных стадиях (био)деградации *in vitro*

АСМ, СЭМ, ДСК, наноиндентация, измерение контактного угла смачивания водой и водопоглощения



Закономерности кинетики и механизмы (био)деградации *in vitro* ПОБ и его сополимеров, а также изделий на их основе

Методы математического моделирования



База данных по параметрам морфологии и физико-химическим свойствам стандартных образцов ПОБ и его сополимеров в процессе (био)деградации *in*

Использование полученных данных для других моделей

Надмолекулярный уровень организации живых систем

Рисунок 108. *Схема экспериментальной модели исследования гидролитической, ферментативной и клеточной деградации полимеров in vitro.*

Эта модель позволила установить, что для большинства ПОА ферментативная деградация идет по двум механизмам – неавтокаталитическому и автокаталитическому. Деградация идет как в объеме полимерной матрицы, так и на ее поверхности. Причем, на поверхности полимера наблюдались три основных типа изменения макромолекулярных структур при ферментативной деградации: проявляются новые ламели (из-за расщепления прикрывающего их слоя аморфного полимера), ламели исчезают, и они фрагментируются на более короткие участки (из-за расщепления в области дефектов кристаллических структур). Показано, что содержание 3-оксивалерата в цепи сополимера ПОБВ более 5,7-5,9 мол.% является границей, при пересечении которой меняется закономерность кинетики изменения степени кристалличности ПОБВ в процессе его биодеградации in vitro. БиоПЭГилирование ПОБ приводит к изменению кинетики ранней стадии биодеградации биополимера *in vitro*. Установленные при помощи этой модели закономерности позволяют прогнозировать изменение свойств полимеров и изделий из них на более высоких уровнях при их исследовании на клетках и животных.

Раздел 3.5. Биосовместимость *in vitro* поли-3-оксибутирата и его сополимеров

3.5.1. Цитотоксичность и пролиферация клеток на пленках из ПОБ и его сополимеров

Основной этап оценки биосовместимости полимеров и изделий на их основе проводится по результатам двух исследований: исследовании цитотоксичности, т.е. токсичности по отношению к клеткам, культивируемым в присутствии исследуемого материала, и исследования прикрепления и пролиферации клеток *in vitro* на поверхности биоматериала. Результаты этих исследований являются одними из важнейших биологических характеристик полимеров биомедицинского назначения, которые используются для разработки и доклинических исследований имплантируемых медицинских изделий (Севастьянов и Кирпичников, 2011; Williams, 2008; Jenkins, 2007; Shtilman, 2003). Для исследования цитотоксичности используется стандартный колориметрический тест МТТ, а также его аналог – тест ХТТ, которые основаны на химической реакции восстановления соли тетразолия (и его аналога) в окрашенные соединения, осуществляющейся за счет активности редуктаз митохондрий живых и физиологически активных клеток (Mosmann, 1983), при этом тест ХТТ отличается тем, что его окрашенные продукты растворимы в воде (Sutherland and Learmonth, 1997), что гораздо удобнее для наших исследований. В нашей работе для анализа цитотоксичности и биосовместимости ПОБ и его сополимеров: ПОБВ, ПОБ4МВ, ПОБ-ПЭГ и ПОБВ-ПЭГ, а также используемых в качестве материалов-сравнения - композита ПОБ/ПЭГ и полилактида была использована стандартная культура клеток, широко используемая для тестирования цитотоксичности и биосовместимости самых различных биомедицинских материалов – фибробласты мыши линии 3Т3 и ХТТ-тест (Borenfreund et al., 1988; Scudiero et al., 1988; Sutherland, 1997; Webb et al., 1998; Schwarze et al., 2002).

Как показали санитарно-химические исследования полимеров, из исследуемых полимеров не происходит экстракции каких-то токсичных веществ (Токсикологическое заключение № 38899). Поэтому для исследования цитотоксичности полимеров было выбрано испытание методом прямого контакта согласно ГОСТ ISO 10993-5-2011 (Севастьянов и Кирпичников, 2011). В этом тесте, как даже следует из его названия, полимерная пленка контактирует с клетками, растущими на поверхности дна ячеек 96-луночного планшета (на площади 10%) через 24 часа их культивирования.

Как видно из диаграммы на Рисунке 109 несмотря на некоторое заметное различие значений относительной жизнеспособности клеток по сравнению с контролем, ни один из исследуемых полимерных материалов не проявлял статистически достоверной цитотоксичности по отношению к фибробластам 3Т3 на сроках 1, 2 и 4 сутки.

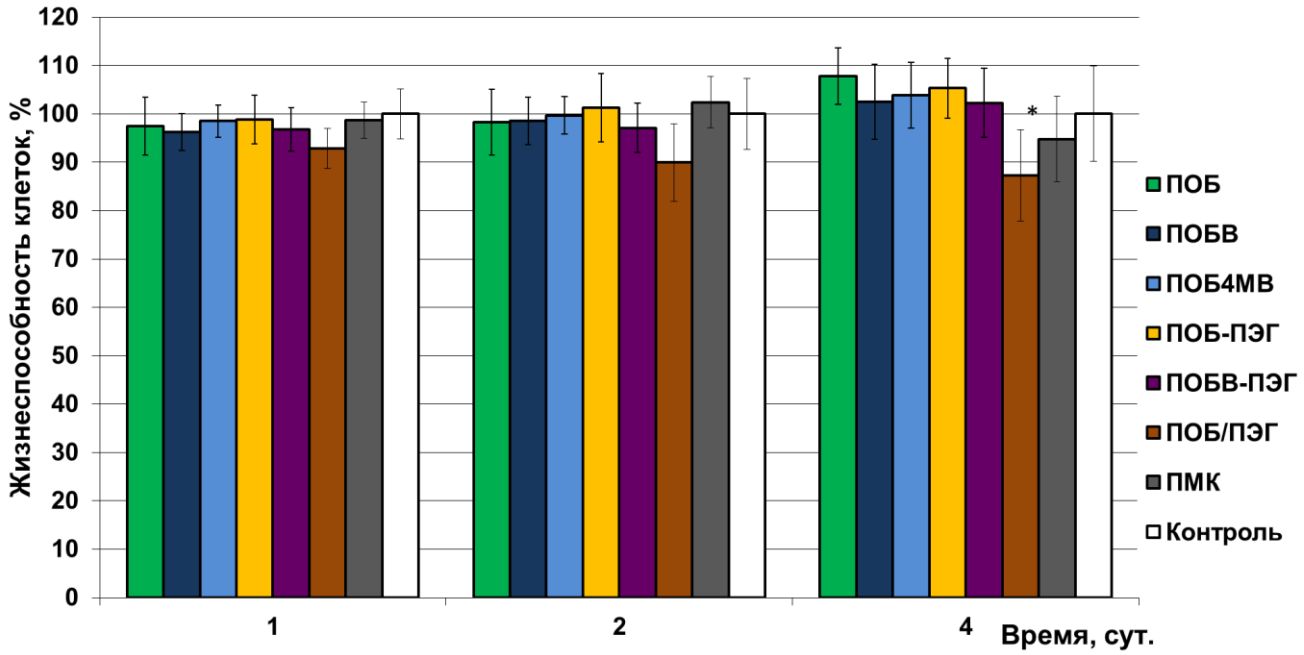


***Рисунок 109**. Жизнеспособность фибробластов линии 3Т3, культивируемых в стандартных условиях (в культуральных планшетах) в присутствии пленок из ПОБ, ПОББ, ПОБ4МВ, ПОБ-ПЭГ, ПОББ-ПЭГ, ПОБ/ПЭГ и ПМК, определенная с помощью ХТТ-теста (средние значения ± стандартное отклонение, n = 12). * $p < 0,05$ в сравнении с группой ПОБ.*

Более длительные сроки при тестировании цитотоксичности полимеров обычно не используются, т.к. клетки на 4-6 сут. образуют монослой, и их пролиферация затормаживается (Ignatius and Claes, 1996; Севастьянов и Кирпичников, 2011; ГОСТ ISO 10993-5-2011). Однако композит ПОБ/ПЭГ проявлял тенденцию к более низким значениям жизнеспособности клеток, которая составила наименьшее значение из всех полимеров (87%) и стала статистически достоверной по сравнению с ПОБ на 4-ый день культивирования клеток.

Для исследования биосовместимости полученных полимеров был изучен рост клеток на всей поверхности полимерных пленок (их «шероховатой» стороны) в течение 7 суток. Как видно из диаграммы на Рисунке 110 фибробласты 3Т3 хорошо прикреплялись на всех полимерах уже через 24 часа культивирования. Лучше всего адгезия клеток происходила на пленках из ПМК, хуже всего – на пленках из композита ПОБ/ПЭГ, число клеток на всех остальных полимерах не отличалось достоверно от пластика ячеек культурального планшета и составляла 3000-4000 клеток/см^2. На более поздних сроках как в контроле (в планшете), так и на полимерных пленках происходил рост клеток с разной скоростью. В контроле число клеток быстро возрастало до более 50 тыс./см^2 к 4-ым суткам, но далее стабилизировалось. На полимерных пленках динамика роста фибробластов 3Т3 сильно зависела от вида полимера.

Число клеток на пленках из ПОБ, ПОБВ, ПОБ4МВ и ПМК достоверно не отличалось друг от друга на каждом сроке и плавно повышалось с 1-ого до 7-ого (ПОБ, ПОБ4МВ) дня или до 4-ого (ПОБВ, ПМК) дня и далее не увеличивалось. Но рост клеток на этих полимерах был в 3 раза менее интенсивным, чем на культуральном пластике, что полностью соответствует литературным данным, а именно тем научным работам, авторы которых не боятся приводить данные по росту клеток на пластике (Naderi et al., 2020; Chang et al, 2016).

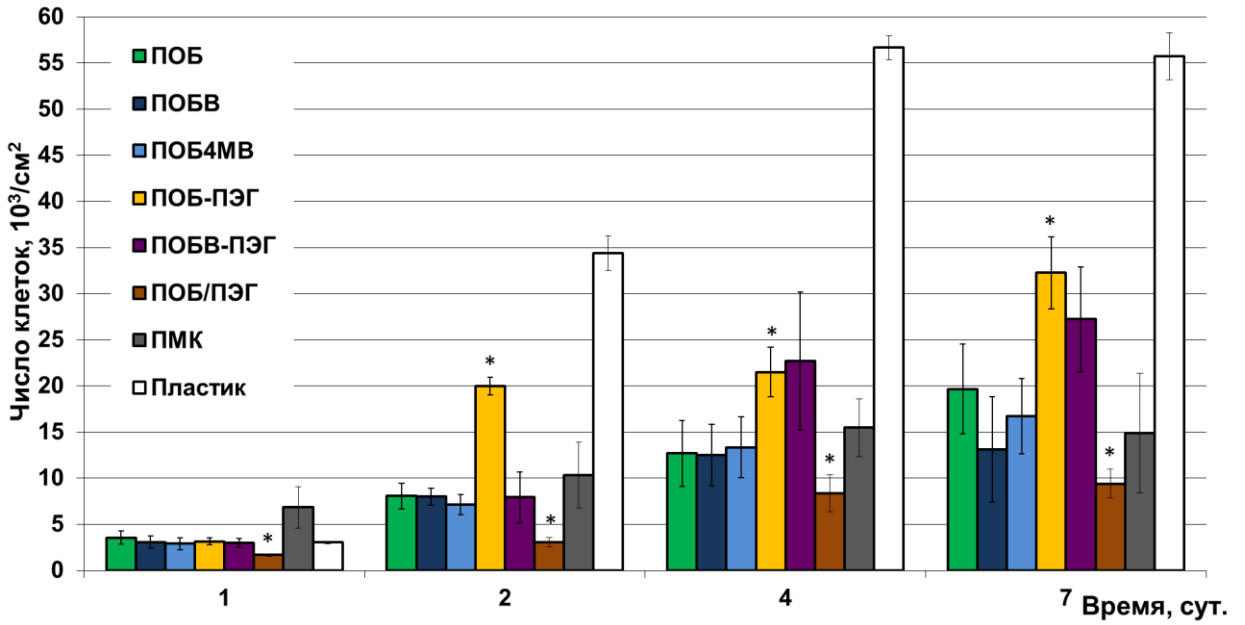


Рисунок 110. *Адгезия и пролиферация клеток фибробластов 3Т3 на пленках полученных полимеров: ПОБ, ПОБВ, ПОБ4МВ, ПОБ-ПЭГ, ПОБВ-ПЭГ, ПОБ/ПЭГ и ПМК, ХТТ-тест. Данные были представлены как средние значения ± стандартное отклонение, n = 12. * p <0,05 в сравнении с группой ПОБ.*

Наилучший рост клеток наблюдался на пленках из биоПЭГилированного ПОБ. Пролиферация фибробластов 3Т3 на пленках из биоПЭГилированного ПОБ была значительно более быстрой, чем на пленках из ПОБ, ПОБВ, ПОБ4МВ, ПОБ/ПЭГ и ПМК на 2-ой, 4-ый и 7-ой сутки культивирования. Наихудший рост клеток был на пленках из композита ПОБ/ПЭГ, что, вероятно, связано с некоторой токсичностью ПЭГ, входящего в его состав в довольно значительной доле (30 вес.%). Интересно, что некоторые исследователи приводят данные о хорошей биосовместимости композитов ПОА с ПЭГ, т.к. такие композиты обладают большей гидрофильностью, которая способствует прикреплению и росту клеток (Zheng et al., 2005). Однако в нашем случае, вероятно, этот эффект оказался полностью нивелирован неблагоприятным воздействием ПЭГ на клетки, как было показано рядом других исследователей (Zanzig et al., 2003; Townsend et al., 2005; Li et al., 2011; Li et al., 2012).

Известно, что прикрепление и рост клеток на полимерных пленках зависит от эффективности адсорбции к ним белка. Фактически рост клеток происходит не на собственно полимерной поверхности, а на слое белков плазмы крови, адсорбированных из межклеточной жидкости (Севастьянов и Кирпичников, 2011; Zheng, 2005; Kuo, 1997). Для исследования адсорбции белка на поверхности пленок мы использовали ФИТЦ-меченый БСА и флуоресцентную микроскопию. К сожалению, количественную оценку адсорбции белка на полимерных пленках с помощью данного метода нам не удалось провести, но качественно выявить характер абсорбции белка на поверхности пленок этот метод позволяет. Как видно на микрофотографиях, полученных на флуоресцентном микроскопе (Рисунок 111), практически на всех пленках мы наблюдаем неравномерную адсорбцию белка, особенно хорошо это заметно на пленках из ПОБ, где даже формируется некое подобие сетки, т.е. белок сорбируется преимущественно в каких-то неровностях и дефектах пленки. На пленках из других полимеров мы также видим выраженные области наиболее интенсивной адсорбции белка. Видно также, что пленки из композита ПОБ/ПЭГ и ПМК образуют на поверхности некие структуры, которые также способствуют неравномерной адсорбции белка. И только пленки из ПОБ-ПЭГ покрыты белком более-менее равномерно, что может быть связано с его большей гидрофильностью по сравнению со всеми другими полимерами, при этом сохраняется гладкая поверхность пленок.

На прикрепление и рост клеток оказывает воздействие не только физико-химические свойства полимерной поверхности, но и ее топография, в частности, шероховатость. Причем, различные типы клеток предпочитают расти на полимерных поверхностях с более подходящей им топографией. Так, фибробласты с большей готовностью растут на шероховатой поверхности, а эпителиальные клетки – на гладкой поверхности (Cochran et al., 1994; Giavaresi et al., 2006). Однако в нашем случае фибробласты росли на пленках с примерно одинаковой шероховатостью (Таблица 9), поэтому мы предполагаем, что более интенсивная пролиферация клеток на пленках из сополимера ПОБ-ПЭГ связана с большей гидрофильностью этого полимера по сравнению с другими полимерами, такими как ПОБ, ПОБВ и ПОБ4МВ.

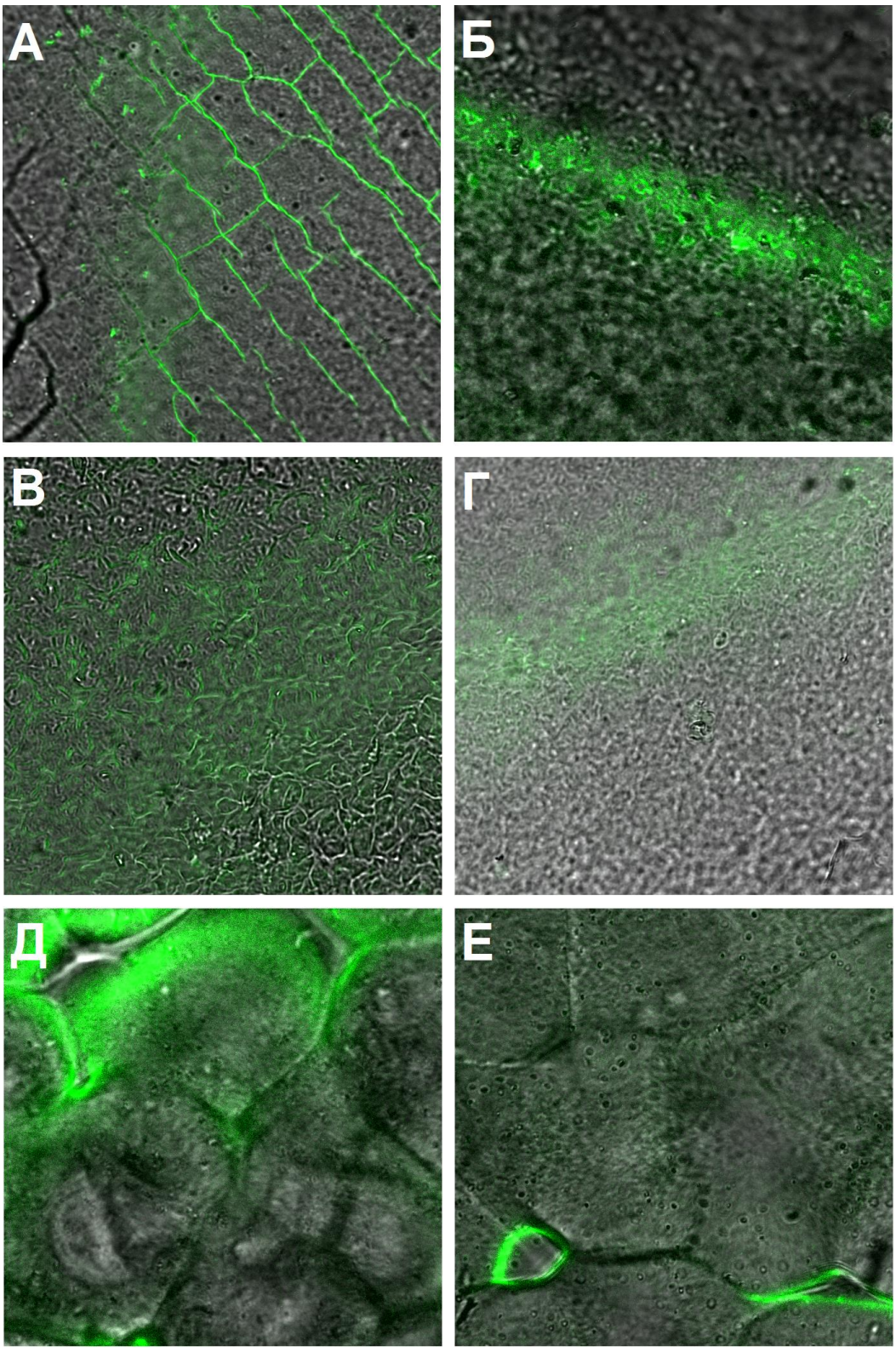


Рисунок 111. *Изображения адсорбции ФИТЦ-меченного БСА на пленках из ПОБ, ПОБВ, ПОБ-ПЭГ, ПОБВ-ПЭГ, композита ПОБ/ПЭГ и ПМК, полученные с помощью флуоресцентного микроскопа, ×900. (Выполнено совместно с сотрудниками научной группы профессора кафедры биоинженерии Феофанова А.В. и на оборудовании ЦКП МГУ).*

Известно, что ПЭГилирование биодеградируемых полимеров, химически синтезируемых ПОА (например, ПМГК) используется для улучшения биосовместимости этих полимеров. Под ПЭГилированием в данном случае понимается как ковалентное связывание ПЭГ с макромолекулами других полимеров, так и образование композитов ПОА с ПЭГ и адсорбция ПЭГ на поверхности полимеров за счет нековалентных межмолекулярных взаимодействий (Foster, 2010). Однако, результаты исследования влияния ПЭГилирования на биосовместимость ПОА часто противоречат друг другу. Так, китайскими исследователями показано значительное улучшение биосовместимости с клетками, уменьшение адгезии тромбоцитов и снижение коагуляции крови при контакте с композитами ПОА/ПЭГ. Улучшение био- и гемосовместимости биоматериала было сопряжено с увеличением гидрофильности, диффузионных характеристик и механических свойств при образовании смесей полимеров (Cheng et al., 2003; Pan et al., 2009; Marçal et al., 2008). Что касается сополимеров, то хорошая биосовместимость продемонстрирована для сополимера ПОБГк с диэтиленгликолем, полученного путем бактериального биосинтеза (Marçal et al., 2008). Однако, в других работах приводятся данные о значительном ухудшении прикрепления и роста различных клеток (меланомы кожи линии *SK-MEL 28*, аденокарциномы груди линии *MDA-MB-231*, фибробласты мыши линии *L929*, глиальные клетки крысы) на пленках как из сополимеров ПОА (ПОБ4ОБ,) с ПЭГ, так и композитов ПОА/ПЭГ, несмотря на значительное увеличение гидрофильности поверхности полимеров, что вроде бы должно, напротив, способствовать прикреплению и росту клеток (Zanzig et al., 2003; Townsend et al., 2005; Li et al., 2011; Li et al., 2012). Следует отметить работу Li с соавторами в которой было показано, что фибробласты и глиальные клетки гораздо лучше прикрепляются и растут на химически синтезированном блок-сополимере ПОБ4ОБ с ПЭГ, в котором блоки ПЭГ расположены регулярно в цепи полимера по сравнению с тем ПОБ4ОБ-ПЭГ, у которого блоки ПЭГ расположены случайно, что, вероятно, связано с микроструктурой поверхности регулярного сополимера, организованной в виде цветочно-подобных структур. В нашем случае нано- и микроструктура поверхности ПОБ и ПОБ-ПЭГ, в котором концевые блоки ПЭГ расположены регулярно, также значительно различается – поверхность биоПЭГилированного ПОБ тоже имеет регулярные структуры (Рисунок 67). Различие в микроструктуре поверхности ПОБ и ПОБ-ПЭГ косвенно подтверждается также и приведенными выше данными по неравномерной адсорбции белка на поверхности пленок из ПОБ, что также указывает и на наличие участков поверхности, сильно различающихся по своим физико-химическим свойствам (Рисунок 111). Показано, что структурированность полимерной поверхности в виде каких-то регулярно расположенных паттернов (ячеек, стержней, звезд,

кругов и т.п.) и к тому же обладающих другими физико-химическими свойствами (например, гидрофильностью, механикой) по сравнению с соседними областями способствует прикреплению и росту клеток на такой поверхности или может вызвать другие изменения физиологии клеток. По-видимому, подобная полимерная поверхность может быть биомиметическим аналогом поверхностей, на которых растут клетки в естественных условиях, т.к. они как раз и имеют подобную мозаичную структуру (Criscenti, 2017; de Boer and van Blitterswijk, 2013; Nelson and Cox, 2008). То есть образование композитов или сополимеров ПОА с ПЭГ химическим путем способно как повышать, так и ухудшить биосовместимость полимеров, а каким образом влияет биоПЭГилирование ПОА на их биосовместимость практически совсем неясно (Li et al., 2011; Pan et al., 2009; Zanzig et al., 2003; Townsend et al., 2005).

Таким образом, несмотря на малое содержание ПЭГ в биоПЭГилированном ПОБ (0,33 мол.%) по сравнению с композитом ПОБ/ПЭГ он значительно отличается по своим физико-химическим свойствам от гомополимера ПОБ и значительно превосходит его по способности поддерживать рост клеток на полимерной поверхности.

3.5.2. Пролиферация клеток на пленках из ПОБ после их биодеградации *in vitro*

Был исследованы также прикрепление и пролиферация фибробластов 3Т3 на пленках из ПОБ, подвергшихся гидролитической и ферментативной деградации in vitro при использовании разработанной нами модели биодеградации in vitro (Раздел 3.4) Результаты представлены в виде графиков изменения числа клеток при их росте на пленках из ПОБ по сравнению с ростом на пленках из ПМК (ПЛА) марки PL-38 (Evonik, Нидерланды), изготовленными по той же методике.

Исследование пролиферации фибробластов линии 3Т3 на полимерных пленках из ПОБ-365 и ПМК, которые подверглись различной степени неферментативной (НД) и ферментативной (ФД) (с помощью панкреатической липазы) деградации в течение 2-х (14 сут.) и 6-ти недель (42 сут.) (Рисунок 112). Как было показано ранее (см. Раздел 4) в ходе биодеградации in vitro происходят изменения как физико-химических свойств, так и морфологии полимерных пленок, поэтому это является хорошей моделью для анализа роста фибробластов на полимерных пленках с различной гидрофильностью и морфологией поверхности (Zhuikov et al., 2021).

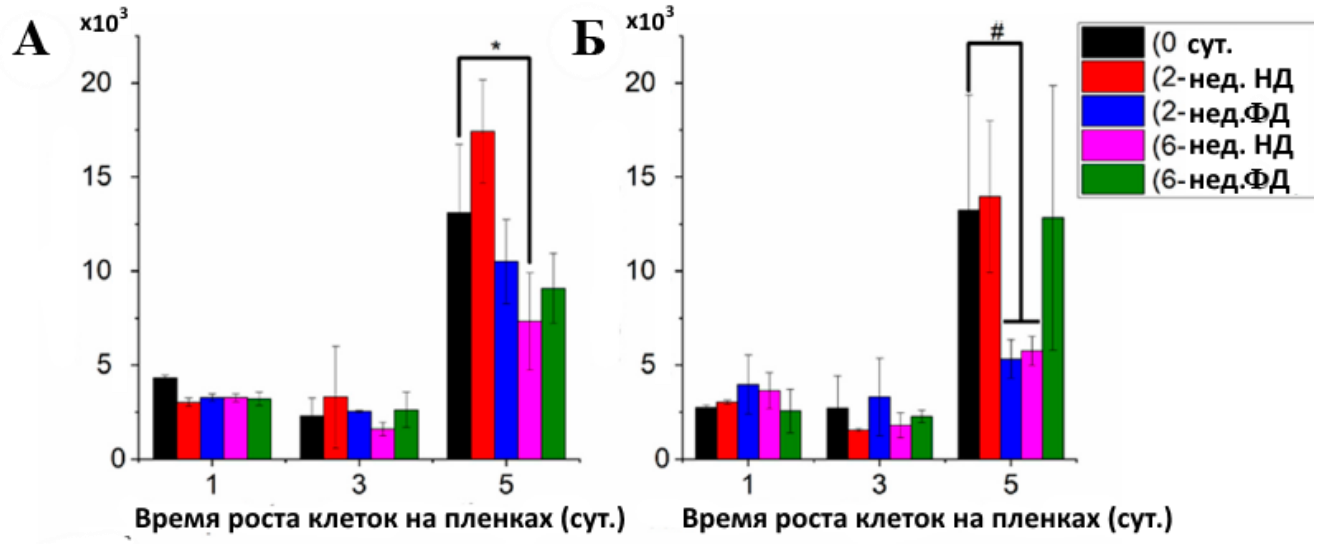


Рисунок 112. *Пролиферация фибробластов 3Т3 на полимерных пленках из ПОБ (А) и ПМК (Б), подвергшихся 2-х и 6-ти недельной неферментативной (НД) и ферментативной (ЭД) деградации; * p <0,05 в сравнении с 0 сут. для ПОБ; # p <0,05 в сравнении с 0 сут. для ПМК.*

Видно, что пролиферация клеток на 5-ые сутки на пленках ПОБ и ПМК, подвергшихся 6-ти недельной гидролитической деградации значительно меньше, чем на свежих пленках, тогда как при ферментативной деградации пленок такое различие в росте клеток не наблюдается.

Методы сканирующей электронной и флуоресцентной микроскопии использовались для того, чтобы оценить изменения в структуре поверхности пленки, а также в распределении клеток. При разрушении пленки наблюдалась поверхностная эрозия, при этом степень эрозии была различной для разных типов полимеров. Поверхность пленок из ПМК подверглась поверхностной эрозии значительной степени, выражающейся изменением морфологии поверхности, в то время как поверхность пленок из ПОБ оставалась относительно гладкой и неповрежденной (Рисунок 113).

Распределение клеток, растущих на поверхности пленок из ПМК, было относительно широким и равномерным. В отличие от роста на пленках из ПМК, при росте на поверхности пленок из ПОБ клетки образовывали изолированные колонии разного размера. Для изучения жизнеспособности и распределения клеток как на свежих, так и на деградированных полимерных пленках была использована также флуоресцентная микроскопия.

Было показано, что фибробласты 3Т3 растут на всех полимерных пленках после 5-ти суток инкубации.

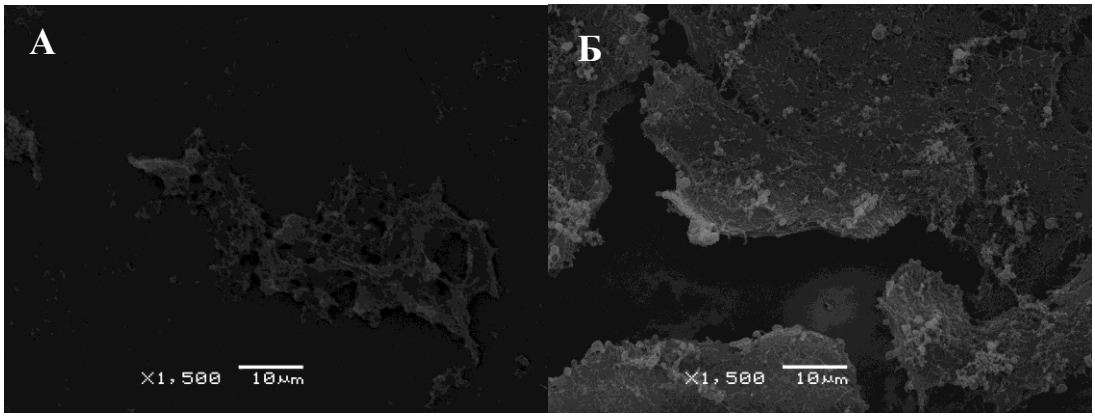


Рисунок 113. *Изображение поверхности пленок из ПОБ (А) и ПМК (Б) после культивирования на них фибробластов 3Т3 в течение 7 сут., СЭМ, ×1500. (Выполнено при содействии и на оборудовании Общефакультетской лаборатории электронной микроскопии (отв. профессор кафедры биоинженерии Соколова О.С.).*

Поверхность свежих пленок была покрыта равномерным и плотным слоем фибробластов 3Т3 (Рисунок 114). Однако распределение клеток на деградированных пленках (ферментативная деградация в течение 42-х сут.) по сравнению со свежеприготовленными демонстрирует характерный узор, образованный изолированными колониями клеток различного размера (Zhuikov et al., 2021).

Таким образом, результаты, полученные в ходе исследований, описанных в Разделе 3.5, нами была создана экспериментальная модель исследования биосовместимости *in vitro* полимеров (ПОА) и изделий из них. Основными объектами изучения модели являются полимерные пленки из синтезированного ПОБ и его сополимеров с заданными свойствами, 2D- и 3D-матриксы, микрочастицы на основе ПОБ, его сополимеров и композитов. Основными входными параметрами модели являются физико-химические свойства (механические, гидрофильность) полимерных изделий, морфологические параметры полимерных изделий (шероховатость пленок, диаметр частиц, пористость матриксов), кинетические параметры изменения физико-химических свойств и морфологии в ходе гидролитической и ферментативной деструкции. Основными выходными параметрами модели являются параметры жизнеспособности и пролиферации клеток (фибробластов, МСК, опухолевых) при росте в присутствии и непосредственно на пленках из ПОБ и его сополимеров, а также микрочастиц и матриксов на их основе. В экспериментальной модели используются следующие методики: ХТТ-тест, МТТ-тест, методы исследования адсорбции белка, СЭМ, конфокальная микроскопия, методики моделирования гидролитической и ферментативной деградации *in vitro*. Уровень происходящих процессов с точки зрения организации живого – клеточный. Временной масштаб экспериментальной модели – до 7 суток.

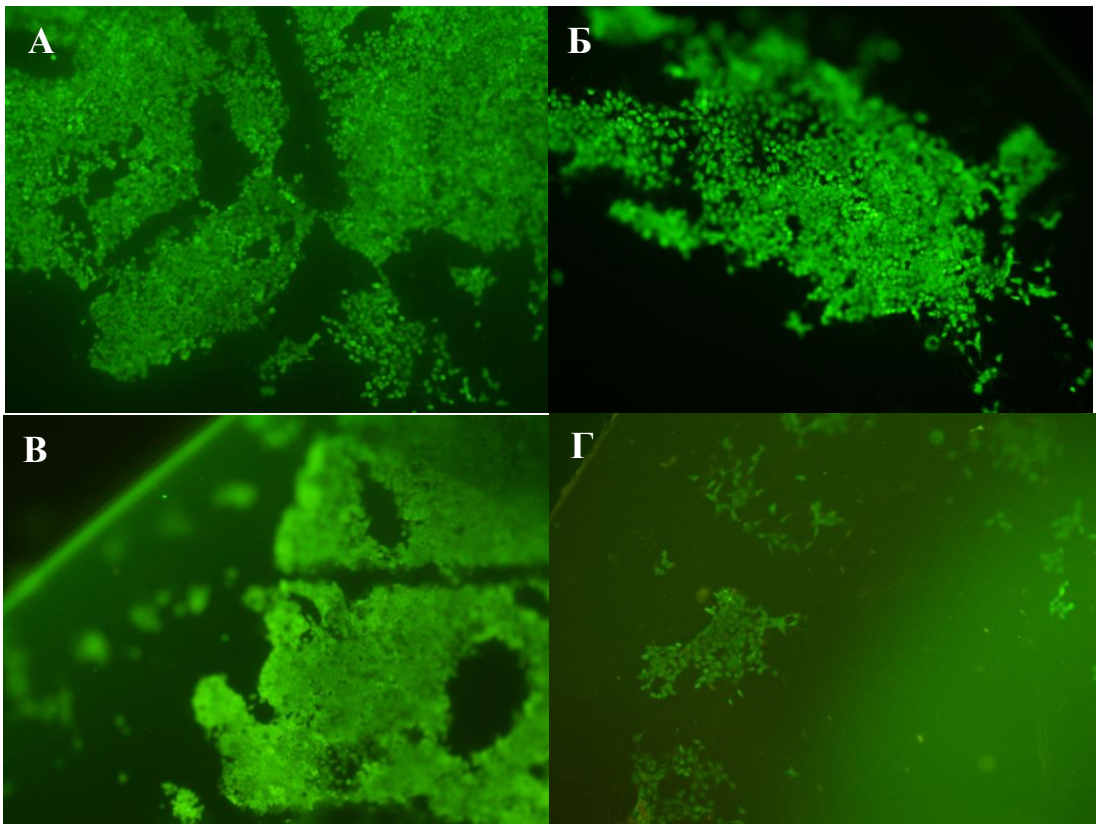


Рисунок 114. *Рост фибробластов 3Т3 на 5-е сут. на полимерных пленках из ПОБ (А,Б) и ПМК (В,Г) - свежеприготовленных (А,В) и подвергшихся 6-ти недельной ферментативной деградации in vitro (Б,Г). (Выполнено совместно с сотрудниками научной группы профессора кафедры биоинженерии Феофанова А.В. и на оборудовании ЦКП МГУ).*

Основные задачи экспериментальной модели: отбор полимеров по параметру цитотоксичности и динамике пролиферации клеток на полимерных пленках и матриксах; анализ противоопухолевой активности микрочастиц in vitro на опухолевых клетках. Моделируемый идеальный биообъект для этой модели – живая ткань.

При помощи этой модели было показано, что ПОБ и его сополимеры не обладают цитотоксичностью по отношению к фибробластам линии 3Т3 и МСК, а также поддерживают рост этих клеток на поверхности пленок из этих биополимеров. Гидролитическая и ферментативная деградация пленок из ПОБ приводит к уменьшению пролиферации клеток на пленках, которое сопровождается изменением характера их роста на пленках – от равномерного к росту в виде колоний. Наиболее выраженный рост клеток наблюдается на пленках из биоПЭГилированных ПОБ. По этой причине для дальнейших исследований помимо ПОБ в качестве материала для изготовления микрочастиц и матриксов был также использован сополимер ПОБ-ПЭГ.

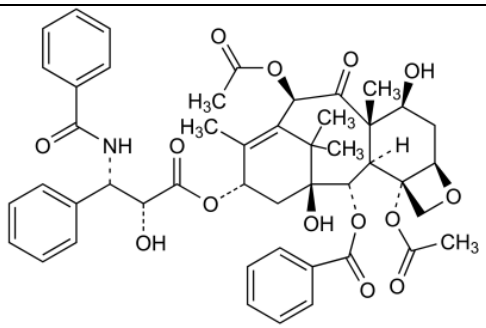
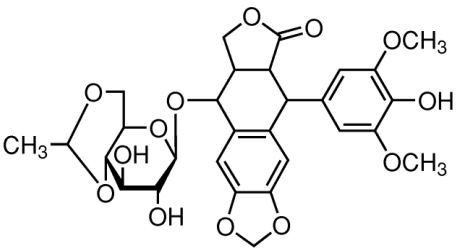
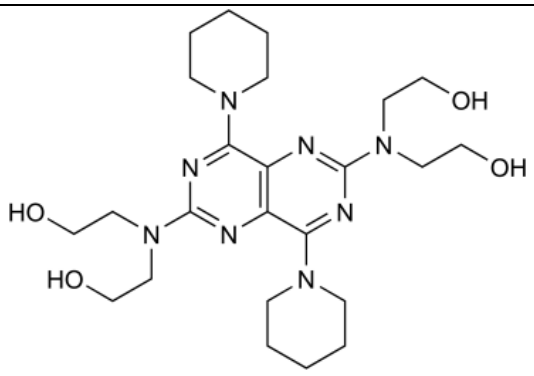
Раздел 3.6. Системы пролонгированного высвобождения низкомолекулярных веществ на основе поли-3-оксибутирата и его сополимеров

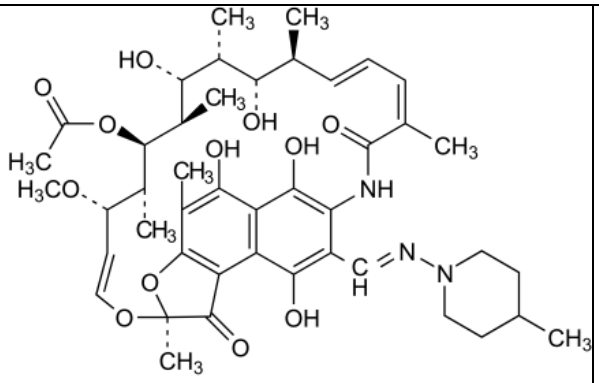
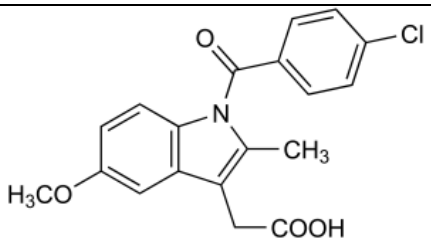
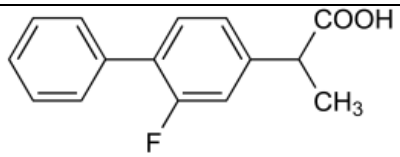
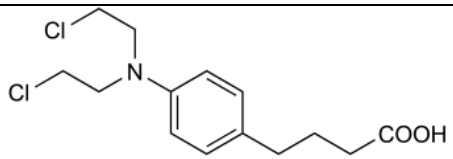
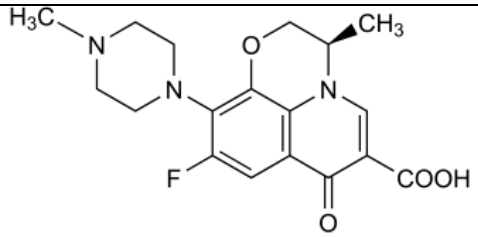
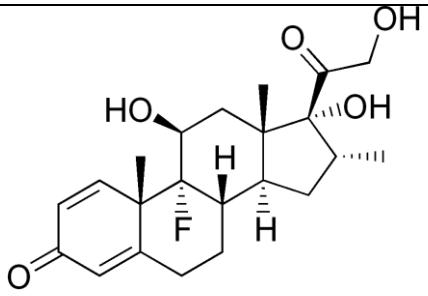
3.6.1 Высвобождение *in vitro* лекарственных веществ различного химического строения из микросфер на основе поли-3-оксибутирата

На первом этапе работы нами было проведено предварительное скриннинговое исследование кинетики высвобождения различных ЛВ из микросфер на основе поли-3-оксибутирата. Существует несколько типов систем пролонгированного высвобождения ЛВ на основе полимерных микрочастиц, но в рамках данной работы мы будем рассматривать системы, представляющие собой композиты полимера с ЛВ, где ЛВ равномерно распределено в полимерной матрице. Для проведения этого эксперимента были выбраны ЛВ различной химической природы и фармакологического действия: дексаметазон (стероидное противовоспалительное ЛВ), хлорамбуцил (антибактериальное ЛВ), паклитаксел (ПТЛ) (противоопухолевый растительный алкалоид), этопозид (противоопухолевый растительный алкалоид), дипиридамол (антитромбогенное ЛВ), индометацин (нестероидное противовоспалительное ЛВ), левофлоксацин (антибактериальное ЛВ), флурбипрофен (нестероидное противовоспалительное ЛВ), рифампицин (противотуберкулезное ЛВ). Информация по используемым в эксперименте ЛВ суммирована в Таблице 15 (DrugBank Online; КлассИнформ).

С этой целью нами были получены микрочастицы на основе ПОБ, содержащие эти ЛВ. Подбор используемого для изготовления микрочастиц ПОБ, параметров самих микрочастиц (форма, диаметр, загрузка ЛВ), метода получения микрочастиц, а также условий эксперимента по исследованию кинетики высвобождения ЛВ из микрочастиц мы провели, опираясь на проведенные ранее исследования кинетики высвобождения ЛВ из полимерных пленок и микросфер на основе ПОБ (Бонарцев и др., 2006; Bonartsev et al., 2007; Лившиц и др., 2009; Iordanskii et al., 2007), а также на классические работы по исследованию кинетики высвобождения ЛВ из композиционных полимерных систем (Higuchi, 1961; Crank, 1975; Korsmeyer et al., 1983; Peppas, 1985; Baker, 1987; Vergnaud, 1993; Liggins and Burt, 2001; Siepmann and Siepmann, 2006; Arifin et al., 2006; Fu and Kao, 2010). Комплексное исследование диффузионных свойств ПОБ и его композитов с другими полимерами были ранее проведены научной группой проф. Иорданского А.Л. (Iordanskii et al., 2007).

Таблица 15. *Основные характеристики используемых в эксперименте лекарственных веществ (DrugBank Online; КлассИнформ).*

Название	Формула	ММ, г/моль	Растворимость в воде, мМ	Код АТХ
Паклитаксел		853,9	0,006-0,015	Противоопухолевое средство, алкалоид, L01CD01
Этопозид		588,6	0,02-0,05	Противоопухолевое средство, алкалоид, L01CB01
Дипиридамол		504,6	1,8	Антикоагулянты, B01AC07

Рифампицин		822,9	1,7-3,0	Противотуберкулезные препараты, Антибиотики, J04AB02
Индометацин		357,8	0,06	Нестероидные противовоспалительные препараты, S01BC01
Флурбипрофен		244,3	0,03-0,10	Нестероидные противовоспалительные препараты, S01BC04
Хлорамбуцил		304,2	40,8	Противоопухолевые препараты, L01AA02
Левофлоксацин		361,4	4,0	Противомикробные препараты, Фторхинолоны, J01MA12
Дексаметазон		392,5	0,12-0.23	Гормональные препараты, кортикостероиды, H02AB02

Микрочастицы были изготовлены методом одноэтапного эмульгирования (Лившиц и др., 2009; Бонарцев и др., 2011б). Большим преимуществом метода является его универсальность – метод широко используется для получения микрочастиц из самых разнообразных полимеров и для загрузки в них всевозможнейших ЛВ (Siepmann and Siepmann, 2006). Полученные микрочастицы содержали 10±1% ЛВ, различающихся по химическому строению и биологической активности, обладали средним диаметром 40±5 мкм, для их получения использовали ПОБ средней молекулярной массы (ПОБ-255, ММ = $2{,}55\times10^5$). Такие параметры микрочастиц были выбраны как наиболее оптимальные для получения максимально полного объема подходящих для математической обработки данных по кинетике выведения ЛВ из микрочастиц. Например, одним из ключевых параметров эксперимента является его длительность, которая может существенно различаться в зависимости от характеристик микрочастиц и физико-химических свойств используемых ЛВ: от нескольких часов до нескольких месяцев. В результате неправильный подбор характеристик микрочастиц может привести к потере части данных по кинетике высвобождения того или иного ЛВ или снижению их точности, если его высвобождение будет происходить слишком медленно или, напротив, слишком быстро. Подбор этих параметров осуществляли экспериментально. Для исследования высвобождения ЛВ из полимерных микрочастиц были выбраны стандартные модельные условия *in vitro* – в 50 мМ фосфатном буфере с pH=7.4 при 37ºС при перемешивании на ротационном шейкере при 330 об/мин, широко используемых в экспериментах по исследованию контролируемого высвобождения ЛВ из полимерных систем для фармацевтики (Vergnaud, 1993; Liggins and Burt, 2001; Siepmann and Siepmann, 2006).

Изображения изготовленных микрочастиц, полученные с помощью световой микроскопии и СЭМ представлены на Рисунках 115 и 116. Все полученные микрочастицы, загруженные различными ЛВ, обладали сферической формой и схожей микропористой структурой поверхности, что связано, вероятно, со сходными физико-химическими свойствами используемых ЛВ – все они малорастворимы в воде.

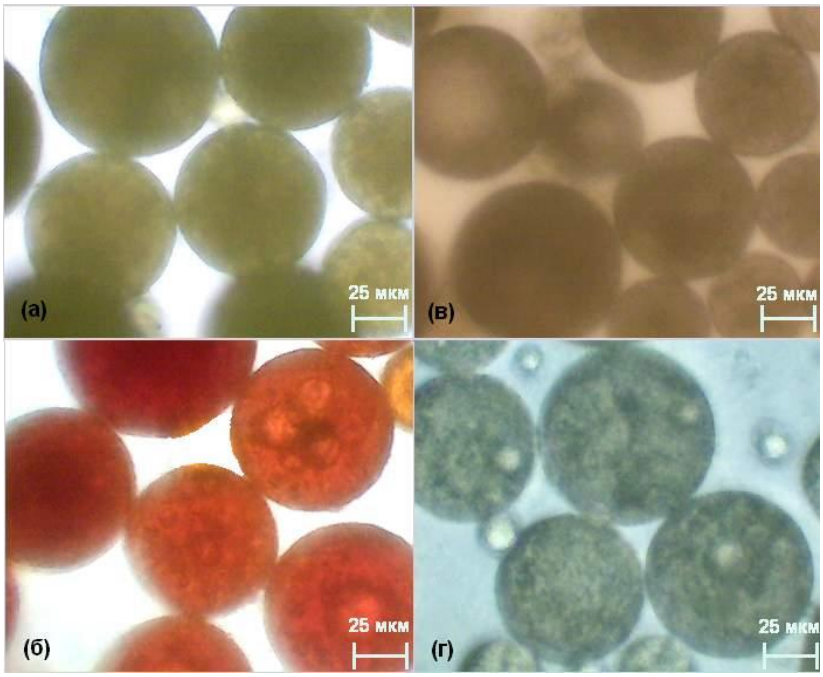


Рисунок 115. *Микрофотографии микросфер из ПОБ с загруженными ЛВ: дипиридамолом (А), рифампицином (Б), индометацином (В), левофлоксацином (Г), полученные методом одноэтапного эмульгирования (световая микроскопия, ×200).*

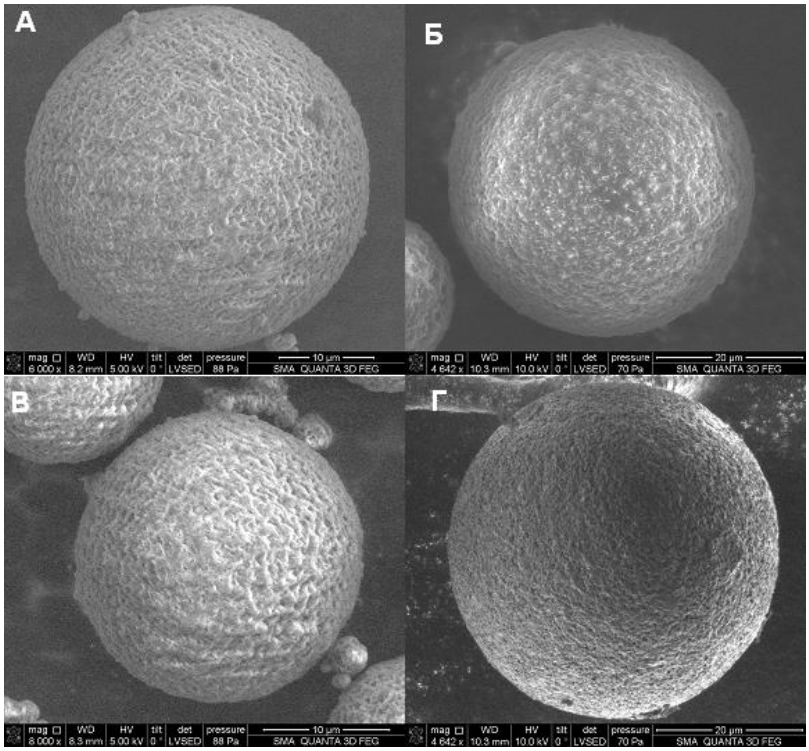


Рисунок 116. *Микрофотографии микросфер из ПОБ с загруженными ЛВ: дипиридамолом (А), ивермектином (Б), этопозидом (В) и паклитакселом (Г), полученные методом одноэтапного эмульгирования (СЭМ, ×4500-8000). (Выполнено при содействии и на оборудовании Общефакультетской лаборатории электронной микроскопии (отв. профессор кафедры биоинженерии Соколова О.С.).*

На Рисунке 117 представлены кривые высвобождения различных ЛВ из микросфер на основе ПОБ в модельных условиях in vitro.

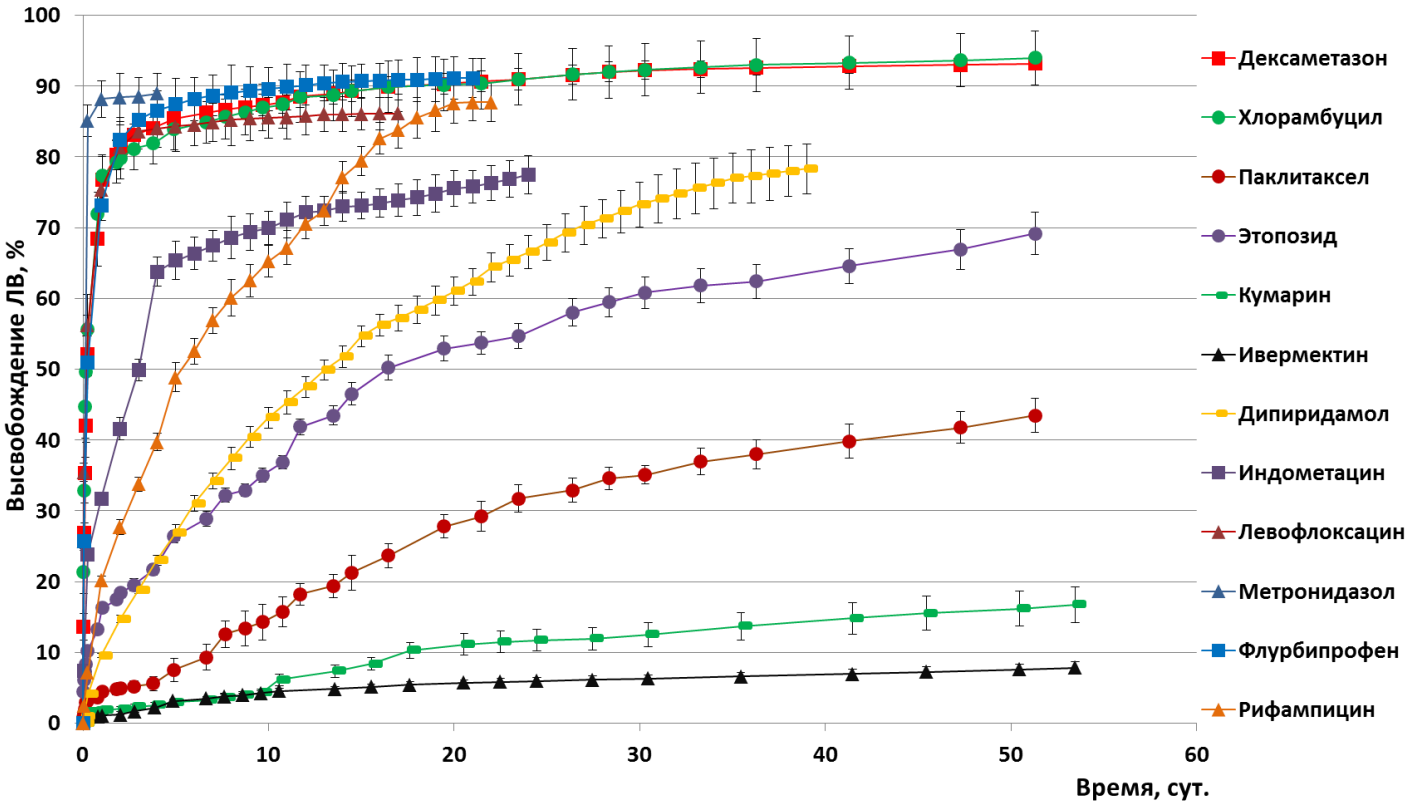


Рисунок 117. *Кинетические кривые высвобождения ЛВ различной химической природы (их названия даны на легенде кривых на графике справа) из микросфер на основе ПОБ (средний диаметр – 40 мкм, содержание ЛВ - 10%).*

Видно, что кинетика высвобождения различных ЛВ сильно различается и зависит от многих факторов: геометрических параметров полимерного изделия, физико-химических свойств полимерного материала, физико-химических свойств ЛВ, состава и свойств окружающей водной среды и много другого (Higuchi, 1961; Crank, 1975; Korsmeyer et al., 1983; Peppas, 1985; Baker, 1987; Vergnaud, 1993; Liggins and Burt, 2001; Siepmann and Siepmann, 2006; Arifin et al., 2006). Ранее нами было показано, что высвобождение ЛВ (дипиридамола) из полимерной матрицы ПОБ происходит преимущественно по механизму диффузии ЛВ в водной среде, что, вероятно, связано с диффузионными свойствами ПОБ (Бонарцев и др., 2006; Bonartsev et al., 2007; Лившиц и др., 2009; Iordanskii et al., 2007).

Для лучшего понимания этих различий нами была проведена математическая обработка полученных результатов.

В качестве первого шага для анализа полученных результатов мы оценили величину т.н. «взрывного эффекта» (в англоязычной терминологии “burst effect”) быстрого высвобождения

ЛВ из микрочастиц на ранних стадиях этого высвобождения. Экспериментально было установлено, что для оценки «взрывного эффекта» следует брать первые 24 часа высвобождения ЛВ из полимерных микрочастиц (Таблица 16) (Бонарцев и др., 2006; Bonartsev et al., 2007; Лившиц и др., 2009). Как видно, данные по «взрывному эффекту» также очень сильно различаются в зависимости от ЛВ, которое было загружено в полимерные микрочастицы.

Таблица 16. *Величина «взрывного эффекта» для микрочастиц, загруженных различными ЛВ.*

ЛВ	Высвобождение ЛВ в 1-ые сутки, % (от загруженного ЛВ)
Дексаметазон	76,7
Хлорамбуцил	77,3
Паклитаксел	4,4
Этопозид	16,3
Симвастатин	1,8
Ивермектин	1,1
Дипиридамол	9,5
Индометацин	31,7
Левофлоксацин	75,4
Метронидазол	88,2
Флурбипрофен	73,1
Рифампицин	20,1

Общепринято, что высвобождение ЛВ из полимерных микрочастиц происходит за счет диффузионных процессов, поэтому кинетику высвобождения ЛВ можно описать, используя упрощенные математические модели, базирующиеся на законе диффузии Фика (Atkins and Peacock, 1996).

Ранее при исследовании высвобождения таких ЛВ, как 5-нитрофурфурилиденсемикарбазон (Kosenko et al., 2007), дипиридамол и индометацин из пленок ПОБ было показано, что на первом этапе высвобождение ЛВ происходит по степенной функции, а на 2-ом этапе – по экспоненциальной функции. Эти данные несколько не согласуются с классическими работами по исследованию высвобождения ЛВ из

биодеградируемых полимеров Шипмана (Siepmann) с коллегами (Siepmann and Siepmann, 2006; Siepmann et al., 2002; Siepmann et al., 2005), которые выделяли еще стадию высвобождения ЛВ за счет деструкции полимерной матрицы. Однако, ПОБ и его сополимеры в отличие, например, от ПМК и ее сополимеров (с которыми работали эти исследователи) являются медленно деструктируемыми полимерами. Как было показано в разделе 3.2 процессы гидролитической деструкции для ПОБ средней молекулярной массы (ММ = 364 кДа) проявляются в достаточно значительной мере (по уменьшению массы, падению ММ, изменению кристалличности, изменению механических свойств) лишь на сроках свыше 90 сут. и даже 180 сут. (Рисунки 91 и 95), тогда как длительность экспериментов по исследованию кинетики высвобождения ЛВ из полимерных систем на основе ПОБ не превышает эти сроки, т.к. не имеет практического биомедицинского значения. Поэтому фактор гидролитической деградации не вносит существенный вклад в кинетику высвобождения низкомолекулярных ЛВ из полимерных систем на основе средне- и высокомолекулярного ПОБ.

Для анализа кинетики высвобождения ЛВ из микросфер на основе ПОБ мы использовали математические модели высвобождения, основанные на законе (уравнении) диффузии Фика (Crank, 1975; Baker, 1987; Vergnaud, 1993). Однако, следует отметить, что эти модели упрощенные и для анализа экспериментальных данных с их помощью, сделаны следующие допущения: равномерное распределение ЛВ в полимерной матрице, исходная концентрация ЛВ в полимерной матрице не превышает предел его растворимости в воде, постоянный не зависящий от концентрации коэффициент диффузии, отсутствие аккумуляции ЛВ на границе раздела фаз микросфера-окружающая водная среда.

Мы использовали приближенные функции для описания ранней и поздней стадий высвобождения ЛВ из микросфер. Раннюю стадию высвобождения ЛВ по закону диффузии Фика можно описать следующей функцией (Baker, 1987; Arifin et al., 2006):

$$\frac{M_t}{M_0} = 6\sqrt{\frac{Dt}{\pi r^2}} - \frac{3Dt}{r^2}, \quad (12)$$

где M_t — количество вышедшего из микросфер ЛВ в момент времени t, M_0 — исходное количество ЛВ в микросферах, r — средний радиус микросфер, D — коэффициент диффузии, для раннего этапа высвобождения ЛВ ($M_t \leq 60\%$).

Позднюю стадию высвобождения ЛВ из микросфер по закону диффузии Фика можно описать следующей функцией:

$$\frac{M_t}{M_0} = 1 - \frac{6}{\pi^2}\exp\left(-\frac{\pi^2 Dt}{r^2}\right), \quad (13)$$

где M_t — количество вышедшего из микросфер ЛВ в момент времени t, M_0 — исходное количество ЛВ в микросферах, r — средний радиус микросфер, D — коэффициент диффузии, для позднего этапа высвобождения ЛВ (M_t > 60%). После преобразования этих выражений с помощью введения такого параметра, как характеристическое время диффузии ($T = \frac{r^2}{\pi^2 D}$) представленные выше функции приобретают более простой вид:

$$\frac{M_t}{M_0} = \frac{3}{\pi^2}\left(2\sqrt{\frac{\pi\, t}{T}} - \frac{t}{T}\right), (14); \quad \frac{M_t}{M_0} = 1 - \frac{6}{\pi^2}\exp\left(-\frac{t}{T}\right), (15)$$

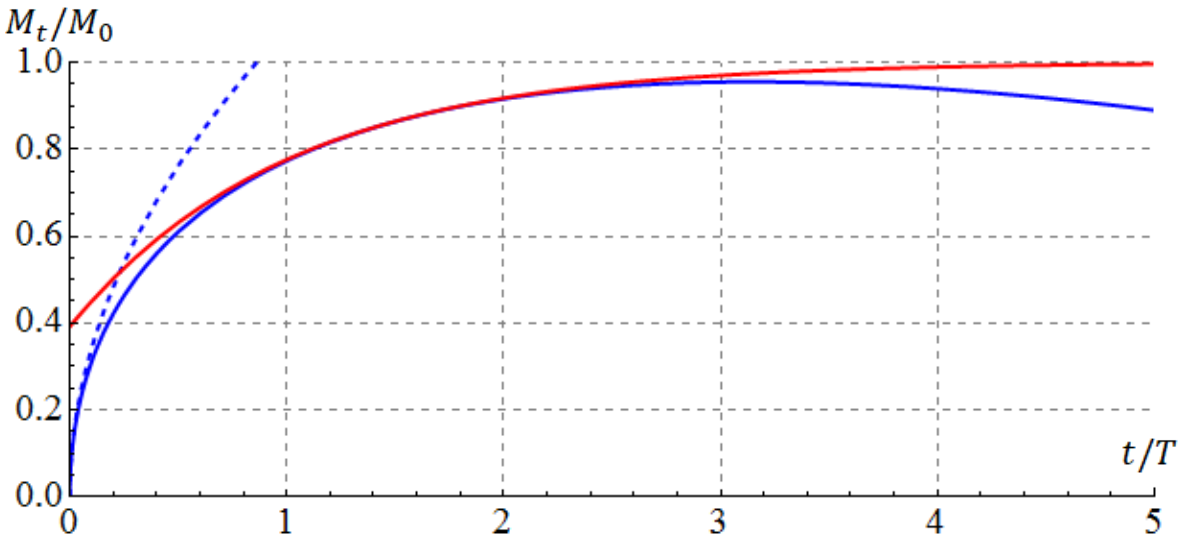


Рисунок 118. *Кривые высвобождения ЛВ из микросфер в единицах характеристического времени (синяя кривая — ранняя стадия, пунктирная синяя кривая — приближение Хигучи для ранней стадии, красная кривая — поздняя стадия).*

Ранняя и поздняя стадии высвобождения ЛВ из микросфер представлены на графике (Рисунок 118) как синяя и красная кривые, соответственно, в единицах характеристического времени T. Для описания высвобождения ЛВ из полимерной матрицы используют также и полуэмпирические модели, наиболее известной из которых является модель Хигучи, в которой ($M_t \sim \sqrt{t}$) - пунктирная кривая на графике (Рисунок 118):

$$\frac{M_t}{M_0} = 6\sqrt{\frac{Dt}{\pi r^2}} = \frac{6}{\pi^{3/2}}\sqrt{\frac{t}{T}}, (16)$$

Во временном интервале $T-2T$ графики по уравнению ранней стадии и уравнению поздней стадии по закону диффузии Фика практически не различаются, а условной границей между двумя этими стадиями является как раз значение $t^* = T$, приблизительно соответствующая высвобождению ЛВ – 77%. Кроме того, видно, что график по уравнению диффузии по Фику на ранней стадии практически не отличается от графика полуэмпирической модели Хигучи для $M_t < 0{,}3\ M_0$, (Рисунок 118) а не для $M_t < 0{,}6\ M_0$, как часто допускается.

После дифференцирования по времени можно получить выражения для скорости высвобождения ЛВ для каждой стадии:

$$V_t = \frac{dM_t}{dt} = \frac{3}{\pi^2}\left(\sqrt{\frac{\pi T}{t}} - 1\right)\frac{M_0}{T}, (17);\ V_t = \frac{6}{\pi^2}\exp\left(-\frac{t}{T}\right)\frac{M_0}{T}, (18)$$

На Рисунке 119 представлены графики скорости высвобождения ЛВ на ранней и поздней стадиях (синяя и красная кривые, соответственно) в единицах характеристического времени T.

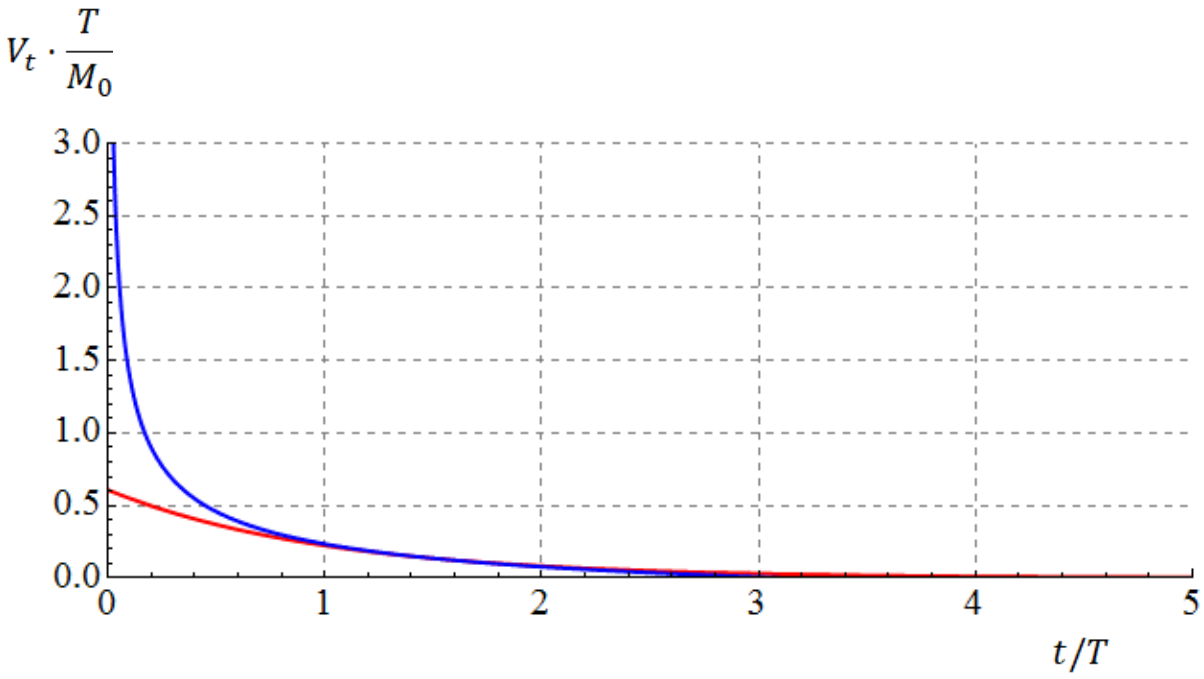


Рисунок 119. *Кинетика скорости высвобождения ЛВ из микросфер в координатах (M_0/T) от (t/T) (синяя кривая — ранняя стадия, красная кривая — поздняя стадия).*

Как можно видеть из графика на Рисунке 119 явление «взрывного эффекта» можно объяснить по закону диффузии Фика: на ранней стадии мы наблюдаем максимальные значения скорости высвобождения, а на поздней – ее стремление к нулю. С целью быстрой оценки и

грубого расчета коэффициента диффузии по уравнениям диффузии по Фику можно использовать следующие приближения: 77% высвобождения соответствует $t = T$, M_t = 60% — $t_{60\%} \approx 0.5\ T$, M_t =50% — $t_{50\%} \approx 0.3\ T$, M_t =30% — $t_{30\%} \approx 0.1\ T$.

К сожалению, модель диффузии по Фику обладает существенными ограничениями, которые были приведены выше. Поэтому для оценки кинетики высвобождения из полимерных изделий и микрочастиц чаще всего используют полуэмпирические модели.

В этой работе мы использовали 4 основных полуэмпирических модели, которые наиболее широко используются для описания процессов высвобождения ЛВ из полимерных изделий: модель кинетики нулевого порядка, модель кинетики первого порядка, модель Хигучи (уже упомянутая нами (Формула 16) (Higuchi, 1961) и модель Пеппаса-Корсмейера (Peppas-Korsmeyer) (Korsmeyer, 1983; Peppas, 1985).

Уравнение модели кинетики нулевого порядка имеет следующий вид:

$$M_t = V_0 t \quad (19)$$

Эта модель обычно используется для описания первичного быстрого высвобождения ЛВ из микросфер, т.н. «взрывного эффекта» (“burst effect”). График этой функции – прямая линия, выходящая из нуля, в этой функции скорость высвобождения ЛВ (начальная скорость V_0) от времени не зависит. Используя модель кинетики нулевого порядка нами были проаппроксимированы экспериментальные данные по высвобождению всех используемых ЛВ (Рисунок 120) и показано, что наибольшая скорость высвобождения в начальный период времени («взрывной эффект») наблюдается при высвобождении из микросфер хлорамбуцила и метронидазола.

Уравнение модели первого порядка имеет следующий вид:

$$\ln\left(1 - \frac{M_t}{M_0}\right) = k_1 - k_2 t, \quad (20)$$

Где k_1 *и* k_2 — это постоянные кинетики высвобождения ЛВ. После преобразования уравнение приобретает такой вид:

$$\frac{M_t}{M_0} = 1 - k_3 \exp(-k_2 t), \quad (21)$$

где $k_3 = e^{k_1}$ — константа, а коэффициент k_2 отражает время затухания скорости высвобождения ЛВ, поэтому эту модель используют для описания поздней стадии диффузии по Фику.

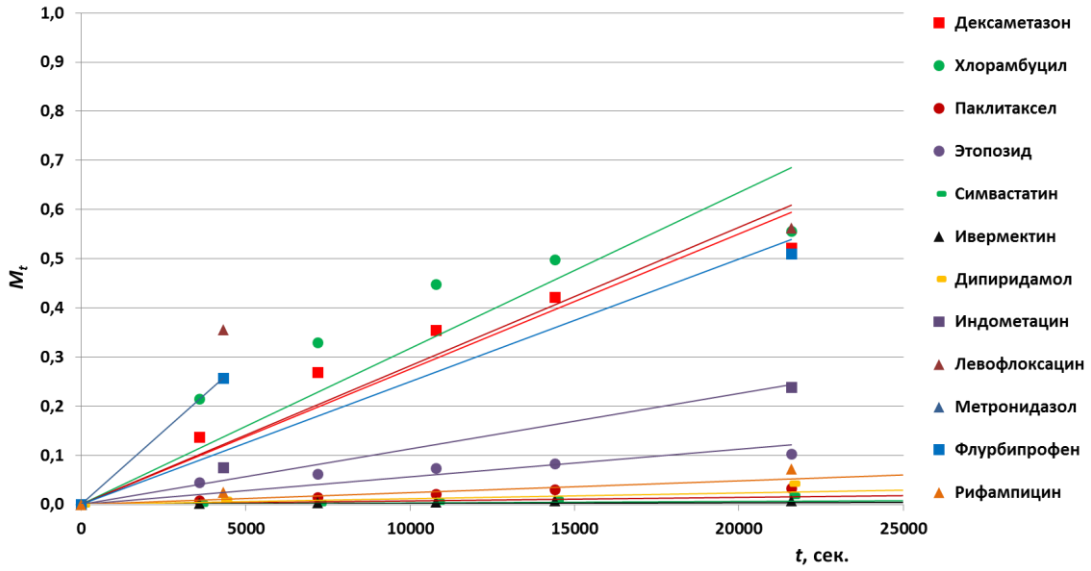


Рисунок 120. *Применение модели кинетики нулевого порядка для описания экспериментальных данных по высвобождению всех использованных ЛВ (их названия даны справа с соотнесением с соответствующими маркерами кривых).*

Используя модель кинетики первого порядка нами были проаппроксимированы экспериментальные данные по высвобождению всех используемых ЛВ (Рисунок 121) и было показано, что кинетика высвобождения рифампицина, дипиридамола и паклитаксела наилучшим образом (по высоким коэффициентам достоверности $R^2 \approx 0{,}99$) соответствуют этой функции, т.е. эти ЛВ высвобождаются на поздней стадии согласно закону диффузии Фика.

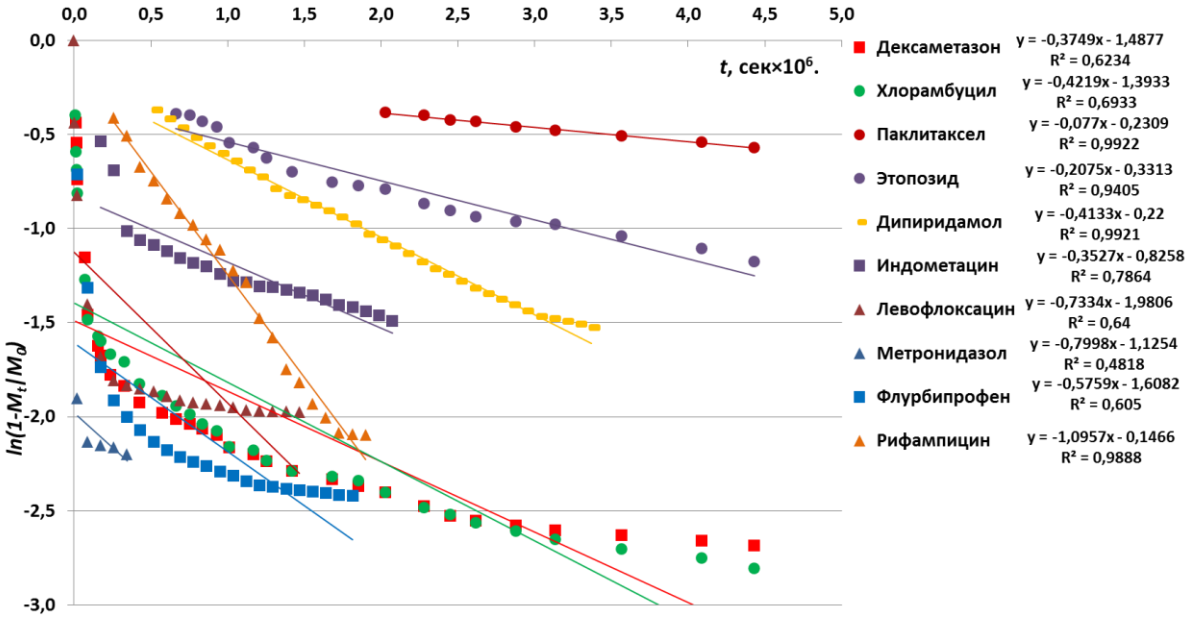


Рисунок 121. *Применение модели кинетики первого порядка для описания экспериментальных данных по высвобождению всех использованных ЛВ на поздней стадии (их названия даны справа с соотнесением с соответствующими маркерами кривых).*

Уравнение модели Хигучи (Higuchi) имеет следующий вид:

$$M_t = k\sqrt{t}, \quad (22)$$

Где k — это постоянная кинетики высвобождения ЛВ, которая связана с коэффициентом диффузии: $k = 6\sqrt{\frac{D}{\pi r^2}}\, M_0$. Эту модель используют для описания ранней стадии диффузии по закону Фику ($M_t < 0{,}6\, M_0$).

Аппроксимация экспериментальных данных по высвобождению ЛВ с применением модели Хигучи в координатах ($\sqrt{t}$, M_t) позволяет получить прямые, выходящие из начала координат и имеющие разные углы наклона, тангенс которых пропорционален k и, соответственно, коэффициенту диффузии D (Рисунок 122). Высокие значения коэффициентов детерминации ($R^2 \geq 0{,}95$) для высвобождения всех ЛВ из микросфер свидетельствуют о том, что диффузия ЛВ из микросфер на ранней стадии подчиняется закону диффузии Фика. Однако, следует отметить, что кинетика высвобождения таких ЛВ, как дексаметазон, паклитаксел, симвастатин, ивермектин, индометацин, левофлоксацин высвобождаются соответствуют в сравнительно меньшей степени «фиковскому» диффузионному механизму высвобождения ЛВ из микросфер, что можно объяснить большим вкладом процессов релаксации, тормозящих высвобождение, например, из-за гидрофобных взаимодействий ЛВ с макромолекулами ПОБ.

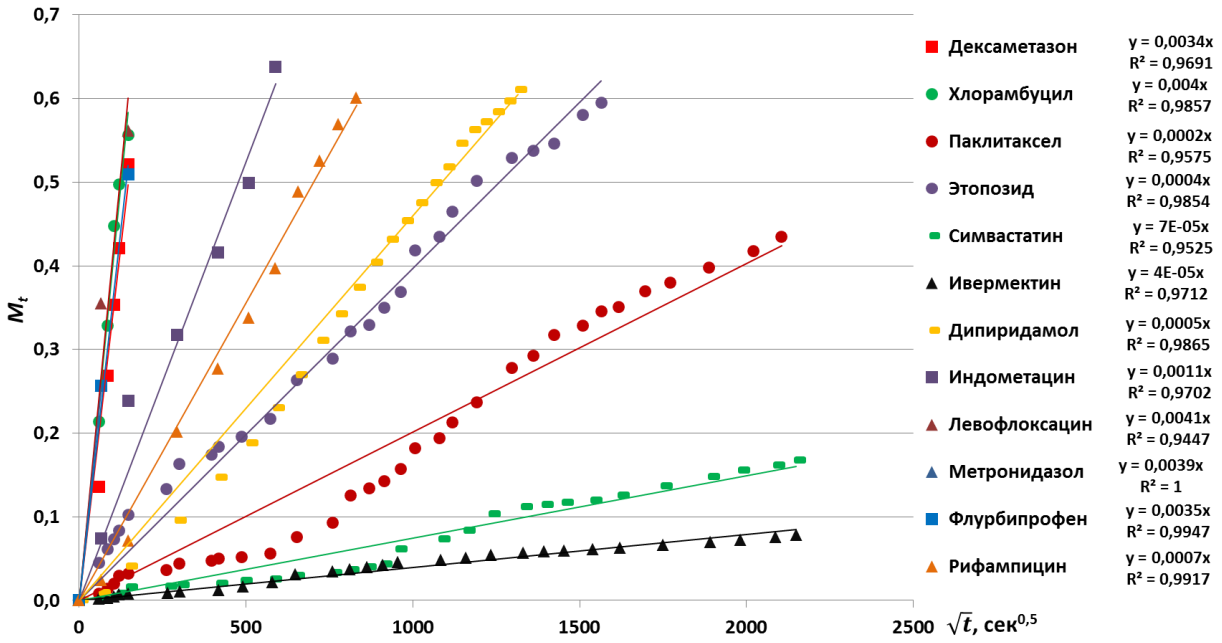


Рисунок 122. *Применение модели Хигучи для описания экспериментальных данных по высвобождению всех использованных ЛВ (формулы полученных линейных функций и названия высвобождающихся ЛВ приведены на легенде кривых справа).*

Уравнение модели Пеппаса-Корсмейера (Peppas-Korsmeyer) имеет следующий вид:

$$M_t = k\, t^n, \quad (23)$$

где k, n — это постоянные кинетики высвобождения ЛВ. При использовании этой модели также анализируется ранний этап высвобождения ЛВ ($M_t \leq 60\%$). Согласно этой модели от показателя степени n зависит предполагаемый механизм высвобождения ЛВ из микросфер. Если n = 0,43 0,5 (для сферических объектов, n = 0,45 для цилиндрических объектов, n = 0,5 для тонких пленок), то высвобождение ЛВ происходит по механизму диффузии Фика; если 0,43 < n < 0,85 (для сферических объектов, 0,45 < n < 0,89 для цилиндрических объектов, 0,50 < n < 1,0 для тонких пленок), то высвобождение ЛВ происходит по механизму аномального транспорта (диффузии) (“Anomalous transport”); если n = 0,85 (для сферических объектов, n = 0,89 для цилиндрических объектов; n = 1,0 для тонких пленок), то высвобождение ЛВ происходит по механизму транспорта (диффузии) случая II (“Case II transport”), причем если n = 1,0, то высвобождение происходит по механизму кинетики нулевого порядка; если n > 0,85 (для сферических объектов, n > 0,89 для цилиндрических объектов; n > 1,0 для тонких пленок), то высвобождение ЛВ происходит по механизму транспорта (диффузии) случая II (“Super Case II transport”) (Peppas, 1985; Kosmidis et al., 2003).

Механизм высвобождения посредством диффузии Фика — это механизм, по которому диффузия ЛВ через полимерную матрицу осуществляется исключительно по закону диффузии Фика. Основное различие между тремя типами «нефиковской» диффузии (аномальная диффузия, диффузия случая II, и диффузия случая II-супер) заключается в скорости диффузии растворителя. Для диффузии случая II скорость диффузии растворителя меньше скорости процесса релаксации полимера, и диффузия ЛВ происходит за счет набухания и релаксации полимерной матрицы микросферы и не зависит от времени. Для аномальной диффузии скорость диффузии растворителя и релаксация полимера имеют близкие величины, и высвобождение ЛВ происходит как за счет «фиковской» диффузии, так и за счет набухания и релаксации полимерной матрицы. Для диффузии случая II-супер скорость диффузии растворителя намного выше, что приводит к ускорению проникновения растворителя, а диффузия ЛВ происходит только за счет релаксации полимерных цепей в матрице микросферы (Klech and Simonelli, 1989).

Применение модели Пеппаса-Корсмейера для аппроксимации высвобождения ЛВ из микросфер показано на Рисунке 123, а рассчитанные с помощью этого графика коэффициенты, как и коэффициенты для модели Хигучи) приведены в Таблице 17.

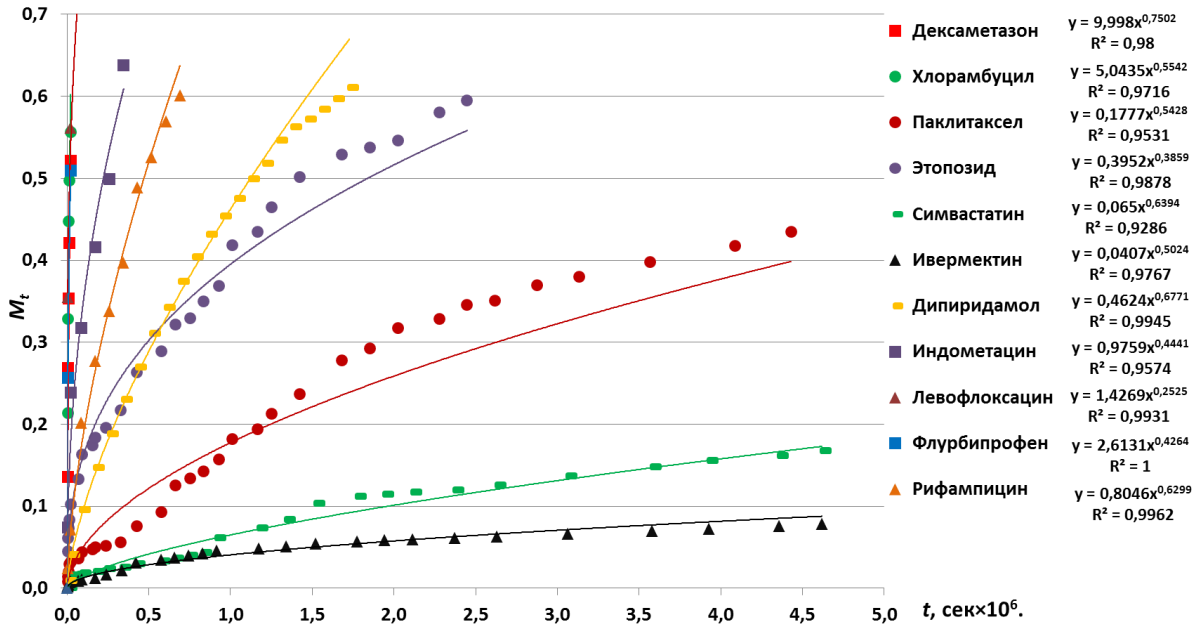


Рисунок 123. *Применение модели Пеппаса-Корсмейера для описания экспериментальных данных по высвобождению всех использованных ЛВ (формулы полученных степенных функций и названия высвобождающихся ЛВ приведены на легенде кривых справа).*

Таблица 17. *Параметры используемых математических моделей (модели Хигучи, модели Пеппаса-Корсмейера) для анализа кинетики высвобождения различных ЛВ из микросфер на основе ПОБ.*

ЛВ	Модель Хигучи		Модель Пеппаса-Корсмейера	
	k_H	R^2	n_{PK}	R^2
Дексаметазон	$3{,}4\times10^{-3}$	0,969	0,75	0,980
Хлорамбуцил	$4{,}0\times10^{-3}$	0,986	0,55	0,972
Паклитаксел	$2{,}0\times10^{-4}$	0,958	0,54	0,953
Этопозид	$4{,}0\times10^{-4}$	0,985	0,39	0,988
Симвастатин	$7{,}0\times10^{-5}$	0,953	0,64	0,929
Ивермектин	$4{,}0\times10^{-5}$	0,971	0,50	0,977
Дипиридамол	$5{,}0\times10^{-4}$	0,987	0,68	0,995
Индометацин	$1{,}1\times10^{-3}$	0,970	0,44	0,957
Левофлоксацин	$4{,}1\times10^{-3}$	0,945	0,25	0,993
Метронидазол	$3{,}9\times10^{-3}$	1,000	-	-
Флурбипрофен	$3{,}5\times10^{-3}$	0,995	0,43	1,000
Рифампицин	$7{,}4\times10^{-4}$	0,992	0,63	0,996

Наиболее близкими значениями к n =0,43 (для сферических объектов) обладают коэффициенты для кинетики высвобождения из микросфер флурбипрофена, индометацина, этопозида и левофлоксацина, что свидетельствует о том, что высвобождение этих ЛВ происходит по механизму «фиковской» диффузии. Высвобождение таких ЛВ, как паклитаксел, хлорамбуцил, ивермектин, симвастатин, дипиридамол и рифампицин происходит по механизму аномальной диффузии, т.е. как за счет диффузии по закону Фика, так и за счет набухания и релаксации полимерной матрицы микросфер, на что указывают коэффициенты *n*, лежащие в интервале от 0,43 до 0,85 (для сферических объектов). Случаев, когда n >0,85 не наблюдалось, т.е. не было обнаружено случаев высвобождения ЛВ по другим механизмам, кроме этих двух. Следует также отметить, что кинетика высвобождения симвастатина, паклитаксела и индометацина не очень хорошо аппроксимировалась по функции модели Пеппаса-Корсмейера (R^2 ≤95%).

Далее снова вернемся к модели диффузии по закону Фика, чтобы рассчитать коэффициенты диффузии высвобождения ЛВ из микросфер. Сначала для примера следует рассчитать величину коэффициента диффузии для одного из используемых нами ЛВ – паклитаксела. Из данных на графике Рисунка 117 можно найти приблизительно параметр времени высвобождения 30% ЛВ из микросфер ($t_{30\%}$), равный 24-м суткам, по которому рассчитывается параметр характеристическое время *T* (Рисунок 119, Формулы 16-18 и описание к ним), равное исходя из формулы $t_{30\%} = 0{,}1\ T$, примерно 240 суткам для высвобождения паклитаксела из микросфер. Соответственно, зная T, можно рассчитать коэффициент диффузии: $D = r^2/(\pi^2 T) \approx 7{,}8 \cdot 10^{-14}$ см^2/с при $r = 40$ мкм.

Чтобы точнее рассчитать коэффициенты диффузии для высвобождения всех используемых ЛВ, экспериментальные данные были проаппроксимированы по функции диффузии по закону Фика (ранняя стадия высвобождения ЛВ, M_t < 0,6) с использованием параметра *T* для последующего расчета коэффициентов диффузии *D* для каждого из ЛВ. График построен в координатах $(M_t/M_0)^2$ и *t* (Рисунок 124).

Как видно, данные для всех ЛВ хорошо соответствуют «фиковской» диффузии. Рассчитанные по графику Рисунка 122 параметры (коэффициент диффузии и характеристическое временя) приведены в Таблице 18.

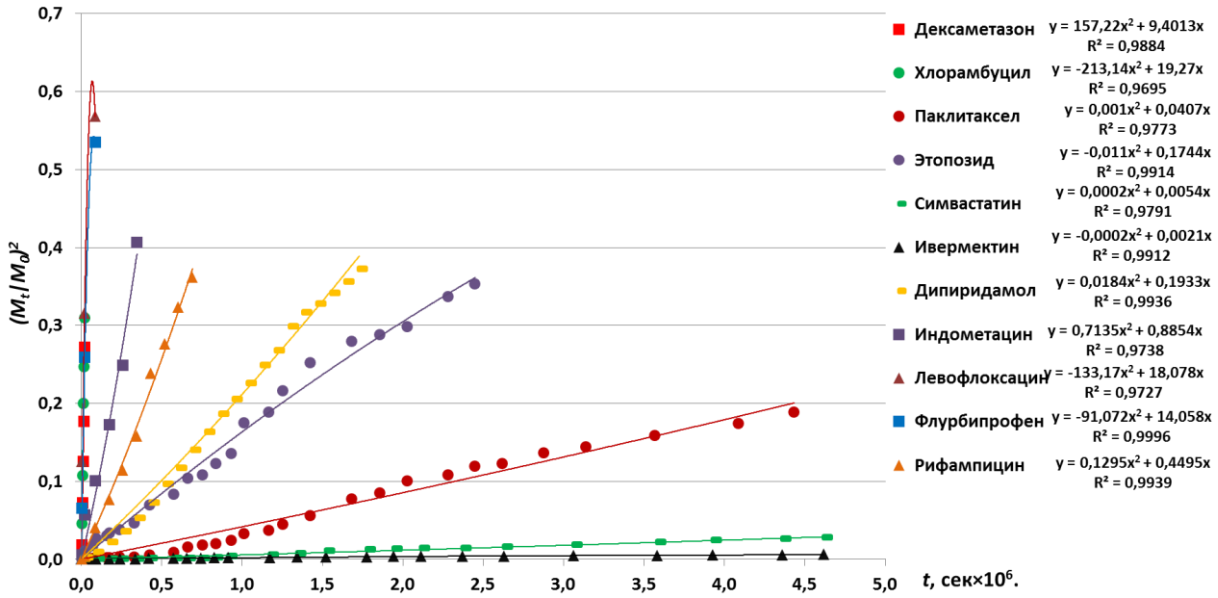


Рисунок 124. *Применение модели диффузии по закону Фика для описания кинетики высвобождения ЛВ из микросфер на ранней стадии (формулы полученных квадратичных функций и названия высвобождающихся ЛВ приведены на легенде кривых справа).*

Таблица 18. *Параметры кинетики высвобождения различных ЛВ из полимерных микрочастиц, рассчитанные по модели Фика.*

ЛВ	Характеристическое время T, сутки	Коэффициент диффузии D, см^2/с	Коэффициент детерминации R^2
Дексаметазон	0,97	$1{,}930\times10^{-10}$	0,988
Хлорамбуцил	0,52	$3{,}642\times10^{-11}$	0,970
Паклитаксел	243,36	$7{,}710\times10^{-14}$	0,977
Этопозид	61,81	$3{,}036\times10^{-13}$	0,991
Симвастатин	1347,75	$1{,}392\times10^{-14}$	0,979
Ивермектин	1921,67	$9{,}764\times10^{-15}$	0,991
Дипиридамол	51,69	$3{,}630\times10^{-13}$	0,994
Индометацин	10,93	$1{,}716\times10^{-12}$	0,974
Левофлоксацин	0,60	$3{,}132\times10^{-11}$	0,973
Флурбипрофен	0,77	$2{,}422\times10^{-11}$	0,999
Рифампицин	21,97	$8{,}540\times10^{-13}$	0,994

Мы не выявили какой-либо общей зависимости величины коэффициента диффузии высвобождения исследуемых нами ЛВ от их физико-химических свойств ЛВ и химического

строения, однако, коэффициенты диффузии для высвобождения ивермектина, симвастатина, этопозида и паклитаксела были значительно меньше, чем для высвобождения других ЛВ, что может быть связано с их большей гидрофобностью и в связи с этим лучшим взаимодействием с полимерными цепями ПОБ, а также большей молекулярной массой (Iordanskii et al., 1994; Liggins and Burt, 2001).

Однако, важно отметить, что из всех исследуемых ЛВ, рассчитанный нами период Т высвобождения Паклитаксела (равный 243 сут.) (Таблица 16) наиболее близко соответствует рассчитанному нами ранее (см. Главу 3.4) полупериоду гидролитической деградации *in vitro* используемого для изготовления этих микрочастиц ПОБ-255 (по потери 50% ММ полимера) – 340 сут. и продолжительности его гидролитической деградации до начала механической фрагментации полимера – 380 сут. Кинетика высвобождения всех остальных ЛВ так или иначе не соответствует кинетики биодеградации этого полимера: скорость высвобождения ЛВ либо значительно выше скорости его деградации, либо, напротив, значительно ниже. Поэтому именно ПТЛ следует использовать для исследования кинетики высвобождения ЛВ на основе биоразлагаемого ПОБ и его биоПЭГилированного сополимера. В связи с этим для дальнейших исследований систем пролонгированного высвобождения низкомолекулярных ЛВ на основе ПОБ и его сополимеров и композитов в качестве ЛВ нами был выбран Паклитаксел.

3.6.2. Получение и исследование полимерных микрочастиц, загруженных Паклитакселом

На сегодняшний момент наиболее эффективным и используемым в медицинской практике противоопухолевым лекарственным средством является Паклитаксел. Лекарственное средство Паклитаксел входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП), утвержденный Распоряжением Правительства Российской Федерации от 11.11.2010 №1938-р. Препараты на основе Паклитаксела широко используются для лечения таких тяжелых и распространенных опухолевых заболеваний как: опухоли молочной железы, рак легкого, рак яичника, рак предстательной железы, плоскоклеточных карцином головы и шеи и др. Однако, Паклитаксел, действующее лекарственное вещество которого обладает высокой токсичностью и оказывает целый ряд побочных эффектов, применяется в традиционной инъекционной лекарственной форме, которая изготовлена на основе полиоксиэтилированного касторового масла, кремофора, обладающего собственной токсичностью различного спектра: кардиотоксичностью, нефротоксичностью, аллеркогенностью, нейротоксичностью. Кремофор использовался еще 25 лет назад для создания инъекционных лекарственных форм плохорастворимых ЛВ и был выбран в качестве лекарственной формы при создании первых препаратов на основе Паклитаксела, т.к. из-за

очень низкой растворимости в воде, создание инъекционных форм этого ЛВ было сильно затруднено. Кроме того, длительное поддержание определенной концентрации, не превышающей токсический уровень, паклитаксела и его аналогов, обладающих повышенной токсичностью, может снизить токсичность этого препарата. Хроническое и злокачественное течение опухолевых заболеваний требует применение комплексных форм паклитаксела с высокой эффективностью, низкой токсичностью, заданной фармакокинетикой, пролонгированным действием и большей биодоступностью (Переводчикова, 2011). Создание систем пролонгированного высвобождения ПТЛ на основе микрочастиц из ПОБ и его сополимеров позволит устранить многие недостатки традиционных лекарственных препаратов ПТЛ.

Из ПОБ-255 были получены микрочастицы схожего диаметра (20±5 мкм) с включением ПТЛ. На Рисунке 125 показаны изображения полученных микрочастиц, полученные с помощью различных методов микроскопии. На размер получаемых микрочастиц влияют различные факторы, прежде всего, это параметры метода эмульгирования с испарением растворителя, который используется для их получения: скорость перемешивания рабочего раствора, концентрация полимера в хлороформе, объем масляной (раствора полимера в органическом растворителе) и водной (раствора ПВС в воде) фаз (Bonartsev et al., 2007; Лившиц и др., 2009).

Нами была исследована морфология микрочастиц с загруженным в них ПТЛ с помощью СЭМ и показано, что микрочастицы имеют сферическую форму с показателями циркулярности и индексом соотношения линейных размеров (aspect ratio) почти равными единице, а поверхность микрочастиц обладают выраженной шероховатостью (Рисунок 125А,Б). Срез микрочастиц, осуществленный с помощью метода травления ионами калия (Рисунок 125В,Г), показал, что микрочастица не полая и не имеет больших пор в объеме, в полимерной матрице не имеется выраженных неоднородностей, имеются лишь небольшие дефекты. Исследование микрочастиц с загруженным в них дипиридамолом, обладающим флуоресценцией, показало, что распределение флуоресценции в полимерной матрице равномерное (Рисунок 125Д). Это свидетельствует о том, что ЛВ равномерно распределено в полимерной матрице, из которой полностью состоит микрочастица.

На следующем этапе было проведено исследование влияния полимерного состава микрочастиц на кинетику высвобождения из них одного выбранного нами, ЛВ – ПТЛ. Для этого параметры метода эмульгирования были стандартизированы для получения микрочастиц с одинаковым диаметром – 20 ±5 мкм и одинаковым содержанием ПТЛ в полимерной матрице микрочастиц – 10 ±1%. Большего содержания ЛВ в микрочастицах получить не удалось, т.к.

при высоких концентрациях в рабочем растворе ПТЛ склонен к неравномерному распределению в полимерной матрице полученных микрочастиц.

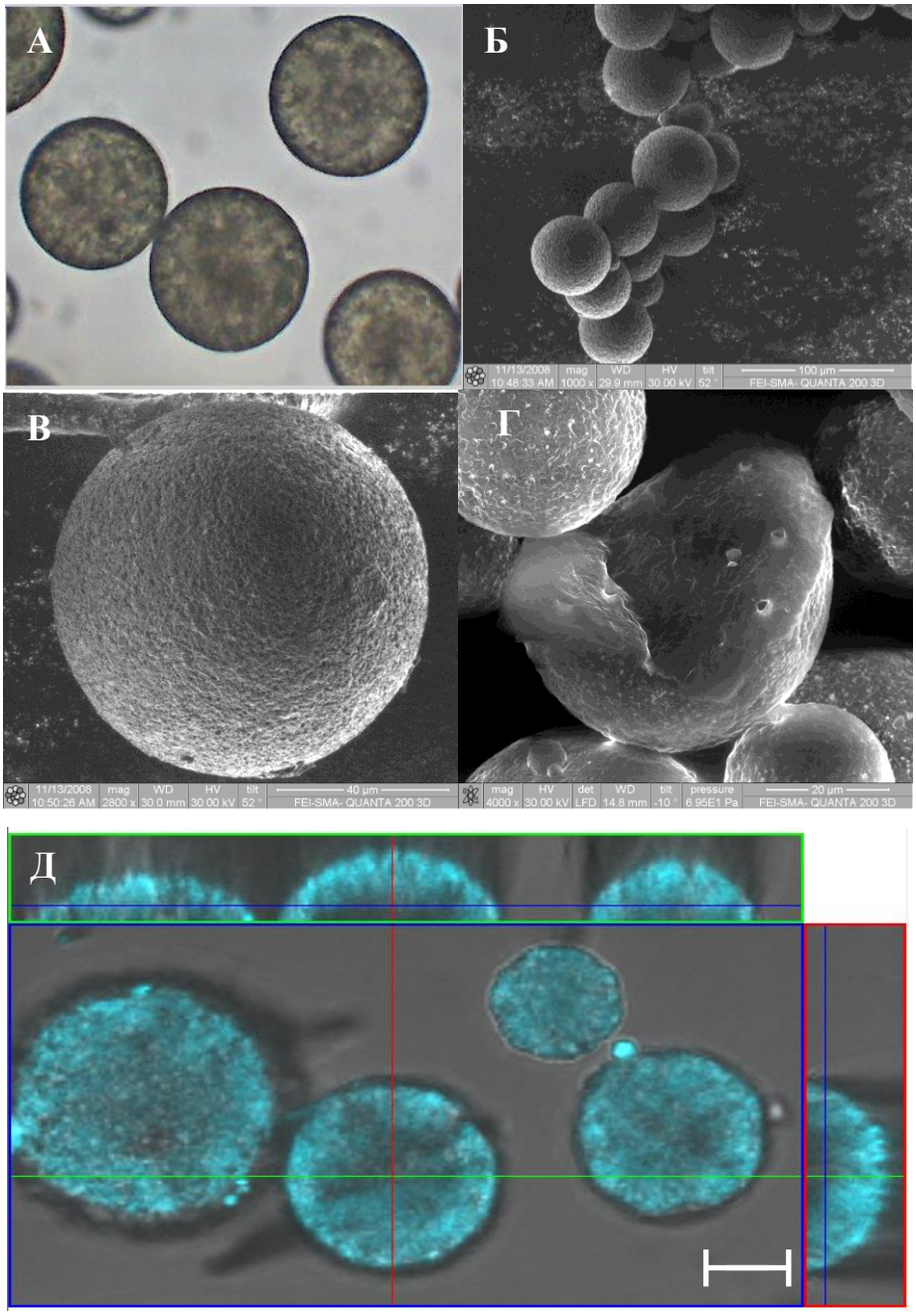


Рисунок 125. *Микрочастицы на основе ПОБ, загруженные паклитакселом: А – группа микрочастиц (световая микроскопия, ×400). Б – группа микрочастиц (СЭМ, ×1000); В – отдельная микрочастица (СЭМ, ×2800); Г – срез микрочастицы, СЭМ, (СЭМ, ×4000); Д – микрочастицы на основе ПОБ, загруженные флуоресцентным ЛВ дипиридамолом (конфокальная микроскопия, шкала 25 мкм, три ортогональные проекции) (Бонарцев, 2011). (Выполнено при содействии и на оборудовании Общефакультетской лаборатории электронной микроскопии (отв. проф. кафедры биоинженерии Соколова О.С.)и с сотрудниками научной группы профессора кафедры биоинженерии Феофанова А.В. и на оборудовании ЦКП МГУ).*

Различие микрочастиц было в составе полимерной основы. Помимо самого ПОБ средней ММ (255 кДа) в качестве полимеров сравнения были использованы низкомолекулярный ПОБ (6 кДа) (нмПОБ), полученный методом биоПЭГилирования сополимер ПОБ-ПЭГ ($2{,}7\times10^5$ Да), а также композиты ПОБ и нмПОБ с ПЭГ 1500 (20% по массе), который выступает в качестве гидрофилизирующего пластификатора полимера – ПОБ/ПЭГ и ПОБнм/ПЭГ, соответственно (Таблица 19). Это позволяет оценить влияние гидрофильного полимера ПЭГ как в составе композита с ПОБ, так и в составе сополимера с ПОБ на кинетику высвобождения ЛВ из композитных микрочастиц.

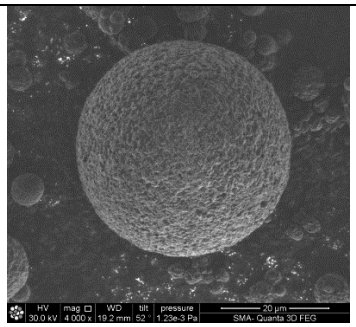
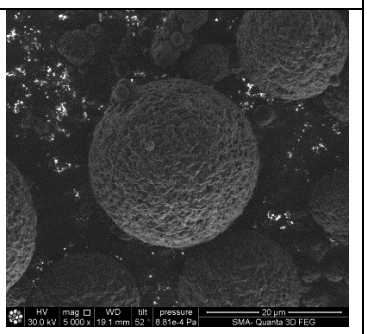
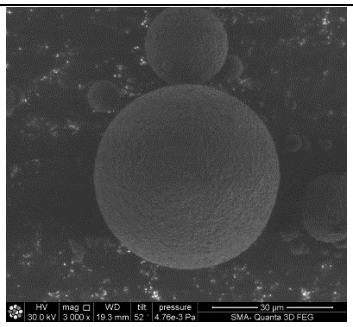
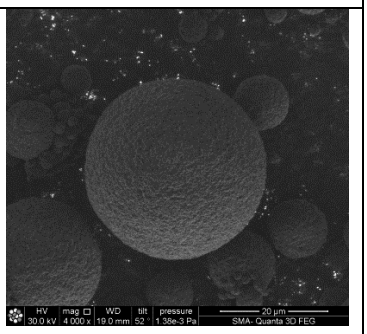
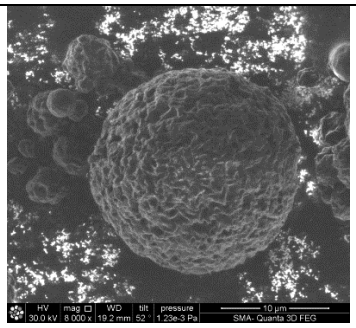
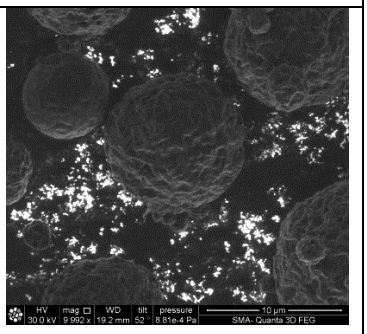
Таблица 19. *Параметры получения микрочастиц, загруженных ПТЛ, и их основные характеристики.*

Полимер	Содержание ПТЛ, %	Содержание ПЭГ, %	Скорость перемеши-вания, об/мин	Диаметр частиц, мкм	Эффективность инкапсулирования, %
ПОБнм	10 ±1	–	1000	21 ± 5	79,2 ± 2,3
ПОБнм/ПЭГ	10 ±1	20 ±1	950	22 ± 5	66,1 ± 2,5
ПОБ	10 ±1	–	1300	19 ± 5	64,5 ± 2,4
ПОБ/ПЭГ	10 ±1	20 ±1	1200	21 ± 5	53,0 ± 2,1
ПОБ-ПЭГ	10 ±1	–	1050	20 ± 5	64,8 ± 2,3

В Таблице 20 приведены изображения СЭМ полученных микрочастиц, загруженных ПТЛ, различной полимерной основы.

Из изображений в Таблице 20 видно, что поверхность микрочастиц из ПОБ-ПЭГ и низкомолекулярного ПОБ имеют более шероховатую поверхность, чем микрочастицы из среднемолекулярного, что можно объяснить большей гидрофильностью композита и сополимера с ПОБ и другой надмолекулярной структурой полимерной матрицы (Разделы 3.2 и 3.3).

***Таблица 20**. Морфология поверхности микрочастиц, загруженных ПТЛ, различной полимерной основы: ПОБнм, ПОБ и ПОБ-ПЭГ (СЭМ, ×4000-5000).*

Полимер	Без пластификатора	ПЭГ, 20%
ПОБнм		
ПОБ		
ПОБ-ПЭГ		

(Выполнено при содействии и на оборудовании Общефакультетской лаборатории электронной микроскопии (отв. проф. кафедры биоинженерии Соколова О.С.).

3.6.3. Физико-термические характеристики полученных микро- и наночастиц

В Таблице 21 приведены физико-термические характеристики микрочастиц с различной полимерной основой: температура плавления и степень кристалличности полимерной матрицы, содержащей ПТЛ на основе данных ДСК.

Таблица 21. *Температура плавления и степень кристалличности полимерной матрицы, содержащей и не содержащей ПТЛ, на различной полимерной основе: ПОБнм, ПОБнм/ПЭГ, ПОБ, ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ.*

Полимер	Наличие ЛВ	Температура плавления, ($T_п^{нач.}$ и $T_п^{пик.}$,ºС)	Степень кристалличности ($X_с$,%)
МЧ ПОБнм	+	133,9 – 155,2	65,0
	–	135,9 – 157,1	62,0
МЧ ПОБнм/ПЭГ	+	138,3 – 160,7	68,0
	–	136,3 – 157,6	63,0
МЧ ПОБ	+	161,1 – 176,6	62,0
	–	163,8 – 178,2	75,0
МЧ ПОБ/ПЭГ	+	162,4 – 177,9	64,3
	–	164,6 – 179,8	77,6
МЧ ПОБ-ПЭГ	+	163,3 – 177,8	63,0
	–	167,8 – 179,0	68,0

(Выполнено совместно с лабораторией химической термодинамики на Химическом факультете МГУ, на оборудовании ЦКП МГУ (оператор н.с. Быков М.А.)).

Наличие ПТЛ в полимерной матрице на основе ПОБ, ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ приводит к снижению ее температуры плавления и степени кристалличности, тогда как добавление ЛВ в микрочастицы на основе ПОБнм и его композита с ПЭГ приводит, напротив, к повышению степени кристалличности полимерной матрицы. Интересно, что степень кристалличности полимерной матрицы на основе биоПЭГилированного ПОБ значительно ниже по сравнению не только с ПОБ, но и с композитом ПОБ/ПЭГ, и близко по значениям (лишь немного выше) с этим параметром микрочастиц на основе ПОБнм и ПОБнм/ПЭГ, что может быть связано с измененной морфологией поверхности микрочастиц (Таблица 20). Вероятно, это связано со значительным, не соразмерным своему содержанию в сополимере влиянием ПЭГ на физико-химические свойства полимера и его наноструктуру, которую мы наблюдали ранее при исследовании полимерных пленок (Разделы 3.2 и 3.3).

3.6.4. Исследование взаимодействия ЛВ с полимерной матрицей микрочастиц

Для выяснения возможного механизма влияния различного состава полимерной матрицы микрочастиц на кинетику высвобождения из них ЛВ было проведено исследование

взаимодействия ПТЛ с полимерной матрицей микрочастиц с помощью метода ИК-спектроскопии, который, в частности, позволяет выявить водородные связи между ЛВ и полимером. ИК-спектры микрочастиц из ПОБнм и его композита с ПЭГ, загруженных ПТЛ, свидетельствуют о том, что взаимодействие посредством водородных связей между ПТЛ и полимерами отсутствует, т.к. смещения максимумов поглощения различных групп ПТЛ (712см$^{-1}$ (–CCH) 1518 см$^{-1}$ (–C=C), 3480 см$^{-1}$ (–OH), 1652 см$^{-1}$ (амидогруппа) (Рисунок 126).

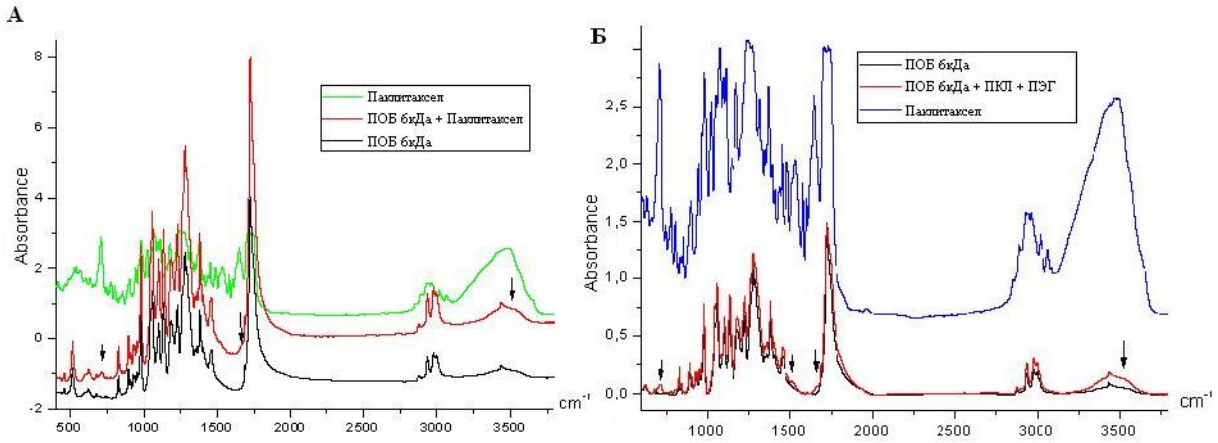


Рисунок 126. *Сравнение ИК-спектров микрочастиц, загруженных ПТЛ, на основе ПОБнм (А) и ПОБнм/ПЭГ (Б). (Совместно с проф. ИНХС РАН Бондаренко Г.Н. и на оборудовании Института).*

Совсем иная картина наблюдается для микрочастиц на основе биоПЭГилированного ПОБ и его композита с ПЭГ (Рисунок 127).

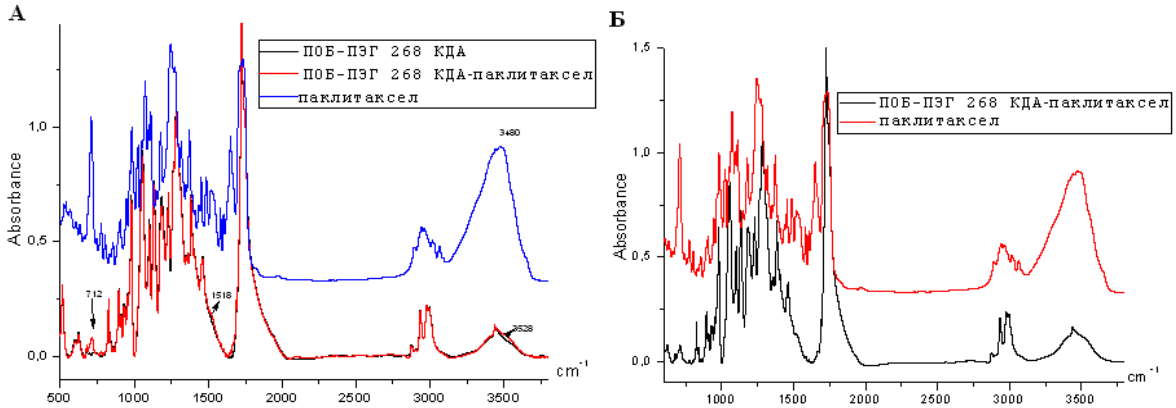


Рисунок 127. *Сравнение ИК спектров ПОБ-ПЭГ и ПТЛ со спектром образца микрочастиц из сополимера ПОБ-ПЭГ с ПТЛ: А – без добавок, Б – с добавлением ПЭГ 300. (Совместно с проф. ИНХС РАН Бондаренко Г.Н. и на оборудовании Института).*

Происходит смещение полос поглощения групп –ОН (3480см$^{-1}$) и С=О в амидогруппе (1652 см$^{-1}$) до 3528 см$^{-1}$ и 1664 см$^{-1}$ соответственно, что свидетельствует о взаимодействии ЛВ с полимерной матрицей, скорее всего, посредством водородных связей.

3.6.5. Кинетика высвобождения лекарственного вещества из полимерных микрочастиц

На следующем этапе работы была исследована кинетика высвобождения ПТЛ из полученных микрочастиц различного состава (состав частиц приведен в Таблице 19) *in vitro*. Графики кинетики высвобождения ПТЛ из микрочастиц приведены на Рисунке 128.

Видно, что кинетика высвобождения ЛВ зависит от полимерного материала, из которого изготовлены микрочастицы. Высвобождение ПТЛ происходит интенсивнее всего из микрочастиц на основе низкомолекулярного ПОБ. Высвобождение ПТЛ из микрочастиц на основе биоПЭГилированного ПОБ происходит немного медленнее, чем из микрочастиц на основе ПОБ. Добавление ПЭГ в полимерную матрицу микрочастиц либо снижает скорость высвобождения, как в случае композита с ПОБнм, либо, напротив, повышает ее, как в случае композита с ПОБ и ПОБ-ПЭГ. Выраженного «взрывного эффекта» не наблюдается при высвобождении ЛВ из всех типов микрочастиц.

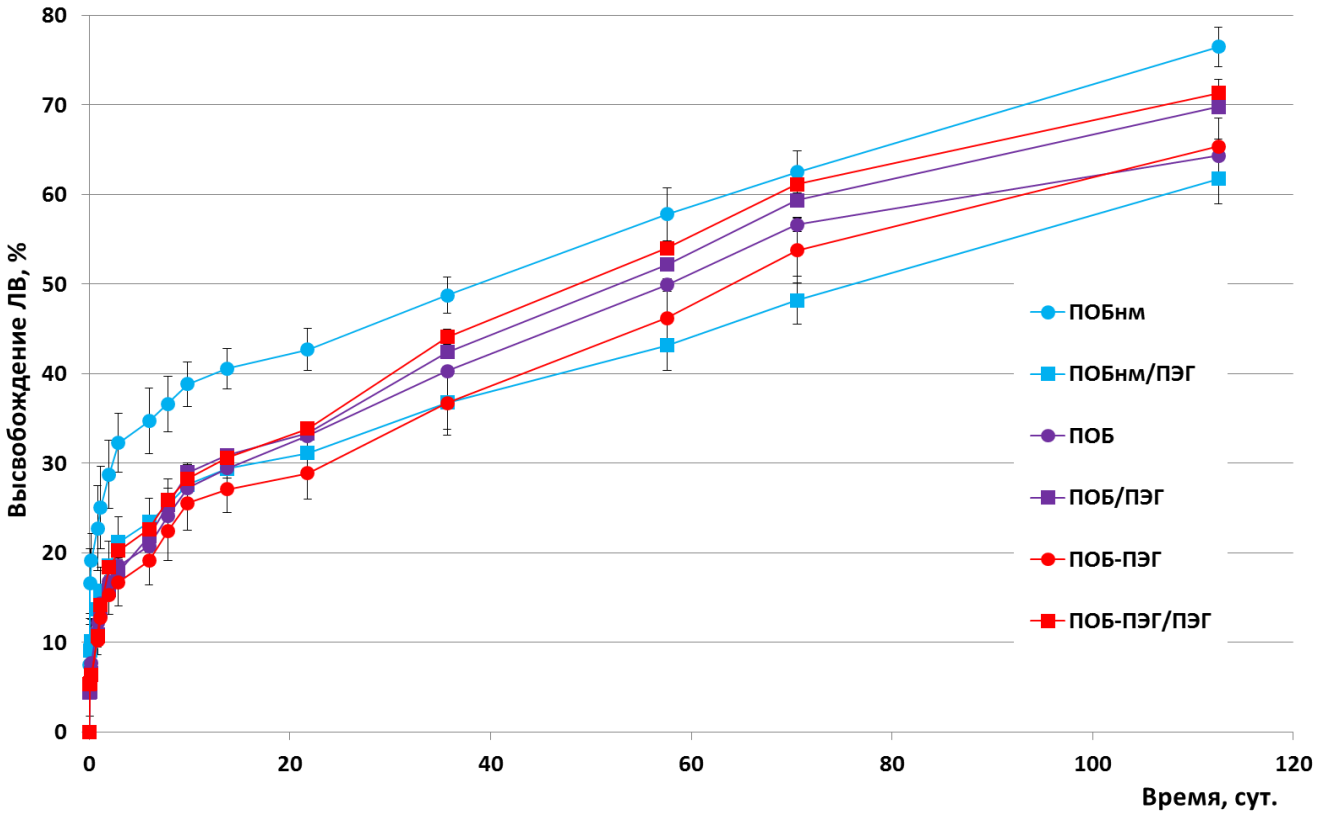


Рисунок 126. *Кинетика высвобождения ПТЛ из микрочастиц различного полимерного состава: ПОБнм (ПОБ 6кДа), ПОБ (ПОБ 255 кДа), сополимера ПОБ-ПЭГ и их композитов с ПЭГ (ПОБнм/ПЭГ, ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ/ПЭГ, соответственно).*

Однако для лучшего понимания изменения кинетики высвобождения ЛВ необходимо, как и в случае анализа кинетики высвобождения различных ЛВ из микрочастиц, провести математическую обработку полученных данных.

Графики применения модели Фика для описания высвобождения ПТЛ из микросфер на основе различных полимерных материалов для в координатах y: $(M_t/M_0)^2$ и x: t для ранней стадии (M_t < 60%) приведены на Рисунке 127.

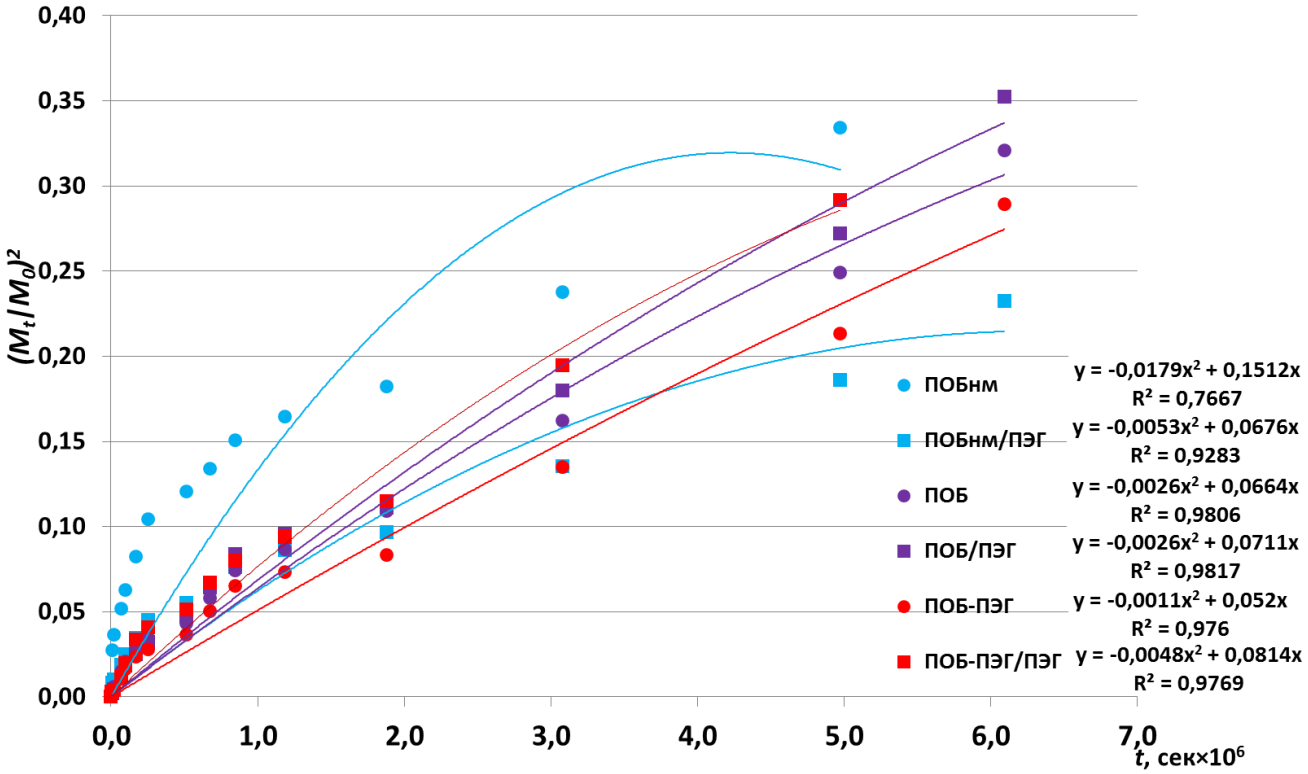


Рисунок 127. *Использование модели диффузии по закону Фика для описания ранней стадии высвобождения ПТЛ из микрочастиц различного полимерного состава (формулы полученных квадратичных функций и сокращения названий полимерных материалов приведены на легенде кривых справа.*

Из этих графиков видно, что кривые аппроксимации кинетики высвобождения из микрочастиц на основе низкомолекулярного ПОБ и его композита ПОБнм/ПЭГ значительно отличаются от всех прочих кривых. Но наилучшим образом различия между полученными данными видны из результатов расчета основных параметров кинетики высвобождения. Следует также отметить, что различие в кинетике высвобождения из микрочастиц на основе ПОБ и его сополимера ПОБ-ПЭГ статистически достоверно. В Таблице 22 приведены основные параметры проведенной аппроксимации экспериментальных данных по модели Фика.

Таблица 22. *Параметры кинетики высвобождения различных ЛВ из полимерных микрочастиц, рассчитанные по модели диффузии по закону Фика.*

ЛВ	Характеристическое время T, сутки	Коэффициент диффузии, $D \times 10^{-14}$ $см^2/с \times 10^{-14}$	Коэффициент корреляции R^2
ПОБнм	74,58	62,89	0,767
ПОБнм/ПЭГ	174,79	2,68	0,928
ПОБ	166,23	2,82	0,981
ПОБ/ПЭГ	154,00	3,05	0,982
ПОБ-ПЭГ	208,25	2,25	0,976
ПОБ-ПЭГ/ПЭГ	137,62	3,41	0,998

Видно, что минимальное значение характеристического времени высвобождения наблюдается для микрочастиц из низкомолекулярного ПОБ. Высвобождение ПТЛ из микрочастиц на основе низкомолекулярного ПОБ также характеризуется наименьшим соответствием диффузионной кинетике по закону Фика, тогда как в случае других полимеров коэффициент корреляции превышает 0,95. Вероятнее всего это связано с гораздо большим вкладом гидролитической деградации микрочастиц на основе ПОБ с ММ = 6 кДа даже на ранней стадии высвобождения, тогда как в случае более высокомолекулярных полимеров этот вклад незначителен и высвобождение ПТЛ протекает практически полностью за счет диффузии ЛВ из полимерной матрицы микрочастиц. Рассчитанный коэффициент диффузии для высвобождения ПТЛ из микрочастиц на основе низкомолекулярного ПОБ также более чем на порядок превосходит коэффициенты диффузии при высвобождении ЛВ из микрочастиц всех прочих типов, что, вероятно, также связано с их деградацией. Высвобождение ПТЛ из микрочастиц на основе биоПЭГилированного ПОБ хорошо соответствует ($R^2 > 0,95$) диффузионной кинетике по Фику, рассчитанные коэффициент диффузии – минимальный, а характеристическое время высвобождения максимальное по сравнению со всеми другими типами микрочастиц. Несмотря на то, что различия этих параметров невелики (коэффициент диффузии на 20% ниже, а время высвобождения T – на 25% больше), тем не менее, учитывая достоверность этих различий, можно предположить, что, либо изменение физико-химических свойств сополимера ПОБ-ПЭГ (кристалличности, гидрофильности, механических свойств) (см. Раздел 3.3), либо изменение морфологии укладки полимерных цепей, наноструктуры полимерной матрицы биоПЭГилированного ПОБ (см. Раздел 3.2), микроструктуры самих частиц (как было показано методом СЭМ) приводит к лучшему удержанию ПКЛ в полимерной

матрице микрочастиц за счет образования новых связей (например, водородных) между ПТЛ и полимерными макромолекулами, как было показано с помощью ИК-спектроскопии (Рисунки 126 и 127) или за счет большего морфологического препятствования диффузии ПТЛ в матрице этого полимера. Интересна роль ПЭГ в композитах ПОБнм, ПОБ и ПОБ-ПЭГ с этим амфифильным полимером. Добавление в полимерную матрицу ПЭГ приводит к увеличению коэффициента корреляции кинетики высвобождения с диффузионной кинетикой по Фику. При этом добавление ПЭГ к низкомолекулярному ПОБ приводит к значительному падению коэффициента диффузии и возрастанию времени высвобождения до величин, характерных для других типов микрочастиц, тогда как добавление ПЭГ к ПОБ-255 и сополимеру ПОБ-ПЭГ, напротив, приводит к небольшому возрастанию коэффициента диффузии и уменьшению характеристического времени высвобождения. Это, вероятно, объясняется тем, что ПЭГ как пластификатор стабилизирует полимерную структуру микрочастиц, что приводит к разнонаправленному изменению коэффициента диффузии высвобождения ПТЛ, в первом случае, значительно снижая его, а во втором – немного повышая.

Анализ кинетики высвобождения ПТЛ из полимерных микрочастиц с помощью более приближенных эмпирических моделей высвобождения не выявил существенных различий между кинетикой высвобождения микрочастиц на основе различных полимерных материалов.

Как можно видеть, вклад диффузии в процесс высвобождения ЛВ из микрочастиц на основе ПОБ является решающим. Между тем, в бактериальных клетках ПОБ синтезируется и расщепляется в специальных гранулах, в которых этот биополимер находится в аморфном состоянии. Что, разумеется, и обеспечивает оперативное и энергетически экономное расщепление бактериальными деполимеразами этого биополимера, когда у клетки возникает потребность в высвобождении и использовании накопленной в виде ПОБ энергии и углерода (Jendrossek and Pfeiffer, 2014). При искусственном же выделении ПОБ из бактериальной биомассы и его очистки этот биополимер приобретает частично кристаллическое состояние, свойственное ему как химическому соединению (Lauzier et al. 1992). В этом состоянии мы его и используем для изготовления различных изделий и микрочастиц, как в данном случае. Причем, аморфное состояние ПОБ в бактериальных гранулах обеспечивает не что иное, как вода, благодаря которой и осуществляется высвобождение ЛВ за счет диффузии. Хотя, конечно, без стабилизации биополимера в таком состоянии специальными белками гранул аморфное состояние ПОБ в бактериальной клетке было бы невозможно. Кроме того, как при синтезе биополимера в гранулах, так и при его расщеплении деполимеразами происходит диффузия различных низкомолекулярных веществ, таких как мономеры и олигомеры ПОБ, в полимерной матрице гранул (Jendrossek and Pfeiffer, 2014). Можно предположить, что получение композита

ПОБ с гидрофильным полимером-пластификатором ПЭГ позволяет с некоторым приближением смоделировать природную пластификацию ПОБ водой. И такой композит ПОБ с ПЭГ может и далее выступать в качестве контрольного материала для исследования биоинженерных применений ПОБ, связанных с его диффузионными свойствами.

6.6. Цитотоксичность микрочастиц с ПТЛ

В качестве первого этапа исследования биологической активности полученных микрочастиц, загруженных ПТЛ, было проведено исследование их цитотоксичности на различных линиях опухолевых клеток (опухоли молочной железы человека MCF-7 и гепатомы мыши МН-22а) (Рисунок 130). Было показано, что микрочастицы с ПТЛ на основе ПОБнм значительно ингибируют рост опухолевых клеток (до 5-ти раз) начиная со 2-х суток до 5-ти суток культивирования клеток в присутствии микрочастиц, тогда как ПТЛ в традиционной лекарственной форме (Таксол) на этих сроках был значительно менее эффективен, что свидетельствует о выраженном пролонгированном действии этой лекарственной формы ПТЛ. В то же время микрочастицы на основе ПОБнм, не загруженные ПТЛ, не совсем не обладали цитотоксичностью, что подтверждает их высокую биосовместимость (Бонарцев и др., 2011).

Низкая цитотоксичность микрочастиц на основе ПОА была показана в ряде работ (Kassab et al., 1999; Gursel et al., 2001; Korkusuz et al., 2001; Yagmurlu et al., 1999; Bonartsev et al., 2017; Ermakova et al., 2017; Salman et al., 2003). Была исследована также цитотоксичность микро- и наночастиц из химически синтезированных сополимеров ПОА с ПЭГ на различных культурах клеток. Наночастицы из ПОБВ-ПЭГ и ПОБ4ОБ-ПЭГ с химически конъюгированным ПЭГ 2000 начинали угнетать рост фибробластов мыши линии NIH/3T3 при концентрации лишь свыше 400 мкг/мл (Shah et al., 2010), а наночастицы из блок-сополимеров структуры ПОБ-ПЭГ-ПОБ не были токсичны для фибробластов мыши линии *L929* и опухолевых клеток яичников хомячка линии *CHO-K1* при концентрации до 120 мкг/мл (Chen et al., 2008).

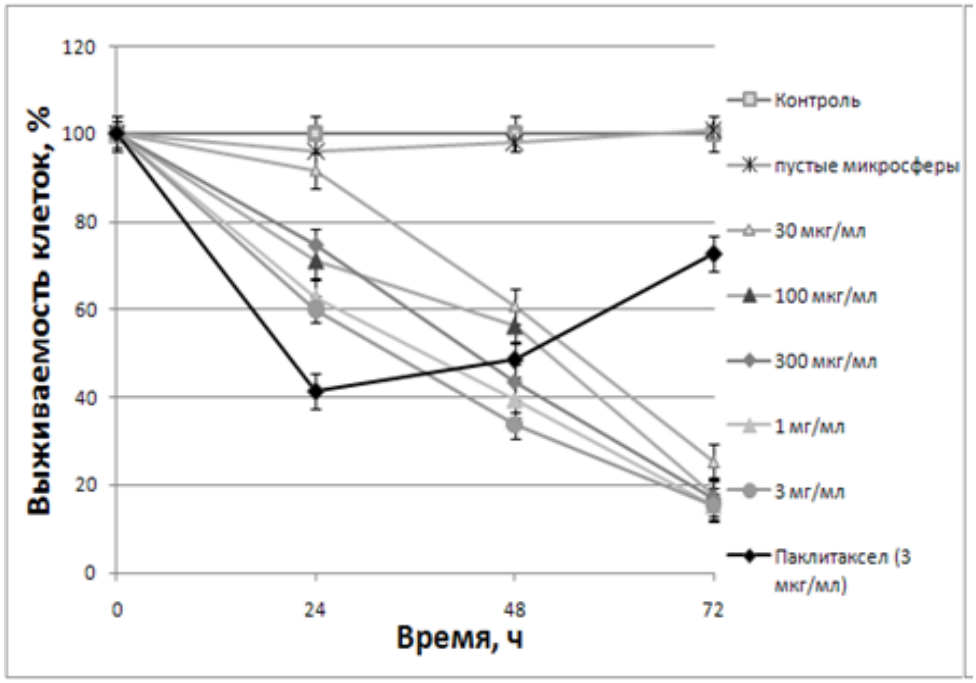


Рисунок 130. *Влияние микрочастиц на основе ПОБнм, загруженных ПТЛ, на жизнеспособность клеток линии MCF-7.*

Исследование цитотоксичности микрочастиц на основе композита ПОБ с ПЭГ до проведения эксперимента по пролонгированному высвобождению ПТЛ из микрочастиц и на 121-123-ие сутки проведения этого эксперимента, продемонстрировало пролонгированную противоопухолевую активность микрочастиц *in vitro* в течение 4-х месяцев (Рисунок 131).

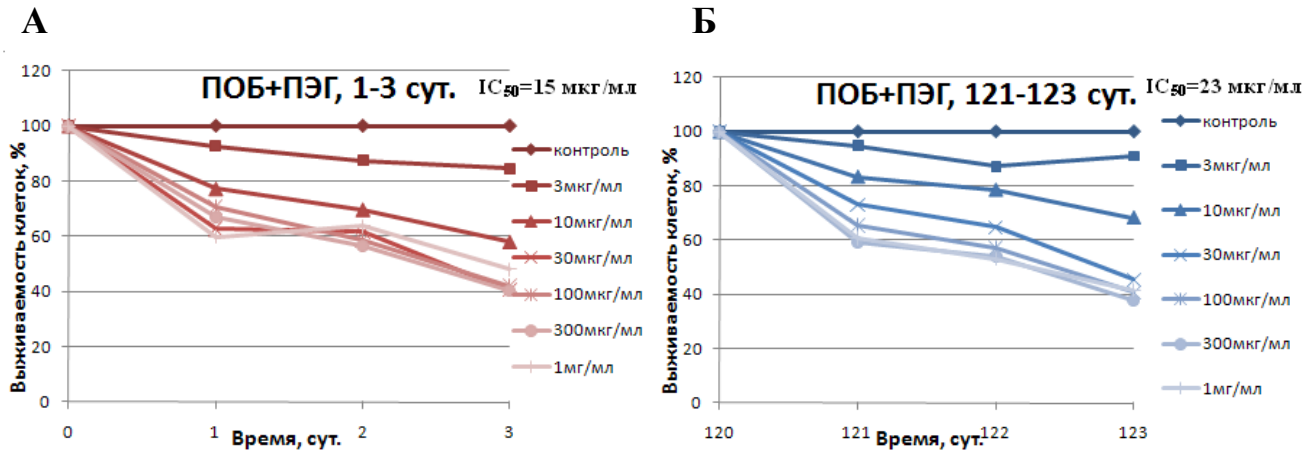


Рисунок 131. *Пролонгированная противоопухолевая активность in vitro микрочастиц на основе ПОБ-255 и ПОБ/ПЭГ через 1-3 суток (А) и 121-123-ие сутки (Б) высвобождения ЛВ в фосфатном буфере in vitro на линии клеток МН-22а.*

Противоопухолевая эффективность микрочастиц после высвобождения из них ПТЛ *in vitro* в течение 4-х месяцев уменьшилась всего в 1,5 раза (IC_{50} = 23 мкг/мл) по сравнению с

медианной токсической концентрацией микрочастиц, загруженных ПТЛ, в первые 1-3 суток высвобождения ЛВ (IC_{50} = 15 мкг/мл).

Создание лекарственных форм Паклитаксела на основе нано- и микрочастиц, загруженных этим ЛВ, имеет также немаловажный биомиметический аспект. Как известно, Паклитаксел содержится в тканях тисов различных видов (*Taxus sp.*). Некоторое время Паклитаксел добывали из коры тихоокеанского тиса *T. brevifolia*, пока не перешли к полусинтетическому способу его производства из его предшественника Баккатина III, содержащегося в иглах тиса (Croteau et al., 2006). Содержание Паклитаксела в различных тканях T. brevifolia следующее: кора – 0,0150 (0,0001-0,0690) вес.%; корни – 0,0040 (0,0008-0,0100) вес.%; древесина – 0,0006 (0,0001-0,0012) вес.%; веточки – 0,0017 (0,0001-0,0050) вес.%; иглы – 0,0015 (0,0001-0,0030) вес.%, т.е. в наибольшем количестве это биоактивное вещество содержится в коре тиса (Videnšek et al., 1990). Эти растения способны к биосинтезу Паклитаксела и множества других химически сходных ему алкалоидов. Более того, оказалось, что к биосинтезу Паклитаксела способны и множество видов эндофитных грибов, обитающих в коре этого растения и в его ризосфере, благодаря чему появилось очень актуальное в связи с острым недостатком растительного сырья биотехнологическое направление по разработке биосинтеза этого ЛВ грибами (Flores-Bustamante et al., 2010). Однако, до недавнего времени физиологическая роль Паклитаксела как для самого растения, так и для его симбионтов оставалась совершенно неясна, более того, она практически не интересовала научное сообщество: из более 30000 публикаций, посвященных паклитакселу, в базе PubMed лишь несколько посвящено этому вопросу. И это публикации лишь одной научной группы проф. Райзада (Raizada), которая провела комплексное исследование, хотя бы частично раскрывающее физиологическую роль этого алкалоида для растений и грибов (Soliman et al., 2015). И то, что они обнаружили, имеет огромное значение, по моему глубокому убеждению, для разработки новых лекарственных форм этого ЛВ.

Эти ученые исследовали симбиотические эндофитные грибы *Paraconiothyrium* SSM001 тиса *Taxus media*. Эти грибы способны к биосинтезу Паклитаксела, как и растение-хозяин, но чистый Паклитаксел при этом оказывает токсическое воздействие на растение, как и следует ожидать от этого антипролиферативного ЛВ, но не токсичен для эндофитных грибов, причем, как синтезирующих, так и не синтезирующих это вещество. Так, зачем тису симбионты, синтезирующие такой яд, и как сами эндофитные грибы выживают в тканях растения, его синтезирующего? Было показано, что синтезированный Паклитаксел у эндофитных грибов содержится в особых гидрофобных тельцах и благодаря такой изоляции не токсичен для гифов самого гриба и тканей тиса. Более того, паклитасел играет важнейшую роль во

взаимоотношении грибов-симбионтов с растением-хозяином. При прорастании боковых веточек из ствола растения происходит повреждение его коры, и тис оказывается подвержен заражению инфекционными грибами, такими как *Heterobasidion annosum, Phaeolus schweinitzii* и *Perenniporia subacida*, способными к разложению древесины, подобная же ситуация может возникнуть и при внешнем повреждении коры. Эти грибы проникают в растительные ткани через эти повреждения и начинают разлагать древесину, выделяя при этом продукт расщепления лигнина – хлорметан, кстати, один из растворителей Паклитаксела. Эндофитные грибы устремляются к месту повреждения ткани подобно макрофагам и цитотоксическим лимфоцитам у человека и, в ответ на хлорметан или компонент клеточной стенки грибов хитин (подобно опять-таки липополисахаридам) путем экзоцитоза выбрасывают локально в окружающие ткани липофильные частицы, содержащие Паклитаксел. В результате эти частицы формируют в поврежденной ткани растения барьер для инфекционных грибов, т.к. выделяющийся из них Паклитаксел оказывает на них токсическое действие. Т.е. эндофитные грибы выполняют роль клеточных элементов иммунной системы растений, ближайшей аналогией которых у человека являются Т-киллеры, выбрасывающие гранзимы в чужеродные клетки при их распознавании. Чтобы проверить, насколько гидрофобные тельца грибов снижают токсичность Паклитаксела, это ЛВ растворили в липидном экстракте из этих грибов и воздействовали им на дрожжи и опухолевые лимфоциты человека. Было показано, что в отличие от чистого Паклитаксела в той же концентрации, это ЛВ в липидном экстракте грибов не угнетает рост дрожжей и лимфоцитов (Soliman et al., 2015). Такой эффект очень похож на наблюдаемое нами на ранних сроках культивирования опухолевых клеток снижение цитостатического действия Паклитаксела, загруженного в микрочастицы на основе ПОБ (Рисунки 130 и 131), связанный, очевидно, с пролонгированным высвобождением ЛВ из них. К сожалению, авторы не исследовали состав этих гидрофобных телец, но можно предположить, что это какие-то из распространенных у растений и грибов гидрофобных полимеров: триглицериды, эфиры стеринов, полипренолы. Причем, для последних показано, что их содержание в иглах тиса *Taxus chinensis* составляет до 3% по сухому весу (Yu et al., 2012). Учитывая, что и ПОБ может содержаться в тканях эукариот (Reusch, 2013), ПОБ также может являться одним из таких возможных кандидатов. Между тем, липидные тельца в тканях грибов и растений – довольно обычное явление (Murphy, 2012; Guenther et al., 2009). Некоторыми исследователями показано, что такие липидные включения способствуют повышению устойчивости грибов к воздействию на них липофильных токсинов. Например, симбиотический гриб *Phaeosphaeria* sp. лишайника *Heterodermia obscurata* (Nyl.) *Trevis*, обладающий липидными тельцами, обладает устойчивостью к фототоксину гипокреллину А благодаря его

аккумуляции в них (Chang et al., 2015). Таким образом, если рассматривать создание терапевтических средств доставки Паклитаксела с биомиметической точки зрения, то подход по загрузке его в микрочастицы или мицеллы из природных гидрофобных полимеров для его последующего локального высвобождения представляется вполне оправданным.

3.6.7. Получение биополимерных микрочастиц методом мембранного распылительного высушивания

3.6.7.1. Характеристика микро- и наночастиц

В данной работе были исследованы частицы с включением паклитаксела, полученные методом распылительного высушивания. Для их создания использовался прибор – нанораспылительная сушилка Buchi Nano Spray Dryer B-90 (Швейцария). Это уникальный прибор для получения полимерных и композитных частиц минимального размера методом пьезоэлектрического спрей-высушивания. Прибор позволяет получать тонкие фракции композитных микрочастиц (в т.ч. с лекарственными веществами), с диаметром от 300 нм до 5 мкм, из растворов веществ в органических растворителях методом пьезоэлектрического распыления. Прибор позволяет инкапсулировать различные низкомолекулярные лекарственные вещества различного фармакологического действия (противоопухолевые, антибиотики, противовоспалительные, гормональные и др.) и получать нано- и микросферы для контролируемой доставки лекарственных веществ (Heng et al., 2011; Arpagaus et al., 2018).

Вкратце, это устройство имеет распылительную головку, помещенную в аэродинамическую трубу. На головке расположена форсунка с мембраной, имеющей отверстия определенного диаметра (в данном случае 7 мкм). С помощью перистальтического насоса, раствор вещества подается на резонирующую мембрану. Процесс вибрации, необходимый для распыления капель раствора с головки, обеспечивается за счет обратного пьезоэффекта. Затем полученные капли заданного диаметра, равного размеру отверстий, проходят по аэродинамической трубе, где происходит их высушивание. К концу прохождения трубы они уже являются твердыми микрочастицами. В конце трубы установлен коллектор для готовых микрочастиц, где они осаждаются на металлический цилиндр за счет статического электричества, подаваемого на него (Рисунок 132) (Nano Spray Dryer B-90 Application Booklet, 2009). Для адаптации этого метода и прибора для работы с хлороформным раствором ПГБ и ПКЛ была использована система инертных газов N_2 и CO_2.

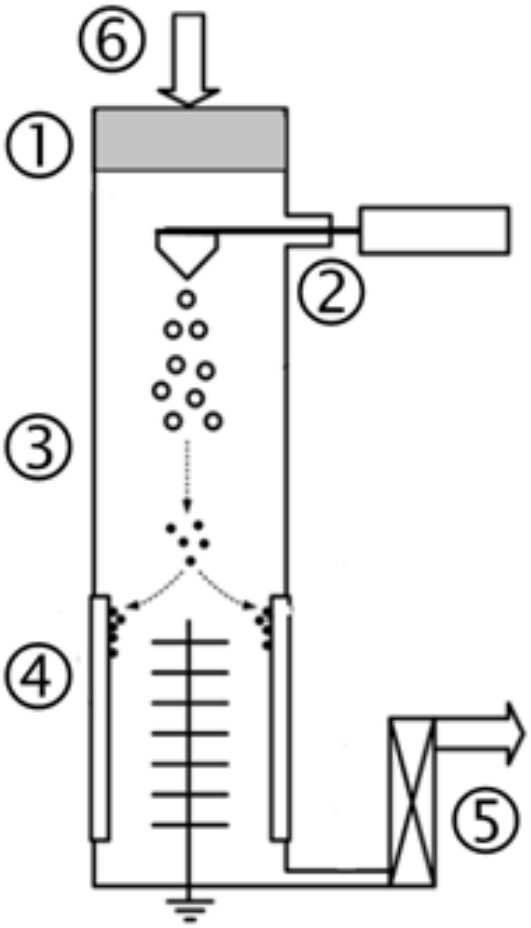


Рисунок 132. *Принцип и работы Buchi Nano Spray Dryer B-90. 1 - Нагревание, 2 - формирование капель, 3 - Сушильная камера (аэродинамическая труба, 4 - Сбор частиц, 5 - Выходной фильтр, 6 - Осушение газа (Nano Spray Dryer B-90 Application Booklet, 2009). (Оборудование ЦКП МГУ, приобретенное за счет средств Программы развития МГУ).*

В начале работы прибора необходимо подать через перистальтический насос на распылительную головку чистый органический растворитель (хлороформ) и проводить распыление в течение часа. Затем при остановке откачки раствора производится замена чистого растворителя на раствор, содержащий компоненты полимерно-лекарственной смеси. При забивании пор распылительной головки компонентами полимерно-лекарственной смеси, заменить раствор, их содержащий на чистый растворитель для отмывки головки. По завершение процесса высушивания, установку Buchi B-90 отключить, прекратить подачу инертных газов и выключить все вспомогательные приборы. Полученные частицы аккуратно счистить с цилиндрического коллектора на плотную бумагу с использованием специального скребка. Далее микрочастицы помещаются во флаконы и взвешиваются.

Полученные микрочастицы были использованы для проведения доклинических исследований и для этого исследуемому препарату было присвоено название биополимерная лекарственная форма Паклитаксела (БЛФП).

Технологические характеристики получения микрочастиц были следующие:

- эффективность количественного выхода продукта: 79,0%;

- массовый выход продукта (БЛФП) из расчета на 1 технологическую установку: 3950 мг/3 часа, что свидетельствует о достижении масштабирования наработки образцов лекарственного средства в количествах, достаточных для проведения полного цикла доклинических исследований.

Таким образом были получены микрочастицы из ПОБ (молекулярная масса 6000 Да) диаметром 2,71 ± 1,01 мкм с включением паклитаксела (Таблица 21). Были также получены контрольные микрочастицы, не содержащие лекарственное вещество. Их диаметр так же приблизительно равнялся 3 мкм. На Рисунке 133 показаны изображения микрочастиц, полученных с помощью сканирующего электронного микроскопа. Микроструктуры имеют правильную сферическую форму с относительно гладкой поверхностью. Распределение частиц по размерам, полученное с использованием ImageJ 1.46 показано на гистограмме (Рисунок 134). Здесь можно видеть узкую дисперсию по размеру частиц, который показывает их единообразие. Микрочастицы, загруженные ПКЛ, показали хорошую способность к диспергированию. Гидродинамический диаметр и поверхностный заряд (ζ-потенциал) равнялись 7.86 мкм и -42 мВ для загруженных микрочастиц и 7.48 мкм и -41 мВ для пустых (Таблица 21).

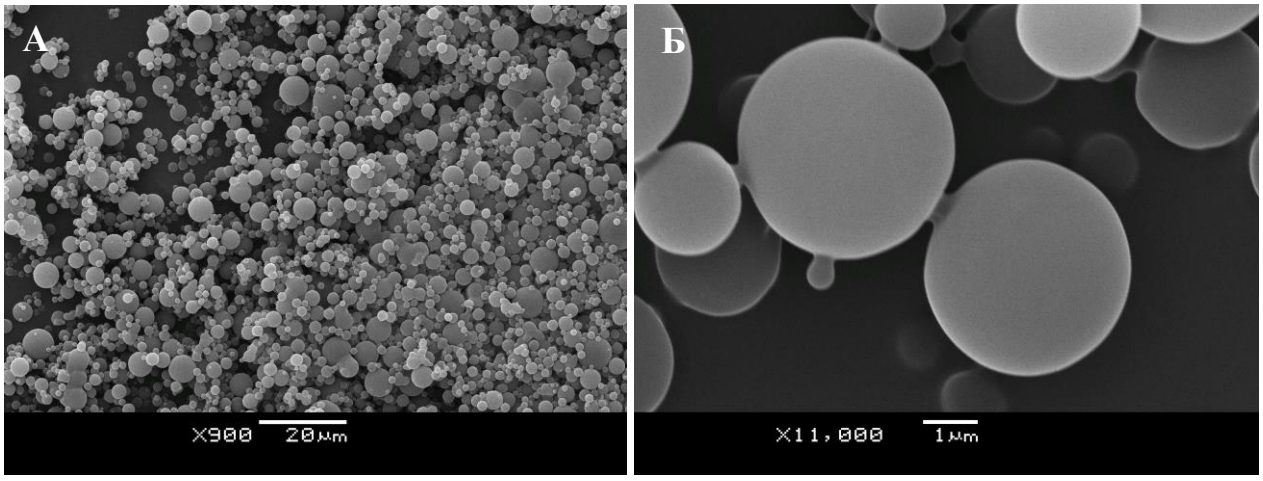


Рисунок 133. *Изображения (×900 (А) и ×11000 (Б)) микрочастиц, изготовленных из ПОБ 6 кДа и загруженных ПТЛ. (Выполнено при содействии и на оборудовании Общефакультетской лаборатории электронной микроскопии (отв. проф. кафедры биоинженерии Соколова О.С.).*

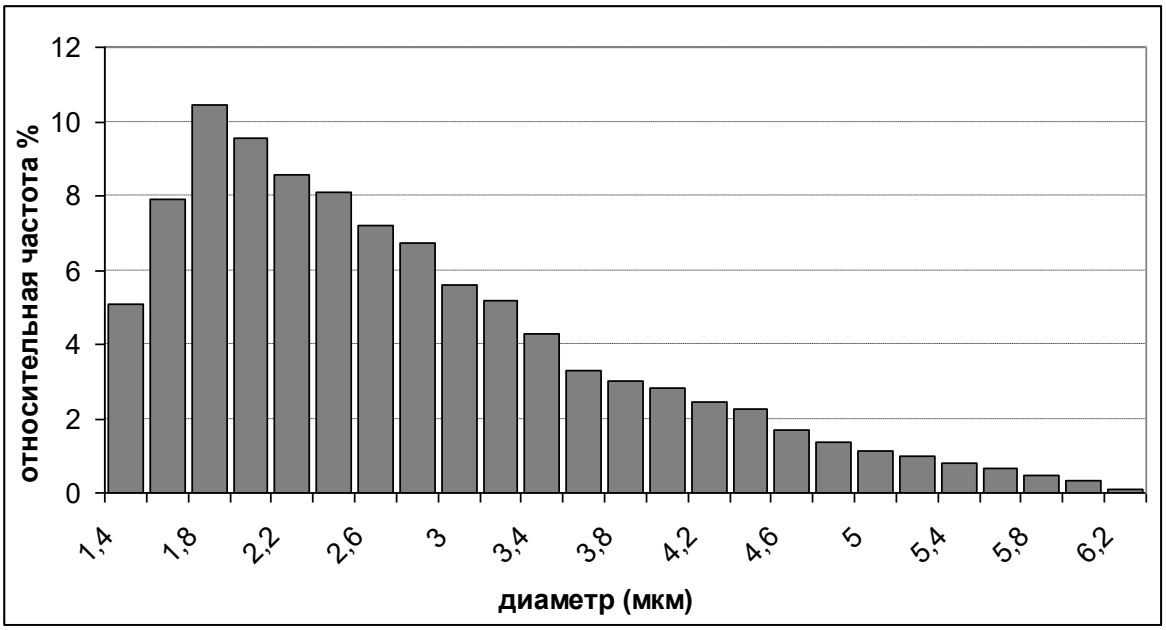


***Рисунок 134**. Распределение микрочастиц на основе ПОБ, загруженных ПТЛ, по размерам. (Выполнено на оборудовании ЦКП МГУ, приобретенном за счет средств Программы развития МГУ).*

Было показано, что размер частиц и другие характеристики инкапсулирования зависят от природы полимера и от ряда факторов и условий формирования микрочастиц (Зернов и др., 2017). Например, было обнаружено, что наиболее важным фактором, отвечающим за размер микрочастиц, является суммарная концентрация распыляемых веществ в растворе. Кроме того, такие параметры прибора, как температура на входе, температура головки, давление, скорость распыления и т.д. может влиять на размер и форму микрочастиц.

Также одним из наиболее важных условий, влияющих на размер полимерных микрочастиц, является концентрация полимера в органическом растворителе. Дело в том, что капля с фиксированным размером (этот размер больше, чем диаметр отверстия в мембране) высыхает до окончательного размера, определяемого количеством полимера, содержащемся в ней. Чем меньше вещества содержится в капле, тем меньше размер частиц. Но при увеличении концентрации полимера, вязкость и плотность раствора полимера также растут, и наступает момент, когда создание частиц становится невозможным из-за того, что раствор стал слишком вязким и густым. Эмпирически, максимальной концентрацией полимера этой молекулярной массы в растворе, при которой возможно электродинамическое высушивание является 50 мг вещества в 1 мл хлороформа. Именно при такой концентрации застывающая капля в аэродинамической трубе содержит наибольшее количество вещества, а, следовательно, эффективность процесса повышается, но при этом микрочастицы сохраняют достаточно малый

размер, достаточный для их попадания внутрь клетки путем эндоцитоза (Зернов и др., 2017; Bonartsev et al., 2017в).

Включение ПКЛ в микрочастицы определялось с помощью УФ спектроскопии. Содержание вещества равнялось теоретическому – 10,2 ± 0,7% вес. По данным дифференциальной сканирующей калориметрии кристалличность полимерных микрочастиц составляла 65,0% при температуре плавления $T_п^{пик}$ от 133,9 до 155,2 ºС (Таблица 23).

Таблица 23. *Размер и физико-химические свойства полученных микро- и наночастиц.*

Параметр	Микрочастицы
Методика приготовления	Электродинамическое высушивание
Диаметр по данным СЭМ	2,71 ±1,01 мкм
Гидродинамический диаметр	7,86 ±0.45 мкм
ζ-потенциал (мВ)	-42
Включение лекарственного вещества (%)	10,2 ±0,7

(*Выполнено совместно с ст.науч.сотр. кафедры биофизики Паршиной Е.Ю. на оборудовании ЦКП МГУ).*

Другие варьируемые параметры прибора не вносили особого вклада в морфологию микрочастиц, а также на включение ПТЛ в полимерную матрицу. Однако их влияние распространялось на само проведение технологического процесса. Данные по их варьированию приведены в Таблице 24. Исходя из нее видно, что оптимальными параметрами для создания микрочастиц ПОБ, загруженных ПКЛ, являются те, которые мы использовали и которые приведены в Таблице 24.

Таблица 24. *Подбор параметров процесса распылительного высушивания.*

Название параметра	**Значение параметра**	**Уменьшение значения параметра**
Gas flow rate (Уровень подачи осушающего газа)	80 л/мин	Невозможность формирования микрочастиц, недостаточное давление газа внутри камеры, частицы не высыхают и образуют агломераты на коллекторе.
	100 л/мин	Недостаточно осушающего газа, частицы не высыхают и образуют агломераты на коллекторе.

	120 л/мин	Достаточное количество осушающего газа, достаточное давление газа, частицы высыхают и не слипаются
	140 л/мин	Достаточное количество осушающего газа, достаточное давление газа, частицы высыхают и не слипаются? Повышенный расход осушающих газов
Inlet temperature (Температура подаваемого осушающего газа)	40 °C	Низкая температура осушающего газа, капли не успевают высохнуть в аэродинамической трубе и образуют сплошную пленку на коллекторе
	50 °C	Низкая температура осушающего газа, капли не успевают высохнуть в аэродинамической трубе и образуют агломераты на коллекторе
	61°C ($t_{Кип\ хф}$)	Температура кипения хлороформа, капли достаточно быстро высыхают для оседания частиц правильной формы на коллекторе
	>70 °C	Температура кипения хлороформа, капли достаточно быстро высыхают для оседания частиц правильной формы на коллекторе. Опасность термического разложения паклитаксела и закристаллизации полимера

(Выполнено на оборудовании ЦКП МГУ, приобретенном за счет средств Программы развития МГУ).

Таким образом, было показано, что микрочастицы, загруженные паклитакселом, хоть и превышают размерами наночастицы, однако не сильно отличаются по морфологии и поверхностному заряду. Сравнительные характеристики частиц приведены в сводной таблице 3. Это позволяет высказать предположение, что метод пьезоэлектрического распыления в инертной атмосфере является хорошим подходом для масштабирования лабораторного метода получения новой лекарственной формы ПКЛ. Однако, в дальнейшем, безусловно, потребуется сравнить микро- и наночастицы по методу доставки лекарственного вещества в клетки *in vitro* и *in* vivo, так как хотя средний диаметр микрочастиц находится ниже порогового значения для эндоцитоза клетками (Bonartsev et al., 2017в), они имеют плотную гидратную оболочку, что показано по разнице в диаметре и гидродинамическом диаметре микрочастиц более чем в два раза. По физико-термическим параметрам микрочастицы, загруженные ПКЛ, не отличались от соответствующих наночастиц. Разработанная технология позволила провести полный цикл

доклинических исследований противоопухолевой лекарственной формы на основе микрочастиц из ПОБ, загруженных ПТЛ (Ermakova et al., 2017; Bonartsev et al., 2017в).

3.6.8. Исследование острой токсичности БЛФП in vivo

Получены расчетные токсические дозы полученных микрочастиц, загруженных Паклитаклелом (БЛФП) для мышей и крыс при внутрибрюшинном применении (Таблица 25).

Таблица 25. *Расчетные токсические дозы БЛФП (в пересчете на д.в.) при внутрибрюшинном применении мышам и крысам.*

Вид животных	**$ЛД_{10}$ (мг/кг)**	**$ЛД_{16}$ (мг/кг)**	**$ЛД_{50}$ (мг/кг)**	**$ЛД_{84}$ (мг/кг)**	**$ЕТ_{50}$ (сут.)**
Мыши-самцы	95,2 (66,5÷123,9)	107,2	161,8(138,7÷184,9)	244,3	8,2
Мыши-самки	371,4 (331,7÷411,1)	385,3	437,2 (412,1÷462,3)	496,1	9,8
Крысы-самцы	59,1 (44,7÷73,5)	63,6	81,9 (72,5÷91,3)	105,4	6,1
Крысы-самки	46,2 (25,9÷66,5)	50,0	65,7 (55,5÷75,9)	86,3	5,1

(Выполнено совместно с Научно-исследовательским институтом экспериментальной диагностики и терапии опухолей Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина с научной группой под руководством проф., д.м.н. Бухмана В.М.).

Полученные токсические дозы более чем в 10 раз (в пересчете на д.в.) больше, чем у традиционного препарата: $ЛД_{50}$ составляет для традиционного препарата 8 мг/кг для крыс и 16 мг/кг для мышей, что свидетельствует о значительно сниженной токсичности БЛФП.

Установлено, что БЛФП при внутрибрюшинном введении в дозе 1000 мг/кг мышам (адекватной по содержанию 100 мг/кг Паклитаксела-Тева) и в дозе 500 мг/кг крысам-самцам (адекватной по содержанию 50 мг/кг Паклитаксела-Тева) не вызывает гибели животных и уменьшения массы тела. При этом Паклитаксел-Тева в таких же дозах при внутрибрюшинном введении (100 мг/кг мышам 50 мг/кг крысам) вызывает гибель всех животных в течение 2-3 часов после введения препарата.

БЛФП при внутрибрюшинном введении крысам-самкам в дозе 500 мг/кг (адекватной по содержанию 50 мг/кг Паклитаксела-Тева) на 8 сутки вызывает гибель 17% и уменьшение массы тела животных. Паклитаксел-Тева в эквидозе при внутрибрюшинном введении (50 мг/кг) вызывает гибель всех крыс-самок в течение 2-3 часов после введения препарата.

Выявлена половая зависимость при применении БЛФП мышам линии B_6D_2F1 по величине расчетных токсических доз: самки примерно в 3 раза менее чувствительны, чем самцы.

Выявлена половая зависимость при применении БЛФП неинбредным крысам по величине расчетных токсических доз: самцы несколько менее чувствительны, чем самки.

Патоморфологическая картина (изменения в почках, селезенке, печени) при введении БЛФП в высоких дозах свидетельствует о наличие системного токсического действия БЛФП наряду с локальным токсическим эффектом.

Препарат обладает выраженным кумулятивным эффектом, ET_{50} составляет от 5,1 до 9,8 сут., тогда как традиционный препарат вызывает гибель животных в первые несколько часов, что полностью согласуется с пролонгированным высвобождением действующего вещества из БЛФП.

3.6.9. Исследование противоопухолевых свойств БЛФП на моделях опухолевых заболеваний

3.6.9.1. Изучение БЛФП в диапазоне доз под контролем воспроизводимости противоопухолевого эффекта на модели в/б трансплантированной эпидермоидной карциноме легкого Льюис

Определение дозового диапазона БЛФП на внутрибрюшинном LLC

Показано (Таблица 26, Рисунок 135), что БЛФП в диапазоне доз 300 и 600 мг/кг при однократном в/б введении дозозависимо, значимо и достоверно пролонгирует жизнь мышей с внутрибрюшинно трансплантированной эпидермоидной карциномой легкого Льюис. При средней продолжительности жизни мышей в группе КРО 13,6±2,2 дня, в группе БЛФП СПЖ=21,5±4,1 и 22,9±2,4 дней соответственно дозе, а УПЖ=58 и 68% ($p < 0,05$). При применении максимальной дозы БЛФП 1200 мг/кг 30% мышей пали раньше контроля на 4-8 сутки после введения. Как следствие, в этой группе УПЖ=39% не достигло достоверного уровня ($p>0,05$) при незначительном уменьшении продолжительности жизни до СПЖ=18,9±4,1 дней, что является косвенным показателем ухудшения переносимости лечения. Свободный паклитаксел в высокой эффективной дозе показал достоверное УПЖ=65% при гибели 30% мышей на 6-12 сутки после введения. Сравнительный анализ позволяет считать, что БЛФП равноэффективен паклитакселу при лучшей переносимости лечения.

Таблица 26. *Диапазон действующих доз БЛФП на внутрибрюшинно трансплантированной карциноме легкого Льюис***.**

Группа	Доза, мг/кг	Показатели эффективности

		СПЖ**, дни	УПЖ,%
КРО	физ. р/р	13,6 ± 2,2	-
БЛФП	300	21,5 ± 4,1	58***
	600	22,9 ± 2,4	68***
	1200	18,9 ± 7,9	39
Паклитаксел	30*	22,4 ± 7,2	65***

Примечание: n=10; *гибель 30% мышей на 6-12 сутки после введения;

** M(÷d) – *ср. арифм. с доверительным интервалом; ***различия с группой КРО достоверны, р <0,05*

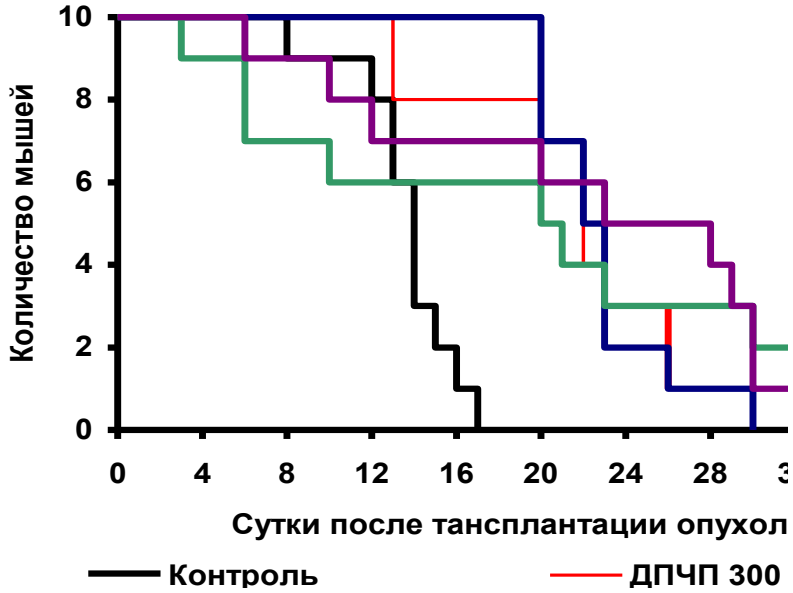


Рисунок 135. *Увеличение продолжительности жизни мышей с внутрибрюшинной карциномой легкого Льюис под действием БЛФП сер. 01.10.13 в диапазоне доз. (Выполнено совместно с Научно-исследовательским институтом экспериментальной диагностики и терапии опухолей Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина с научными группами под руководством проф., д.м.н. Трещалиной Е.М.).*

При исследовании БЛФП сер. 20.11.13 в диапазоне доз 150, 600 и 900 мг/кг при однократном в/б введении, было показано (Таблица 27, Рисунок 136), что на фоне СПЖ=12,7±1,4 дней у мышей группы КРО, БЛФП достоверно значимо и дозозависимо пролонгировал жизнь мышей до СПЖ=23,0±2,5 дней, 26,7±3,4 дней и 29,8±4,2 дней с соответственным УПЖ=81, 110 и 135% (р<0,05).

Таблица 27. *Диапазон эффективных доз БЛФП сер. 20.11.13 на внутрибрюшинно трансплантированной карциноме легкого Льюис.*

Группа	Доза, мг/кг	Показатели эффективности					
		Асцит		Канцероматоз по брюшине		СПЖ, дни *	УПЖ, %
		абс.	%	абс.	%		
КРО	Физ. р/р	10/10	100	10/10	100	12,7±1,4	-
БЛФП	150	10/10	100	10/10	100	23,0±2,5	81**
	600	8/10	80	7/10	70	26,7±3,4	110**
	900	5/10	50	5/10	50	29,8±4,2	135**

Примечание: n=10; * M(÷d) – *Ср. арифм. с доверительным интервалом; **различия с группой КРО достоверны, p <0,05. (Выполнено совместно с Научно-исследовательским институтом экспериментальной диагностики и терапии опухолей Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина с научными группами под руководством проф., д.м.н. Трещалиной Е.М.).*

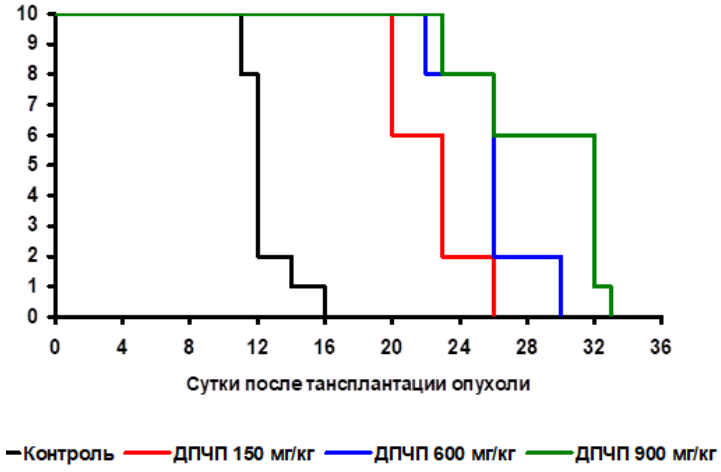


Рисунок 136. *Увеличение продолжительности жизни мышей с внутрибрюшинной карциномой легкого Льюис под действием БЛФП сер. 20.11.13 в диапазоне доз. (Выполнено совместно с Научно-исследовательским институтом экспериментальной диагностики и терапии опухолей Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина с научными группами под руководством проф., д.м.н. Трещалиной Е.М.).*

Оценка воспроизводимости противоопухолевого эффекта БЛФП на в/б LLC

О воспроизводимости противоопухолевого эффекта БЛФП судили по данным двух опытов, полученных на в/б LLC. БЛФП двух серий 20.11.13 и 31.01.14 в максимальной

эффективной и переносимой дозе 900 мг/кг, использованы для лечения в разных опытах (Рисунок 135). В результате показано, что обе серии в изученной дозе вызывают идентичный противоопухолевый эффект с увеличением выживаемости мышей, СПЖ=29,8 ± 4,2 дней против СПЖ=26,8 ± 4,5 дней, УПЖ=135% против 94% (различия недостоверны). Данные аутопсии подтвердили выявленные эффекты. Обе серии БЛФП в равной степени ингибировали накопление асцита и развитие канцероматоза у 50% мышей. Переносимость лечения была удовлетворительной.

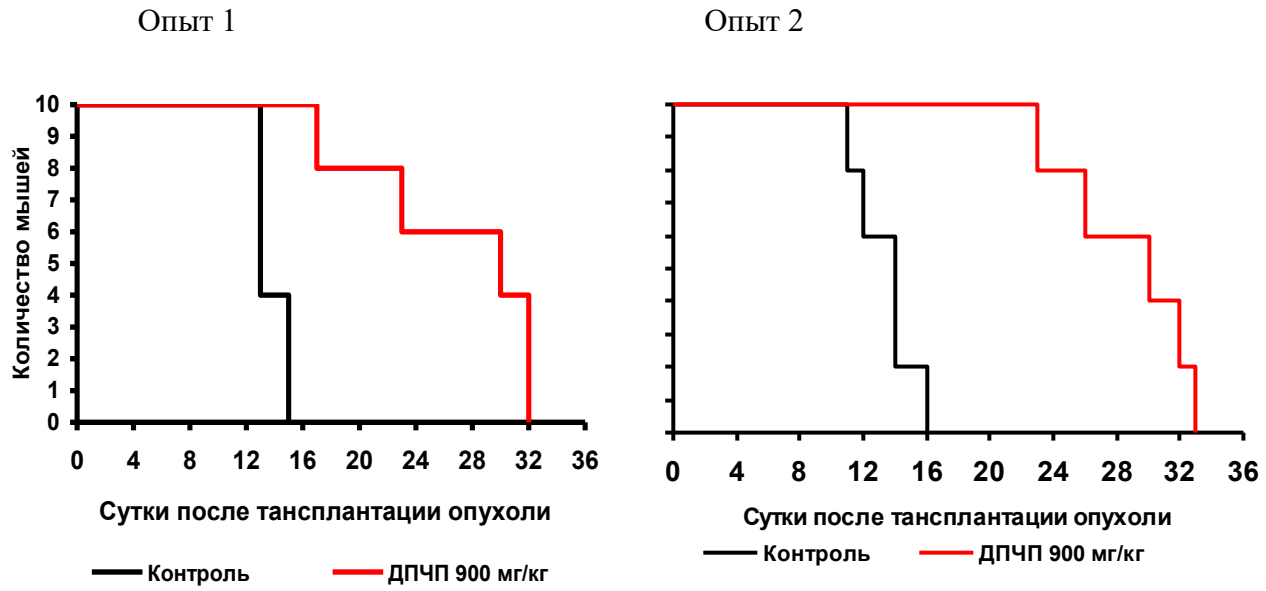


Рисунок 137. *Воспроизводимость в 2-х опытах противоопухолевого эффекта БЛФП сер. 20.11.13 и сер. 31.01.14 в максимальной дозе по выживаемости мышей с внутрибрюшинной карциномой легкого Льюис. (Выполнено совместно с Научно-исследовательским институтом экспериментальной диагностики и терапии опухолей Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина с научными группами под руководством проф., д.м.н. Трещалиной Е.М.).*

Таким образом, БЛФП в высокой эффективной переносимой дозе 900 мг/кг оказывает воспроизводимый противоопухолевый эффект в 2-х опытах на LLC при удовлетворительной переносимости.

6.8.2. Изучение БЛФП на модели в/б ксенографтов перевиваемого рака молочной железы человека РМЖ-1

Определение дозового диапазона и воспроизводимости эффектов БЛФП на РМЖ-1

На РМЖ-1 (Таблица 28 и Рисунок 138) БЛФП сер. 01.10.13 в дозах 300 и 600 мг/кг достоверно ($p<0,05$) ингибировал рост в/б опухолевых узлов (Т/С=38-42%, минимальный критерий Т/С$\leq$42%) по сравнению с паклитакселом (Т/С=21%), который вызвал полную регрессию опухоли в большей части мышей.

В отличие от паклитаксела, который при близкой к максимально дозе 30 мг/кг вызывал единичную гибель мышей без отрицательной симптоматики, побочные эффекты БЛФП сер. 20.11.13 при дозах $\geq$900 мг/кг носили лимитирующий характер и были связаны, вероятно, с кумулятивной токсичностью паклитаксела на тромбоцитарный и миелоидный ростки кроветворения (резко увеличенной кровоточивостью, геморрагическим асцитом, кровенаполнением органов и развитием стерильных абсцессов), а также с адгезивным действием дисперсии микрокапсул (тотальный спаечный процесс с наслоениями БЛФП).

Таблица 28. *Диапазон действующих доз БЛФП разных серий при однократном внутрибрюшинном введении мышам с в/б ксенографтами рака молочной железы человека РМЖ-1 под контролем эффективности и переносимости лечения.*

Группы	Доза, мг/кг	Объем опухоли, мм^3	Т/С%*	CR%	Локальный Побочный эффект**, +/-
Контроль	Физиоло-гический раствор	367±196	100	-	-
Микрочастицы	300	114±53	31	0	+
	600	125±47	34	0	++
	900	124±71	34	60	+++
	1100***	144 (n=1)	39	70	++++
Таксол	30****	198±43	54	20	-

*Примечание: n=8; *Vср÷d – ср. объем опухоли с доверительным интервалом на 21 суток после трансплантации; **Ингибирование роста опухоли, Т/С $\leq$42% на 18 с после лечения; ***Различия с КРО достоверны, p <0,05; ****Един. гибель от токсичности на 5 сутки. (Выполнено совместно с Научно-исследовательским институтом экспериментальной диагностики и терапии опухолей Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина с научными группами под руководством проф., д.м.н. Трещалиной Е.М.).*

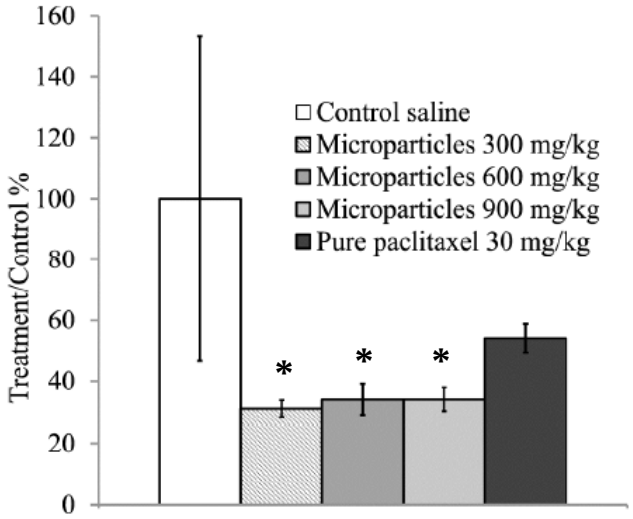


Рисунок 138. *Ингибирование роста рака молочной железы человека РМЖ-1 при использовании разных действующих доз БЛФП сер. 01.10.13 при однократном внутрибрюшинном введении. (Выполнено совместно с Научно-исследовательским институтом экспериментальной диагностики и терапии опухолей Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина с научными группами под руководством проф., д.м.н. Трещалиной Е.М.). * p <0,05 в сравнении с Контролем.*

Таким образом, на РМЖ-1 БЛФП сер. 01.10.13 в диапазоне действующих доз 300 и 600 мг/кг достоверно (p <0,05) ингибировал рост в/б опухолевые узлы. Побочные эффекты БЛФП сер. 20.11.13 при дозах ≥900 мг/кг носили лимитирующий характер и были связаны, вероятно, с кумулятивной токсичностью паклитаксела.

Таким образом, были выполнены исследования с целью формирования доказательной базы доклинического изучения специфической противоопухолевой активности дисперсии микрокапсул диаметром 2,4 мкм с 10% содержанием паклитаксела (БЛФП) для внутриполостного введения.

В задачи исследования входила подготовка материала для изучения элементов фармакокинетики, определение терапевтического диапазона доз БЛФП и воспроизводимости противоопухолевого эффекта в сравнении с паклитакселом под контролем переносимости.

БЛФП вводили мышам однократно в/б в диапазоне доз от 150 до 1200 мг/кг. Использованы мыши BDF1 с трансплантированной внутрибрюшинно (в/б) метастазирующей в легкие эпидермоидной карциномой легкого Льюис (LLC) и иммунодефицитные мыши Balb/c nude с в/б ксенографтами рака молочной железы человека РМЖ-1.

В результате для изучения фармакокинетики подготовлены и переданы Заказчику 24 мыши с в/б LLC, пролеченные эффективной дозой БЛФП. Определен диапазон действующих доз БЛФП с прямой зависимостью противоопухолевого эффекта: 150—900 мг/кг (соотношение 1:6) для в/б LLC и 300-600 мг/кг (соотношение 1:2) для в/б РМЖ-1.

На LLC БЛФП воспроизводимо в 2-х опытах ингибировал накопление асцита и развитие канцероматоза у 50% мышей с достоверным ($p < 0,05$) увеличением продолжительности жизни при лучшей переносимости в сравнении с паклитакселом.

На РМЖ-1 БЛФП в одном опыте достоверно ($p < 0,05$) ингибировал рост в/б опухолевых узлов (Т/С=38-42%, минимальный критерий Т/С $\leq$42%) при значимом ухудшении эффективности в сравнении с паклитакселом, который вызвал полную регрессию опухоли у большей части мышей. В отличие от паклитаксела, который при близкой к максимально дозе 30 мг/кг вызывал единичную гибель мышей без отрицательной симптоматики, побочные эффекты БЛФП при дозах $\geq$900 мг/кг носили лимитирующий характер и были связаны, вероятно, с кумулятивной токсичностью паклитаксела на тромбоцитарный и миелоидный ростки кроветворения (резко увеличенная кровоточивость, геморрагический асцит, кровенаполнение органов и развитие стерильных абсцессов), а также с адгезивным действием дисперсии микрокапсул (тотальный спаечный процесс с наслоениями БЛФП).

Полученные данные позволяют считать, что при однократном в/б введении мышам БЛФП может быть охарактеризован, как эффективный противоопухолевый агент пролонгированного действия, воспроизводимо реализующий значимый противоопухолевый эффекты на солидные опухоли, локализованные в брюшной полости. Противоопухолевое действие БЛФП проявляется на уровне паклитаксела при сравнительно более широком терапевтическом дозовом диапазоне, при высокой терапевтической дозе вызывает у иммунодефицитных мышей лимитирующее кумулятивное побочное действие.

3.6.10. 3D-матриксы, загруженные симвастатином для тканевой инженерии

Симвастатин в основном используется в составе лекарственных препаратов, понижающих уровень холестерина. Однако в более низких дозах этот статин обладает способностью стимулировать рост костной ткани и индуцировать дифференцировку МСК в остеобласты. Использование симвастатина в условиях постепенного локального высвобождения позволяет добиться пролонгированного эффекта для стимуляции регенерации костной ткани в области ее повреждения. Симвастатин может быть использован для включения в полимерные матриксы, используемые для инженерии костной ткани (Chou et al., 2013; Mottaghitalab, 2022).

Были получены 3D-матриксы на основе ПОБ-365 по разработанной нами методике (см. Раздел 2.2.4). Все характеристики и исследование остеогенных свойств полученных матриксов (не загруженных симвастатином) приведены в Разделе 3.9.

Было проведено исследование высвобождения симвастатина из полученных 3D-матриксов. Профиль кинетики высвобождения симвастатина из полученных микросфер приведен на Рисунке 139.

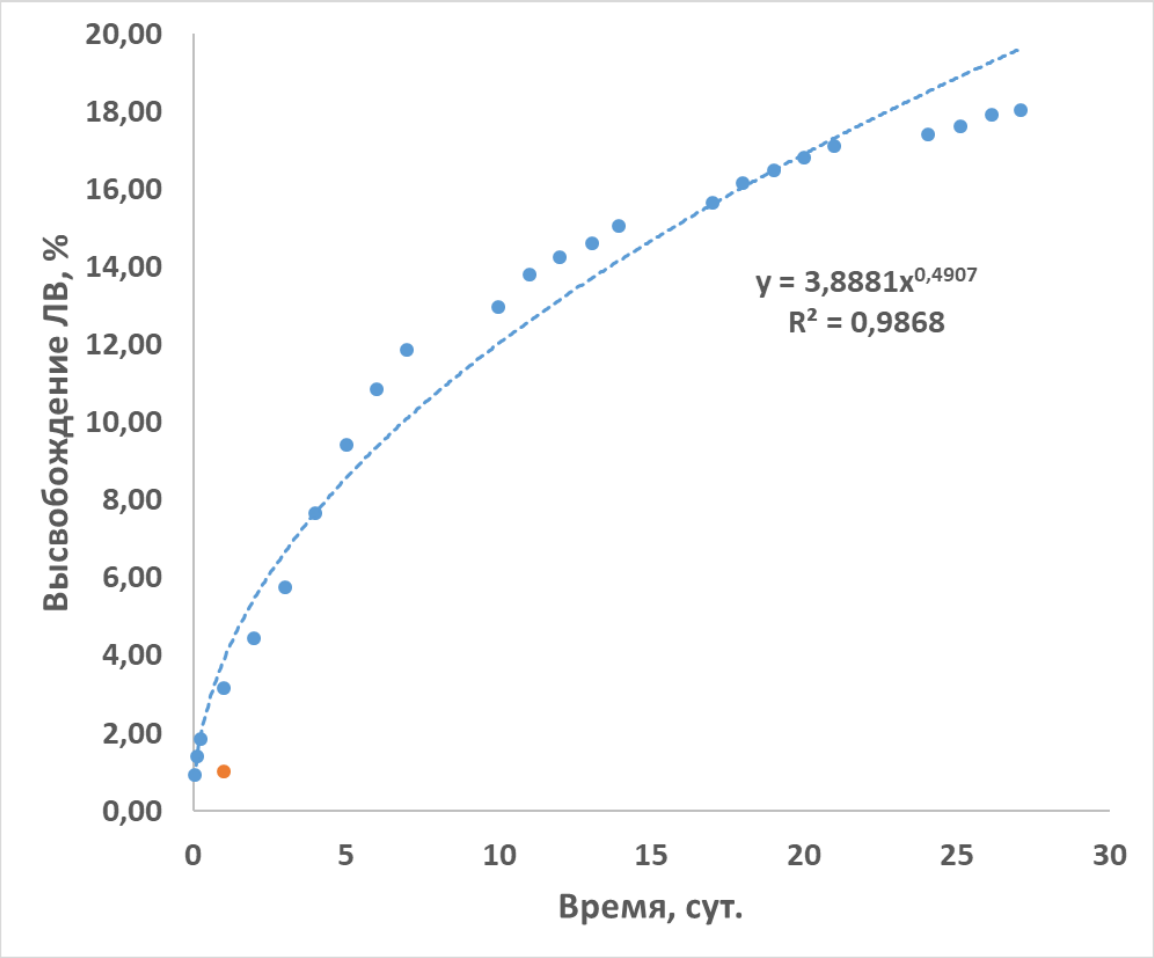


Рисунок 139. *Кинетика высвобождения симвастатина из пористых 3D-матриксов из ПОБ.*

Для изучения кинетики высвобождения симвастатина из исследуемых 3D-матриксов были применены математические модели высвобождения ЛВ: модель диффузии по закону Фика, модель первого порядка, модель Хигучи и модель Пеппаса-Корсмейера по выше описанному алгоритму (формулы 12 – 23, подраздел 3.6.1).

Результаты аппроксимации экспериментальных данных по кинетике высвобождения симвастатина из 3D-матриксов на основе ПОБ по применяемым моделям показали, что кинетика высвобождения этого ЛВ очень хорошо соотвествует диффузионному высвобождению по модели диффузии по закону Фика (Таблица 29).

Таблица 29. *Коэффициенты детерминации и константы моделей высвобождения симвастатина из 3D-матриксов на основе ПОБ.*

	Модель кинетики первого порядка	Модель Хигучи		Модель Пеппаса-Корсмейера		
	R^2	R^2	k_H	R^2	k_{KP}	n_{KP}
Пористые микросферы на основе ПОБ	0,99	0,99	3,89	0,99	3,78	0,49

R^2 - коэффициент детерминации;

k_H, kKP, nKP – константы моделей Хигучи ($_H$) и Пеппаса-Корсмейера ($_{KP}$);

Наблюдаемое нами выраженное пролонгированное высвобождение с хорошо прогнозируемой и регулируемой кинетикой указывает на то, что 3D-матриксы, загруженные симвастатином могут быть использованы для создания биоактивного остеоиндуктивного материала для регенерации костной ткани (Акулина, 2021).

Были получены также пористые микросферы, загруженные симвастатином, для пролонгированного высвобождения этого лекарственного вещества. В настоящее время проводится их комплексное исследование *in vitro* (морфологии, физико-химических свойств, на культуре МСК) и *in vivo* (на модели некритического костного дефекта бедренной кости крысы).

Раздел 3.7. Микрочастицы из поли-3-оксибутирата и его сополимеров для пролонгированного высвобождения белков

Влияние биоПЭГилирования ПОБ на функциональные свойства биополимера было рассмотрено также на примере микрочастиц, загруженных белками, для их пролонгированного высвобождения. Разработка систем пролонгированной доставки терапевтических белков является актуальной задачей в современной биотехнологии. Такие системы могут использоваться в фармацевтике, тканевой инженерии и экспериментальной биологии. В микро- и наночастицы на основе ПОБ и его сополимеров могут быть загружены различные биологически активные белки: гормоны, цитокины, факторы роста. Однако, доставляемые биоактивные вещества, белки, являются также, как и ПОБ, полимерами со сложной конформацией, которая определяет их функциональность. И на биологическую активность высвобождаемого из микрочастицы белка будет влиять не только физико-химические свойства ПОБ или его сополимера, но и морфология микрочастиц, технология их получения, дополнительные вещества, используемые для изготовления микрочастиц, которые обладают способностью высвобождать терапевтический белок с необходимой кинетикой без потери его функциональной активности. В нашем исследовании мы использовали лизоцим. Это катионный белок с небольшой ММ подобно целому ряду ростовых факторов и цитокинов, используемых в тканевой инженерии, обладающий ферментативной активностью. Он способен гидролизовать β-1,4-гликозидную связь пептидогликана муреина – главного компонента клеточной стенки бактерий (McKenzie and White, 1986).

7.1. Получение полимерных микрочастиц, содержащих лизоцим

На первом этапе был разработан метод загрузки лизоцима в микрочастицы на основе ПОБ. Разработанный нами метод основан на технологии двухэтапного эмульгирования В/М/В (W/O/W) «водная фаза/масляная фаза/водная фаза», модифицированной с целью снижения денатурации на границе раздела фаз, что приводит к потере активности фермента (van de Weert et al., 2000; Kwon et al., 2001). Для этого лизоцим вводили в рабочий раствор масляной фазы (хлороформ) не в виде раствора в воде, а в виде сухой смеси с нано-носителем гидроксиапатитом (нГА) (Зернов и др., 2017). Наночастицы гидроксиапатита были выбраны в качестве носителя лизоцима, т.к. это минеральное вещество является основным (наряду с коллагеном) компонентом костной ткани, что обуславливает его хорошую биосовместимость, способно довольно эффективно связывать белок, нерастворимо как в воде, так и в органических

растворителях, что необходимо для его применения в данной методике, и активно применяется в регенеративной медицине и тканевой инженерии (Zhang et al., 2015; Zhou and Lee, 2011).

Таким образом, сначала был изготовлен композитный материал, представляющий собой наночастицы (с диаметром примерно 3 мкм) носителя нГА с адсорбированным на них лизоцимом (Рисунок 140). На этом изображении СЭМ хорошо видно, насколько сильно изменяется морфология микрочастиц нГА после покрытия их белком.

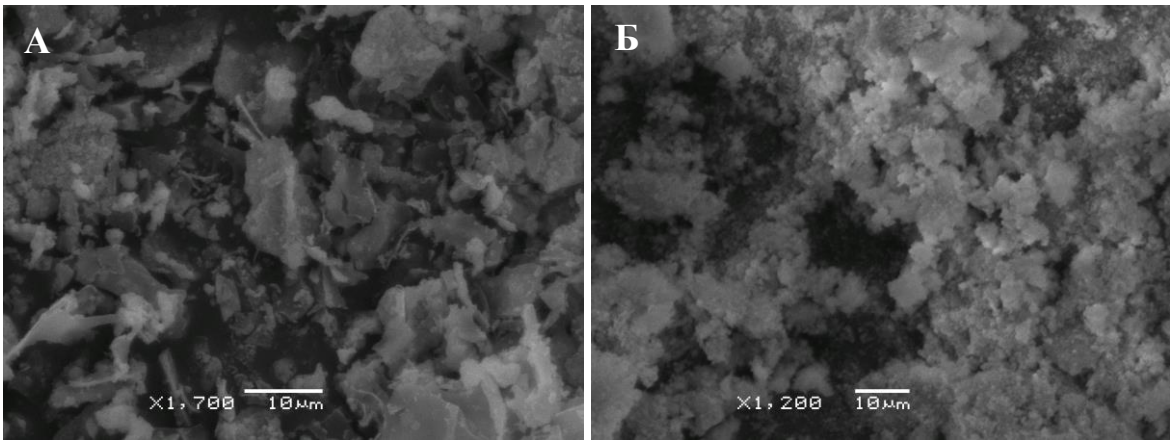


Рисунок 140. *Изображения СЭМ частиц наноГА (А) и частиц наноГА/лизоцим (Б) (×1200 – 1700). (Выполнено при содействии и на оборудовании Общефакультетской лаборатории электронной микроскопии (отв. проф. кафедры биоинженерии Соколова О.С.).*

Экспериментально было показано, что количество лизоцима, загруженного на нГА, ограничено емкостью данного носителя. При увеличении массовой доли используемого лизоцима более 10% по отношению к нГА, содержание белка, сорбируемого на него, возрастает незначительно, тогда как эффективность загрузки белка резко падает (Зернов и др., 2017б), что вероятно связано с превышением лимита сорбционной емкости нГА для лизоцима. Наиболее оптимальным соотношением лизоцима к нГА оказалось значение 10:90, которое обеспечивало максимальную сорбцию белка на носителе и при этом наибольшую эффективность загрузки лизоцима на нГА. Это массовое соотношение и было использовано далее для получения микрочастиц из ПОБ и его сополимера, загруженных композитом лизоцим/нГА.

Затем проводили загрузку белка в микросферы на основе ПОБ уже по методу T/M/B (S/O/W) «твердая фаза/масляная фаза/водная фаза», что позволяло сохранить конформацию лизоцима и как следствие его ферментативную активность благодаря тому, что в твердом состоянии белок гораздо меньше конформационно подвижен, и хлороформ в гораздо меньшей степени способен вызывать его денатурацию (Griebenow and Klibanov, 1997) (Рисунок 141).

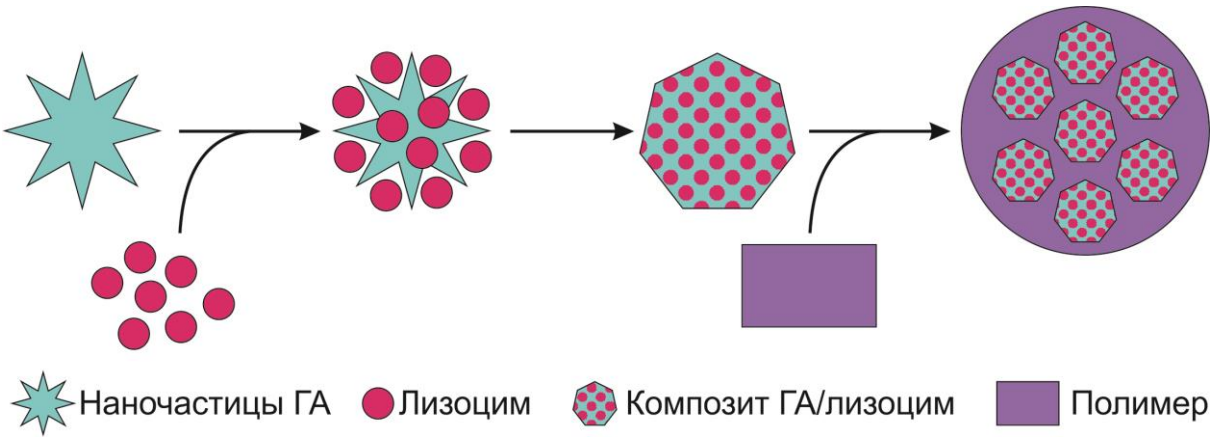


Рисунок 141. *Схема изготовление микрочастиц на основе ПОБ по методу* T/M/B *с использованием в качестве носителя для лизоцима нГА.*

Для получения микрочастиц и исследования высвобождения из них модельного белка, лизоцима, был использован ПОБ средней молекулярной массы (ПОБ-255, ММ = $2{,}55\times10^5$) и низкой молекулярной массы (ПОБ-25, ММ = $2{,}5\times10^4$), а также сополимер, полученный методом биоПЭГилирования (ПОБ-ПЭГ, ММ = $1{,}6\times10^5$). К сожалению, использовать композит ПОБ с ПЭГ для этих экспериментов не представилось возможным, т.к. при его использовании по данной методике микрочастицы не образовывались. Изображения СЭМ полученных микрочастиц представлены на Рисунке 142. Микрочастицы на основе различных полимеров обладали правильной сферической формой, имели диаметр от 22 до 25 мкм и статистически не отличались друг от друга.

На изображениях с СЭМ с большим увеличением видно, что поверхность микрочастиц шероховатая и микропористая, диаметр пор составляет около 1 мкм. Поверхность микрочастиц на основе различных полимеров также не различалась. Выраженная шероховатость поверхности микрочастиц может быть полезным свойством для их применения для инженерии костной ткани (Park et al., 2010), т.к. МСК и предшественники остеобластов предпочитают прикрепляться к шероховатой, а не гладкой поверхности, особенно, если топографические элементы такой поверхности имеют размер в микрометровом диапазоне (Deligianni et al., 2000).

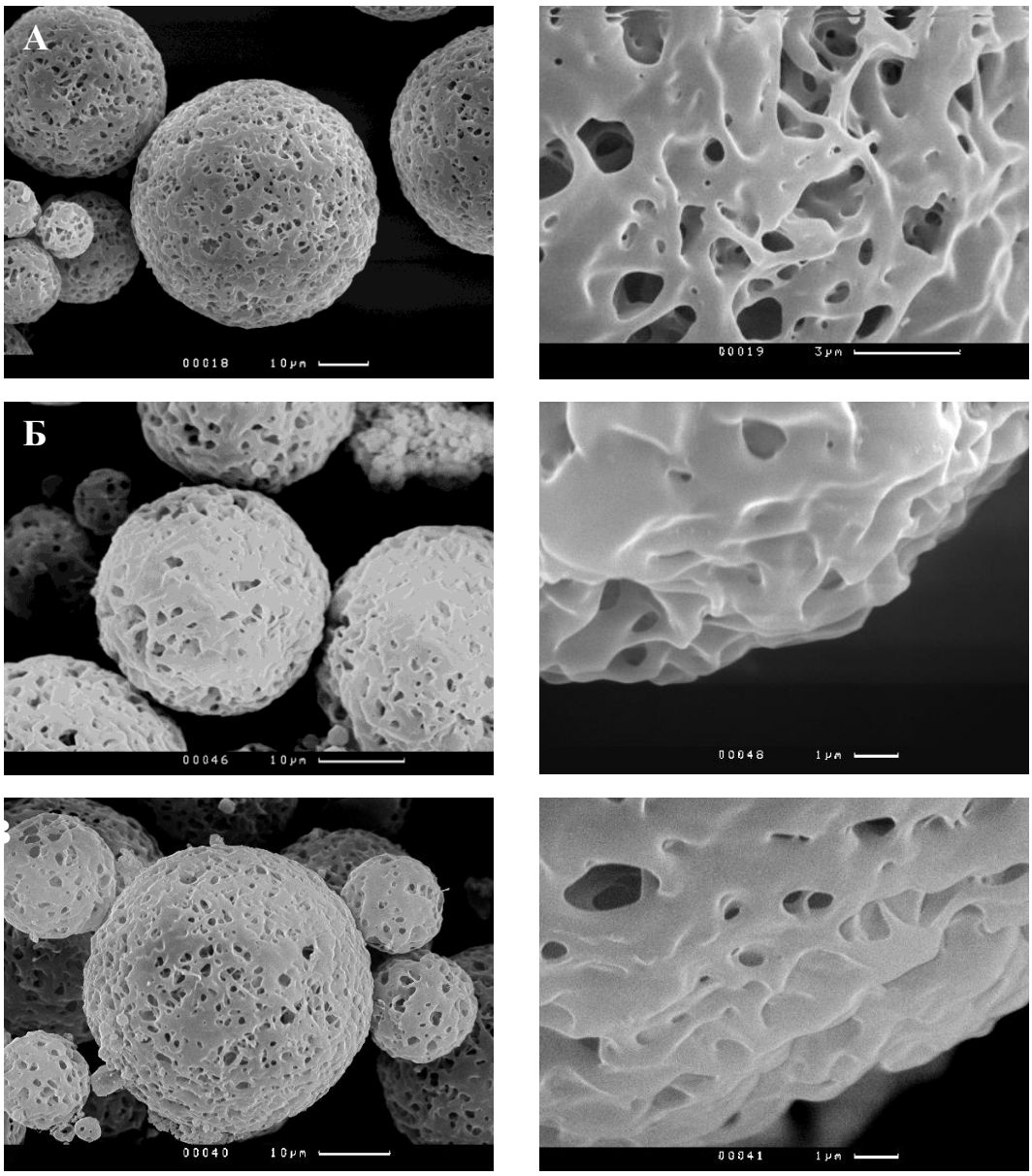


Рисунок 142. *Морфология микрочастиц на основе ПОБ (ПОБ-255 (А) и ПОБ-25 (Б)) и его сополимера ПОБ-ПЭГ (В), СЭМ (×1000 (слева) и ×5000 (справа)). (Выполнено при содействии и на оборудовании Общефакультетской лаборатории электронной микроскопии (отв. проф. кафедры биоинженерии Соколова О.С.).*

В Таблице 30 приведены основные параметры используемого метода Т/М/В для загрузки лизоцима в микрочастицы на основе ПОБ-25, ПОБ-255 и ПОБ-ПЭГ: величина «взрывного эффекта» (ВЭ), эффективность инкапсулирования (ЭИ) и степень загруженности (СЗ) (см. определения терминов в разделе «Материалы и методы»). Из данных, представленных в Таблице 30, следует, что снижение ММ ПОБ приводит в значительному (в 2 раза) снижению параметров СЗ и ЭИ, тогда как биоПЭГилирование ПОБ эти параметры не ухудшает. Это вероятно связано с повышением степени кристалличности у ПОБ с низкой ММ (Perego et al.,

1996; Barham et al., 1984), что может снижать эффективность инкапсулирования белков (Schugens et al., 1994).

Таблица 30. *Размер и параметры загрузки лизоцима в микрочастицах на основе ПОБ и ПОБ-ПЭГ.*

Полимер	Диаметр микрочастиц, мкм	Диаметр пор микрочастиц, мкм	ЭИ %	СЗ %	ВЭ %
ПОБ-255	24,3 ±8,4	0,9 ±0,3	39,10	0,39	64,65
ПОБ-25	22,4 ±6.4	1,1 ±0,4	20,53	0,21	43,55
ПОБ-ПЭГ	25,1 ±7.2	1,0 ±0,3	38,13	0,38	21,82

Загрузка лизоцима в полимерные микрочастицы была подтверждена методом конфокальной микроскопии (Рисунок 143). Следует отметить, что включение белка в полимерную матрицу микрочастиц происходит в виде конгломератов, что может повышать стабильность загружаемого белка, благодаря уменьшению площади контакта нативного белка с окружающей полимерной матрицей, которая может необратимо сорбировать белок (Van Tassel et al., 1998).

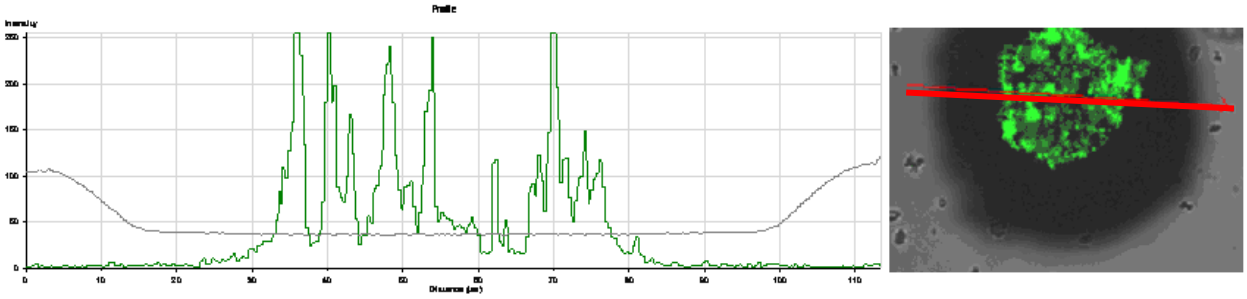


Рисунок 143. *Распределение флуоресценции вдоль линии сечения микрочастицы на основе ПОБ-255, загруженной лизоцимом на носителе нГА (серая кривая – канал проходящего света, зеленая кривая – флуоресценция, прямая линия на изображении КМ – сечение образца микрочастицы; в координатах x: координата сечения микрочастицы (мкм), y: – интенсивность флуоресценции (усл. ед.). (Выполнено совместно с сотрудниками научной группы профессора кафедры биоинженерии Феофанова А.В. и на оборудовании ЦКП МГУ).*

7.2. Исследование высвобождения лизоцима из полученных полимерных микрочастиц

Кинетика высвобождения лизоцима из полученных композитных микрочастиц в течение 25 суток показана на Рисунке 144.

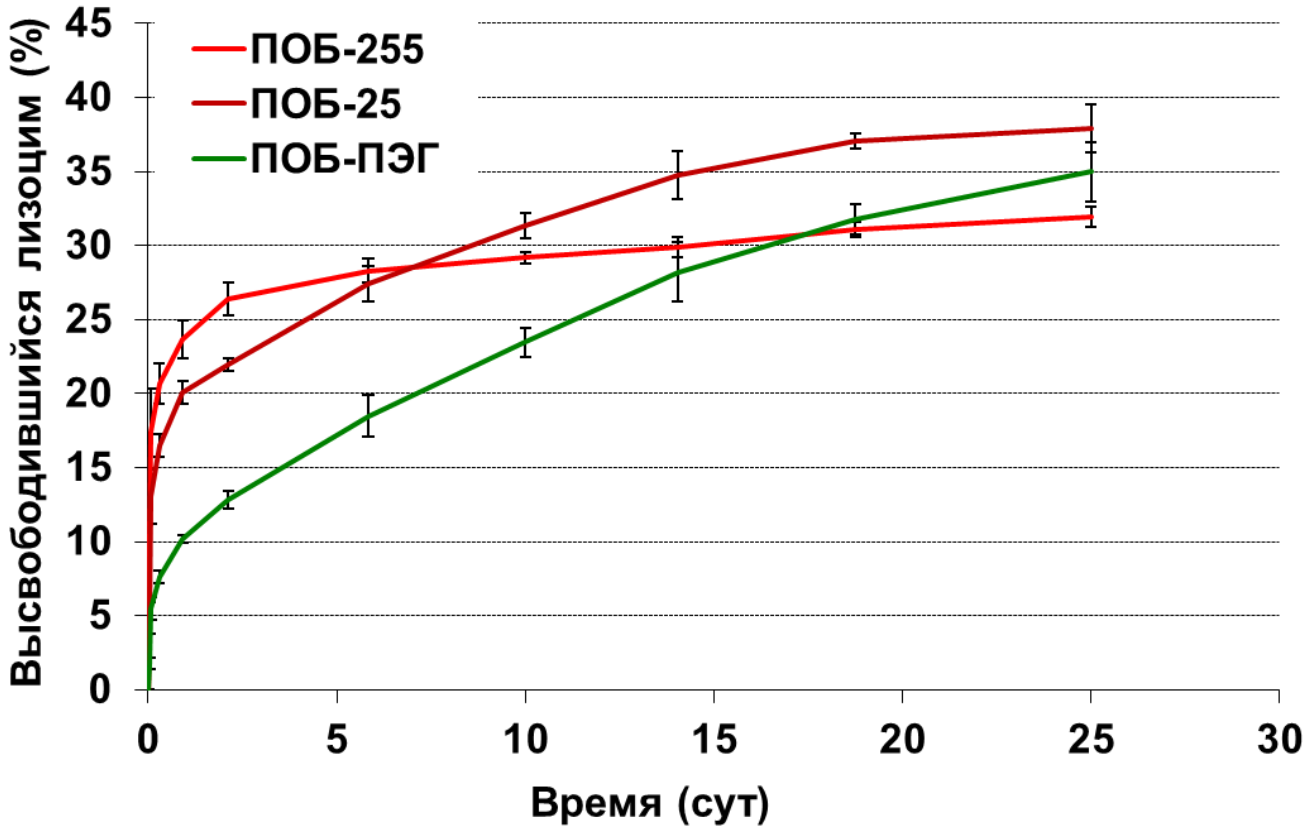


Рисунок 144. *Кинетика высвобождения лизоцима из микрочастиц на основе ПОБ-250, ПОБ-25 и ПОБ-ПЭГ.*

Видно, что кривые высвобождения белка из микрочастиц различного полимерного состава значительно различаются: профиль высвобождения лизоцима из микрочастиц на основе ПОБ-255 характеризуется ранней фазой «взрывного эффекта» высвобождения (более 50% в 1-ые сутки от всего вышедшего за 25 суток белка), тогда как профили высвобождения белка из микрочастиц на основе низкомолекулярного ПОБ-25 и сополимера ПОБ-ПЭГ гораздо более пологие.

Чтобы лучше проанализировать кинетические характеристики высвобождения лизоцима из микросфер, была построена гистограмма по распределению количества белка, вышедшего в ходе раннего этапа «взрывного эффекта» и в ходе более позднего этапа пролонгированного высвобождения. Эта диаграмма также показывает гораздо большую долю белка, высвобождающегося в ходе этапа «взрывного эффекта» из микрочастиц на основе ПОБ-255, тогда как доля высвободившегося лизоцима из микрочастиц на основе биоПЭГилированного ПОБ в ходе пролонгированного этапа составляла более 80% (Рисунок 145).



Рисунок 145. *Доля количества белка (от вышедшего за все время – 25 суток), высвободившегося на раннем этапе «взрывного эффекта» высвобождения и позднего этапа пролонгированного высвобождения из микрочастиц на основе ПОБ-255, ПОБ-25 и ПОБ-ПЭГ.*

Предположительно, высвобождение лизоцима из полимерных микрочастиц осуществляется преимущественно по механизму «фиковской» диффузии и, соответственно, мы можем использовать математические модели, которые мы использовали для описания высвобождения низкомолекулярных ЛВ из микрочастиц на основе ПОБ (разделы 3.6.1 и 3.6.5).

Для дополнительной проверки этого предположения нами был проведен эксперимент с использованием флуоресцентно-меченого белка лизоцим-ФИТЦ, в растворе которого в фосфатно-солевом буфере инкубировали в течение нескольких часов композитные микрочастицы на основе ПОБ-255, не загруженные лизоцимом, после чего исследовали микрочастицы на конфокальном микроскопе (Рисунок 146).

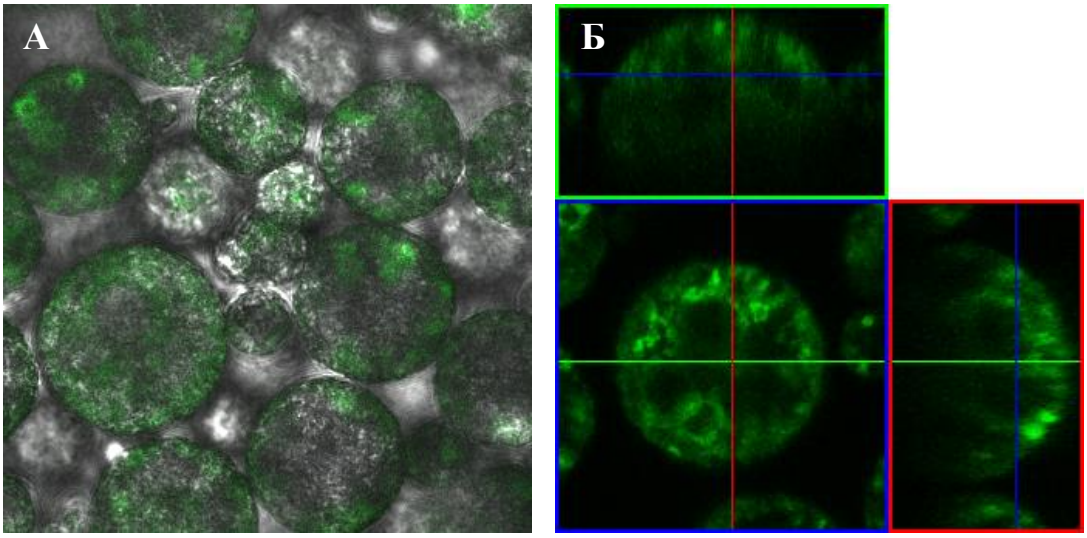


Рисунок 146. *Изображения конфокальной микроскопии (фильтр 505 нм) микрочастиц на основе ПОБ-255, не загруженных лизоцимом и инкубированных в растворе лизоцима-ФИТЦ: общий вид (А), ортогональные проекции (Б) отдельной микрочастицы. (Выполнено совместно с сотрудниками научной группы профессора кафедры биоинженерии Феофанова А.В. и на оборудовании ЦКП МГУ).*

Было показано, что после инкубации в растворе лизоцим-ФИТЦ микрочастицы демонстрировали выраженный сигнал флуоресценции на поверхности и во всем объеме частиц, что свидетельствует о том, что белок диффундирует в полимерную матрицу микрочастиц, вероятно, благодаря ее нано- и микропористости. А это означает, что имеет место и обратный процесс диффузии белка из микрочастиц, загруженных лизоцимом, в водную среду инкубации.

Нами был поставлен также другой эксперимент, который демонстрировал деградацию композитных микрочастиц, загруженных лизоцимом, при их инкубации в фосфатно-солевом буфере в течение 40 суток (Рисунок 147). Было показано, что уже через 20 суток наблюдается частичная деградация микрочастиц, а через 40 суток они уже практически полностью теряют целостность.

Для анализа высвобождения лизоцима из композитных микрочастиц мы использовали стандартные математические модели диффузии по закону Фика на раннем (Формула 12) и позднем (Формула 13) этапах высвобождения ЛВ из микросфер, модели кинетики первого порядка, модели Хигучи (Формула 22) и модели Пеппаса-Корсмейера (Формула 23) (Siepmann et al., 2002; Baker, 1987; Arifin et al., 2006). При этом помимо всех прочих допущений для использования этих моделей мы проводили расчеты, исходя не из того количества белка, которое было загружено в микрочастицы (M_0), а из того который высвобождался за все время проведения эксперимента (M_∞).

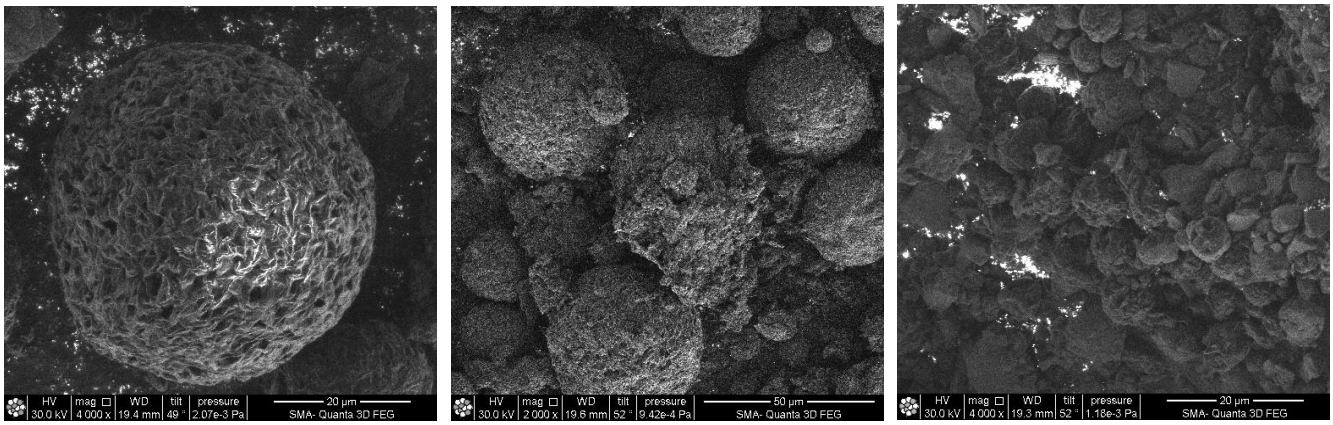


Рисунок 147. *Изображения СЭМ микрочастиц на основе ПОБ-255, загруженных лизоцимом, в течение 1 сут. (А), 20-ти сут. (Б) и 40-ка сут. (В). (Выполнено при содействии и на оборудовании Общефакультетской лаборатории электронной микроскопии (отв. проф. кафедры биоинженерии Соколова О.С.).*

Описание высвобождения на поздней стадии (M_t <60%) с применением модели диффузии по закону Фика (модели кинетики первого порядка) приведена на Рисунке 148. По коэффициентам детерминации видно, что наилучшим образом кинетике высвобождения по закону диффузии Фика соответствует высвобождение лизоцима из микрочастиц на основе биоПЭГилированного ПОБ, однако и высвобождение белка из микрочастиц на основе ПОБ-25 и ПОБ-255 довольно хорошо соответствовало «фиковской» кинетике (R^2 >0,99).

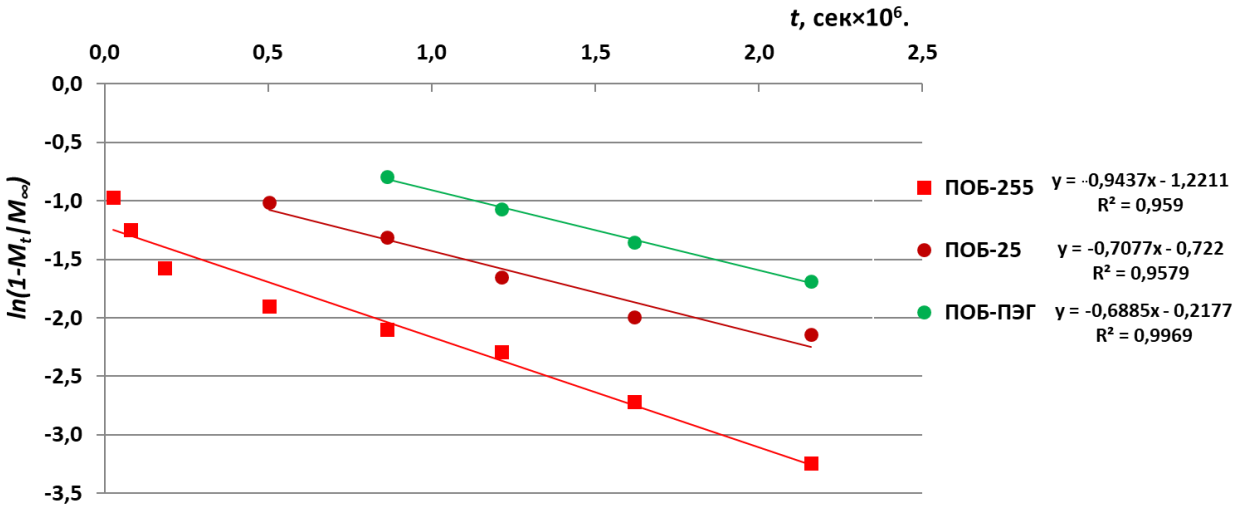


Рисунок 148*. Применение модели кинетики первого порядка для описания экспериментальных данных по высвобождению лизоцима из композитных микрочастиц на основе ПОБ-255, ПОБ-25 и ПОБ-ПЭГ (их названия даны справа с соотнесением с соответствующими маркерами кривых).*

Применение модели полуэмпирической модели Хигучи для ранней фазы высвобождения лизоцима из микрочастиц приведена на Рисунке 149.

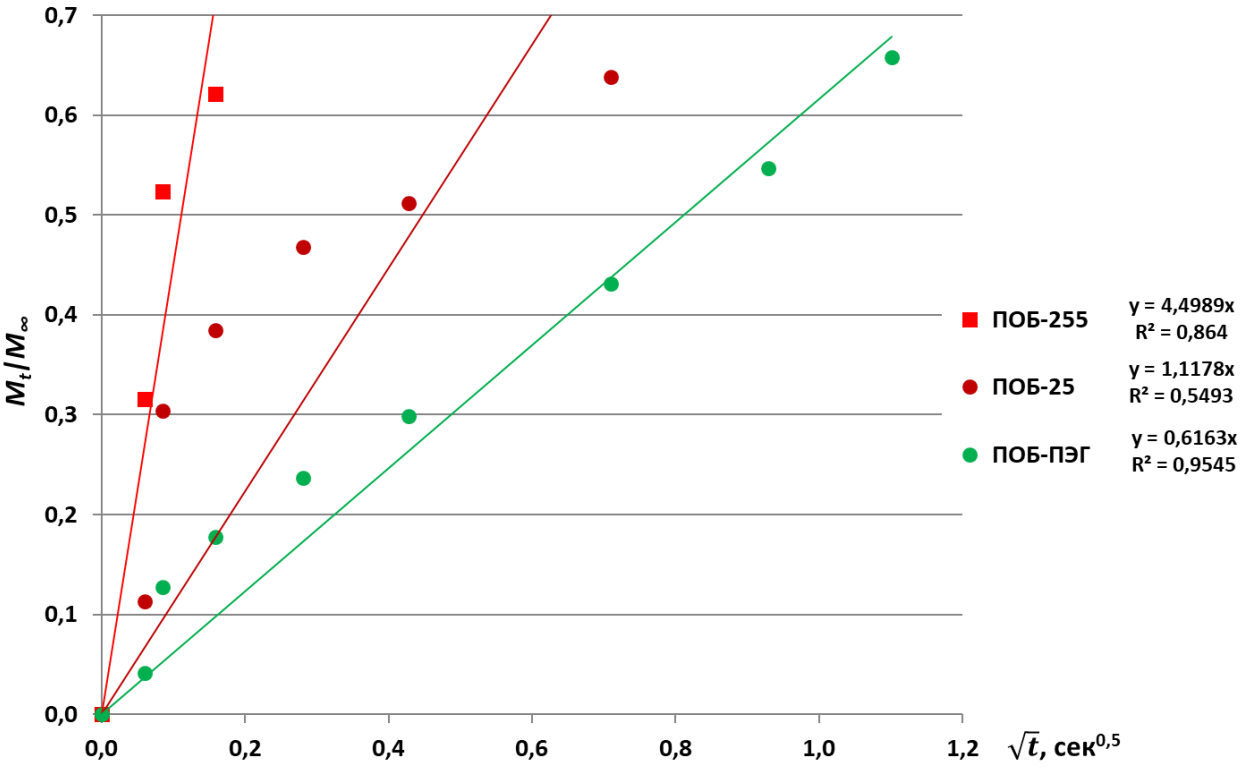


***Рисунок 149**. Применение модели Хигучи для описания экспериментальных данных по высвобождению лизоцима из композитных микрочастиц на основе ПОБ-255, ПОБ-25 и ПОБ-ПЭГ (формулы полученных линейных функций и названия высвобождающихся ЛВ приведены на легенде кривых справа).*

Высокие значения коэффициента детерминации (R^2 ≥0,95) наблюдаются только для профиля высвобождения лизоцима из микросфер на основе ПОБ-ПЭГ, что свидетельствует о том, что высвобождение белка из этих микрочастиц подчиняется закону диффузии Фика. Однако, кинетика высвобождения лизоцима из микросфер на основе гомополимеров ПОБ-255 и ПОБ-25 слабо соответствуют «фиковскому» диффузионному механизму высвобождения веществ из микросфер, что можно объяснить большим вкладом процессов релаксации полимера, сорбции белка в полимерной матрице (Lu and Park, 1995) или гидролитической деградации микрочастиц (Рисунок 147). Следует также отметить, что k_H, пропорциональный коэффициенту диффузии D (Формула 16), для высвобождения белка из микрочастиц на основе ПОБ-255 наиболее высокий.

Применение модели Пеппаса-Корсмейера для аппроксимации высвобождения лизоцима из микросфер показано на Рисунке 150, а рассчитанные с помощью этого графика коэффициенты, как и коэффициенты для модели Хигучи приведены в Таблице 31.

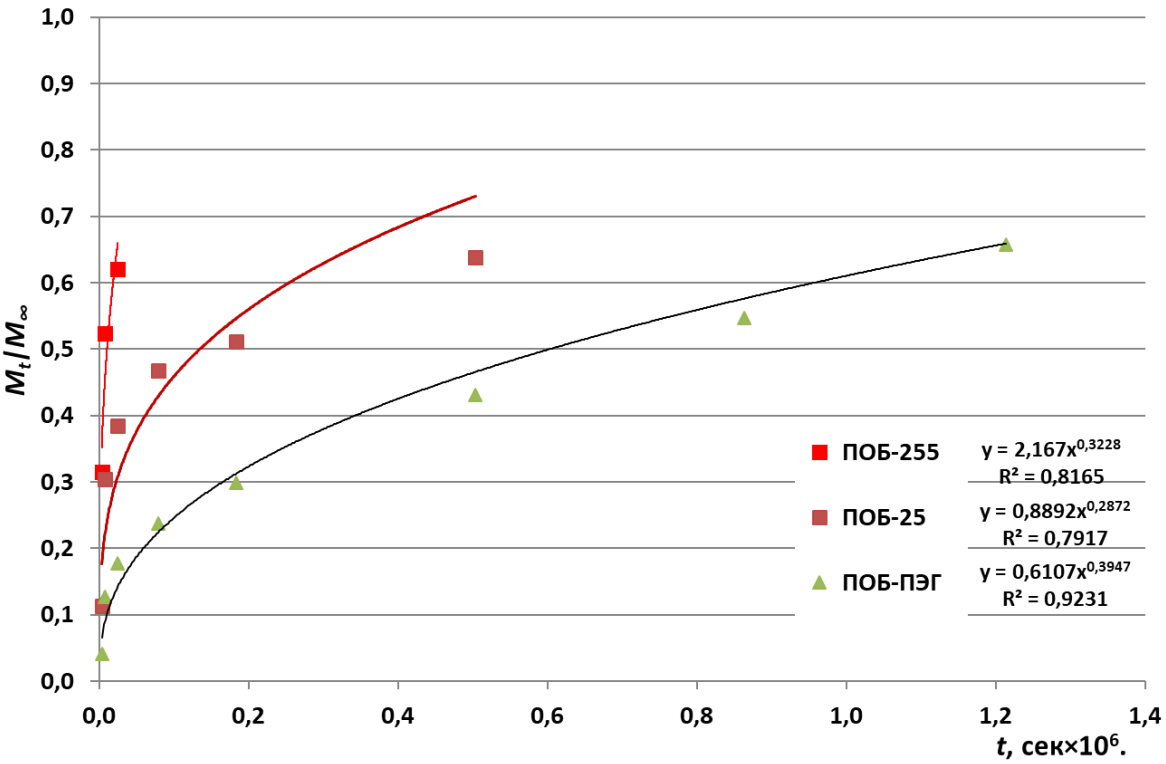


Рисунок 150. *Применение модели Пеппаса-Корсмейера для описания экспериментальных данных по высвобождению лизоцима из композитных микрочастиц на основе ПОБ-255, ПОБ-25 и ПОБ-ПЭГ (формулы полученных степенных функций и названия высвобождающихся ЛВ приведены на легенде кривых справа).*

Таблица 31. *Параметры используемых математических моделей (модели кинетики первого порядка, модели Хигучи, модели Пеппаса-Корсмейера) для анализа кинетики высвобождения лизоцима из композитных микрочастиц на основе ПОБ-255, ПОБ-25 и ПОБ-ПЭГ.*

Полимерный состав микрочастицы	Модель Хигучи		Модель Пеппаса-Корсмейера	
	k_H	R^2	n_{PK}	R^2
ПОБ-255	4,50	0,864	0,32	0,817
ПОБ-25	1,12	0,549	0,28	0,792
ПОБ-ПЭГ	0,62	0,955	0,39	0,923

Наиболее близкими значениями к n = 0,43 (для сферических объектов) обладают коэффициенты для кинетики высвобождения белка из микросфер на основе биоПЭГилированного ПОБ, что свидетельствует о том, что высвобождение этих ЛВ

происходит по механизму «фиковской» диффузии. Высвобождение лизоцима из микросфер на основе гомополимеров ПОБ-255 и ПОБ-25 происходит по какому-то иному механизму, что следует как из аномально низких коэффициентов n_{PK} (<0,43), так и низких коэффициентов детерминации ($R^2 \leq 0,95$). Однако высокие коэффициенты аппроксимации данных по модели Хигучи для высвобождения из микросфер на основе ПОБ-255 и ПОБ-25 говорит о том, что этот неизвестный механизм, по-видимому, способствует ускорению высвобождение белка из микрочастиц. Можно предположить, что это деградация микрочастиц.

К сожалению, в связи с тем, что кинетика высвобождения лизоцима из микрочастиц на основе ПОБ-25 и ПОБ-255 не соответствует в достаточной степени (($R^2 \leq 0,95$) диффузии по закону Фика, рассчитать коэффициенты диффузии нам не удалось.

Для проверки сохранения конформационной стабильности высвобождающегося из полимерных микрочастиц лизоцима, который при диффузии через полимерную матрицу из-за взаимодействия с полимерными молекулами может терять как целостность, так и вторичную и третичную структуру (van de Weert et al., 2000), были проведены исследования с использованием методов электрофореза белков по Лэммли и метода кругового дихроизма. На Рисунке 151 представлены электрофореграммы лизоцима, который высвободился в буферный раствор из полимерных микрочастиц через 3 часа, 7 суток и 14 суток в стандартных условиях эксперимента. Видно, что полосы, соответствующие белку с меньшей ММ, отсутствуют, тогда как полосы, соответствующие по ММ лизоциму, хорошо видны, что говорит о том, что разрушения белковой молекулы не происходило.

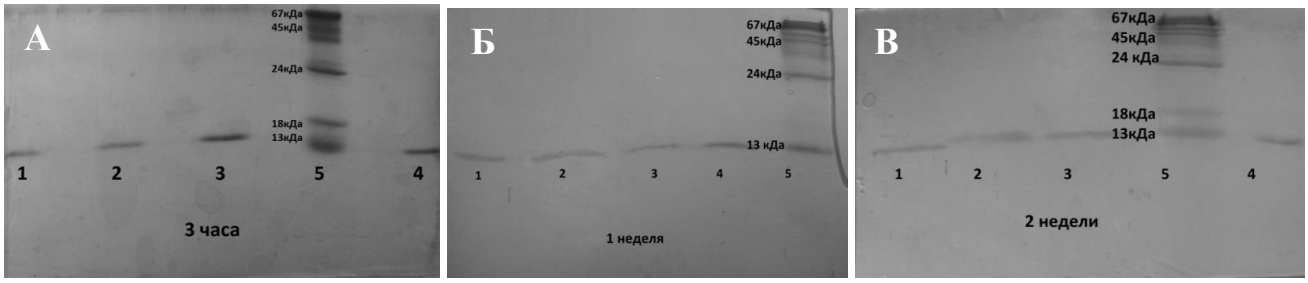
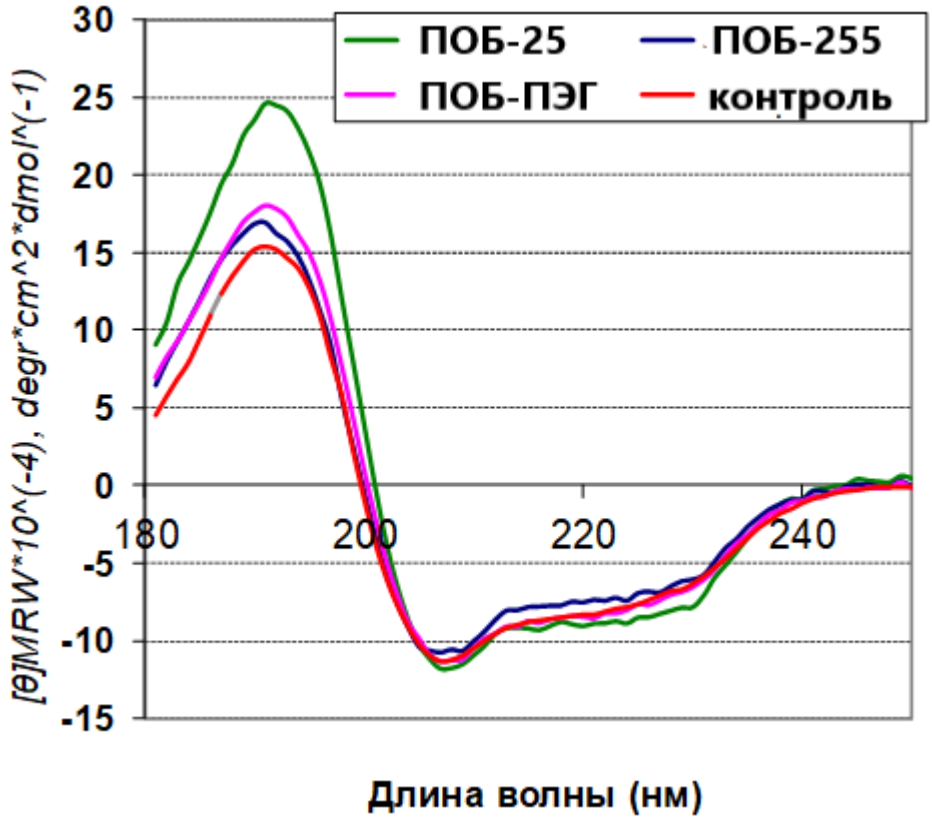


Рисунок 151. *Электрофореграммы лизоцима, высвободившегося через 3 часа (А), 7 суток (Б) и 14 суток (В) инкубации в БФС при 37°С (1 – ПОБ-25, 2 – ПОБ-255, 3 – ПОБ-ПЭГ, 4 – лизоцим, 5 – белки-маркеры).*

Изменение вторичной структуры высвобождающегося из микрочастиц лизоцима было исследовано с помощью метода кругового дихроизма, спектры которого представлены на Рисунке 152 для белка, вышедшего через 14 суток из микрочастиц на основе ПОБ-255, ПОБ-25 и ПОБ-ПЭГ. Для сравнения на Рисунке 152Б даны характерные спектры для α-спирали, β-

складки и аморфной фазы, имеющих отношение к вторичной структуре белка (Финкельштейн и Птицын, 2005, стр. 94).

А



Б

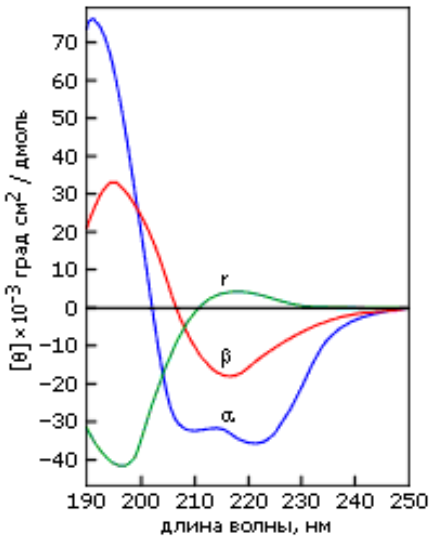


Рисунок 152. *Спектры кругового дихроизма лизоцима, высвободившегося после 14 суток инкубации микрочастиц на основе ПОБ-255, ПОБ-25 и ПОБ-ПЭГ (А). (Выполнено на оборудовании центра общего пользования ФИЦ «Биотехнологии» РАН и при содействии ст.науч.сотр. Шубина В.В.) (А). Стандартные спектры кругового дихроизма для альфа-спирали (α), бета-складки (β), и аморфной фазы (r) (Б).*

Видно, что спектр лизоцима, высвободившегося из микрочастиц на основе ПОБ-255 и ПОБ-ПЭГ почти совпадает со стандартным спектром белка (Matsuo et al., 2004), тогда как спектр лизоцима, вышедшего из микрочастиц на основе ПОБ-25 довольно существенно отличается, что может свидетельствовать о его денатурации. Денатурация белка может происходить в результате взаимодействия с концевыми карбоксильными группами низкомолекулярного ПОБ, у которого их количество значительно выше (Domb, 1994), чем у ПОБ-255 и ПОБ-ПЭГ, тогда как все карбоксильные группы биоПЭГилированного ПОБ экранированы молекулами ПЭГ (Раздел 3.3, Рисунок 88).

Активность фермента также является хорошим показателем сохранения его стабильности, в т.ч. третичной структуры, лизоцим же является ферментом – мурамидазой. Анализ активности лизоцима, высвободившегося из композитных микрочастиц, по его способности гидролизовать пептидогликаны клеточных стенок бактерий *Micrococcus luteus* (Рисунок 153), продемонстрировал, что активность лизоцима, высвобождающегося из микрочастиц на основе ПОБ-255 и ПОБ-ПЭГ в течение 14 суток, снижается примерно на 22% от исходного, тогда как снижение активности фермента, высвободившегося к этому сроку из микрочастиц на основе низкомолекулярного ПОБ, гораздо более сильное – на 58%, что согласуется достаточно хорошо с данными спектров кругового дихроизма (Рисунок 151).

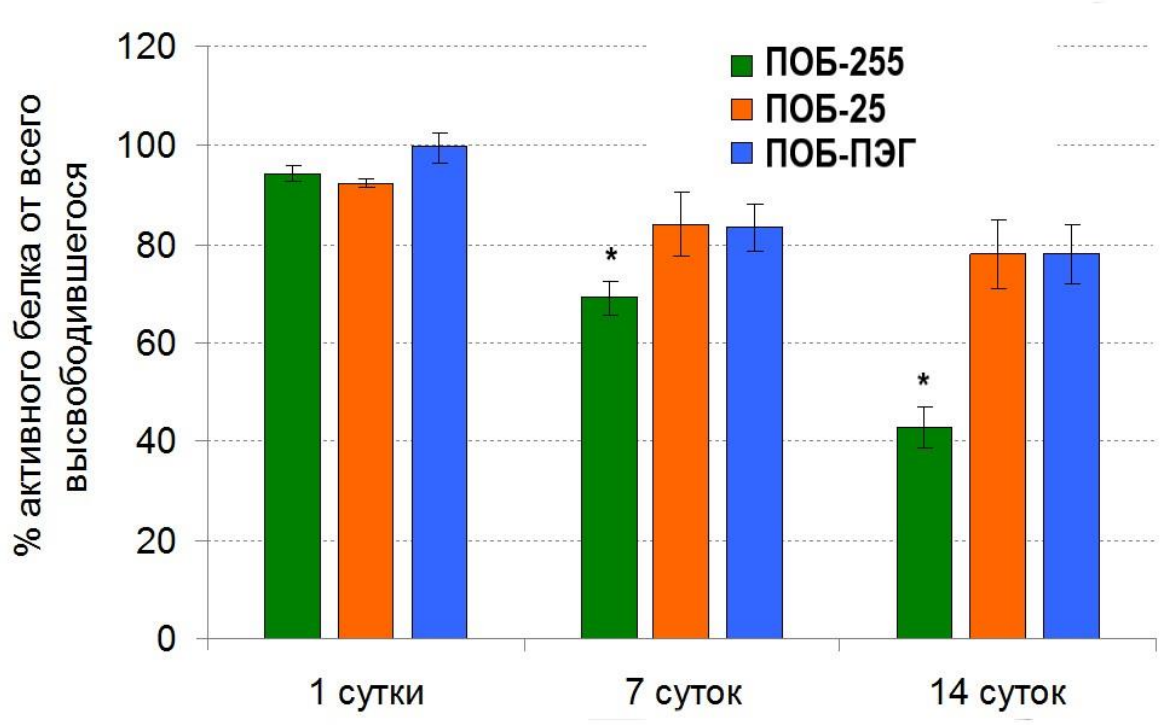


Рисунок 153. *Доля (от всего высвободившегося белка) ферментативно-активного лизоцима, высвободившегося через 1, 7 и 14 суток из микрочастиц на основе ПОБ-255, ПОБ-25 и ПОБ-ПЭГ. * p <0,05 в сравнении с 1-ыми сут.*

Вероятно, полученные результаты тоже можно объяснить негативным влиянием концевых карбоксильных групп низкомолекулярного ПОБ на стабильность третичной структуры загруженного в полимерные микрочастицы лизоцима.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что микрочастицы на основе биоПЭГилированного ПОБ обеспечивают наилучшие характеристики высвобождения белка с сохранением его биоактивности. На схеме Рисунка 154 предложен механизм сохранения исходной конформации (его вторичной и третичной структуры) и, как следствие, ферментативной активности при загрузке в микрочастицы на основе ПОБ-ПЭГ.

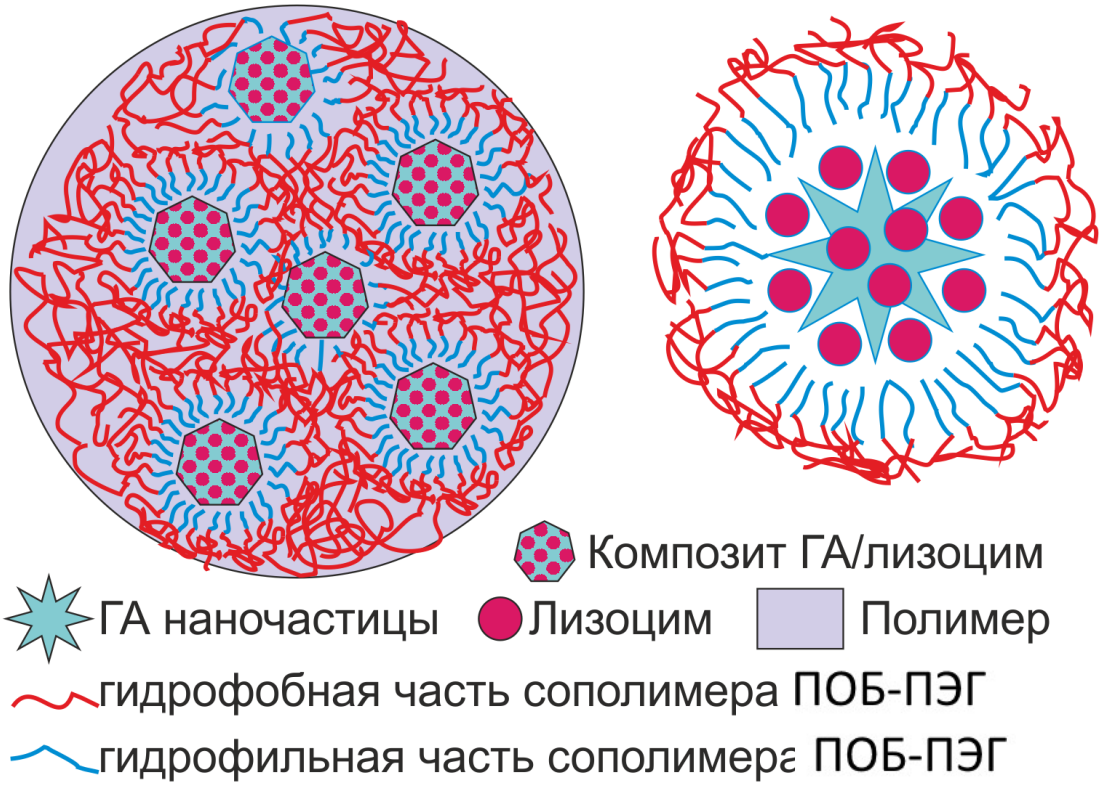


Рисунок 154. *Предположительная схема взаимного расположения полимерных цепей ПОБ-ПЭГ и лизоцима в микрочастицах на основе ПОБ-ПЭГ, полученных по методике эмульгирования T/M/B.*

Мы предполагаем, что к амфифильным молекулам белка обращены короткие концевые молекулы гидрофильного ПЭГ, которые экранируют химически «агрессивные» концевые карбоксильные группы ПОБ.

Следует отметить, что в естественных условиях ПОБ практически всегда взаимодействует с белками. Бактерии запасают его в цитоплазме в виде дискретных включений (гранул) обычно от 100 до 800 нм в диаметре. ПОА-гранулы представляют собой сложные органоидоподобные структуры с ферментативными системами для синтеза и использования ПОА - карбоносомы (Jendrossek and Pfeiffer, 2014). Причем, оболочка гранул содержит только

функциональные белки: ферменты биосинтеза и биодеградации ПОБ, а также белки-регуляторы этих процессов, такие как фасины (Jendrossek and Pfeiffer, 2014).

Согласно так называемой «мицеллярной модели» образования карбоносомы (Рисунок 53) растворенные в цитоплазме неактивные мономерные субъединицы ПОБ-полимеразы при связывании субстрата – остатков 3-ГБ, активируются и начинают димеризоваться, т.е. синтез ПОБ происходит в составе комплекса гидрофобного ПОБ и амфифильного белка, который самопроизвольно организуется в мицеллы (Gerngross and Martin, 1995; Tian et al., 2005). ПОБ-полимераза, как и другие белки, находящихся в оболочке карбоносом, обладают большим сродством к ПОБ благодаря специальным доменам - сайтам связывания (Pötter and Steinbüchel, 2005). Более того, связывание ПОБ с белками в грануле как раз и обеспечивает его аморфное состояние, которое сразу же нарушается при выделении полимера и его очистки от белков (Barnard and Sanders, 1989; Jendrossek and Pfeiffer, 2014). Так, было показано, что фасин *PhaF* бактериального штамма *Pseudomonas putida GPo1* имеет на N-концевой части гидрофобный регион *BioF* из 7-ми остатков аминокислот (WLAGLGI, позиции 26-32), обладающий высоким сродством к ПОА (Moldes et al., 2004).

Не исключено, что какие-то аминокислотные последовательности, состоящие преимущественно из гидрофобных аминокислот и сходные с *BioF*, случайно могут иметься и у других белков, в т.ч. у лизоцима. Это может приводить к прочной неспецифической сорбции лизоцима на ПОБ. Для того, чтобы проверить это, мы загрузили микрочастицы на основе ПОБ флуоресцентно-меченым белком – лизоцим-ФИТЦ. Было показано, что некоторое количество лизоцима остается в полимерной матрице микрочастицы после 90 суток инкубации в буферном растворе, когда высвобождение белка уже полностью завершилось (Рисунок 155). По-видимому, белок, денатурируя, прочно адсорбируется на полимере.

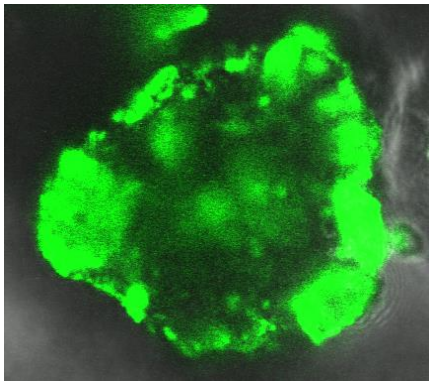


Рисунок 155. *Микрочастицы на основе ПОБ-255, загруженные лизоцимом, через 90 суток инкубации in vitro (конфокальная микроскопия, ×100). (Выполнено совместно с сотрудниками научной группы профессора кафедры биоинженерии Феофанова А.В. и на оборудовании ЦКП МГУ).*

Возможно, что такая естественно присущая «дружба» ПОБ с белками и позволяет получать системы доставки белков на основе этого полимера. А так как ПОБ является природным предшественником синтетических ПОА, то и системы доставки белков на основе ПМК, ПГК, ПМГК, ПКЛ, ПД также обязаны своим существованием природным свойствам ПОБ.

А как же может повлиять биоПЭГилирование на адсорбцию белка на полимере? По-видимому, ПЭГ каким-то образом экранирует гидрофобные аминокислотные последовательности, что приводит как раз к ослаблению прочного неспецифического связывания полимера с белком. Возможно этот эффект и обеспечивает пролонгированное высвобождение белка из микрочастицы за счет «размывания» участков прочного связывания ПОБ и белка. ПЭГилирование микро- и наночастиц из синтетических ПОА (ПМК, ПГК, ПМГК, ПКЛ, ПД) также значительно улучшает функциональные свойства систем контролируемой доставки белков на их основе (Xiao et al., 2010).

7.3. Исследование цитотоксичности полимерных микрочастиц, загруженных лизоцимом in vitro

С целью возможного применения разработанных нами микрочастиц, содержащих лизоцим, в тканевой инженерии, нами была проведена оценка их цитотоксичности на МСК, выделенных из костного мозга крыс, с использованием следующих контрольных образцов: микрочастиц соответствующего полимерного состава, не содержащих лизоцим, раствор лизоцима, и ГА в виде суспензии (в тех подобранных концентрациях, которые соответствуют содержанию белка и ГА в микрочастицах).

Было показано, что полученные на основе ПОБ-25, ПОБ-255 и ПОБ-ПЭГ композитные микрочастицы, как содержащие, так и не содержащие лизоцим, не обладают цитотоксичностью по отношению к МСК, тогда как ГА обладает концентрационно-зависимой цитотоксичностью (Рисунок 156), что может объясняться способностью ГА тормозить пролиферацию МСК за счет индукции их остеогенной дифференцировки (Mygind et al., 2007; Shishatskaya et al., 2006). Проведенное нами исследование на цитотоксичность полученных микрочастиц указывает на их высокую биосовместимость, что позволяет их использовать для инженерии костной ткани.

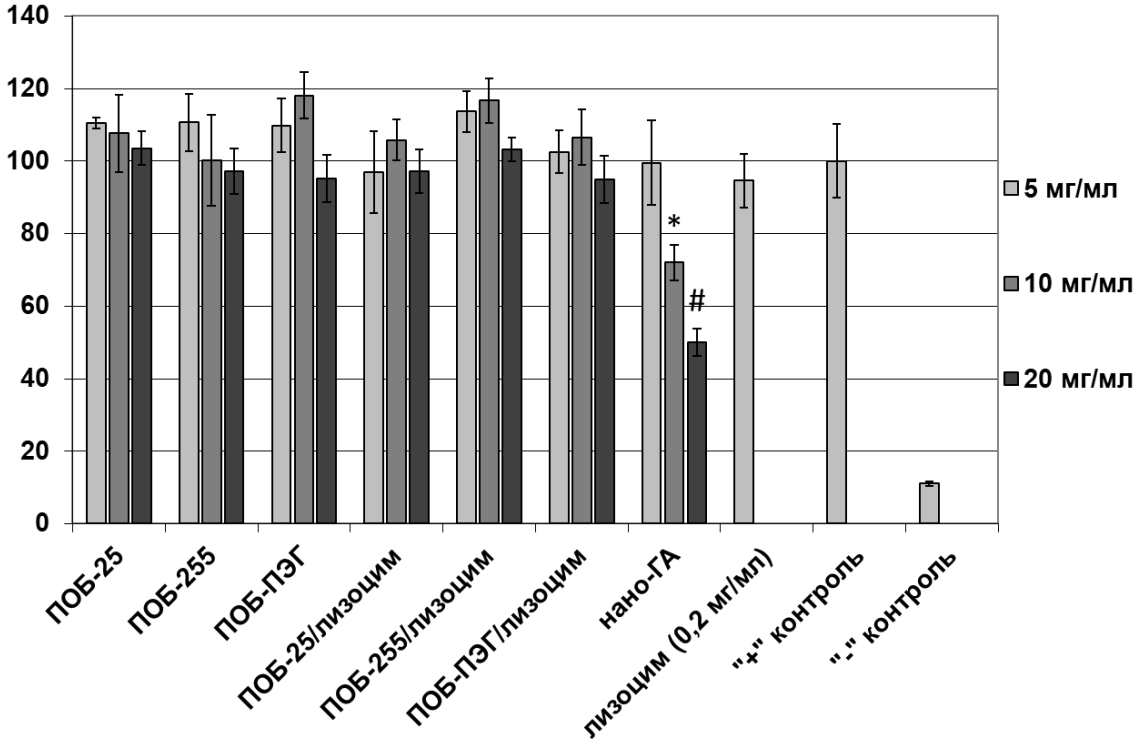


***Рисунок 156**. Цитотоксичность микрочастиц на основе ПОБ-25, ПОБ-255 и ПОБ-ПЭГ, загруженных и незагруженных лизоцимом, гидроксиапатита и раствора лизоцима на МСК крыс с помощью метода ХТТ. * $p < 0,05$ в сравнении с ПОБ-255 (10 мг/мг), # $p < 0,05$ в сравнении с ПОБ-255 (10 мг/мг).*

Таким образом, результаты, описанные в Разделах 3.6 и 3.7 позволили разработать экспериментальную модель исследования кинетики высвобождения низкомолекулярных лекарственных веществ и белков из полимерных пленок и микрочастиц (Рисунок 157).

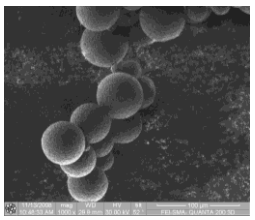
Основным объектом изучения модели являются сплошные нано- и микрочастицы, пористые микросферы большого диаметра (более 100 мкм) на основе ПОБ, его сополимера и композитов с ПЭГ и ГА. Основными входными параметрами модели являются параметры метода получения микрочастиц: состав и концентрации ПОБ и его сополимеров, а также дополнительных веществ в рабочих растворах, скорость перемешивания. Основными выходными параметрами модели является кинетика высвобождения ЛВ и кинетика изменения термофизических свойств (степень кристалличности, температура плавления) микрочастиц. Для обеспечения функционирования экспериментальной модели используются следующие методики: методы одно- и многоэтапного эмульгирования, мембранной фильтрации, распылительного высушивания, АСМ, СЭМ, метод исследования высвобождения ЛВ и белков из микрочастиц и полимерных изделий, УФ-спектроскопия, конфокальная микроскопия, ДСК,

Данные экспериментальной модели биотехнологического получения ПОБ и его сополимеров

Полимер	Содержание ПТД, %	Содержание ПЭГ, %	Скорость перемешивания, об/мин	Диаметр частиц, мкм	Эффективность инкапсулирования, %
ПОБвм	10 ± 1	–	1000	21 ± 5	79,2 ± 2,3
ПОБвм/ПЭГ	10 ± 1	20 ± 1	950	22 ± 5	66,1 ± 2,5
ПОБ	10 ± 1	–	1300	19 ± 5	64,5 ± 2,4
ПОБ/ПЭГ	10 ± 1	20 ± 1	1200	21 ± 5	53,0 ± 2,1
ПОБ-ПЭГ	10 ± 1	–	1050	20 ± 5	64,8 ± 2,3

Состав и концентрации ПОА и дополнительных веществ в рабочих растворах, скорость перемешивания.

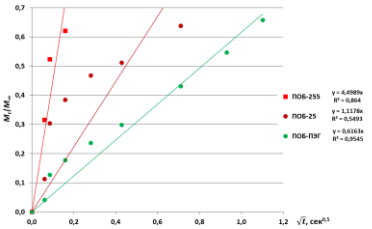
Методы одно- и многоэтапного эмульгирования, мембранной фильтрации, распылительного высушивания



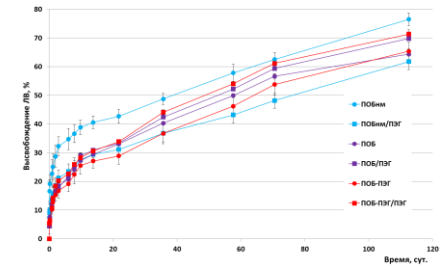
Микрочастицы и пленки на основе ПОБ, его сополимеров и композитов

Метод исследования высвобождения ЛВ и белков из микрочастиц и полимерных изделий

до 110 сут.



Механизм высвобождения ЛВ из полимерных микрочастиц



База данных по кинетики высвобождения ЛВ и белков из микрочастиц и изделий на основе ПОБ и его сополимеров и композитов

Математические модели анализа кинетики высвобождения ЛВ из полимерных изделий

АСМ, СЭМ, ДСК, ИК-спектроскопия и др.

Образец	ММ, ·10³	T_c, °C	T_m, °C	Е, ГПа	X_c, %	Контактный угол, °
Группа I. ПОБ с различной ММ						
ПОБ-25*	25	–	142/159	–	66	50
ПОБ-105	105	74	152/168	2,2	66	59
ПОБ-255	255	–	161/181	1,9*	68	61
ПОБ-364	364	87	159/176	2	65	60
ПОБ-485	485	–	156/178	1,7*	63	63
ПОБ-1005	1005	90	154/170	2,2	63	59
Группа II. ПОБ/ПЭГ с различным молярным содержанием ЭОЗ и различной ММ						
ПОБ/ПЭГ-2,5-768	768	88	157/170	1,3	60	66
ПОБ/ПЭГ-5,0-820	820	81	155/167	0,9*	51	65
ПОБ/ПЭГ-5,7-172	172	–	151/175	0,8	58	70
ПОБ/ПЭГ-9,0-850	850	77	151/165	1,3	47	70
ПОБ/ПЭГ-5,1010	1010	70	155/166	1,0	44	64
ПОБ/ПЭГ-9,0-320	320	60	134/149	1,4	41	68
ПОБ/ПЭГ-17,6-220	220	75	149/162	1,2	42	67
ПОБ/ПЭГ-17,6-635	635	74	151/166	0,7	41	63
ПОБ/ПЭГ-17,6-1190	1190	69	154/169	0,4	34	62
Группа III. ПОБ/МВ						
ПОБ/МВ	1340	73	145/157	1,3	49	63
Группа IV. ПОБ/ПЭГ, ПОБ/ПЭГ и полимеры ПОБ/ПЭГ						
ПОБ-ПЭГ	160	–	157/178	0,9*	59	52
ПОБВ-ПЭГ	219	75	153/175	2,0	60	63
ПОБ-ПЭГ	485/1,5	–	159/172	0,4*	56	49

База данных по параметрам морфологии и физико-химическим свойствам полимерных микрочастиц

Надмолекулярный уровень организации живых систем

Использование полученных данных для других моделей

Рисунок 157. *Схема экспериментальной модели исследования кинетики высвобождения низкомолекулярных лекарственных веществ и белков из полимерных пленок и микрочастиц.*

ИК-спектроскопия, электрофорез белков, круговой дихроизм, измерение активности ферментов. Для обработки экспериментальных данных используются методы математического моделирования. Уровень происходящих процессов с точки зрения организации живого – надмолекулярный. Основная задача экспериментальной модели – анализ кинетики и установление механизма высвобождения низкомолекулярных ЛВ и белков из полимерных нано- и микрочастиц. Моделируемый идеальный биообъект модели – лекарственная форма пролонгированного высвобождения ЛВ. Временной масштаб экспериментальной модели – до 110 суток, что соответствует продолжительности применения лекарственных форм пролонгированного действия.

Эта модель позволила установить, что кинетика высвобождения различных низкомолекулярных лекарственных веществ как из пленок, так и из микрочастиц на основе ПОБ зависит, прежде всего, от химической структуры этих соединений и их физико-химических свойств. Кинетика высвобождения паклитаксела из микрочастиц на основе ПОБ наилучшим образом соответствует кинетики биодеградации этого биополимера. БиоПЭГилирование ПОБ оказывает влияние на параметры кинетики диффузионного высвобождения паклитаксела из биополимерных микрочастиц на ранней стадии. Была разработана также оригинальная методика инкапсулирования белка лизоцима в микрочастицы на основе поли-3-оксибутирата и его биоПЭГилированного сополимера с использованием гидроксиапатита, как носителя. Высвобождение лизоцима из полимерного матрикса микрочастиц происходит посредством диффузии белка и их деградации. Наилучшие характеристики пролонгированного высвобождения лизоцима с сохранением его биоактивности в течение 2-х недель *in vitro* демонстрируют микрочастицы на основе биоПЭГилированного ПОБ.

Раздел 3.8. Остеогенные свойства 2D-матриксов на основе поли-3-оксибутирата и его сополимеров

3.8.1. Структура плоских матриксов из различных материалов

Для исследования влияния биоПЭГилирования на остеогенные свойства ПОБ были изготовлены пористые матриксы на основе ПОБ, ПОБ-ПЭГ, а в качестве контроля – на основе композита ПОБ/ПЭГ. Полученные методом выщелачивания с использованием газообразователя карбоната аммония матриксы обладали сложной пористой структурой (Рисунок 158). Кроме того, на Рисунке 158 даны изображения СЭМ бедренной (трубчатой и губчатой) кости крысы породы Вистар (возрастом две недели).

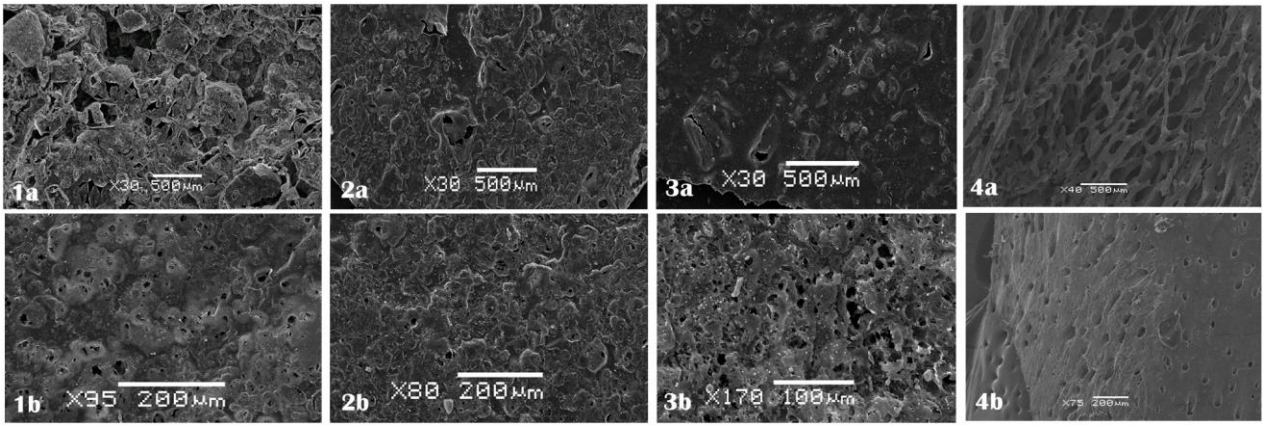


Рисунок 158. *Изображения СЭМ пористых матриксов на основе: ПОБ (1), ПОБ/ПЭГ (2), ПОБ-ПЭГ (3), бедренная (трубчатая) кость (4); внешняя сторона (a), внутренняя сторона (b). (Выполнено при содействии и на оборудовании Общефакультетской лаборатории электронной микроскопии (отв. проф. кафедры биоинженерии Соколова О.С.).*

Можно выделить два типа пор в полученных матриксах: крупные «лакуны», представляющие собой складки полимерных пластов, в которых имеются более мелкие поры, которые мы будем называть «малые поры». Кроме того, полученные плоские матриксы обладают разной морфологией на разных поверхностях: внутренней, лежащей на стекле при получении матрикса, и внешней, обращенной к воздуху. По методике Мазели (Masaeli) (Masaeli et al., 2012) была рассчитана пористость полученных матриксов (Таблица 32).

Размер пор на внешней стороне трубчатой кости составил 36 ±11 мкм, на внутренней стороне трубчатой кости 42 ±15 мкм, на внутренней стороне губчатой кости 169 ±55 мкм.

***Таблица 32**. Морфологические характеристики (пористость и размер пор) матриксов на основе ПОБ, ПОБ-ПЭГ и ПОБ/ПЭГ (*p <0,05 в сравнении с ПОБ, #p <0,05 в сравнении с ПОБ/ПЭГ, n =6).*

Полимер	Внешняя сторона, мкм		Внутренняя сторона, мкм		Пористость, %
	разрывные поры	лакуны	разрывные поры	лакуны	
ПОБ	103 ±37#	215 ±137	7 ±4	43 ±15	87 ±7
ПОБ/ПЭГ	33 ±18*	100 ±53	7 ±5	53 ±26	75 ±16
ПОБ-ПЭГ	16 ±5*#	105 ±74	5 ±3	38 ±14	69 ±12*

(Выполнено при содействии и на оборудовании Общефакультетской лаборатории электронной микроскопии (отв. проф. кафедры биоинженерии Соколова О.С.).

Размеры пор на внутренней стороне матриксов из разных полимерных материалов статистически значимо не различались, значительно не различались размеры пор матриксов из ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ на внешней стороне матриксов, а размеры пор матриксов из ПОБ на внешней стороне были в 2 – 6 раз больше. Пористость матриксов из сополимера ПОБ-ПЭГ была ниже пористости матриксов из ПОБ (Таблица 32). Размеры пор полученных матриксов (40 – 215 мкм) подходят для роста клеток.

Чернильный тест показал, что матриксы из всех полимеров обладают связанной внутренней пористой структурой – закрытые поры, которые бы выглядели как белые пятна в матриксе отсутствовали.

Высокая пористость и связанность пор между собой являются ключевыми для использования матриксов в биоинженерии костной ткани, где в основном и используются матриксы из ПОБ и его сополимеров, и, соответственно, необходимым условием для роста клеток в этих матриксах (Lim et al., 2016; Misra et al., 2010; Murphy et al., 2010; Rumian et al., 2013; Zhang et al., 2010; Ribeiro-Samy et al., 2013; Moisenovich et al., 2015; Houben et al., 2017; Shumilova et al., 2017). Размер пор матриксов от 20 до 1500 мкм позволяет использовать их в инженерии костной ткани (Richardson et al., 2006; Oh et al., 2007; Zhang et al., 2010; Moisenovich et al., 2015; Rumian et al., 2013; Kuznetsova et al., 2016). Минимальный размер пор для прорастания через матрикс костной ткани и для культивирования остеобластов и МСК составляет 40 мкм, а оптимальный размер – в переделах от 100 до 200 мкм (Klawitter et al., 1976; Richardson et al., 2006; Misra et al., 2010; Cruz et al., 2010; Murphy et al., 2010; Zhang et al., 2010; Ribeiro-Samy et al., 2013; Shishatskaya et al., 2014; Hadjicharalambous et al., 2015; Houben et al.,

2017), хотя некоторые авторы говорят о расширении этого диапазона до 300 мкм (Matsiko et al., 2014). Однако, как было показано в исследовании роста клеток различных типов (хондроцитов, остеобластов и фибробластов) в цилиндрических матриксах из ПКЛ с градуально увеличивающимся размером пор от 88 до 405 мкм и пористостью от 80 до 94% различие в микроструктуре матриксов имеет значение только при долговременном культивировании клеток, тогда рост клеток в течение менее чем 14 суток не зависел от пористости матрикса и размера его пор (Oh et al., 2007). В другом исследовании также была выявлена низкая корреляция между размером топографических элементов и ростом МСК на них (Criscenti et al., 2017). Для матриксов на основе ПОБ, его сополимеров и композитов, рядом исследователей было показано, что для эффективного их использования в тканевой инженерии и культивирования в них МСК наиболее оптимальным размером их пор является от 100 до 200 мкм, а пористость – более 80% (Misra et al., 2010; Ribeiro-Samy et al., 2013; Shishatskaya et al., 2014). Было также показано, что топография полимерной поверхности и микроструктура поверхности пор матриксов существенно влияют не только на рост МСК, но также и на дифференцировку клеток в остеогенное, хондрогенное и липогенное направления (Bai et al., 2010; Lim et al., 2017).

Таким образом, получаемые нами плоские пористые матриксы имеют гетерогенную морфологию с различных сторон (внутренней и внешней), а по размеру пор и пористости соответствуют губчатой костной ткани (Вавилова, 2008).

3.8.2. Теплофизические свойства матриксов

Было проведено исследование теплофизических свойств полученных матриксов методом ДСК (Рисунок 159) и получены основные характеристики: температуры плавления (начальные и пиковые), энтальпии плавления и рассчитанные на ее основе степени кристалличности (Таблица 33). Если сравнивать полученные данные с соответствующими результатами, полученными при исследовании пленок из этих полимерных материалов, то пиковая температура плавления не изменяется, а степень кристалличности полимерных материалов ПОБ и ПОБ/ПЭГ в матриксах повышается, тогда как ПОБ-ПЭГ не изменяется (Таблицы 10 и 32). Повышение кристалличности полимерного материала может быть связано с технологическими особенностями метода их изготовления, а именно, повышенной температурой при порообразовании (Тагер, 2007).

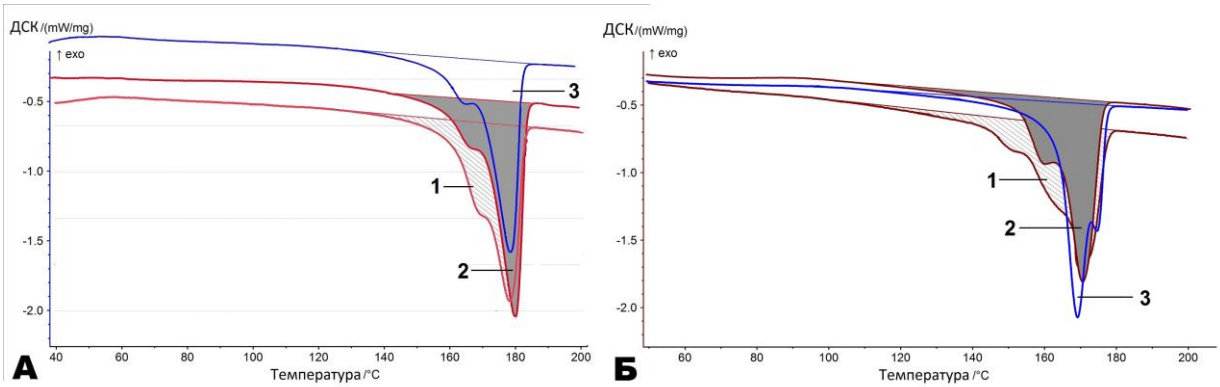


***Рисунок 159**. Термограммы ДСК пористых матриксов из ПОБ (1), ПОБ/ПЭГ (2), ПОБ-ПЭГ (3) (первый нагрев (А), второй нагрев (Б). (Выполнено совместно с лабораторией химической термодинамики на Химическом факультете МГУ, на оборудовании ЦКП МГУ (оператор н.с. Быков М.А.)).*

***Таблица 33.** Теплофизические характеристики матриксов из ПОБ, ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ.*

Полимеры	Температура начала плавления, ($T_{пл.}^{0}$, °C)	Температура пика плавления ($T_{пл.}^{пик}$, °C)	Энтальпия плавления (ΔH, Дж/г)	Кристалличность (X_c,%)	Температура начала плавления, ($T_{пл.}^{0}$, °C)	Температура пика плавления ($T_{пл.}^{пик}$, °C)	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	72,21	151,1	168	99,08	74,32
ПОБ-ПЭГ	125	179	97,!5	66,27	164	169	103,1	70,33

*- степень кристалличности полимерной компоненты ПОБ

(Выполнено совместно с лабораторией химической термодинамики на Химическом факультете МГУ, на оборудовании ЦКП МГУ (оператор н.с. Быков М.А.)).

3.8.3. Адсорбция белка

В качестве предварительного этапа исследования биосовместимости плоских матриксов мы исследовали адсорбцию белка на них. Для этого мы использовали конфокальную микроскопию (в качестве белка – БСА-ФИТЦ) (Рисунок 160) и методику смыва

адсорбированного белка 0,1% раствором додецилсульфата натрия (SDS) в фосфатно-солевом буферном растворе с последующим его анализом с помощью метода Бредфорда (Таблица 34).

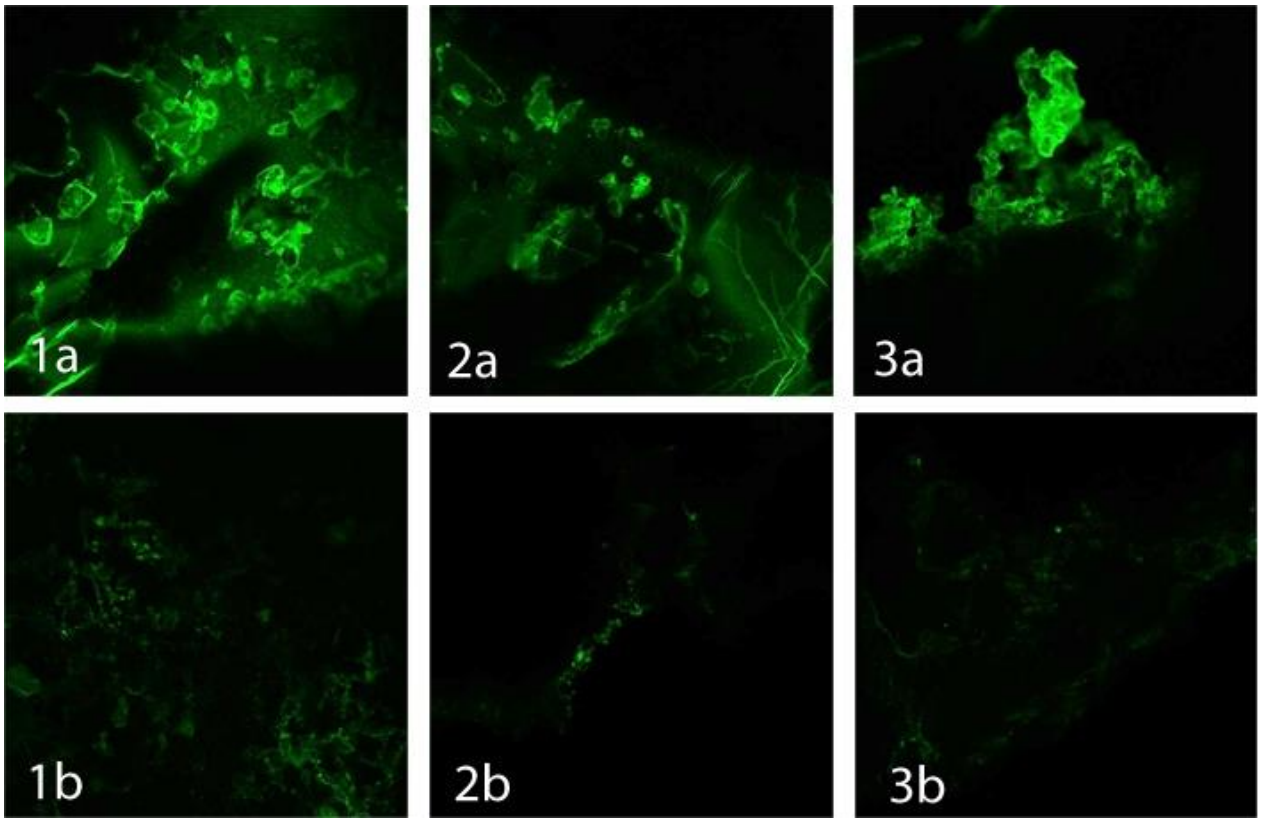


***Рисунок 160**. Адсорбция флуоресцентно-меченого белка БСА-ФИТЦ на матриксах из ПОБ (1), ПОБ/ПЭГ (2) и ПОБ-ПЭГ (3) через 1 час инкубации в БФС (a) и через 1 час инкубации в 0,1% SDS в БФС (b). (Выполнено совместно с сотрудниками научной группы профессора кафедры биоинженерии Феофанова А.В. и на оборудовании ЦКП МГУ).*

***Таблица 34**. Адсорбция БСА на матриксах из ПОБ, ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ (*p <0,05 по сравнению с ПОБ).*

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

Полученные результаты показали, что доля необратимо адсорбированного на матриксах белка (который не смывался раствором SDS) составляет примерно от четверти до трети всего абсорбированного на матриксах белка и не отличается у матриксов из разных полимерных материалов. Тогда как доля необратимо адсорбированного на матриксах белка отличается

значительно: на матриксах из ПОБ-ПЭГ обратимо сорбируется в 2 раза меньше белка, чем на матриксах из ПОБ, а на матриксах из ПОБ/ПЭГ еще в 3 раза меньше белка, чем на матриксах из ПОБ-ПЭГ, что можно объяснить большей гидрофильностью поверхности полимерных материалов ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ (Norde and Lyklema, 1991; Севастьянов и Кирпичников, 2011).

Кроме того, БСА-ФИТЦ оказался хорошим инструментом для визуализации пористой структуры матриксов. На Рисунке 161 показана трехмерная модель на основе изображений конфокальной микроскопии матрикса, инкубированного в растворе БСА-ФИТЦ, которая демонстрирует равномерное распределение белка в порах матрикса.

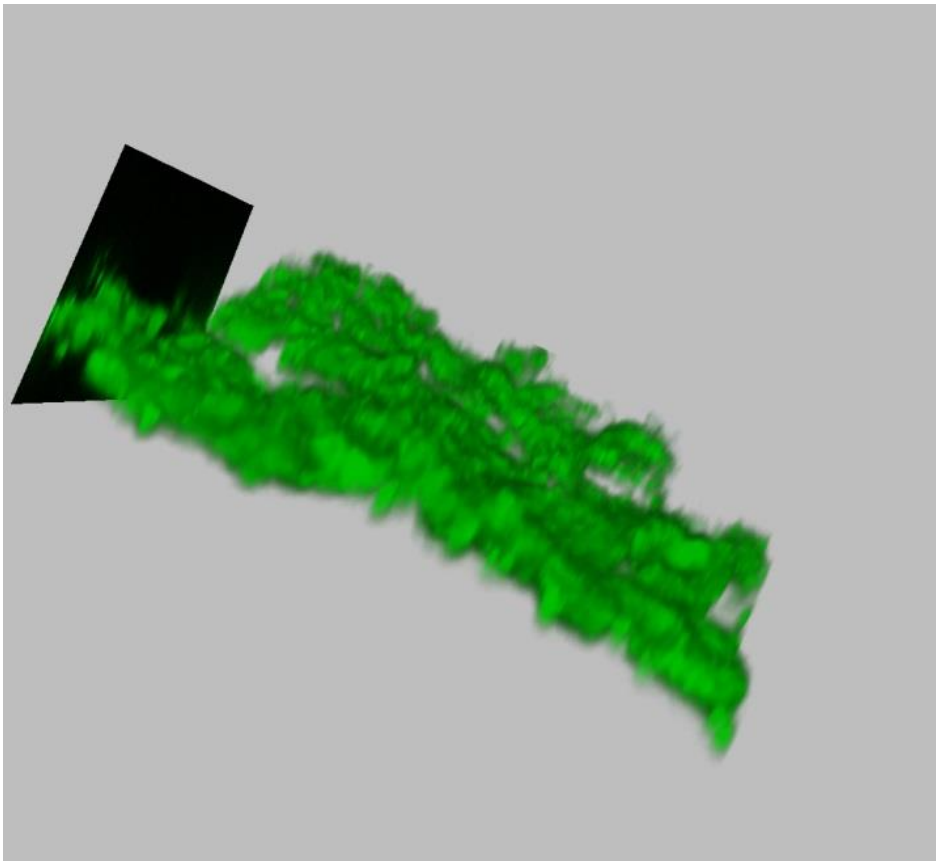


Рисунок 161. *Трехмерная модель матрикса на основе ПОБ с адсорбированным ФИТС-меченым БСА. (Выполнено совместно с сотрудниками научной группы профессора кафедры биоинженерии Феофанова А.В. и на оборудовании ЦКП МГУ).*

3.8.4. Подтверждение фенотипа мезенхимальных стволовых клеток

Фенотип МСК, выделенных из костного мозга крыс был подтвержден с помощью метода проточной цитометрии с использованием антител к фенотипическим маркерам МСК: CD 90, CD 45, CD 11b/c, CD 29 (Harting, 2008; Boxall and Jones, 2012) (Рисунок 162).

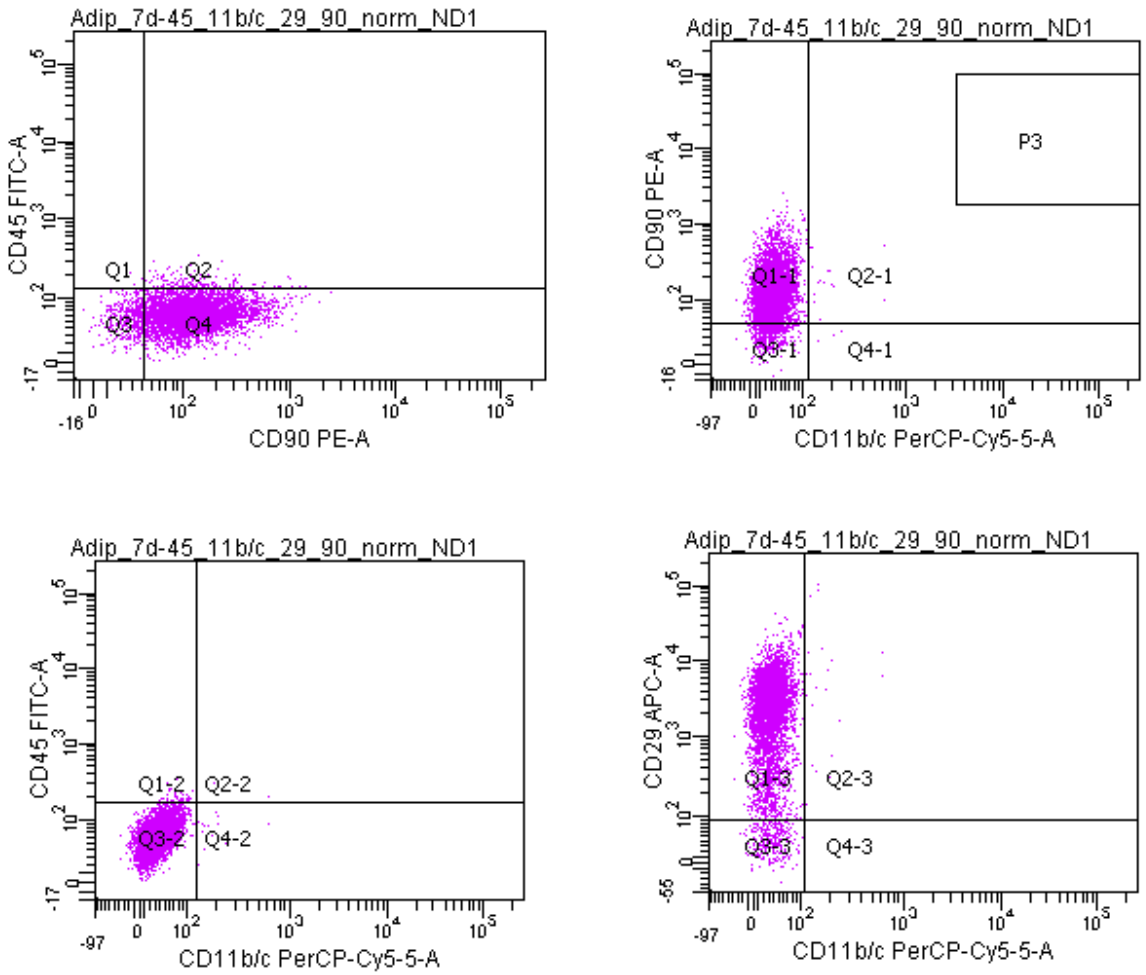


Рисунок 162. *Диаграммы проточной цитометрии определения маркеров фенотипа МСК костного мозга крыс. (Выполнено совместно с ст.науч.сотр. кафедры клеточной биологии и гистологии Поташниковой Д.М. на оборудовании ЦКП МГУ, приобретенном за счет средств Программы развития МГУ).*

МСК после 3-его пассажа обладали высоким уровнем жизнеспособности (95,8 % по маркеру 7ААД) и характерным набором поверхностных маркеров в тех долях, которые соответствуют фенотипу стволовых клеток: CD 90 – 95% (+), CD 45 – 2,1% (–), CD 11b/c – 26% (–), CD 29 – 50% (+) (Рисунок 162), для подтверждения которого необходимо, чтобы имелся в наличии положительный маркер CD 90 и отсутствовал отрицательный маркер CD 45 (Harting et al., 2008; Boxall and Jones, 2012; Goodwin et al., 2001; Schrepfer et al., 2007).

3.8.5. Биосовместимость пористых матриксов *in vitro*

Для комплексной оценки биосовместимости матриксов из биоПЭГилированного ПОБ *in vitro* нами было проведено исследование цитотоксичности этих матриксов, как и матриксов на основе ПОБ и композита ПОБ/ПЭГ, а также исследование пролиферации клеток на них (Рисунок 163).

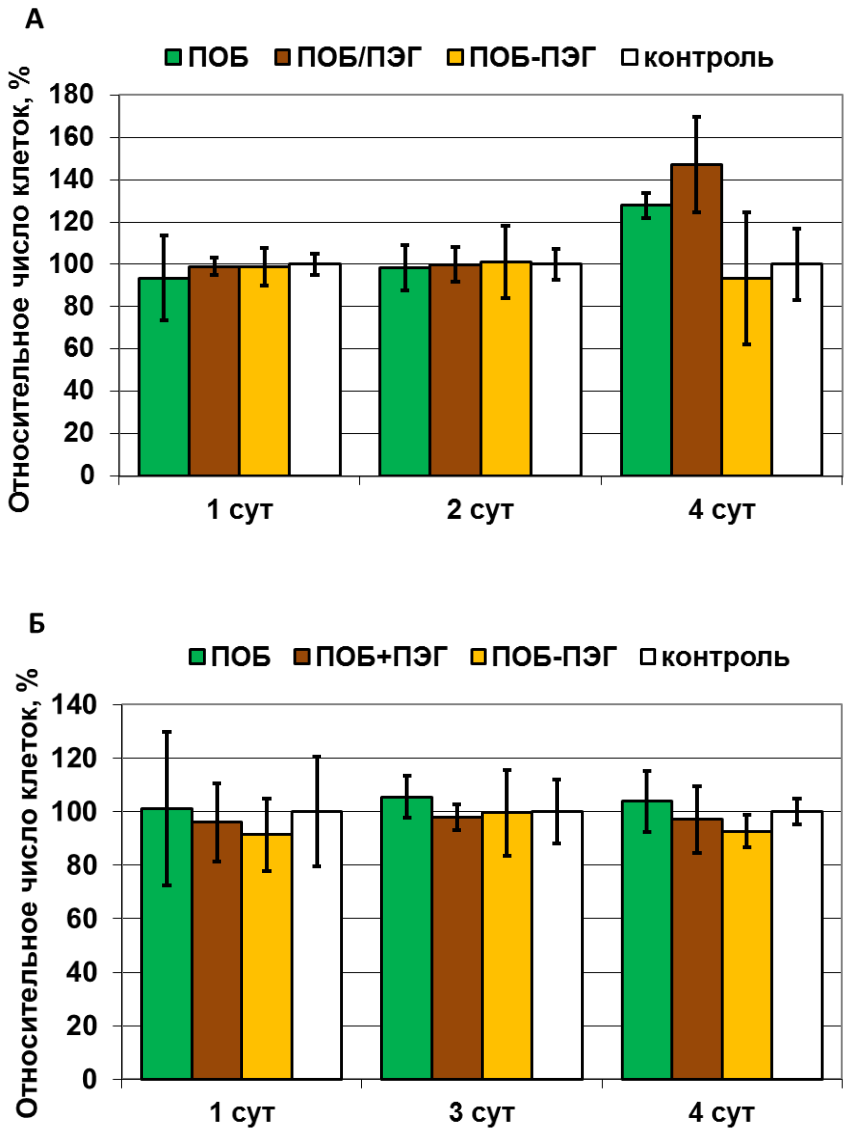


Рисунок 163. *Цитотоксичность in vitro матриксов из ПОБ, ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ на культурах фибробластов 3Т3 (А) и МСК (Б).*

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в присутствии матриксов из всех исследуемых полимерных материалов, жизнеспособность клеток обеих линий не уменьшается, т.е. матриксы не обладают цитотоксичностью *in vitro* (Рисунок 163).

Уровень пролиферации клеток этих же линий при их росте на поверхности и в порах матриксов показан на Рисунке 164.

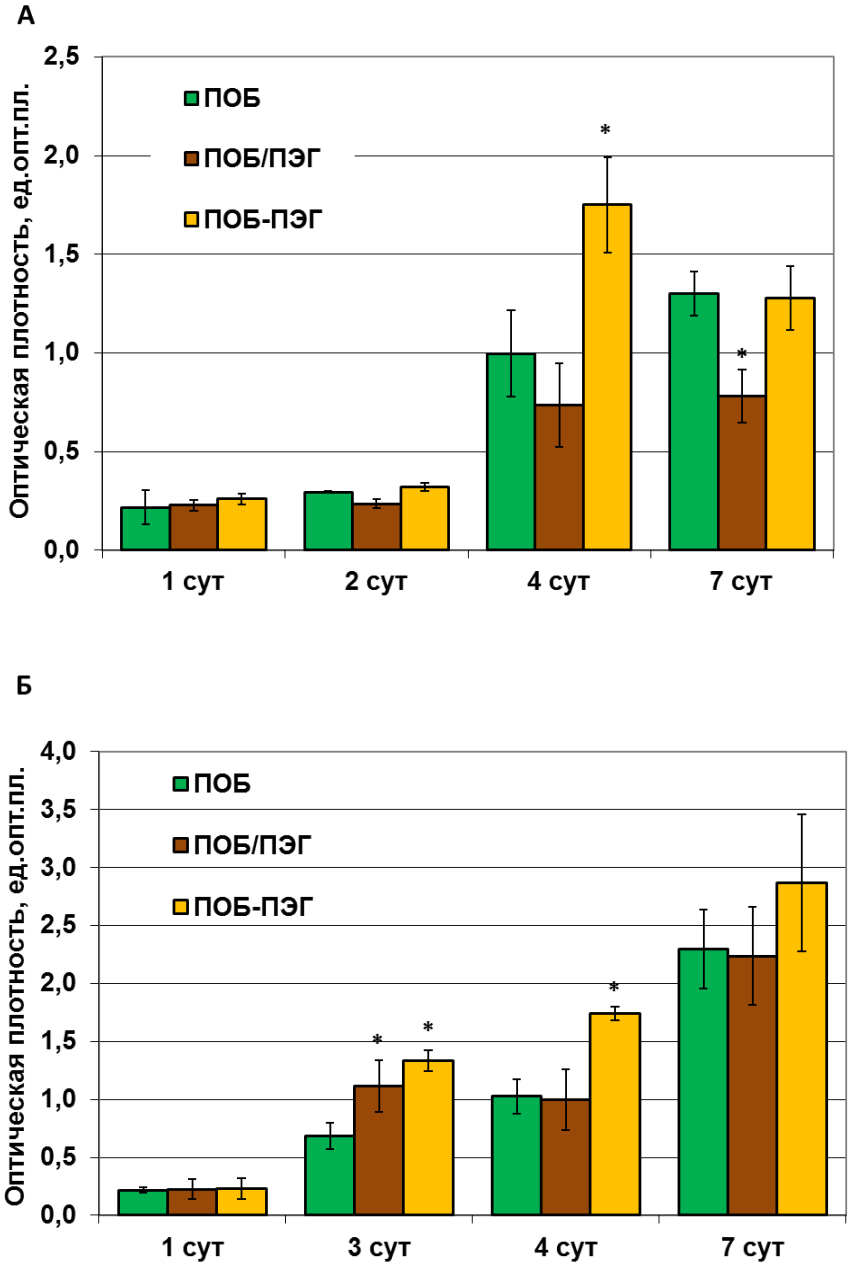


Рисунок 164. *Пролиферация клеток 3Т3 (А) и МСК (Б) на матриксах из ПОБ, ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ. * $p < 0,05$ в сравнении с группой ПОБ.*

Результаты, полученные нами, свидетельствуют о способности матриксов поддерживать рост клеток обеих линий, но пролиферация фибробластов 3Т3 была в целом менее интенсивной, чем МСК. Если же сравнивать матриксы из разных полимерных материалов, то видно, что пролиферация как фибробластов 3Т3, так и МСК более выражена (на 4-ые сутки) в

матриксах из ПОБ-ПЭГ, а наихудшим образом поддерживают рост фибробластов 3Т3 матриксы из композита ПОБ/ПЭГ.

Чтобы исследовать, каким образом происходит рост клеток в матриксах, мы использовали методы флуоресцентной микроскопии и СЭМ (Рисунки 165 и 166). На микрофотографиях видно, что клетки хорошо прикрепляются к поверхности пор матриксов и формируют в ходе пролиферации слой, покрывающий полимерную поверхность.

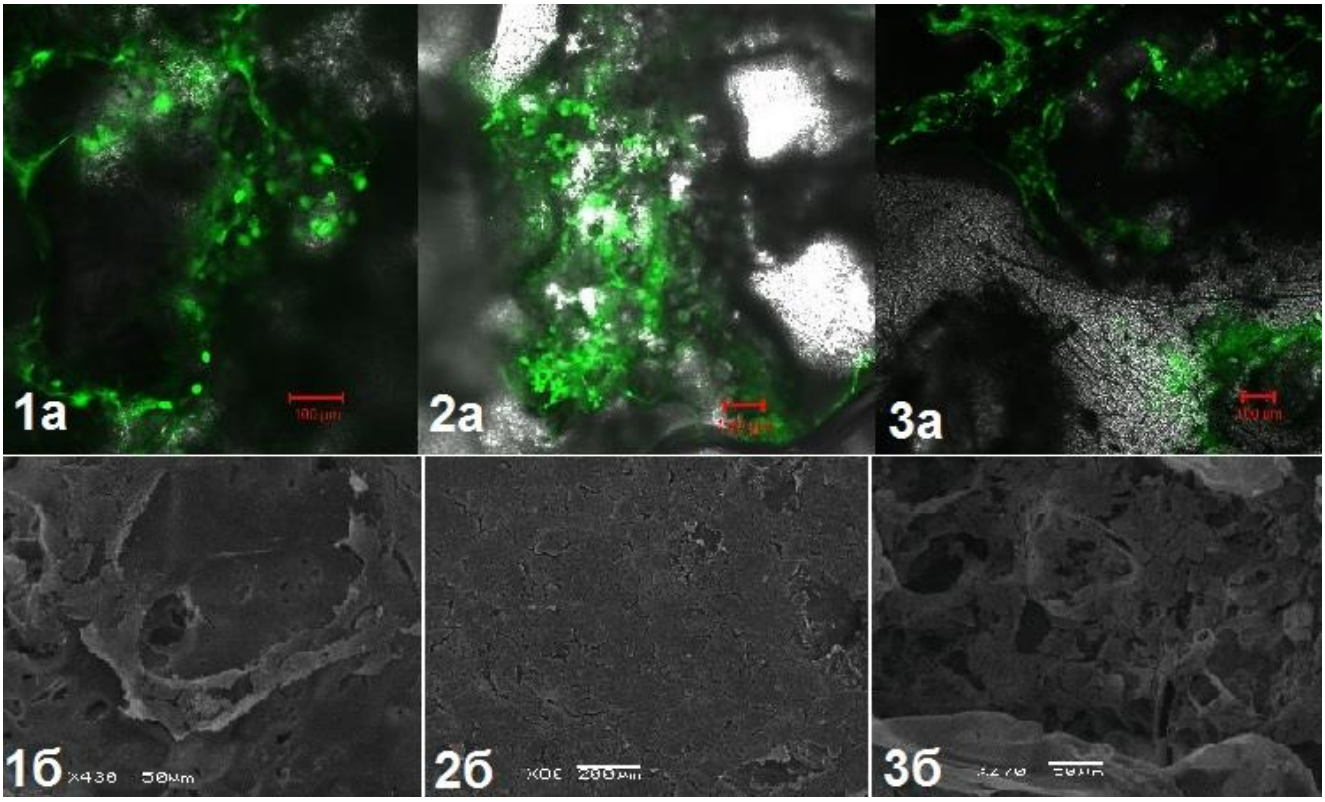


Рисунок 165. *Фибробласты 3Т3, растущие (на 5-ые сутки) на матриксах из ПОБ (1), ПОБ/ПЭГ (2) и ПОБ-ПЭГ (3), конфокальная микроскопия, ×400 (а); (б) СЭМ, ×270-430. (Выполнено при содействии и на оборудовании Общефакультетской лаборатории электронной микроскопии (отв. проф. кафедры биоинженерии Соколова О.С.) и совместно с сотрудниками научной группы профессора кафедры биоинженерии Феофанова А.В. и на оборудовании ЦКП МГУ).*

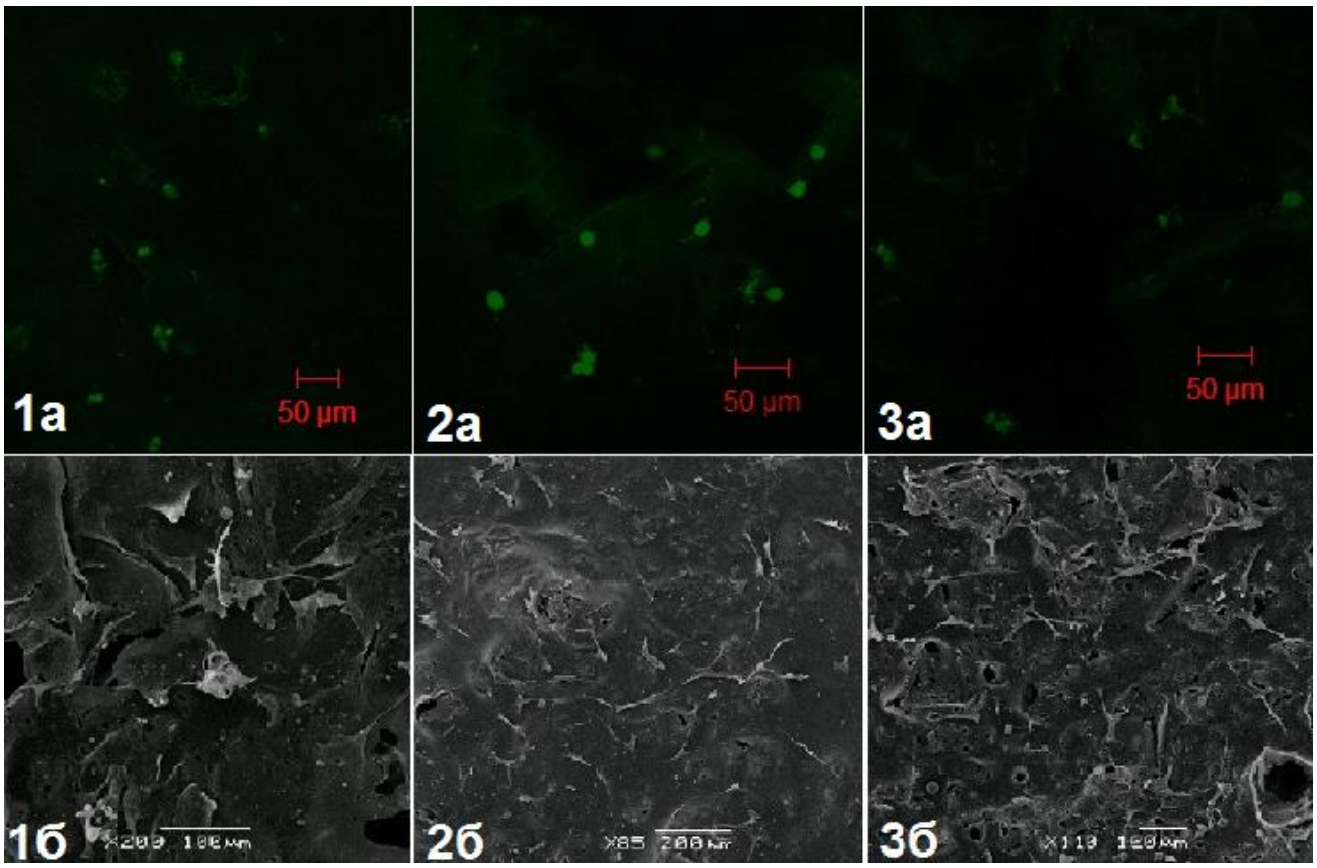


Рисунок 166. *МСК, растущие (на 3-ьи сутки) на матриксах из ПОБ (1), ПОБ/ПЭГ (2) и ПОБ-ПЭГ (3), конфокальная микроскопия, ×400 (а); (б) СЭМ, ×170-200. (Выполнено при содействии и на оборудовании Общефакультетской лаборатории электронной микроскопии (отв. проф. кафедры биоинженерии Соколова О.С.) и совместно с сотрудниками научной группы профессора кафедры биоинженерии Феофанова А.В. и на оборудовании ЦКП МГУ).*

Было также создано 3D-изображение расположения клеток в пористом матриксе из ПОБ на основе данных изображений конфокальной микроскопии (Рисунок 167), которая подтверждает, что клетки растут не только на поверхности матриксов, но и во всем их объеме, в порах матрикса.

Таким образом, можно заключить, что данные виды полимерных пористых матриксов всех трех типов способны поддерживать клеточный рост на своей поверхности, но наилучший рост клеток наблюдается на матриксах из биоПЭГилированного ПОБ.

Показано, что одним из ведущих факторов, влияющих на способность матриксов поддерживать рост клеток в них, является размер пор: 325 мкм для остеобластоподобных клеток (Murphy et al., 2010), 90 мкм для остеобластоподобных клеток линии *MC3T3-E1* (O'Brien et al., 2005) и мышиных фибробластов *NR6* (Harley et al., 2008), от 250 до 500 мкм для хондроцитов крысы (Lien et al., 2009). Таким образом, различные типы клеток предпочитают

расти в матриксах с разным размером пор, но МСК лучше растут в матриксах с размером пор от 150 мкм (Byrne et al., 2008) и 300 мкм, чем на матриксах с размером пор 90 мкм (Matsiko et al., 2014).

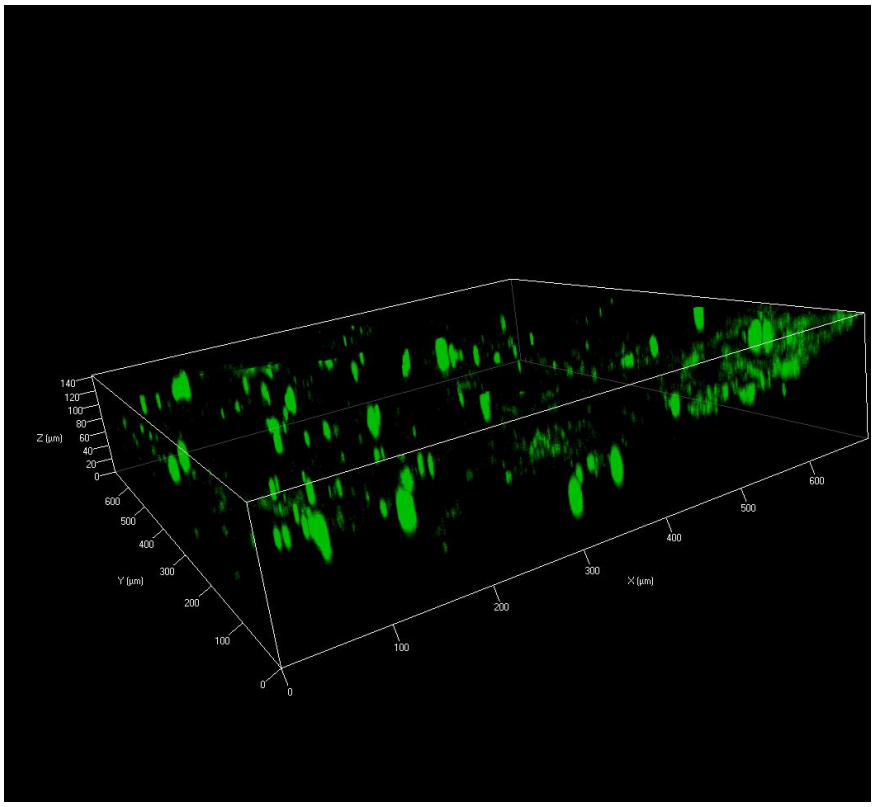


***Рисунок 167**. Трехмерное изображение расположения МСК, растущих в пористом матриксе из ПОБ (конфокальная микроскопия). (Выполнено совместно с сотрудниками научной группы профессора кафедры биоинженерии Феофанова А.В. и на оборудовании ЦКП МГУ).*

Однако, рядом исследователей высказано предположение, что наибольшее значение для хорошего роста МСК в матриксах является не размер пор как таковой, а как неравномерность размера пор, так и нерегулярность их структуры. В нашем случае как раз наблюдается градиент в размере пор между внутренней и внешней стороной матриксов, а также наличие двух типов пор: больших лакун и значительно меньших по размеру малых пор (Таблица 32). Так, было показано, что полимерные матриксы с наличием градиента по размеру пор или анизотропной морфологией пор способствуют лучшему росту МСК в них по сравнению с матриксами с одинаковым размером и строением пор (Ribeiro-Samy et al., 2013; Houben et al., 2017).

Помимо влияния морфологии матриксов и физико-химических свойств полимеров, из которых их изготавливают, следует учитывать и возможную биологическую активность ПОА. Так, было показано, что терполимер ПОБВГк стимулировал пролиферацию кератиноцитов человека линии *HaCaT* при росте клеток на полимерных пленках, полученных осаждением из

раствора. Исследование механизма стимуляции пролиферации клеток с использованием наночастиц из этого биополимера показало, что добавление наночастиц из ПОБВГк в концентрации от 0,02 до 0,1 г/л стимулировало увеличение тока ионов кальция в цитоплазму клетки, что является одним из основных сигнальных путей активации их деления. В работе этих авторов было показано, что продукт деградации ПОА мономер 3-гидроксибутират также самостоятельно вызывает активацию пролиферации кератиноцитов человека линии *HaCaT* и фибробластов мыши *L929* в концентрации от 0,01 до 0,1 г/л (0,1 – 1 мМ) по механизму увеличения концентрации ионов кальция в цитоплазме клетки, а также подавляет апоптоз и некроз фибробластов (Ji et al., 2008; Cheng et al., 2005; Cheng et al., 2006). Подобная биоактивность 3-гидроксибутирата неудивительна, поскольку он является естественным метаболитом в организме млекопитающих, так называемым кетоновым телом, и обладает выраженной разносторонней биологической активностью (Nelson and Cox, 2008). Однако помимо 3-гидроксибутирата биологической активностью могут обладать и олигомеры ПОА. Так, показано, что олигомеры ПОБ и его сополимеров с 4-оксибутиратом и 3-оксигексаноатом (с длиной цепи 20-25 мономеров) не токсичны для клеток (до концентрации 20 мкг/мл) и обладают биологической активностью, стимулируя пролиферацию, подавляя апоптоз, выброс кальция в цитоплазму и образование межклеточных контактов между В-клетками поджелудочной железы мышей (Yang et al., 2009). Следует отметить, что в отличие от высокомолекулярных полимеров олигомеры ПОА растворимы в воде. Так, после гидролитического разложения ПОБ и водной экстракции продуктов деградации полимера в воде были обнаружены олигомеры ПОБ с длиной цепи до 7 остатков 3-ГВ (Athlan et al., 1997). Более того, позже было показано, что олигомеры ПОБ, состоящие из примерно 25 остатков 3-ГВ, конъюгированные с липолиевой кислотой, также были растворимы в воде (Maksymiak et al., 2012).

В связи с этим, в нашем случае большое значение приобретает фактор влияния ПЭГ на свойства ПОБ как полимерного материала для изготовления матриксов. Как уже было отмечено выше (см. раздел 3.5), химическая сшивка ПОБ с ПЭГ или образование композита ПОБ/ПЭГ может, как улучшить, так и ухудшить рост клеток на изделиях из этих полимеров. Это зависит, по-видимому, от того, насколько ПЭГ в том или ином случае изменяет микро- и наноструктуру поверхности пор матрикса и физико-химические свойства ПОА (Li et al., 2011; Pan et al., 2009; Zanzig et al., 2003; Townsend et al., 2005).

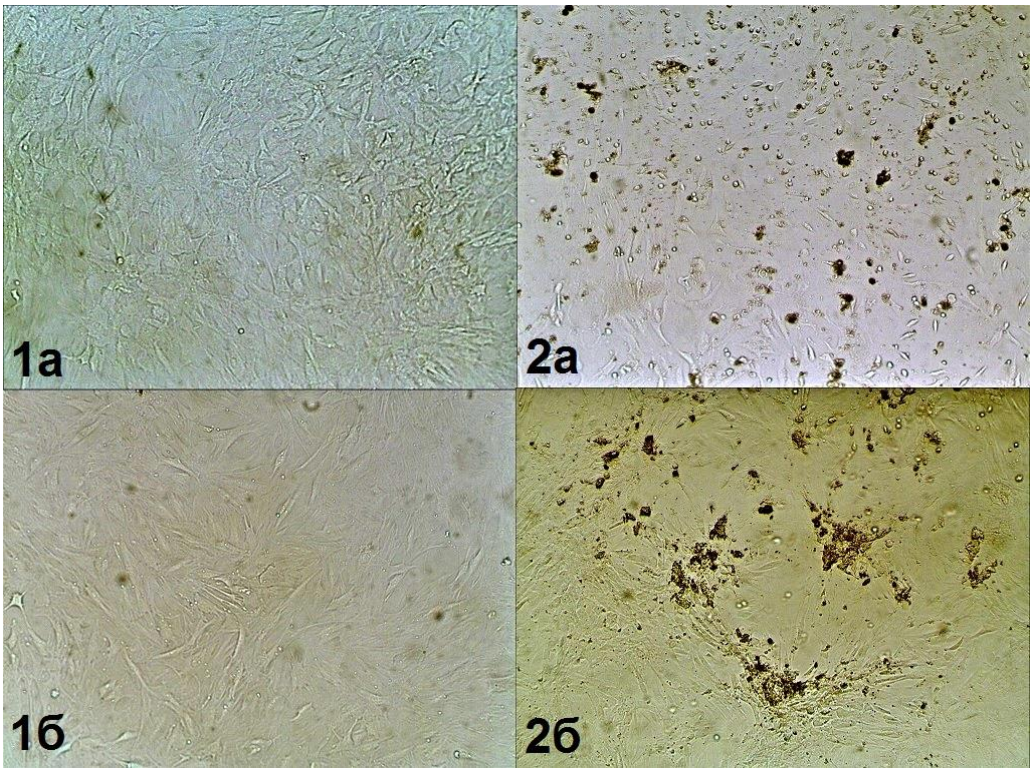
3.8.6. Направленная остеогенная дифференцировка

3.8.6.1. Изменение морфологии МСК и минерализация

Для исследования биоактивности матриксов на основе ПОБ было проведено исследование остеогенной дифференцировки МСК in vitro как в стандартных условиях, так и в остеогенной культуральной среде (содержащей 0,1 мкМ дексаметазона, 10 мМ β-глицерофосфата и 50 мМ аскорбиновой кислоты) (Shakibaei et al., 2012).

Мы наблюдали у МСК после культивирования их в остеогенной среде присущие остеобластам морфологические признаки: увеличения числа включений и вакуолей, угловатая форма клеток, длинные тонкие отростки. При окраске ализариновым красным хорошо видны отложения солей кальция (Puchtler et al., 1969) (Рисунок 168).

А



Б

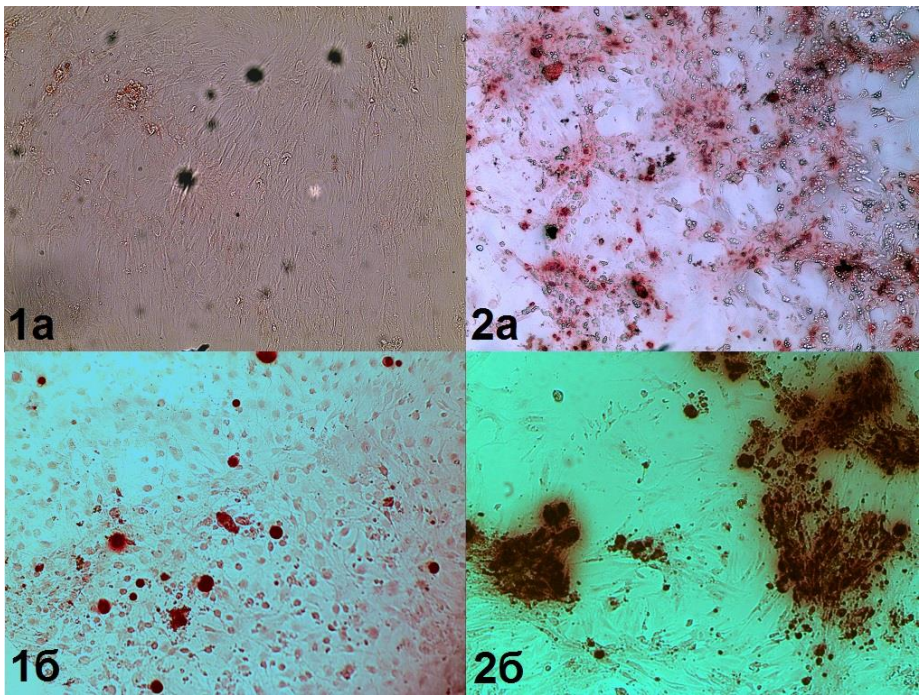


Рисунок 168. *МСК, культивируемые в стандартной (1) и остеогенной среде (2) в течение 14-ти (а) и 21-х (б) суток на культуральном пластике: без окраски (А) и при окраске ализариновым красным (Б).*

Аналогично отложения солей кальция хорошо проявляются при окраске ализариновым красным при выращивании МСК на пористых матриксах из разных полимерных материалов в остеогенной среде (Рисунок 169б).

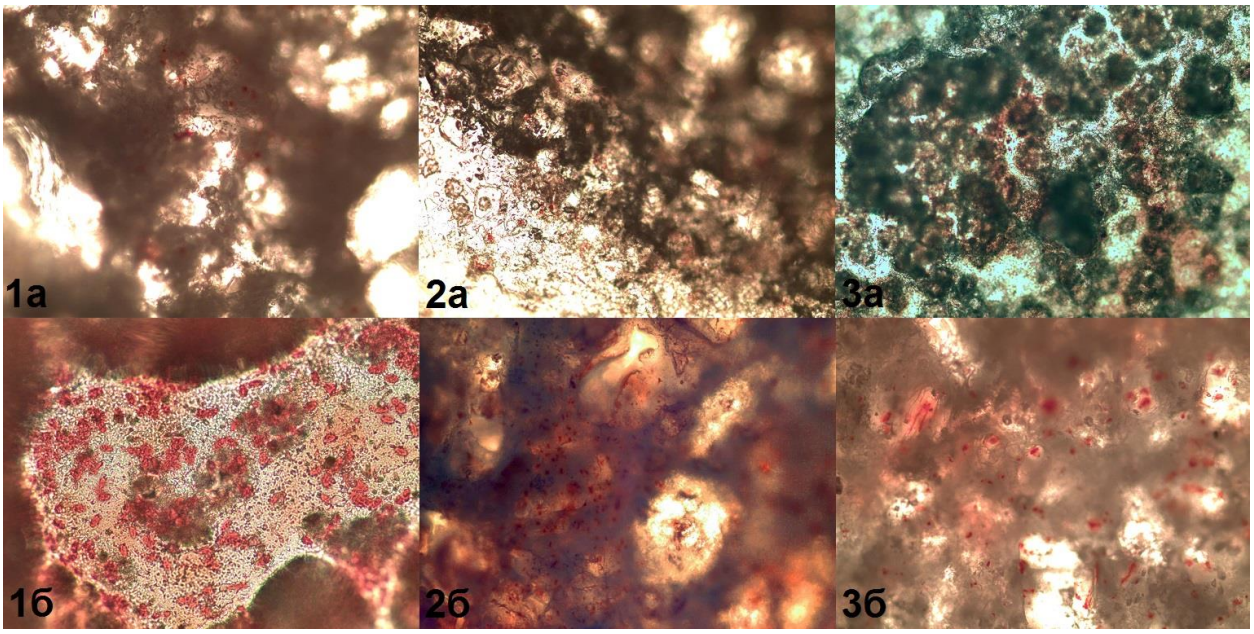


Рисунок 169. *МСК, культивируемые в стандартной (а) и остеогенной (б) среде в течение 14-ти суток на матриксах из ПОБ (1), ПОБ/ПЭГ (2) и ПОБ-ПЭГ (3) при окраске образующихся отложений солей кальция ализариновым красным (красное окрашивание).*

Более детальное изучение морфологии МСК, растущих на матриксах в остеогенной среде было проведено с помощью СЭМ (Рисунок 170Б). Характерная для остеобластов форма МСК (угловатая форма клеток, длинные тонкие отростки), культивируемых на матриксах из ПОБ-ПЭГ в течение 21 суток имела высокое сходство с остеобластоподобными клетками после индукции их остеогенной дифференцировки (Рисунок 170Б) (Annaz et al., 2004).

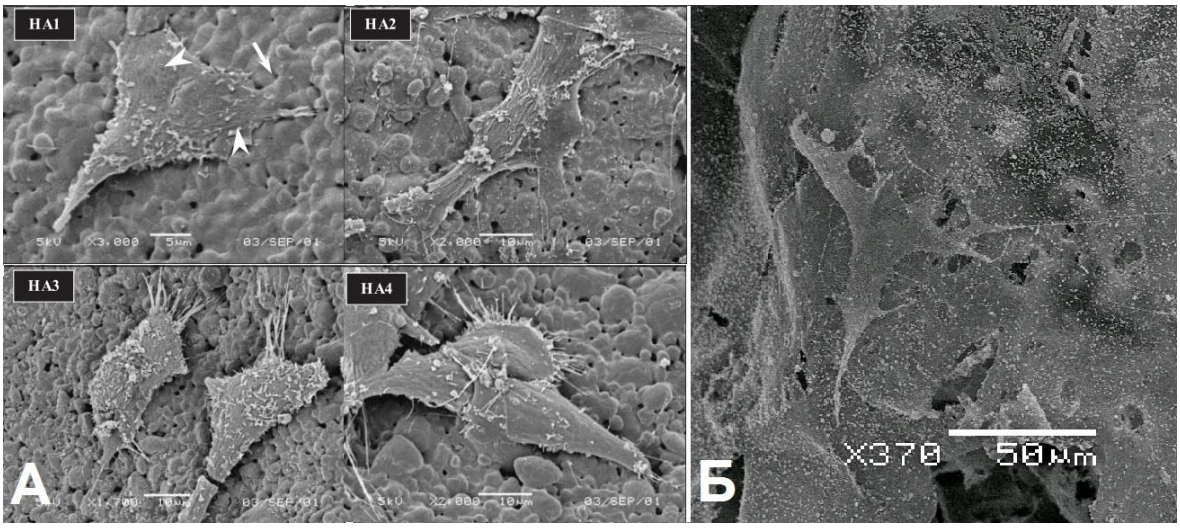


Рисунок 170. *Морфология МСК, выращенных на матриксе из ПОБ-ПЭГ в остеогенной среде на 21-ые сутки культивирования (Б) при сравнении с остеобластоподобными клетками с индуцированной остеогенной дифференцировкой (Б) (Annaz et al., 2004). (Выполнено при содействии и на оборудовании Общефакультетской лаборатории электронной микроскопии (отв. проф. кафедры биоинженерии Соколова О.С.).*

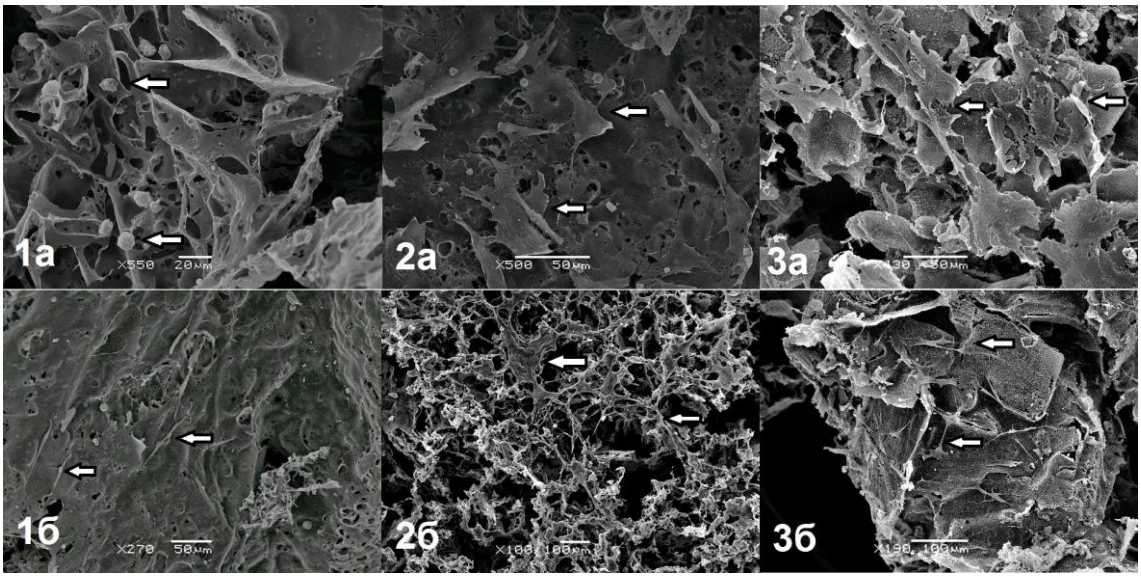


Рисунок 171. *МСК, культивируемые на матриксе из сополимера ПОБ-ПЭГ в стандартной (а) и остеогенной (б) культуральной среде через 7 (1), 14 (2) и 21 (3) сутки. (Выполнено при содействии и на оборудовании Общефакультетской лаборатории электронной микроскопии (отв. проф. кафедры биоинженерии Соколова О.С.).*

На изображениях СЭМ видно, что остеобластоподобная морфология клеток формируется постепенно: увеличивается тело клетки, она становится более угловатой формы, вытягиваются и утончаются отростки от 7-ых до 21-х суток культивирования в остеогенной среде (Рисунок 171).

Аналогично, можно наблюдать постепенное увеличение количества отложений солей кальция при выращивании МСК в остеогенной среде на матриксах (Рисунок 172).

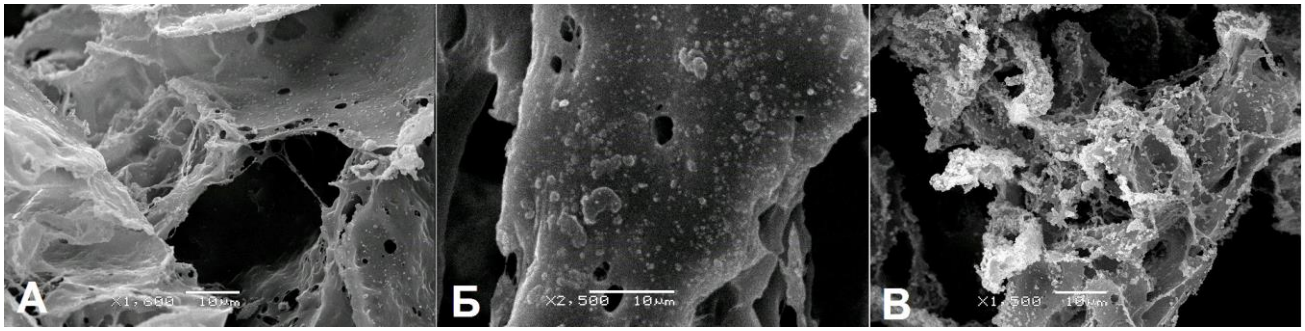


Рисунок 172. *Минеральные отложения на матриксе из сополимера ПОБ-ПЭГ при культивировании в остеогенной среде на 7 (А), 14 (Б), 21 (В) сутки. (Выполнено при содействии и на оборудовании Общефакультетской лаборатории электронной микроскопии (отв. проф. кафедры биоинженерии Соколова О.С.).*

Полученные результаты изменения морфологии клеток на более раннем сроке и отложения солей кальция на более позднем указывают на остеогенную дифференцировку МСК (Stein and Lian, 1993; Pittenger et al., 1999; Yoshikawa et al., 1996; Caliari and Harley, 2014; Coelho and Fernandes, 2000).

3.8.6.2. Активность щелочной фосфатазы МСК

Одним из важнейших маркеров остеогенной дифференцировки МСК является повышение активности щелочной фосфатазы (Coelho and Fernandes, 2000; Pittenger et al., 1999). Экспрессия ЩФ является также важным маркером процесса регенерации костной ткани после ее повреждения (Golub and Boesze-Battaglia, 2007; Balcerzak et al.; 2003). Нами получены довольно интересные результаты при исследовании активности этого фермента в МСК, выращиваемых на пористых матриксах из различных полимерных материалов в стандартной и остеогенной среде. В остеогенной среде наблюдается многократное повышение активности ЩФ как при культивировании МСК на культуральном пластике, так и на матриксах из ПОБ и его композита с ПЭГ. Однако, повышение активности ЩФ в МСК имеет место и при выращивании их на матриксах из ПОБ, ПОБ/ПЭГ и ПОБ/ПЭГ, причем увеличение активности ЩФ на 14-ые и

21-ые сутки достоверно меньшее для матриксов из биоПЭГилированного ПОБ и композита ПОБ/ПЭГ, чем для матриксов из ПОБ. Показано также, что даже в остеогенной среде активность ЩФ в МСК, выращиваемых на матриксах из ПОБ-ПЭГ также сильно снижена к 21-м суткам культивирования (Рисунок 173), т.е. основному сроку, по которому проводится оценка формирования остеогенной дифференцировки МСК в остеогенной среде (Caliari and Harley, 2014).

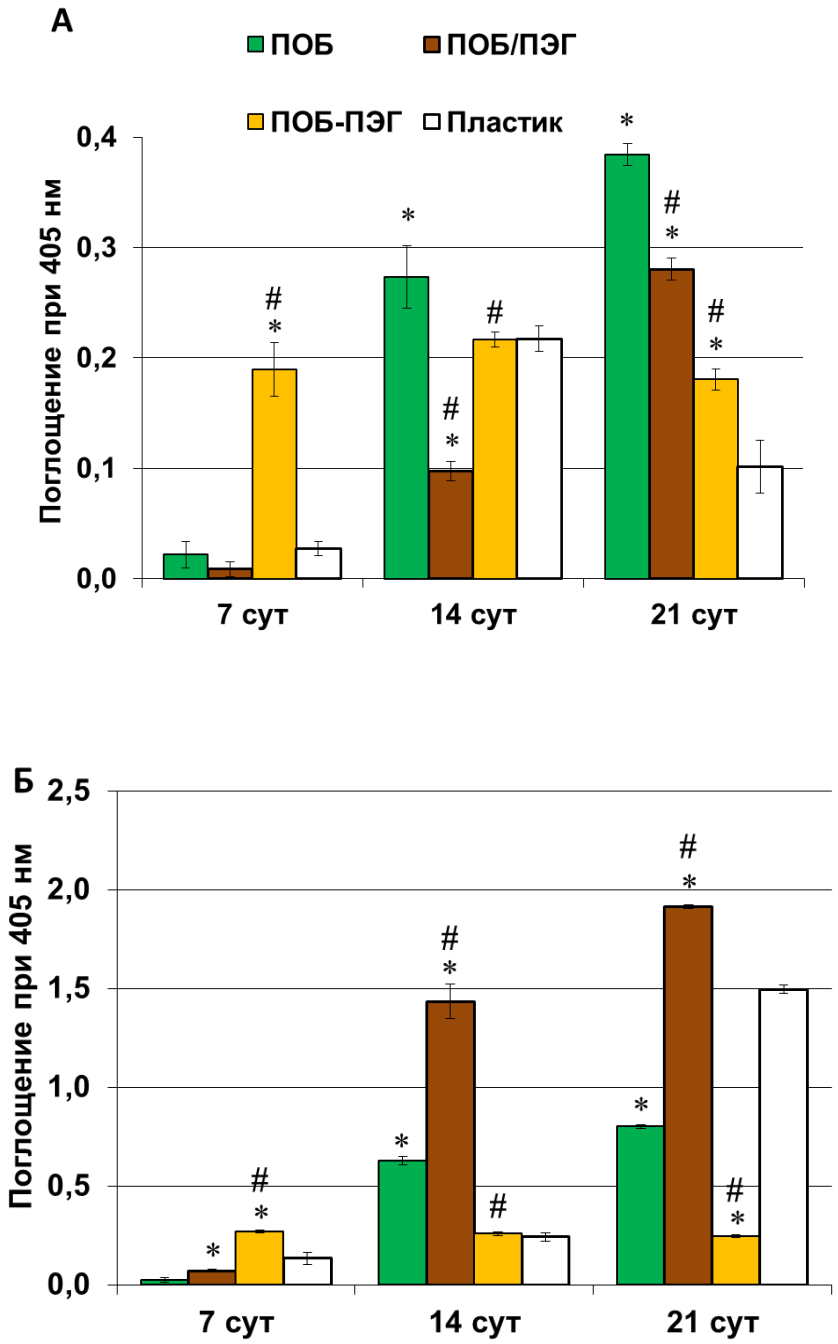


Рисунок 173. *Активность щелочной фосфатазы МСК, культивируемых на матриксах из ПОБ, ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ в стандартной ростовой среде (А) и в остеогенной среде (Б). * $p < 0,05$ в сравнении с группой Пластик, # $p < 0,05$ в сравнении с группой ПОБ.*

3.8.6.3. Экспрессия поверхностных маркеров МСК

Мы исследовали также изменение экспрессии поверхностных маркеров фенотипирования МСК (CD 90, CD 45, CD 11b и CD 29) при культивировании на матриксах в стандартной и остеогенной среде (Рисунок 174).

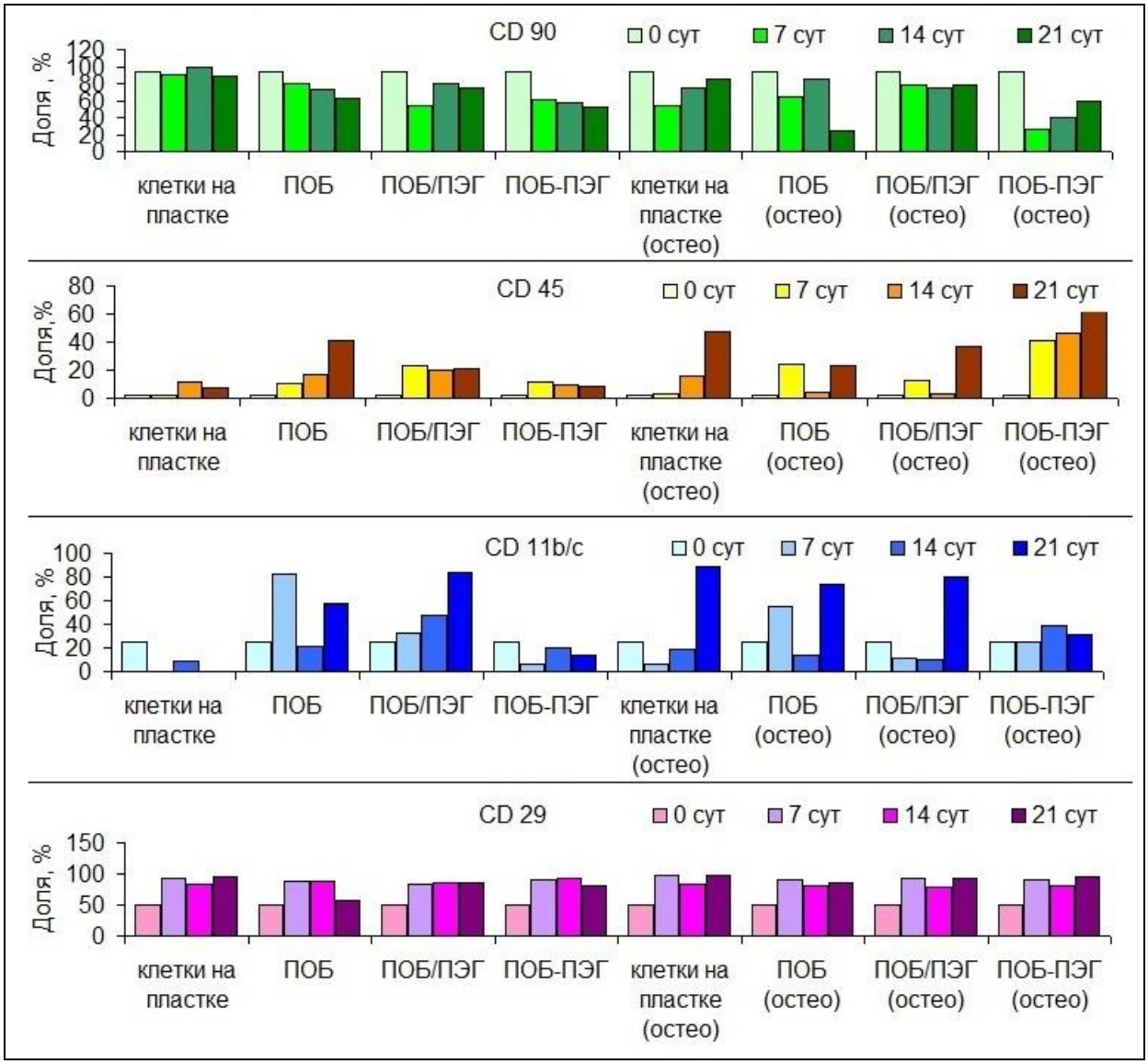


Рисунок 174. *Изменение экспрессии поверхностных маркеров МСК при культивировании на пластике и на матриксе из ПОБ, ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ в стандартной и остеогенной (остео) среде на 7-ые, 14-ые и 21-ни сутки культивирования. (Выполнено совместно с ст.науч.сотр. кафедры клеточной биологии и гистологии Поташниковой Д.М. на оборудовании ЦКП МГУ, приобретенном за счет средств Программы развития МГУ).*

Видно, что имеет место повышение экспрессии отрицательных маркеров CD 45 и CD 11b/c в МСК, выращиваемых на матриксах из ПОБ и ПОБ/ПЭГ не только в остеогенной среде, но и в стандартной, как и в случае повышения активности ЩФ, что указывает на потерю

фенотипа стволовых клеток культивируемых на матриксах МСК, тогда как в МСК, выращиваемых на матриксах из биоПЭГилированного ПОБ не происходило.

Таким образом, полученные нами результаты, а именно изменение морфологии клеток, отложение солей кальция, повышение активности ЩФ и изменение экспрессии маркеров фенотипирования (CD 45 и CD 11b/c) (Pittenger et al., 1999; Yoshikawa et al., 1996; Caliari and Harley, 2014) свидетельствуют о том, что наблюдается дифференцировка МСК при их выращивании на матриксах не только в остеогенной среде, но и в стандартной культуральной среде, т.е. имеет место спонтанная остеогенная дифференцировка, а такие полимерные материалы как ПОБ и его композит с ПЭГ способны к индукции дифференцировки МСК в этом направлении, тогда как биоПЭГилированный ПОБ практически не обладает этой способностью. Это позволяет использовать как МСК, так и матриксы, обладающие способностью к их остеогенной дифференцировке для регенерации костной ткани (Деев и др., 2007; Деев и др., 2011).

Полученные нами данные по спонтанной дифференцировке МСК, культивируемых на матриксах из ПОБ подтверждаются другими исследователями. Было показано, что матриксы из ПОБ и его сополимеров (ПОБВ, ПОБГк) стимулируют дифференцировку остеобластов и мезенхимальных стволовых клеток человека, крысы, кролика (выделенных как из жировой ткани, так и из костного мозга) в остеогенном направлении при росте клеток на них (Shumilova et al., 2017; de Paula et al., 2013; Wang et al., 2004; Misra et al., 2010; Köse et al., 2003; Cool et al., 2007; Saad et al., 1998; Wei et al., 2009; Yang et al., 2004). Дифференцировка МСК при росте на скаффолдах из природных ПОА была подтверждена по изменению морфологии клеток, угнетению их пролиферации, увеличению активности щелочной фосфатазы, отложению солей кальция в клетке (de Paula et al., 2013; Wang et al., 2004; Misra et al., 2010; Köse et al., 2003; Saad et al., 1998; Yang et al., 2004) и экспрессии маркеров остеогенной дифференцировки и формирования костной ткани (щелочной фосфатазы, коллагена 1-ого типа, *Runx2*, остеокальцина, остеопонтина) с помощью иммуноферментных методов и ПЦР (Shumilova et al., 2017; de Paula et al., 2013). Впрочем, в некоторых работах индукция остеогенной дифференцировки при росте эмбриональных предшественников остеобластов на матриксах не была подтверждена (Zhang et al., 2015). Впрочем, необходимо отметить, что, как и в случае биосовместимости, биологическая активность полимеров, в частности, их влияние на дифференцировку МСК, зависит как от их физико-химических свойств (химический состав, кристалличность, гидрофобность), так и микроструктуры изделий из них (морфология поверхности, пористость, размер пор). Особенно значительное влияние на дифференцировку МСК может оказывать именно микроструктура и топография конструкции, на которой растут

клетки, и этот эффект может даже нивелировать воздействие на клетки биоактивных молекул, стимулирующих их рост или дифференцировку в том или ином направлении (Fischer et al., 2003; Wang et al., 2011; Criscenti et al., 2017). Влияние ПОА на дифференцировку МСК также может быть связано с биоактивностью продукта их биодеградации 3-гидроксибутирата. Так, 3-гидроксибутират вызывает остеогенную дифференцировку остеобластов мыши линии *MC3T3-E1*, определенную по увеличению активности щелочной фосфатазы, отложению кальция (тест на краситель ализариновый красный S) и экспрессии остеокальцина, в концентрациях 0,005-0,1 г/л (0,05 – 1 мМ). Тем не менее, при меньших концентрациях 3-ГБ не обладал подобным действием, а при медленной биодеградации ПОА 3-ГБ как раз и образуется в концентрациях гораздо меньших 0,05 мМ (Zhao et al., 2007). Показано также, что ПОБГк вызывает дифференцировку МСК также и в хондрогенном направлении, что выявлено по изменению экспрессии хондрогенных генов-маркеров МСК: аггрегана, *col2, sox9, col10* и *pthrp* (Wang et al., 2011). Интересно, что реализация эффектов ПОА на пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клеток может осуществляться через интегрины – молекулы межклеточных контактов и распознавания. Было показано, что дифференцировка МСК и апоптоз остеобластов осуществляется по каскадному механизму, который запускается при взаимодействии ПОА с интегринами на поверхности клетки (Wang et al., 2012; Wang et al., 2013). Кроме того, подобная биологическая активность ПОБ может быть связана как с не до конца изученной физиологической ролью эндогенного ПОБ, так и слабоизученной его ролью как сигнальной молекулы в симбиотических отношениях бактерий микробиоты с клетками различных тканей человека, что может выражаться в неспецифическом влиянии на дифференцировку МСК (Бонарцев и др., 2018).

Таким образом, из полученных данных следует, что матриксы из ПОБ и его композита с ПЭГ влияют на изменение фенотипа МСК, которые растут в них. Тогда как матрикс из биоПЭГилированного ПОБ оказывает гораздо менее выраженное влияние на МСК, что видно, как по активности щелочной фосфатазы, так и по экспрессии поверхностных маркеров. Более того, подавление спонтанной дифференцировки МСК при их культивировании на матриксе из биоПЭГилированного ПОБ полностью подтверждается данными по лучшему росту клеток на матриксе из этого сополимера по сравнению с ростом МСК на матриксах из ПОБ, т.к. дифференцировка МСК приводит к подавлению их пролиферации.

3.8.6.4. Исследование регенерации костной ткани при использовании матриксов на модели дефекта кости in vivo

Для того чтобы исследовать остеогенные свойства матриксов из биоПЭГилированного ПОБ была использована модель некритического дефекта бедренной кости (1,5 мм) кости крысы, исследование тканевой реакции проводили на сроках 3, 7, 14, 40, 90 и 180 суток (Рисунок 175).

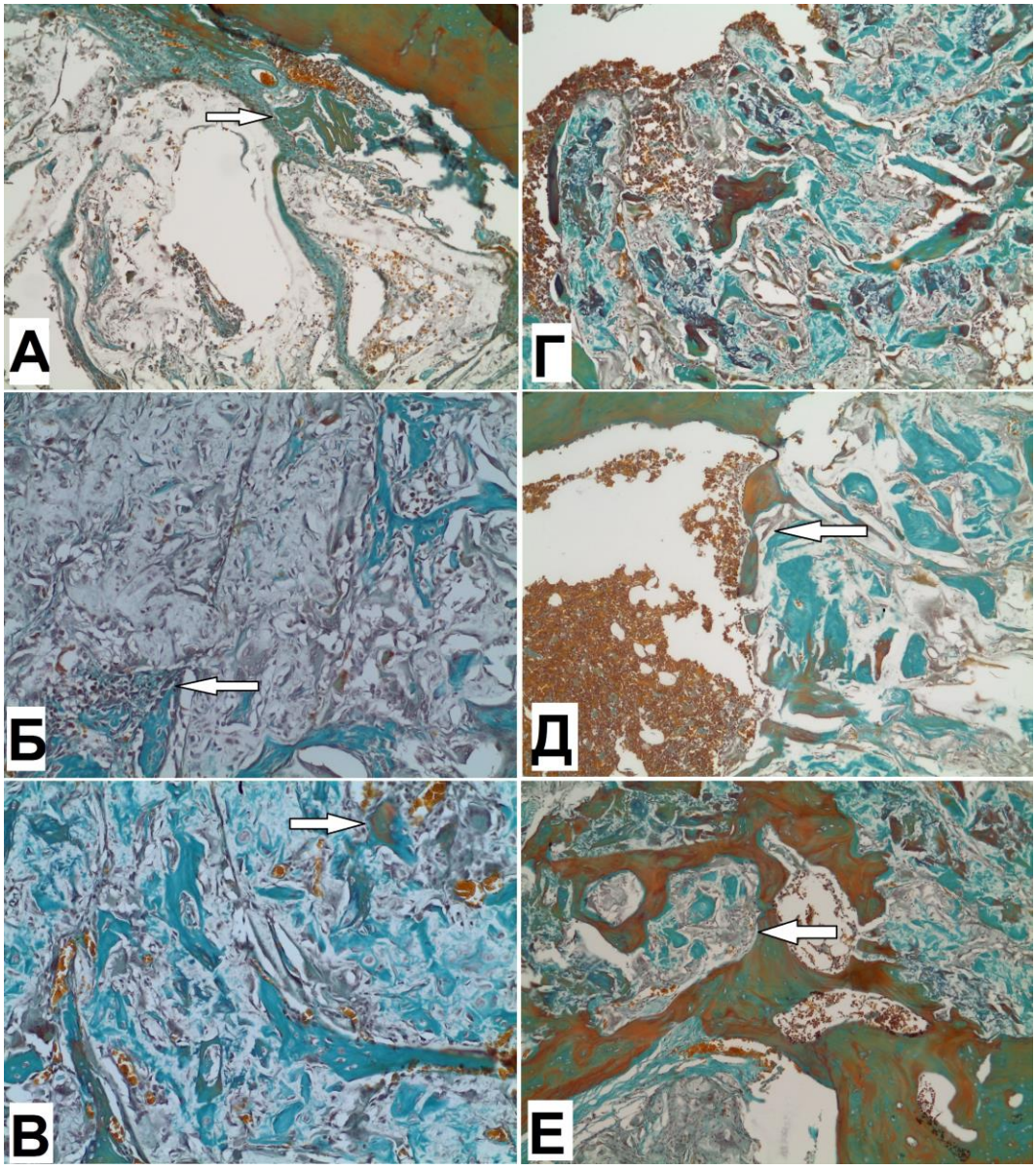


Рисунок 175. *Поперечные срезы костной ткани в области некритического дефекта бедренной кости крысы через 3 (А), 7 (Б), 14 (В), 40 (Г), 90 (Д) и 180 (Е) суток после имплантации 2D-матриксов из ПОБ. Оригинальная окраска трихромовым синим (оранжевый G, эозин, толуидиновый синий, основной фуксин), × 100 (А), × 200 (Б). (Выполнено совместно с ст.науч.сотр. ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова» МЗ РФ Волковым А.В.).*

Результаты гистологического исследования демонстрируют, что с 3-ьх суток имплантации матриксов в костную ткань происходит прорастание новообразованной костной ткани (голубая окраска – это коллаген костного межклеточного вещества) в поры 2D-матриксов и образование ее островков (показан стрелкой на Рисунке 175А). Воспалительная реакция (гранулематозное воспаление) была слабо выраженной, хотя на 7-ые сутки в зоне имплантации присутствовали гигантские клетки инородных тел (серые) с большим количеством ядер (10-20), одновременно присутствуют остеобласты (показаны стрелкой), соединительно-тканная капсула не стала образовываться (Рисунок 175Б). На 14-ые сутки стали формироваться костные балки (плотная костная ткань окрашена в бурый цвет и лежит среди окрашенный в голубой менее плотной) и созревали остеоциты (Рисунок 175В). При этом рост костной ткани происходит хаотично, что, по-видимому, характерно для роста костной ткани в порах матрикса. Наблюдалась активная васкуляризация матриксов, которая была связана с образованием новой костной ткани – по всей видимости предшественники остеобластов проникали в поры матрикса из проросших туда капилляров. Через 90 суток формировалась компактная костная ткань в виде регулярно расположенных костных балок, которая полностью заполняла поры матрикса, тогда как полимерное вещество матрикса подвергалась постепенной биорезорбции остеокластами. Яркой особенностью этого процесса было то, что хорошо заметно отсутствие фиброзной капсулы на границе между матриксом и костным мозгом (показано стрелкой) (Рисунок 175Д). Через 180 суток происходит замыкание костного дефекта, происходит формирование зрелой губчатой кости, которая заполняет весь объем, ранее занятый матриксом, вытесняя его остатки на край (полость кости обозначена стрелкой).

Из литературы известно, что в большинстве случаев для ПОБ и его сополимеров наблюдается хорошая биосовместимость. Не отмечена острая воспалительная реакция, не регистрировались абсцессы или некрозы тканей вблизи полимера. Более того, на достаточно удаленном от имплантата расстоянии, отсутствовали клеточная реакция и клеточная мобилизация (Qu, 2006; Freier, 2002; Kawaguchi, 1992). В целом ряде работ при сопоставлении тканевой реакции ПОБ и синтетических полиэфиров ПЛА, ПГА или их сополимеров продемонстрировано, что, для ПОБ тканевая реакция мягкая или умеренная, тогда как для ПЛА, ПГА и ПЛГА нередко наблюдается выраженная хроническая воспалительная реакция (Agrawal, 1997; Vacanti, 2012; Solheim, 2000; Böstman, 2000; Lickorish, 2004; Khouw, 1998; Su, 2005; Ceonzo, 2006; Kim, 2007; Taylor, 1994).

При стандартном исследовании тканевой реакции при подкожной имплантации ПОБ и его сополимеров в виде пленок, применяемом в протоколах доклинических исследований, наблюдается слабая или умеренная тканевая реакция на чужеродный материал, в течение 1

месяца формируется тонкая фиброзная капсула (около 100 мкм), в ряде работ показано рассасывание этой капсулы после биодеградации образцов (Qu et al., 2006; Freier et al., 2002). Во многих работах показано очень малое количество или практически полное отсутствие лимфоцитов (в частности, Т-лимфоцитов) в области имплантации ПОБ, что свидетельствует о значительно сниженной или отсутствующей иммунной реакции на этот полимерный биоматериал (Shumilova et al., 2017; Malm et al., 1992a; Malm et al., 1994).

А какое же влияние оказывает сополимеризация с ПЭГ на ПОА? В работе Li с соавт. исследовали тканевую реакцию на имплантацию химически синтезированного сополимера ПОБГк-ПЭГ для закрытия дефекта брюшной стенки мышей. Было показано, что тканевая реакция была более мягкая и не отличалась от области ложной операции уже на 14 сут. после имплантации, тогда как воспалительная реакция на имплантацию ПОБГк еще сохранялась, что, как предполагают авторы, было связано с возрастанием гидрофильности, ускорением биодеградации и увеличением пластичности пленок из сополимера ПОБГк с ПЭГ (Li et al., 2009).

Рядом исследователей также было показано, что, несмотря на высокую биосовместимость, ПОБ и его сополимеры не являются биологически инертными материалами. Помимо того, что они, как уже было отмечено, активируют при имплантации клетки иммунной системы, вызывая секрецию ими провоспалительных цитокинов (Löbler et al., 2002; Löbler et al., 2003), что характерно для обычной тканевой реакции на имплантацию практически любых материалов, ПОБ и его сополимеры обладают, по-видимому, и собственной биологической активностью. Показано, что изделия из ПОБ (неплетеные заплаты, пористые матриксы) способствуют регенерации тканей различных органов: костей, сердца и сосудов, нервов, кишечника; показана высокая васкуляризация (ангиогенез) в зоне восстановления дефектов ткани с использованием изделий из ПОБ (Malm et al., 1992a; Malm et al., 1992b; Malm et al., 1992c; Malm, 1994; Castellano et al., 2014; Löbler et al., 2003; Shumilova et al., 2017; Hazari et al., 1999; Novikov et al., 2002; Kose et al., 2003a; Иванов и др., 2015; Бонарцев и др., 2018б; Volkov et al, 2020). Особенно ярко проявляется биологическая активность ПОБ и его сополимеров при их использовании в качестве костезамещающих биоматериалов. На критических (теменной кости черепа крысы) и некритических (бедренной кости крысы) моделях костных дефектов было показано, что пористые матриксы из ПОБ способствуют регенерации костной ткани. На всех стадиях процесса регенерации костного дефекта отмечалась минимально выраженная тканевая реакция на имплантацию, связанная с постепенной клеточной биорезорбцией полимерного материала, активная васкуляризация матриксов и прорастание образующейся костной ткани в

порах матрикса из ПОБ. Регенерация костной ткани в матриксе из ПОБ указывало также экспрессия остеогенных маркеров, например, коллагена I типа (Shumilova et al., 2017).

Мы наблюдали появление новообразующейся костной ткани равномерно по всему объему пористого биополимерного матрикса в виде островков, а не с его краев, при этом фиброзная капсула вокруг материала не образовывалась, что указывает на полную интеграцию биополимерного материала с костной тканью (Иванов и др., 2015; Бонарцев и др., 2018б). Показан высокий уровень васкуляризации (ангиогенеза) при использовании конструкций на основе ПОБ в зоне дефекта костной ткани (Rentsch et al., 2010; Shumilova et al., 2017; Paula et al., 2020). Все это указывает на превосходную биосовместимость ПОБ с костной тканью и его выраженную остеокондуктивную и даже остеоиндуктивную способность. Некоторые исследователи связывают биологическую активность ПОБ и его сополимеров, полученных бактериальным биосинтезом, с тем, что полимерный материал может быть плохо очищен от бактериального липополисахарида или ДНК, но в этих же работах видно, что даже очень хорошо очищенный полимер все равно способен активировать клеточный ответ (Wu et al., 2006).

Биологическая активность пористых матриксов из ПОБ и его сополимеров ПОБВ, ПОБГк, ПОБВГк была показана и на клеточном уровне *in vitro*. Так, было показано, что терполимер ПОБВГк стимулировал пролиферацию кератиноцитов человека линии *HaCaT* при росте клеток на полимерных пленках, полученных осаждением из раствора. Исследование механизма стимуляции пролиферации клеток с использованием наночастиц из этого биополимера показало, что добавление наночастиц из ПОБВГк в концентрации от 0,02 до 0,1 г/л стимулировало увеличение тока ионов кальция в цитоплазму клетки, что является одним из основных сигнальных путей активации их деления. В работе этих авторов было показано, что продукт деградации ПОА мономер 3-гидроксибутират также самостоятельно вызывает активацию пролиферации кератиноцитов человека линии *HaCaT* и фибробластов мыши *L929* в концентрации от 0,01 до 0,1 г/л (0,1 – 1 мМ) по механизму увеличения концентрации ионов кальция в цитоплазме клетки, а также подавляет апоптоз и некроз фибробластов (Ji et al., 2008; Cheng et al., 2005; Cheng et al., 2006). Подобная биоактивность 3-гидроксибутирата неудивительна, поскольку он является естественным метаболитом в организме млекопитающих, так называемым кетоновым телом, и обладает выраженной разносторонней биологической активностью (Nelson and Cox, 2008). Однако помимо 3-гидроксибутирата биологической активностью могут обладать и олигомеры ПОА. Так, показано, что олигомеры ПОБ и его сополимеров с 4-оксибутиратом и 3-оксигексаноатом (с длиной цепи 20-25 мономеров) не токсичны для клеток (до концентрации 20 мкг/мл) и обладают биологической

активностью, стимулируя пролиферацию, подавляя апоптоз, выброс кальция в цитоплазму и образование межклеточных контактов между В-клетками поджелудочной железы мышей (Yang et al., 2009). Следует отметить, что в отличие от высокомолекулярных полимеров олигомеры ПОА растворимы в воде. Так, после гидролитического разложения ПОБ и водной экстракции продуктов деградации полимера в воде были обнаружены олигомеры ПОБ с длиной цепи до 7 остатков 3ГВ (Athlan et al., 1997). Более того, позже было показано, что олигомеры ПОБ, состоящие из примерно 25 остатков 3ГВ, конъюгированные с липоевой кислотой, также были растворимы в воде (Maksymiak et al., 2012).

Было показано, что скаффолды из ПОБ и его сополимеров (ПОБВ, ПОБГк) стимулируют дифференцировку остеобластов и мезенхимальных стволовых клеток человека, крысы, кролика (выделенных как из жировой ткани, так и из костного мозга) в остеогенном направлении при росте клеток на них (Saad et al., 1998; Kose et al., 2003a; Wang et al., 2004; Yang et al., 2004; Cool et al., 2007; Wei et al., 2009; Misra et al., 2010; de Paula et al., 2013; Shumilova et al., 2017; Volkov et al., 2020). Дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток (стромальных стволовых клеток) (МСК) при росте на скаффолдах из ПОА была подтверждена по изменению морфологии клеток, угнетению их пролиферации, увеличению активности щелочной фосфатазы, отложению солей кальция в клетке (Saad et al., 1998; Kose et al., 2003a; Wang et al., 2004; Yang et al., 2004; Misra et al., 2010; de Paula et al., 2013; Volkov et al., 2020;) и экспрессии маркеров остеогенной дифференцировки и формирования костной ткани (щелочной фосфатазы, коллагена 1-ого типа, *Runx2*, остеокальцина, остеопонтина) с помощью иммуноферментных методов и ПЦР (de Paula et al., 2013; Shumilova et al., 2017; Volkov et al., 2020). Впрочем, в некоторых работах индукция остеогенной дифференцировки при росте эмбриональных предшественников остеобластов на матриксах не была подтверждена (Zhang et al., 2015). Влияние ПОА на дифференцировку МСК также может быть связано с биоактивностью продукта их биодеградации 3-гидроксибутирата. Так, 3ГБ вызывает остеогенную дифференцировку остеобластов мыши линии *MC3T3-E1*, определенную по увеличению активности щелочной фосфатазы, отложению кальция (тест на краситель Ализариновый красный S) и экспрессии остеокальцина, в концентрациях 0,005-0,1 г/л (0,05 – 1 мМ). Показано, что 3ГБ обладает остеоиндуктивным действием *in vivo*, продемонстрированном на модели остеопороза у самок крыс с удаленными яичниками. Тем не менее, при меньших концентрациях 3-ГБ не обладал подобным действием, а при медленной биодеградации ПОА 3ГБ как раз и образуется в концентрациях гораздо меньших 0,05 мМ (Zhao et al., 2007). Показано также, что ПОБГк вызывает дифференцировку МСК в хондрогенном направлении, что выявлено по изменению экспрессии хондрогенных генов-маркеров МСК: аггрегана, *col2, sox9, col10* и *pthrp*

(Wang et al., 2011). В других исследованиях показано, что ПОБ, ПОБГк, ПОБВГк, ПОБО и их композиты, а также ПМК стимулируют дифференцировку МСК в нейрогенном направлении, что выражается в изменении морфологии клеток и экспрессии ими генов специфических белков: нестина, глиального фибриллярного кислого белка и βIII-тубулина (Wang et al., 2010; Lizarraga-Valderrama et al., 2015). Это также теоретически могло бы быть связано с показанным ранее нейропротекторным действием 3ГБ, если бы не тот факт, что позитивное воздействие 3ГБ на нервную систему обусловлено питательной (энергетической) функцией жирных кислот, в т.ч. 3ГБ для нейронов и проявляется при очень больших дозах этих веществ (Zhang et al., 2013). Однако, было показано также, что 3ГБ стимулирует образование щелевых контактов между нейронами для передачи электрического сигнала, чем может объясняться вызываемое им улучшение памяти и обучения (Zou et al., 2009). Интересно, что реализация эффектов ПОА на пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клеток может осуществляться через интегрины – молекулы межклеточных контактов и распознавания. Было показано, что дифференцировка МСК и апоптоз остеобластов осуществляется по каскадному механизму, который запускается при взаимодействии ПОА с интегринами на поверхности клетки (Wang et al., 2012; Wang et al., 2013).

Однако, как и в случае биосовместимости, следует отметить, что биологическая активность полимеров, в частности, их влияние на рост и дифференцировку клеток, зависит как от их физико-химических свойств (химический состав, кристалличность, гидрофобность), так и микроструктуры изделий из них (морфология поверхности, пористость, размер пор) (Fischer et al., 2003; Wang et al., 2011).

Объяснение биологической активности ПОБ, его способности стимулировать регенерацию тканей, возможно, лежит в этом ключе. Так, способность биополимера вызывать дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток в остеогенном направлении может быть связано не только его гидрофобностью и механической жесткостью. Возможно, что этот биополимер выполняет некие неизученные пока сигнальные функции в нашем организме, посредством которых бактерии микробиоты «общаются» с клетками иммунной системы, слизистой кишечника и других тканей, вызывая у них тот или иной физиологический ответ. Причем, рассмотренное выше участие молекул межклеточных контактов и распознавания интегринов в реализации биологических эффектов ПОБ (Wang et al., 2013; Wang et al., 2012), а также данные об осуществлении биологического ответа посредством ковалентного связывания ПОБ с белками (Reusch, 2013) также может быть связано с сигнальной функцией этого биополимера. Соответственно, обладая, возможно, такими сигнальными функциями по отношению к клеткам, ПОБ и может неспецифически воздействовать на МСК, изменяя

скорость их пролиферации или дифференцировку. Но при этом, ПОБ не вызывает выраженной активации иммунного ответа, в отличие от, например, липополисахарида клеточных стенок бактерий, хотя этот биополимер также содержат симбиотические бактерии микробиоты. Это можно объяснить, вероятно, тем, что ПОБ не является для иммунной системы маркером каких-то опасных для организма состояний.

Подводя итог сказанному выше, можно вернуться к самому началу обзора и попробовать разобраться в причинах уникальных свойств ПОБ и его сополимеров: преимущественно клеточной биодеградации, неиммуногенности, совместимости с клетками различных типов, наличием регенерационного потенциала для различных тканей, а также соответствующих биомедицинских свойств синтетических ПОА как аналогов ПОБ, уже на другом уровне, принимая во внимание различные природные функции ПОБ. Можно предположить, что биосовместимость и неиммунногенность ПОБ связаны с тем, что он может синтезироваться в постоянном режиме в организме человека с самых ранних периодов его жизни или являться естественным продуктом микробиоты человека. Соответственно, иммунная система человека воспринимает ПОБ как эндогенный естественно присущий организму биополимер, поэтому и не происходит ее выраженной активации при его имплантации, за исключением тех случаев, когда биополимер загрязнен какими-либо добавками, обработан жесткими методами, сильно изменяющими его надмолекулярную структуру (например, плавлением) или выполнен в виде изделия, структура или морфология поверхности которого само по себе может стимулировать иммунный ответ. Способность ПОБ к биодеструкции фагоцитирующими клетками соединительных тканей связана с его функцией в бактериальной клетке, как запасного вещества, ведь, функциональность запасного вещества определяет возможность его утилизации в ходе биодеградации для дальнейшего использования клеткой в качестве источника энергии и углерода. Причем, подверженность этого запасного вещества гидролитической деструкции крайне нежелательна, т.к. внутри клетки жидкая среда. Соответственно, подверженный гидролитическому расщеплению полимер не будет стабилен или для обеспечения его стабильности потребуются особые усилия, затраты энергии и механизмы, такой полимер нельзя будет контролируемо синтезировать и контролируемо утилизировать. Специализированные клетки в тканях человека (макрофаги, остеокласты) наподобие бактерий тоже способны контролируемо утилизировать имплантированный ПОБ, хотя и используют неспецифические механизмы его биодеструкции, например, вместо специализированной ПОА-деполимеразы – липазу и другие эстеразы. По той же причине ПОБ – довольно гидрофобный полимер. Именно гидрофобность ПОБ позволяет его использовать как запасающее вещество бактериями, т.к. он не влияет на осмотическое давление внутри клетки. Специфическая сложная надмолекулярная

структура ПОБ, возможно, также имеет большое значение как полимерные структуры, играющие некие пока не изученные роли во взаимодействии клеток иммунной системы и симбиотических бактерий и бактерий между собой. Объяснение биологической активности ПОБ, его способности вызывать дифференцировку стволовых клеток и стимулировать регенерацию тканей также может лежать в этом ключе как неспецифическое проявление естественных сигнальных функций ПОБ. Таким образом, затронутая нами область науки еще требует обширного и тщательного исследования.

Таким образом, на модели некритического костного дефекта было показано, что пористые матриксы из ПОБ-ПЭГ и ПОБ способствуют регенерации костной ткани. На всех стадиях процесса регенерации костного дефекта отмечалась минимально выраженная тканевая реакция на имплантацию, связанная с постепенной клеточной биорезорбцией полимерного материала, активная васкуляризация матриксов и прорастание образующейся костной ткани в порах матрикса из ПОБ. Кость росла со стороны эндооста и со стороны сосудов, т.е. по сосудам, по-видимому, стволовые клетки проникают в матрикс и там дифференцируются в остеобласты, образуя костную ткань вокруг сосуда, тогда как в образцах без матрикса костная ткань образуется только с эндооста и не растет внутрь. Мы наблюдали появление новообразующейся костной ткани равномерно по всему объему пористого биополимерного матрикса в виде островков, а не с его краев, при этом фиброзная капсула вокруг материала не образовывалась, что указывает на полную интеграцию биополимерного материала с костной тканью. Все это указывает на превосходную биосовместимость ПОБ с костной тканью и его выраженную остеокондуктивную и даже остеоиндуктивную способность.

Раздел 3.9. Остеогенные свойства 3D-матриксов на основе ПОБ

3.9.1. Структура и морфология 3D-матриксов

Изображения, полученные методом СЭМ и широкопольной световой микроскопии, изготовленных нами 3D-матриксов на основе ПОБ и ПОБ/ГА, показаны на Рисунке 176.

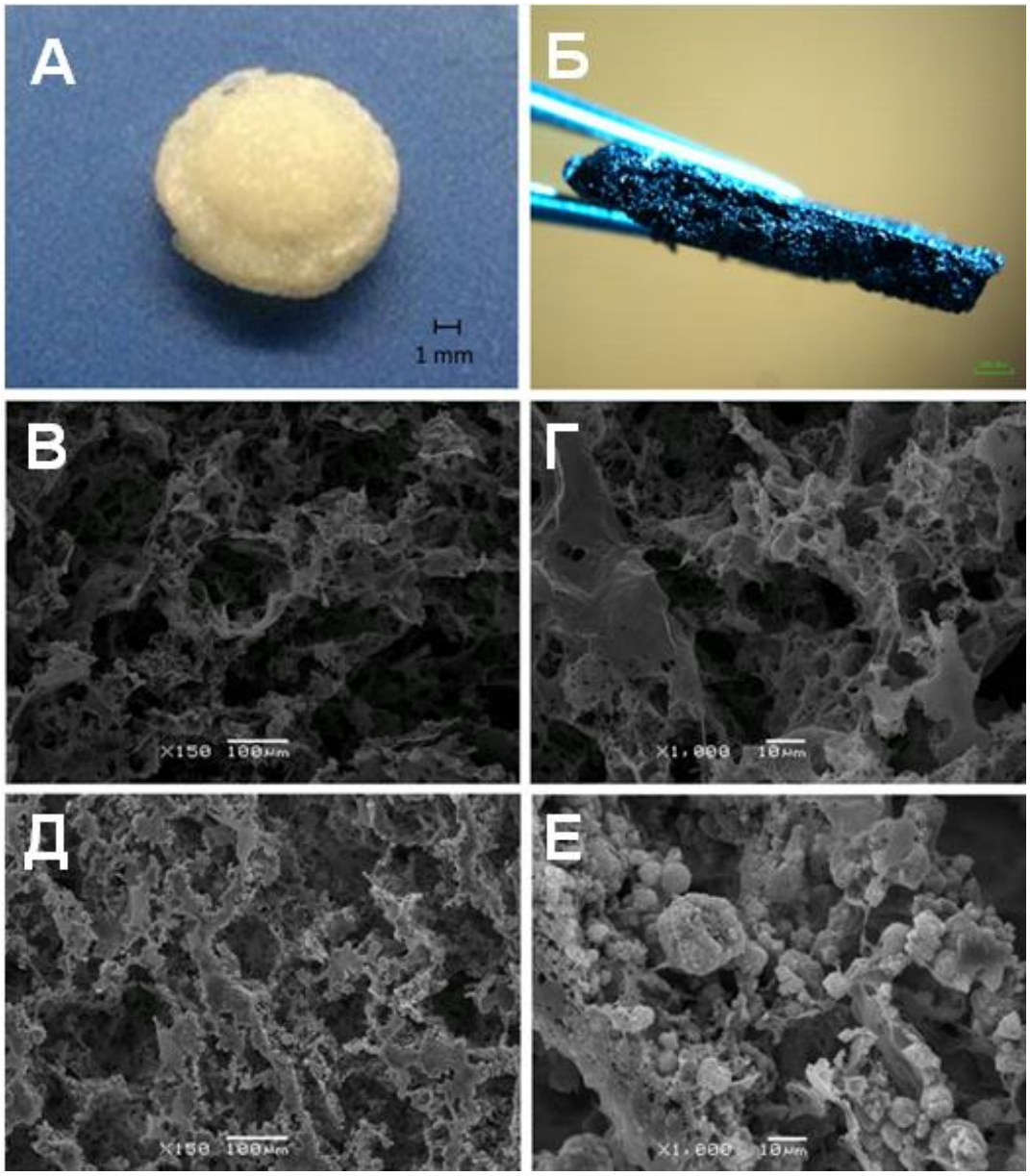


Рисунок 176. *Внешний вид и микроструктура матриксов на основе ПОБ и композита ПОБ/ГА. Внешний вид матрикса на основе ПОБ (А); Микрофотография матрикса на основе ПОБ после чернильного теста (Б); Структура пор матриксов на основе ПОБ, СЭМ, ×150 (В), ×1000 (Г); Структура пор матриксов на основе композита ПОБ/ГА, СЭМ, ×150 (Д), ×1000 (Е). (Выполнено при содействии и на оборудовании Общефакультетской лаборатории электронной микроскопии (отв. проф. кафедры биоинженерии Соколова О.С.).*

Как видно на изображениях СЭМ матриксы из ПГБ/ГА, имеют пористую структуру с порами неправильной формой и шероховатой поверхностью (Рисунок 176В-Е). Чернильный тест показал, что 3D-матриксы на основе ПОБ и ПОБ/ГА имеют взаимосвязанную (сквозную) пористую структуру – в матриксе нет закрытых пор (которые должны быть видны в виде белых пятен) (Рисунок 176Б). Полученные 3D-матриксы из ПОБ и ПОБ/ГА имели относительно высокую пористость (93 ±5% и 88 ±6%, соответственно) и размер пор около 100 мкм (116 ±26 мкм и 104 ±25 мкм, соответственно). Образование композита ПОБ с ГА привело к уменьшению пористости на 5% и уменьшению размера пор на 10% полученных матриксов. На следующем этапе 3D-матриксы были заполнены альгинатным гидрогелем, который затем использовали в качестве средства доставки МСК в поры матриксов. Альгинатный гидрогель полностью заполнял поры матриксов и немного покрывал их снаружи.

Было показано, что трехмерная микроструктура матриксов способствует поддержанию роста введенных в поры матриксов МСК, а также может играть роль проводника для клеток собственной костной ткани организма, то есть остеокластов и остеобластов (Lim et al., 2016; Misra et al., 2010; Murphy et al., 2010; Rumian et al., 2013; Zhang et al., 2010; Ribeiro-Samy et al., 2013; Moisenovich et al., 2015; Houben et al., 2017; Shumilova et al., 2017).

3.9.2. Физико-химические свойства 3D-матриксов

Механические свойства полученных 3D-матриксов сильно различались (Таблица 35). Модуль Юнга и сдвига 3D-матриксов на основе композита ПОБ с ГА больше, чем у матрикса без ГА. Аналогично, матриксы, заполненные альгинатным гидрогелем, обладают более высоким модулем Юнга, чем матриксы, не им заполненные. Например, матриксы ПОБ/ГА/АЛГ имели модуль Юнга в 5 и 20 раз выше по сравнению с матриксами ПОБ/ГА и ПОБ, соответственно. Модуль Юнга самого альгинатного гидрогеля при этом составил 19,2 кПа.

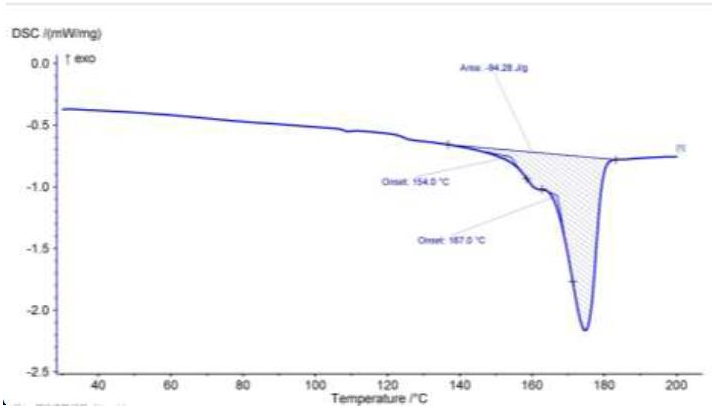
Таблица 35. *Физико-химические свойства 3D-матриксов на основе ПОБ, ПОБ/ГА, ПОБ/АЛГ и ПОБ/ГА/АЛГ. * p <0,05 и **p <0,01 в сравнении с группой ПОБ.*

Полимеры	Модуль Юнга, кПа	Модуль сдвига, кПа	Температура пика плавления ($T_п^{пик}$.,˚C)	Степень кристалличности (X_c,%)	Водопоглощение, %
ПОБ	8.7 ±0.1	54.2 ±2.2	175	64.3 ±1.2	2.4 ±0.8
ПОБ/ГА	34.0 ±0.6*	85.6 ±3.0*	177	60.2 ±1.4*	3.7 ±1.3*
ПОБ/АЛГ	42.0 ±0.8*	66.7 ±2.1*	176	45.9 ±0.9**	226 ±23**
ПОБ/ГА/АЛГ	178.5 ±1.8**	254.3 ±3.7**	178	41.1 ±0.7**	241 ±21**

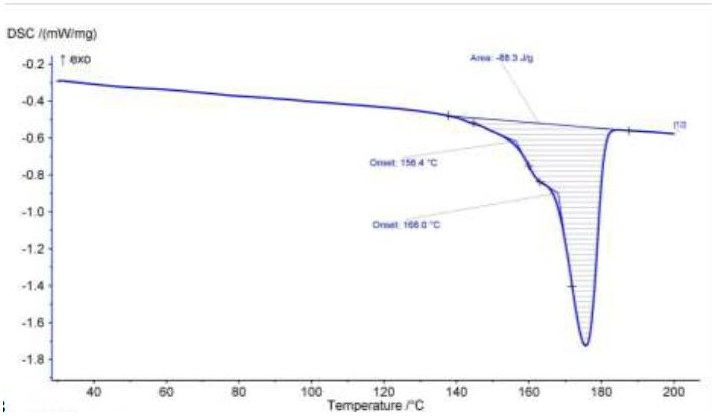
Изготовление матриксов на основе композита ПОБ с ГА и заполнение пористого матрикса альгинатным гидрогелем привело к значительному увеличению их механической прочности. Определение композита следующее: «Конструкционный композит - это система материалов, состоящая из двух или более фаз в макроскопическом масштабе, чьи механические характеристики и свойства подобраны таким образом, чтобы превосходить механические характеристики составляющих его материалов по-отдельности. Одна из фаз обычно прерывистая, более жесткая и прочная и называется армирующей, тогда как вторая, непрерывная, гораздо менее жесткая и прочная, называется матрицей» (Daniel and Ishai, 2006). Таким образом, поскольку матриксы групп ПОБ/АЛГ и ПОБ/ГА/АЛГ намного жестче, чем матрицы на основе ПОБ и ПОБ/ГА соответственно, а также альгинатного гидрогеля (Таблица 35), их можно считать истинными композитами. Причем, матрикс ПОБ/ГА/АЛГ можно определить как сложный анизотропный композит с непрерывными волокнами в армирующей фазе (Daniel and Ishai, 2006), в котором армирующая фаза и матрица представлена совершенно разными материалами по их физико-химическим свойствам: частицы композита ПОБ/ГА и гидрогель альгината кальция.

Параметры теплофизических свойств, рассчитанные по данным термограмм плавления 3D-матриксов представлены в Таблице 35. Температура плавления и степень кристалличности матрикса из композита ПОБ с ГА значительно не изменяются по сравнению с матриксом на основе ПОБ. Между тем, заполнение матрикса альгинатным гидрогелем привело к значительному изменению термограммы: в области низких температур появляется дополнительный широкий пик, который, по-видимому, показывает процесс испарения воды из альгинатного гидрогеля и термическое разложение гидрогеля. Эти процессы искажают всю термограмму, изменяя форму пика плавления ПОБ в области высоких температур (Рисунок 177). Получение композита ПОБ с ГА и заполнение матриксов альгинатных гидрогелей привело к значительному снижению степени кристалличность матриксов ПОБ/ГА/АЛГ на 32% и 36%по сравнению с матриксами ПОБ/ГА и ПОБ, соответственно. Исследование гидрофильности 3D-матриксов с помощью измерения их водопоглощения показало, что композитные матриксы ПОБ/ГА имеют относительно более высокую гидрофильность по сравнению с матриксами только из ПОБ (Таблица 35).

А



Б



В

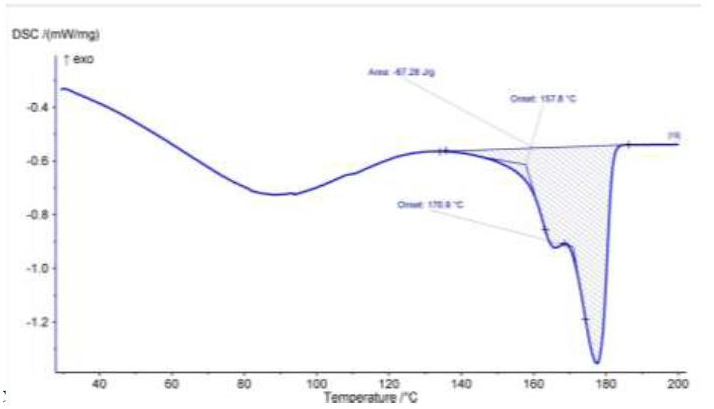


Рисунок 177. *Термограммы ДСК матриксов ПОБ (А), ПОБ/ГА (Б) и ПОБ/ГА/АЛГ (Г). (Выполнено совместно с лабораторией химической термодинамики на Химическом факультете МГУ, на оборудовании ЦКП МГУ (оператор н.с. Быков М.А.))*

По данным анализа матриксов методом ДСК можно также увидеть кумулятивный эффект влияния в композите материалов друг на друга (Таблица 35, Рисунок 177), однако ни ДСК, ни ИК-спектроскопия не могут показать химическое взаимодействие между компонентами в композитах ПОА/АЛГ (Zhu et al., 2002).

Косвенно на увеличение гидрофильности матриксов на основе композита ПОБ с ГА указывает их лучшая способность адсорбировать белок на полимерной поверхности пор матрикса (Рисунок 178), а также большая величина контактного угла смачивания водой пленок из композита ПОБ с ГА - 59.3 ±3,1 по сравнению с 52.4 ±2.7 у пленок из ПОБ. Заполнение 3D-матриксов альгинатным гидрогелем закономерно привело к резкому увеличению их гидрофильности: возрастание водопоглощения составило в 65 и в 100 раз по сравнению с матриксами на основе ПОБ/ГА и ПОБ, соответственно (Таблица 35).

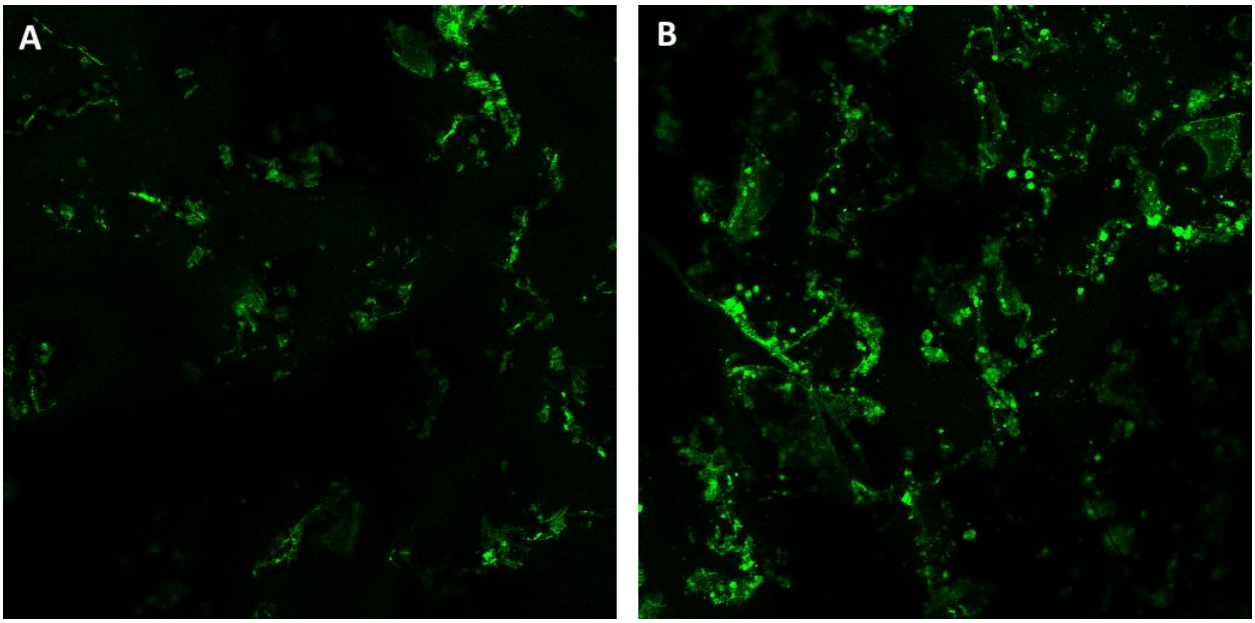


Рисунок 178. *Адсорбция ФИТЦ-БСА на поверхности пор матриксов из ПОБ (А) и ПОБ/ГА (Б) (конфокальная микроскопия, × 100). (Выполнено совместно с сотрудниками научной группы профессора кафедры биоинженерии Феофанова А.В. и на оборудовании ЦКП МГУ).*

Физико-химические свойства полимерные биоматериалов, которые используются для культивирования клеток, играют важную роль в росте и дифференцировки стволовых клеток (Bai et al., 2010; Gorodzha et al., 2017; Kulikouskaya et al., 2018). Физико-химические свойства изготовленных нами композитных матриксов, а именно их относительно невысокая жесткость и сочетание гидрофильных биоматериалов (гидроксиапатит, альгинатный гидрогель) с гидрофобными биоматериалами (ПОБ), также может улучшить сродство биоматериалов с клетками: МСК, остеобластами и остеокластами для лучшей интеграции матрикса с окружающими тканями с последующей индукцией остеогенеза (Salinas and Anseth, 2009; Lomas et al., 2012; Garg et al., 2012; Munoz-Pinto et al., 2012; Jiang et al., 2019). Необходимо отметить, что даже максимальные значения модуля Юнга для полученных 3D-матриксов, равно как и для других типов матриксов в этой работе, были во много раз меньше модуля Юнга самого полимерного материала (модуль Юнга ПОБ >1500 МПа) и самой костной ткани (модуль Юнга

губчатой костной ткани - до 500 МПа) (Odgaard and Linde, 1991). Поэтому эти матриксы могут использоваться только как биоматериал для регенерации костной ткани, но не для поддержания или восстановления биомеханических свойств кости в случае ее повреждения (Rezwan et al., 2006; Oryan et al., 2014; Houben et al., 2017).

3.9.3. Ферментативная деградация 3D-матриксов *in vitro*

Исследование ферментативной деструкции in vitro на матриксов на основе ПОБ и его композита ПОБ/ГА показало, что через 180 сут. происходило почти 3-х кратное падение массы матриксов, менее значительное уменьшение их в объеме (до 30%), 2-х – 3-х кратное возрастание жесткости матриксов и 6-ти – 8-ми кратное увеличение их гидрофильности по параметру водопоглощения (Рисунок 179).

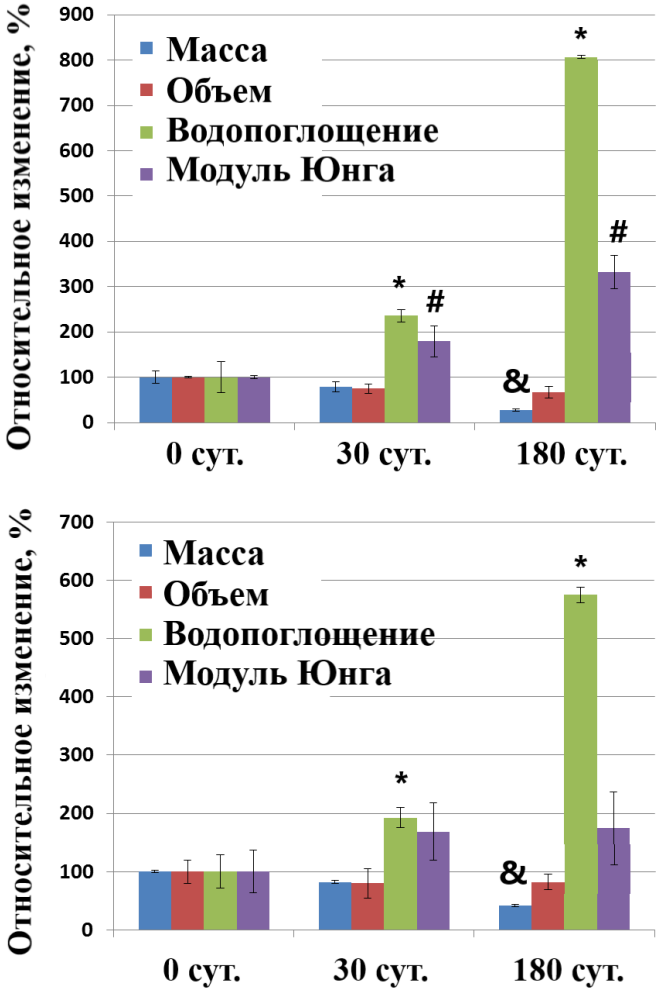


***Рисунок 179**. Относительное изменение массы, объема, водопоглощения и модуля Юнга 3D-матриксов ПОБ (А) и ПОБ/ГА (Б) во время ферментативной деградации in vitro в течение 1 и 6 месяцев. & $p < 0,05$, * $p < 0,05$, # $p < 0,05$ в сравнении с 0 сут. для массы, водопоглощения и модуля Юнга, соответственно.*

Таким образом, можно сделать вывод о выраженном процессе ферментативной деструкции пористых 3D-матриксов, более значительном, чем пленок из ПОБ, что можно объяснить гораздо большей площадью контакта хорошо развитой поверхности пор матриксов с водой и растворенной в ней панкреатической липазой (Volkov et al., 2020).

3.9.4. Рост клеток в 3D-матриксах

В эксперименте были использованы МСК, у которых была подтверждены их характеристики, как стволовых клеток. Количество живых клеток составляло 98,8 ± 0,8% от общего количества. Тестирование жизнеспособности клеток использовалось для оценки эффективности прикрепления и пролиферация МСК в 3D-матриксах на основе ПОБ и его композита ПОБ/ГА по сравнению с пролиферацией МСК в альгинатном гидрогеле и на культуральном пластике (как контроль). Как показано на Рисунке 180, пролиферация клеток в матриксах ПОБ и ПОБ/ГА была намного ниже, чем на культуральном пластике.

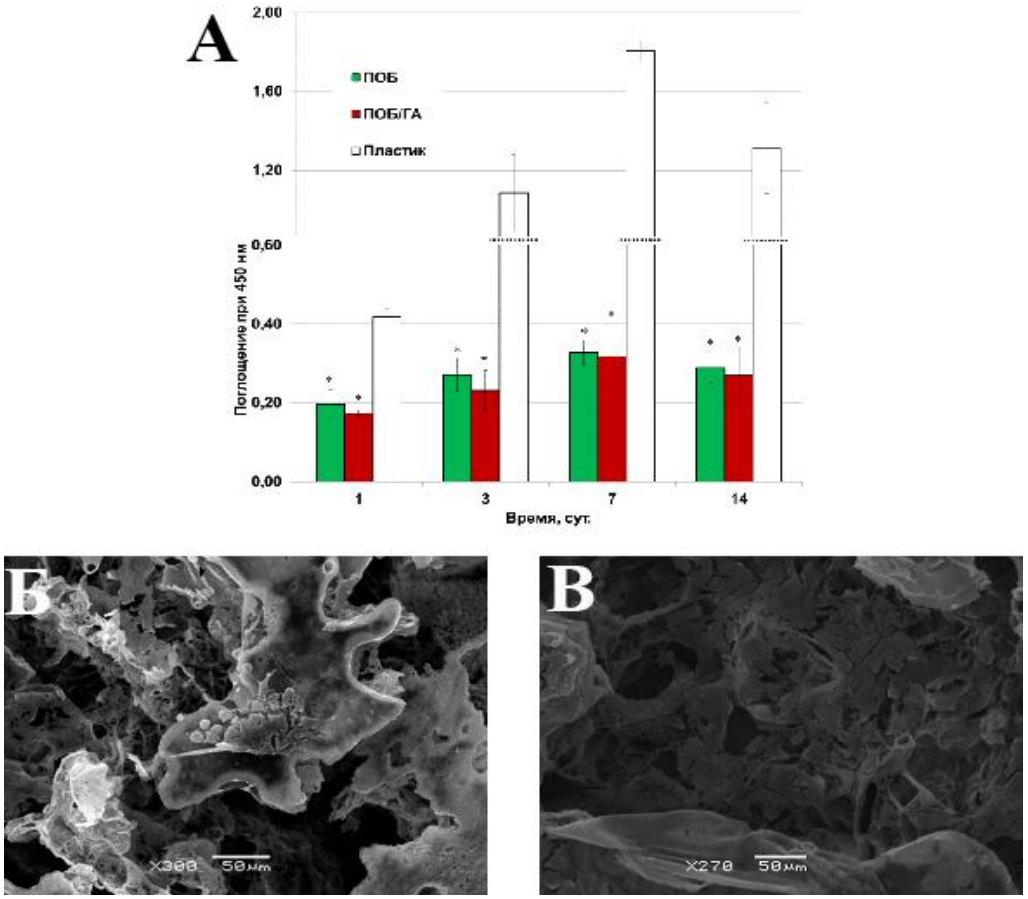


***Рисунок 180**. А - Пролиферация МСК на матриксах из ПОБ. Рост МСК (Б) и фибробластов 3Т3; *p <0,05 в сравнении с группой Пластик. (В) на 3D-матриксах из ПОБ, 14-ый день культивирования (СЭМ: ×270-300). (Выполнено при содействии и на оборудовании Общефакультетской лаборатории электронной микроскопии (отв. проф. кафедры биоинженерии Соколова О.С.).*

Рост МСК в сферах из альгинатного гидрогеля был значительно ниже, чем на культуральном пластике, но также намного выше, чем в матриксах, не заполненных альгинатным гидрогелем. Существенной разницы в пролиферации МСК в матриксах ПОБ и ПОБ/ГА не было обнаружено.

На Рисунке 180Б,В показаны изображения СЭМ прикрепившихся и растущих на поверхности пор матриксов МСК.

3.9.5. Активность щелочной фосфатазы и экспрессия CD45

Чтобы разобраться в причине подавления роста МСК в 3D-матриксах, была измерена активность ЩФ и уровень экспрессии наиболее показательного в динамике остеогенной дифференцировки фенотипического маркера CD45 в МСК, растущих в матриксах ПОБ и ПОБ/ГА в стандартной среде (Рисунок 181А).

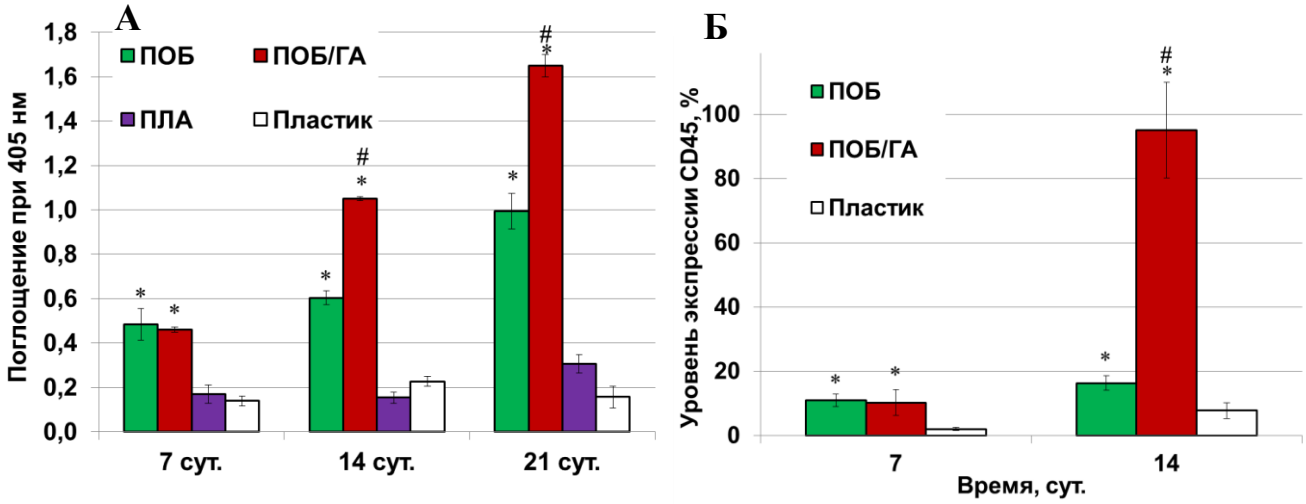


Рисунок 181. *Изменение активности щелочной фосфатазы МСК, культивируемых на 3D-матриксах в стандартной ростовой среде (А). Изменение экспрессии фенотипического маркера МСК CD45 при росте клеток на матриксах в стандартной ростовой среде (Б). *p <0,05 в сравнении с группой Пластик, #p <0,05 в сравнении с группой ПОБ. (Выполнено совместно с ст.науч.сотр. кафедры клеточной биологии и гистологии Поташниковой Д.М. на оборудовании ЦКП МГУ, приобретенном за счет средств Программы развития МГУ).*

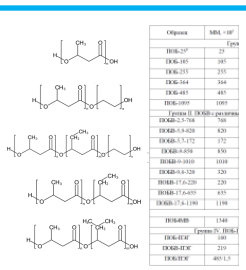
Мы предположили, что снижение роста МСК в 3D-матриксах может быть связано со спонтанной остеогенной дифференцировкой стволовых клеток. Значительное повышение активности ЩФ в МСК, растущих в матриксах из ПОБ и композита ПОБ с ГА (в 2,7 и 4,6 раза, соответственно, по сравнению с клетками, выращенными на культуральном пластике) и

увеличение экспрессии фенотипического маркера CD45 (в 1,9 и 12,2 раза, соответственно, по сравнению с МСК, культивируемыми на пластике) указывает на спонтанную дифференцировку МСК в 3D-матриксах ПОБ и ПОБ/ГА в обычной среде начиная с 7-ых суток культивирования клеток. (Rumian et al., 2013; de Paula et al., 2013; Shumilova et al., 2017; Hosseini et al., 2019). В остеогенной среде такая значительная разница в активности ЩФ у МСК, выращенных в матриксах ПОБ и ПОБ/ГА, в альгинатном гидрогеле и на культуральном пластике не наблюдалась (Volkov et al., 2020).

Таким образом, результаты, изложенные в Разделах 3.8, 3.9 и 3.10, позволили разработать экспериментальную модель исследования влияния полимеров и изделий из них на остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток. Эта модель требует изготовления 2D- и 3D-матриксов, пористых микросфер и других довольно сложно сконструированных конструкций на основе ПОБ, его сополимеров и композитов, которые являются основными объектами исследования. Соответственно, эта модель позволяет исследовать также как морфология этих конструкций влияет на дифференцировку клеток. Основными входными параметрами модели являются морфологические параметры (пористость матриксов, размер и форма пор, диаметр микросфер, топография поверхности, наноструктура поверхности), физико-химические свойства (степень кристалличности, механические свойства, гидрофильность), результаты исследования цитотоксичности и пролиферации клеток на полимерных пленках. Основными выходными параметрами модели являются остеогенные свойства *in vitro,* 2D- и 3D-матриксов, пористых микросфер на основе ПОБ, его сополимеров и композитов (изменение фенотипа клеток, отложение солей кальция, повышение активности щелочной фосфатазы). Для обеспечения функционирования экспериментальной модели используются следующие методики: выделение МСК из костного мозга, культивирование клеток млекопитающих, СЭМ, конфокальная микроскопия, окраска ализариновым красным, измерение активности ЩФ, проточная цитометрия. Уровень происходящих процессов с точки зрения организации живого – клеточный. Основная задача экспериментальной модели – анализ способности ПОБ и его сополимеров, 2D- и 3D-матриксов, пористых микросфер на их основе стимулировать остеогенную дифференцировку МСК, т.е. обладать остеогенными свойствами *in vitro*. Моделируемый идеальный биообъект модели – костная ткань. Временной масштаб экспериментальной модели – до 21 суток, что соответствует продолжительности дифференцировки МСК.

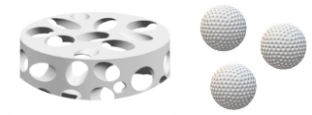
Данные экспериментальной модели биотехнологического получения ПОБ и его сополимеров

Методы изготовления матриксов и микросфер



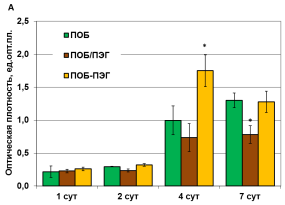
ПОБ и его сополимеры различной ММ и мономерного состава; дополнительные вещества: ГА, ПЭГ

Данные экспериментальной модели исследования взаимосвязи надмолекулярной структуры полимера с его физико-химическими свойствами



2D- и 3D-матриксы, пористые микросферы

21 сут.



Данные по пролиферации клеток в 2D- и 3D-матриксах, на пористых микросферах

Методики культивирования МСК в матриксах *in vitro*

СЭМ, ДСК, реометрия, водопоглощение

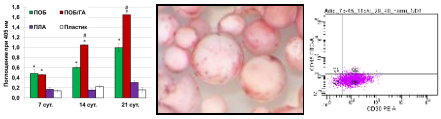


Методика выделения МСК



Мезенхимальные стволовые клетки, фибробласты *3T3*

Культиви-рование в остеогенной среде



Данные по фенотипу МСК и оценка их остеогенной дифференцировки: фенотипирование с помощью проточной цитометрии по маркерам, активность ЩФ, окраска на соли кальция

Полимер	Внешняя сторона, мкм		Внутренняя сторона, мкм		Пористость, %
	разрывные поры	лакуны	разрывные поры	лакуны	
ПОБ	103 ±37#	215 ±137	7 ±4	43 ±15	87 ±7
ПОБ/ПЭГ	33 ±18*	100 ±53	7 ±5	53 ±26	75 ±16
ПОБ-ПЭГ	16 ±5*#	105 ±74	5 ±3	38 ±14	69 ±12*

Данные по параметрам морфологии и физико-химическим свойствам 2D- и 3D-матриксов, пористых микросфер

Клеточный уровень

Использование полученных данных для других моделей

Рисунок 182. *Схема экспериментальной модели влияния полимеров и изделий из них на остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток.*

Получены матриксы на основе поли-3-оксибутирата и его биоПЭГилированного сополимера, обладающие высокой пористостью и средним размером пор около 100 мкм. Матриксы из поли-3-оксибутирата вызывают спонтанную дифференцировку МСК по остеогенному пути, а биоПЭГилирование этого полимера приводит к подавлению этого эффекта. 3D-матриксы с регулируемой микроструктурой и формой из ПОБ и его композита ПОБ/ГА и на основе пористых микросфер из ПОБ также вызывают спонтанную остеогенную дифференцировку МСК.

3.9.6. Исследование биосовместимости *in vivo* 3D-матриксов при их подкожной имплантации

Для исследования биосовместимости *in vivo* 3D-матриксов при их подкожной имплантации матриксы были изготовлены особой формы. Для их получения в качестве шаблонов были использованы не стандартные пробирки или шаблоны, изготовленные с помощью 3D-печати, а стеклянная трубка (См. Раздел Методика, подраздел 2.4.2). Полученные таким образом пористые 3D-матриксы оборачивали пленкой из ПОБВ, которую по краю склеивали с помощью частичного растворения хлороформом (Рисунок 183А). Мы наблюдали, что при подкожной имплантации пористого 3D-матрикса из ПОБ, помещенного в трубку из ПОБВ (Рисунок 183Б), происходит постепенное прорастание соединительной ткани в порах матрикса с края трубки к ее центру, что подтверждает сквозную пористость 3D-матрикса. При этом воспалительная тканевая реакция на биоматериал слабо выражена. Это также свидетельствует о хорошей биосовместимости ПОБ по отношению к мягкой соединительной ткани (Рисунок 183В-Д).

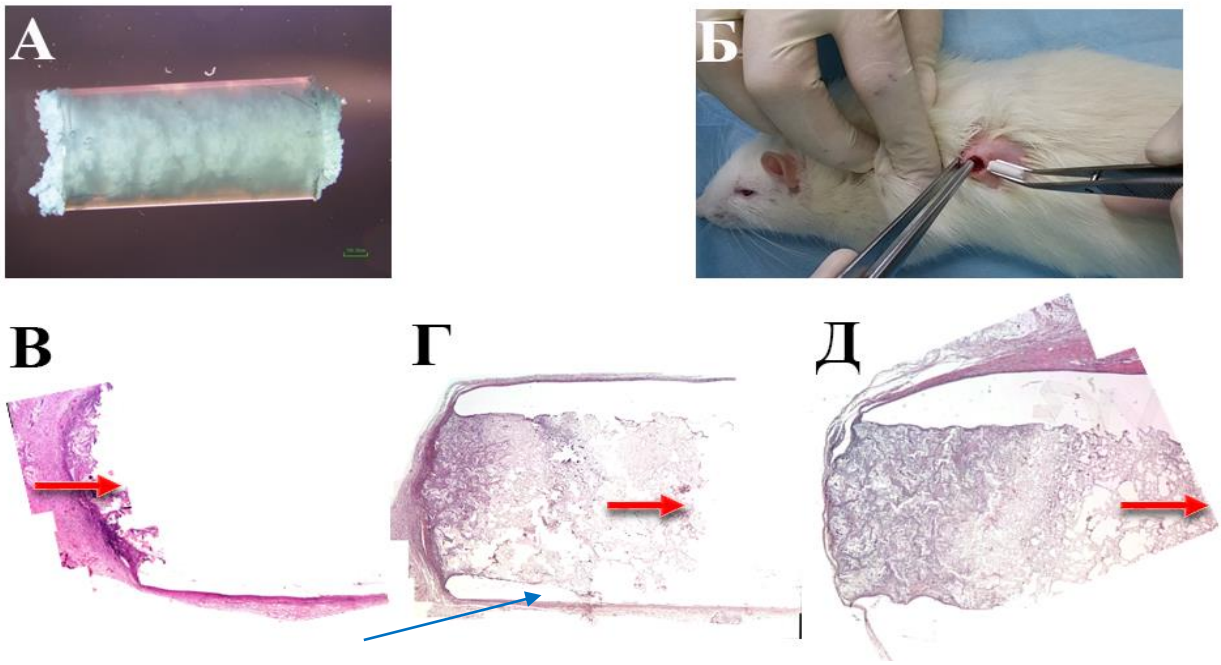


Рисунок 183. *Биосовместимость пористого 3D-матрикса in vivo. А - Пористый матрикс из ПОБ, помещенный в трубку из ПОБВ. Б - Операция по подкожной имплантации пористого полимерного матрикса. Гистологическая картина прорастания соединительной ткани через пористый матрикс из ПОБ в полимерной трубке из ПОБВ: А – 7 сут., Б – 14 сут., В – 28 сут. (красная стрелка – направление прорастания ткани, синяя стрелка – трубка из ПОБВ). (Выполнено совместно с доцентом ФГАОУВО «Российский университет дружбы народов» МЗ РФ Мураевым А.А. и ст.науч.сотр. ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова» МЗ РФ Волковым А.В.).*

3.9.7. Восстановление критического костного дефекта при использовании 3D-матриксов и тканеинженерной конструкции

Полученные 3D-матриксы на основе ПОБ и ПОБ/ГА были использованы для создания тканеинженерных конструкций. Для этого в матриксы были инкапсулированы МСК с использованием раствора альгината натрия в качестве средства доставки клеток в поры 3D-матриксов – суспензией МСК в растворе альгината заполняли поры матрикса, после чего альгинат желировали.

На первом этапе область критического костного дефекта в теменной кости крысы была исследована с помощью компьютерной томографии, чтобы оценить процесс регенерации костной ткани (Рисунок 185). В контроле (без использования 3D-матрикса) через 24 сут. после операции происходило лишь незначительное заживление костного дефекта – восстановление составило лишь 10% площади.

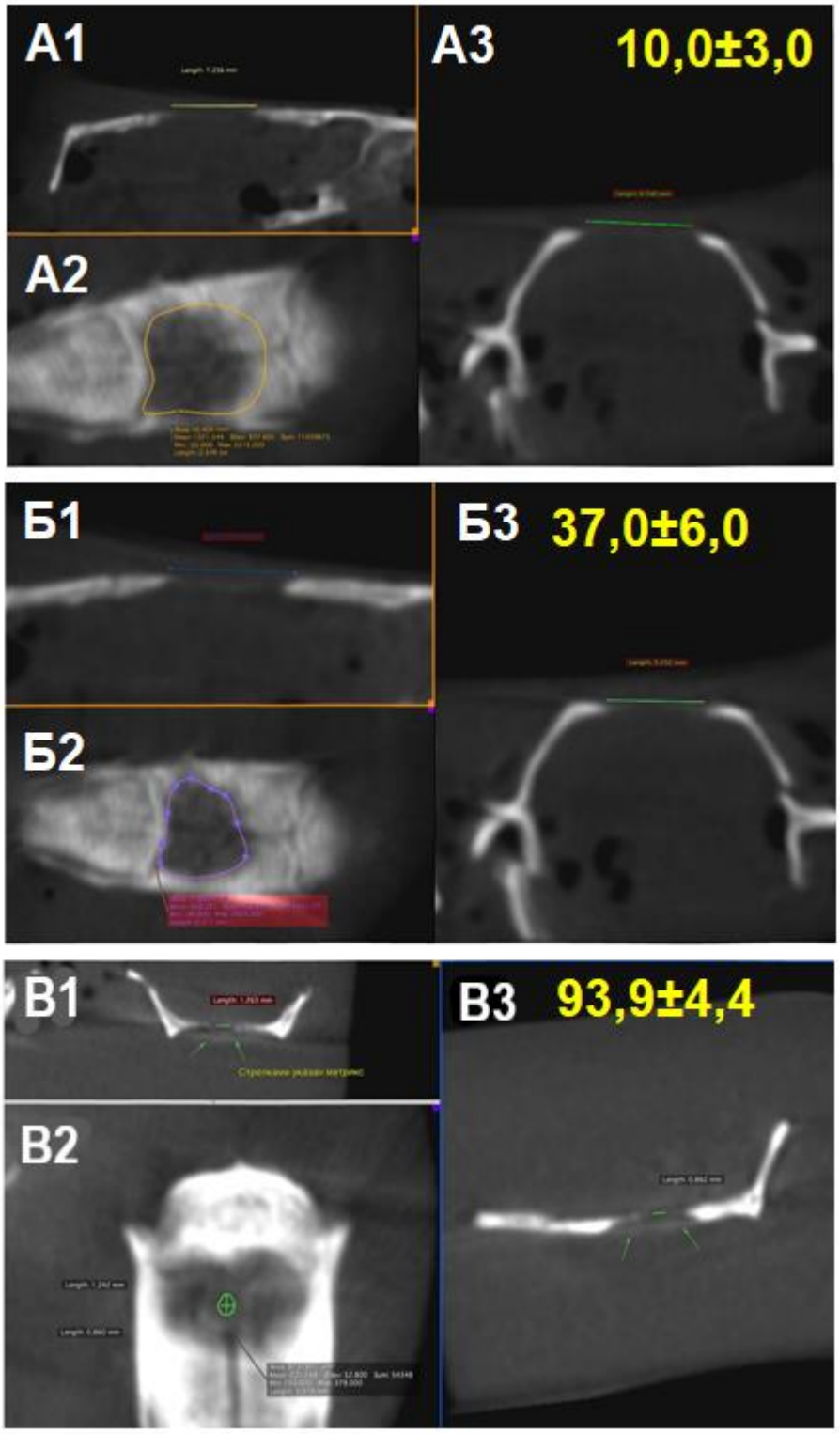


Рисунок 184. *Изображения КТ (сагиттальная (1), аксиальная (2) и корональная (3) проекции) критического костного дефекта через 28 сут. после имплантации бесклеточных ПОБ/АЛГ (Б) и ПОБ/ГА/АЛГ (В) и засеянных МСК ПОБ/ГА/АЛГ/МСК (Г) матриксов в сравнении с контролем без имплантации матрикса (А). Числами желтым шрифтом в правом верхнем углу показаны % закрытия дефекта в каждой группе. (Выполнено совместно с доцентом ФГАОУВО «Российский университет дружбы народов» МЗ РФ Мураевым А.А.).*

Восстановление костных дефектов, которые были заполнены бесклеточными матриксами ПОБ/АЛГ и ПОБ/ГА/АЛГ или засеянными МСК матриксами ПОБ/ГА/АЛГ/МСК было выраженным, происходило образование новой костной ткани с краев дефекта к его центру разной степени эффективности. Выраженной воспалительной реакции при имплантации этих матриксов не наблюдалось. Изображения КТ (сагиттальная, аксиальная и корональная проекции) процесса заживления циркулярного дефекта теменной кости диаметра 8 мм и анализ области его регенерации показаны на Рисунках 184 и 185. 3D-матриксы, засеянные МСК, способствовали почти полному по площади зарастанию костной тканью дефекта теменной кости критического размера (эффективность закрытия исходного дефекта - 93,9 ±4,4). Для экспериментальной группы ПОБ/ГА/АЛГ/МСК изображение КТ с максимальным закрытием (98,3%) показано на Рисунке 184 В1-В3, а изображение КТ с минимальным закрытием (89,6%) костного дефекта представлен на Рисунке 185.

Использование бесклеточных матриксов ПОБ/АЛГ и ПОБ/ГА/АЛГ привело только к частичной регенерации дефект теменной кости критического размера: 37,0 ±5,9% и 60,1 ±6,2% соответственно.



Рисунок 185. *Изображения КТ критического костного дефекта через месяц после имплантации засеянных МСК 3D-матриксов группы ПОБ/ГА/АЛГ/МСК. Площадь неминерализованного костного дефекта составляет около 5 мм^2, что соответствует примерно 10% от начальной площади дефекта. (Выполнено совместно с доцентом ФГАОУВО «Российский университет дружбы народов» МЗ РФ Мураевым А.А.).*

На втором этапе было проведено гистологическое и гистоморфометрическое исследование процессе регенерации критического костного дефекта при использовании 3D-матриксов. Полученные гистологические данные подтвердили результаты КТ в том, что использование засеянных МСК матриксов группы ПОБ/ГА/АЛГ/МСК привело к

прогрессирующему образованию новой минерализованной костной ткани в области регенерирующего дефекта. На Рисунке 186 видно, что диск материала матрикса с пористой структурой лежит над дефектом и окружен соединительной тканью. Под ним наблюдается рост новообразованной кости, при этом с краев критического дефекта роста кости не наблюдалось. Новообразованная кость имеет типичную организацию и зрелую морфологию костной ткани с пластинчатой структурой в виде широких слоев, толщина которых сопоставима с толщиной старой кости. Полного закрытия дефекта новообразованной костью не происходит, но в большинстве случаев возникает сближение и слияния фронтов регенератов с края дефекта (Рисунок 186В). Использование бесклеточных 3D-матриксов групп ПОБ/АЛГ и ПОБ/ГА/АЛГ показало, что происходит образование меньшего количества костной ткани в зоне критического дефекта (Рисунок 186Б). Объем новой минерализованной костной ткани, визуализируемой с помощью трихромового синего, был значительно выше ($p < 0,01$) при использовании засеянных МСК матриксов (92%) по сравнению с бесклеточными матриксами ПОБ/АЛГ (27%) на 28-ые сутки после операции (Рисунок 186Г).

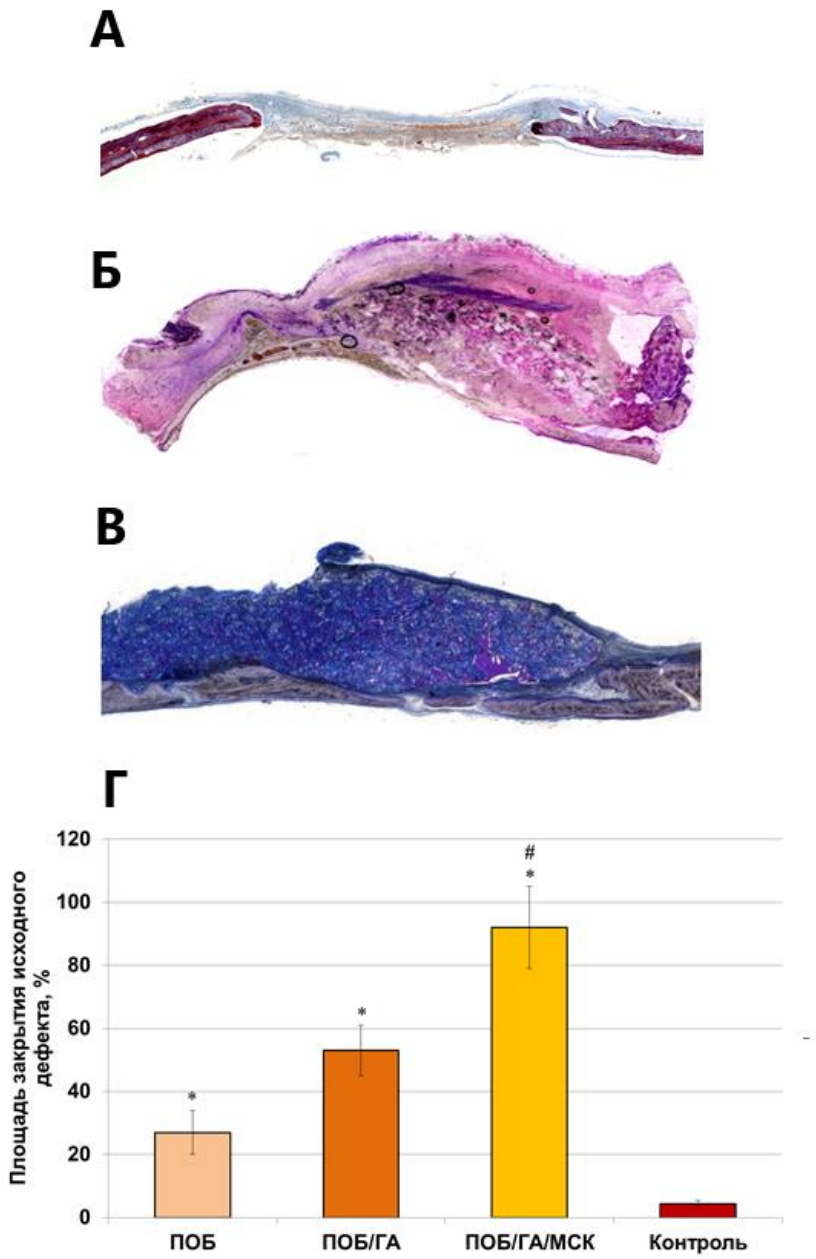


Рисунок 186. *Репрезентативные поперечные срезы (широкоугольные изображения) радиального критического дефекта теменной кости крысы через 28 сут. после имплантации бесклеточных ПОБ (Б) и засеянных МСК ПОБ/ГА/МСК (В) матриксов в сравнении с контролем без имплантации матрикса (А); Оригинальное окрашивание трихромовым голубым (оранж G, эозин, толуидиновый голубой, фуксин основной). Площадь закрытия исходного критического дефекта в разных экспериментальных группах (Д); * p <0.05 в сравнении с Контролем, # p <0.05 в сравнении с группой ПОБ матрикс). (Выполнено совместно с доцентом ФГАОУВО «Российский университет дружбы народов» МЗ РФ Мураевым А.А. и ст.науч.сотр. ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова» МЗ РФ Волковым А.В.).*

Исследование области критического костного дефекта с помощью флуоресцентной микроскопии при использовании флуоресцентного мечения позволило рассмотреть динамику регенерации костной ткани за счет накопления в новообразованной костной ткани флуоресцентных маркеров на трех разных сроках: 1–14 сутки (накопление доксициклина, желтое окрашивание), 15–21 сутки (накопление тетрациклина, зеленое окрашивание) и 22–28 сутки (накопление ализаринового красного, красное окрашивание); синий цвет характеризует свечение фона остеина без флуоресцентных меток. После имплантации засеянных МСК матриксов ПОБ/ГА/АЛГ/МСК основной объем костной ткани сформировался на 22–28 сутки (красное окрашивание) (Рисунок 187В), тогда как образования новой костной ткани после имплантации бесклеточных матриксов ПОБ/АЛГ и ПОБ/ГА/АЛГ в этот период практически не наблюдалось, что свидетельствует о снижении регенерации костной ткани в области дефекта примерно через три недели после операции без дополнительного стимулирования остеогенеза. Основной объем кости для матриксов ПОБ/АЛГ и ПОБ/ГА/АЛГ был окрашен тетрациклином (зеленое окрашивание), что указывает на преобладающий остеогенез в период с 14-ого по 21-ый день (Рисунок 187Б). Однако объем новообразованной костной ткани после закрытия дефекта матриксами, засеянными МСК, был значительно выше на всех этапах процесса заживления костного дефекта по сравнению с использованием бесклеточных матриксов ПОБ/АЛГ и ПОБ/ГА/АЛГ (Рисунок 187Г). Таким образом, имплантация в область критического костного дефекта матриксов, содержащих МСК, продемонстрировало выраженную стимуляцию репаративного остеогенеза (Volkov et al., 2020).

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что матриксы на основе ПОБ и его композита с ГА, заполненные альгинатным гидрогелем, вызвали частичную регенерацию костной ткани в экспериментальной модели дефекта свода черепа критического размера у крыс в течение 1 месяца. Кроме того, эти композитные матриксы в сочетании с МСК, выделенными из костного мозга, значительно улучшили заживление дефекта кости, что указывает на то, что такие гибридные матриксы представляют собой перспективный терапевтическое средство для регенерации костей в челюстно-лицевой хирургии и ортопедии. Следует отметить, что новые технологии восстановления повреждений костей особенно актуальны для черепно-лицевой области, для которой довольно часты из-за травм, инфекционных, воспалительных или опухолевых заболевания, а также наследственных аномалий.

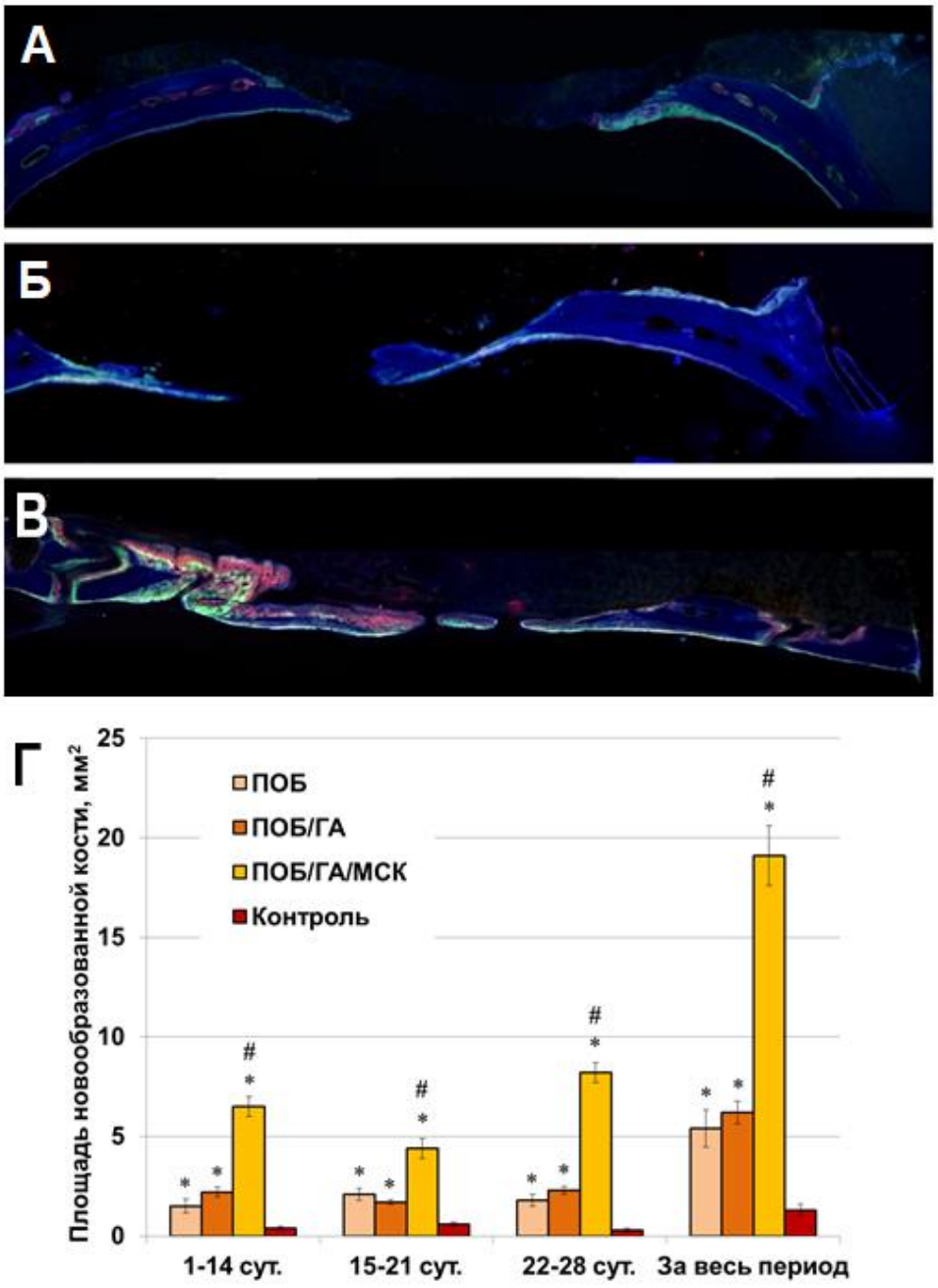


Рисунок 187. *Мультиканальная гистопантомограмма гистологического среза с раздельным флуоресцентным окрашиванием радиального критического дефекта теменной кости крысы через 28 сут. после имплантации бесклеточных ПОБ (Б) и засеянных МСК ПОБ/ГА/МСК (В) матриксов в сравнении с контролем без имплантации матрикса (А). Скорость роста новообразующейся костной ткани при использовании различных типов 3D-матриксов и тканеинженерной конструкции (Г), * p <0.05 в сравнении с Контролем, # p <0.05 в сравнении с группой матрикс на основе ПОБ (Выполнено совместно с доцентом ФГАОУВО «Российский университет дружбы народов» МЗ РФ Мураевым А.А. и ст.науч.сотр. ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова» МЗ РФ Волковым А.В.).*

В настоящее время созданы стандартизованные экспериментальные модели дефектов кости критического размера, которые используются для анализа эффективности остеокондуктивных и остеоиндуктивных биоматериалов для заживления и регенерации костной ткани (Spicer et al., 2012). Костный дефект диаметром от 5 до 8 мм был описан как дефект критического размера у крыс, такие дефекты называются критического размера, т.к. не способны регенерировать в норме без каких-либо дополнительных средств (Schmitz and Hollinger, 1986; Bosch et al., 1998). Соответственно, дефект диаметром 8 мм, что является верхним пределом этого диапазона, был использован в нашей работе для обеспечения высокой воспроизводимости экспериментальной модели дефекта критического размера. Мы предполагаем, что характер влияния разработанных нами гибридных матриксов на регенерацию костной ткани в модели дефекта свода черепа критического размера сложный и многоплановый, он складывается из взаимозависимого влияния основных параметров этих конструкций: их морфологии, свойств составляющих их биоматериалов и биоактивности самих МСК. Следует отметить, что основной целью нашего исследования было не использовать биополимерные матриксы в качестве протеза для кости при закрытии критического костного дефекта (как и некритического костного дефекта), но в качестве остеоиндуктивного биоматериала для стимуляции регенерации костной ткани в этом дефекте.

Биоматериалы матриксов играют ключевую роль в их способности к регенерации костной ткани. Показано, что ПОБ и его сополимеры проявляют остеоиндуктивные свойства in vivo при использовании матриксов, полученных из этих полимеров, для закрытия костных дефектов. Пористые матриксы на основе ПОБ и его сополимеров способствуют регенерации костной ткани, что было продемонстрировано на экспериментальной модели критического (на теменной кости черепа крысы) костного дефекта (Lim et al., 2017). Кроме того, было показано, что ГА имеет выраженную остеоиндуктивную активность (Shi et al., 2018; Jeong et al., 2019). В нашем исследовании остеоиндуктивная активность была показана как для матриксов ПОБ/АЛГ, так и для композитных матриксов ПОБ/ГА/АЛГ. Матриксы, содержащие ГА, вызывали лучшую регенерацию костной ткани на модели критического дефекта кости по сравнению с матриксом ПОБ/АЛГ (Рисунок 188). Остеоиндуктивная активность матриксов ПОБ/ГА/АЛГ при регенерации костной ткани *in vivo* может быть связано со способностью композита ПОБ/ГА индуцировать остеогенную дифференцировку МСК *in vitro*. Выше показано, что МСК, культивированные в 3D-матриксах на основе ПОБ/ГА, в стандартной культуральной среде претерпевают дифференцировку в остеогенном направлении. Эти матриксы вызывали выраженное повышение активности ЩФ и экспрессии CD45 (Рисунок 181). Подобная спонтанная дифференцировка МСК в стандартной культуральной среде или стимуляция

остеогенной дифференцировки МСК в остеогенной среде показана не только для композитных матриксов ПОА/ГА (Kim et al., 2007; Lü et al., 2013; Degli Esposti et al., 2019), но даже для матриксов из чистых ПОА (Shumilova et al., 2017; de Paula et al., 2013; Hosseini et al., 2019). Матрицы на основе композита ПОБ с биостеклом также индуцируют повышение активности ЩФ в остеобластоподобных клетках MG63, культивируемых в них в стандартной среде (Hajiali et al., 2012; Saadat et al., 2013). Гидрогели, например, альгинатный гидрогель также используется для инженерии костной ткани, но в основном в качестве средства доставки и инкапсулирования клеток и биоактивных веществ (Salinas and Anseth, 2009; Garg et al., 2012; Venkatesan et al., 2015; Apte et al., 2019). Мы использовали гидрогель альгината кальция в качестве средства доставки и инкапсуляции МСК в полимерные матриксы, т.к. это нейтральное вещество широко используется для инкапсуляции различных клеток (Hoffman, 2002; Tan and Takeuchi, 2007). Было показано, что период полураспада плотного альгинатного гидрогеля после его внутримышечной имплантации - около 4 дней (Shkand et al., 2016). Обмен сшивающих гидрогель катионов кальция с одновалентными катионами натрия - основная причина растворения кальциево-сшитого альгинатного гидрогеля (Lee and Mooney, 2012; Matyash et al., 2014) с резкой потерей механической прочности: было показано, что модуль сдвига альгинатного гидрогеля снизился с 155 кПа до 5 кПа в течение 2-х суток (Shahriari et al., 2016). Таким образом, после имплантации матриксов ПОБ/АЛГ, ПОБ/ГА/АЛГ и ПОБ/ГА/АЛГ/МСК, плотный альгинатный гидрогель держится всего несколько дней. Тогда как, как мы предлагаем, прикрепление и пролиферация инкапсулированных МСК в матриксе ПОБ/ГА/АЛГ/МСК может происходить в порах каркаса матрикса на основе ПОБ/ГА, как было показано in vitro (Рисунок 180). А позже происходит прорастание имплантированных матриксов с постепенным замещением альгинатного гидрогеля новообразованной костной тканью (Рисунки 184 и 185). Однако примечательно тут то, что наиболее эффективная регенерация костного дефекта критического размера была достигнута с помощью засеянных МСК композитных матриксов ПОБ/ГА/АЛГ/МСК (Рисунки 184, 185, 186 и 187). После имплантации матриксов ПОБ/ГА/АЛГ/МСК основной объем костной ткани формировался на 22–28 сутки (красное окрашивание) (Рисунок 183), тогда как формирования костной ткани после имплантации бесклеточных матриксов ПОБ/АЛГ и ПОБ/ГА/АЛГ в этот период практически не наблюдалось. Это свидетельствует о снижении регенерации костной ткани теменной кости примерно через 3 недели после повреждения без дополнительного влияния. Нам неизвестно, формируют ли инкапсулированные МСК напрямую новую костную ткань или они инициируют каскад процесса естественной регенерации ткани, как происходит при имплантации аутологичных костных трансплантатов, но наблюдаемое отсроченное остеогенное действие

матриксов, засеянных МСК, скорее всего, может быть связано с биоактивностью стволовых клеток. Мы предлагаем, что инкапсулированные МСК в матриксах могут способствовать регенерации кости, благодаря стимуляции остеогенной активности по отношению к этим клеткам полимерно-минеральной составляющей матриксов, поскольку мы наблюдали регенерацию костной ткани в основном из краев к центру дефекта (Рисунки 186 и 187). Возможно также, что по крайней мере некоторые клетки со стимулированной остеогенной дифференцировкой могут мигрируют из матрикса в пространство костного дефекта, вызывая формирование межклеточного матрикса костной ткани. Это может объяснить образование островков костной ткани (Рисунки 186Г и 187Г) при использовании засеянных МСК матриксов, тогда как они отсутствует при использовании бесклеточных матриксов.

Полученные результаты показывают, что биомиметический матрикс на основе композита ПОБ/ГА как армирующей конструкции и альгинатного гидрогеля в качестве матрицы могут использоваться для разработки изделий для регенерации костной ткани. Было продемонстрировано, что разработанная технология сочетания непрямой 3D-печати и технологии выщелачивания с регуляцией пористости и размера пор является перспективной для изготовления матриксов со сложной формой и структурой, подходящей для культивирования в них МСК и для прорастания костной ткани. Кроме того, было показано, что матриксы ПОБ и ПОБ/ГА способны вызывать остеогенную дифференцировку МСК. Таким образом, разработанные гибридные конструкции на основе матриксов ПОБ/ГА, заполненных МСК-содержащим альгинатным гидрогелем, усиливают регенерацию критического костного дефекта благодаря остеоиндуктивных свойств матрикса и регенеративного потенциала МСК, который проявляется при помещении клеток в биополимерно-минерально-гидрогелиевые матриксы. Эти результаты подтверждают высокий потенциал природных биоматериалов как костезамещающих материалов и тканевой инженерии для регенерации костной ткани.

Следует отметить, что разработана тканеинженерная конструкция, состоящая из композитного полимерного 3D-матрикса и клеток – МСК, является как моделью искусственной костной ткани, так и сложным экспериментальным объектом, свойства которого можно исследовать только при использовании других экспериментальных моделей, прежде всего: модели исследования влияния полимеров и изделий из них на остеогенную дифференцировку МСК и модели некритического и критического костных дефектов для изучения остеогенных свойств полимеров и изделий из них *in vivo* (Рисунок 188).

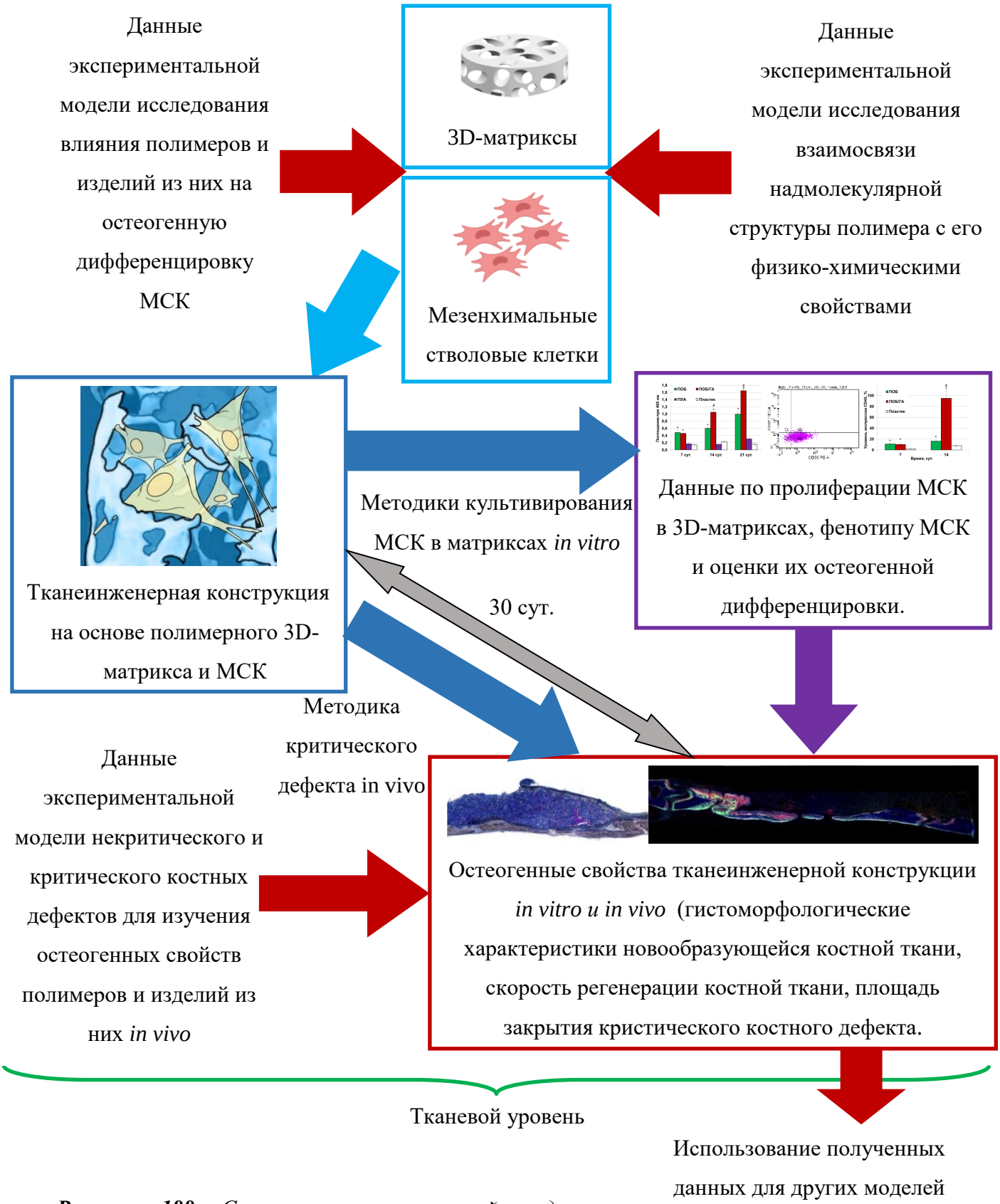


Рисунок 188. *Схема экспериментальной модели - тканеинженерной конструкции на основе полимерного 3D-матрикса.*

Такое комплексное исследование позволило продемонстрировать, что разработанные гибридные конструкции на основе матриксов ПОБ/ГА, заполненных МСК-содержащим альгинатным гидрогелем, усиливают регенерацию критического костного дефекта благодаря остеоиндуктивных свойств матрикса и регенеративного потенциала МСК, который проявляется при помещении клеток в биополимерно-минерально-гидрогелевые матриксы. Эти результаты подтверждают высокий потенциал природных биоматериалов как костезамещающих материалов и тканевой инженерии для регенерации костной ткани.

Раздел 3.10. Остеогенные свойства 3D-матриксов из пористых микросфер на основе ПОБ

Диаметр полученных микросфер составил 510±60 мкм, диаметр пор - 2,5±0,5, а пористость – 90%.

На полученных изображениях со сканирующего электронного микроскопа можно видеть, что МСК формируют на матриксах из больших микросфер островки монослоя (Рисунок 189).

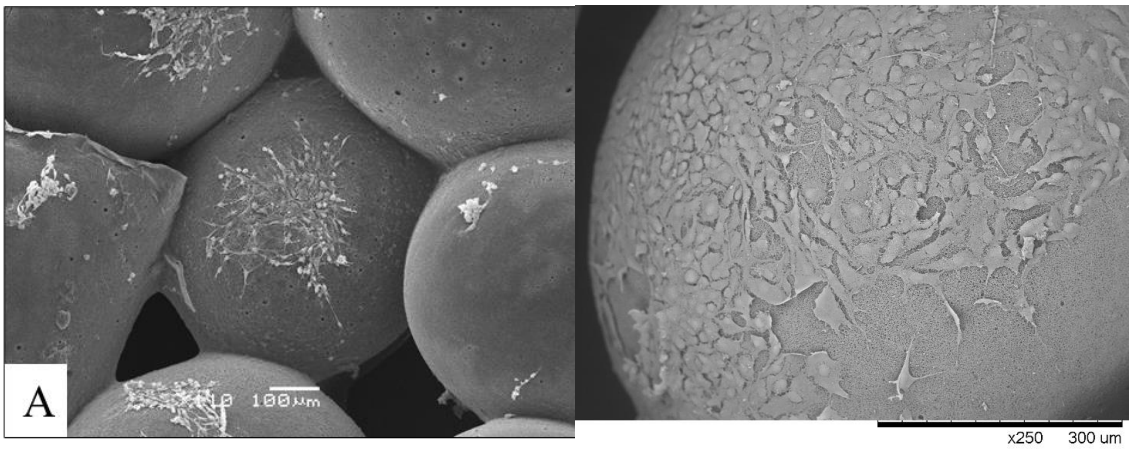


Рисунок 189. *МСК, растущие на матриксах из микросфер, СЭМ, ×110 (А), ×250 (Б). (Выполнено при содействии и на оборудовании Общефакультетской лаборатории электронной микроскопии (отв. проф. кафедры биоинженерии Соколова О.С.).*

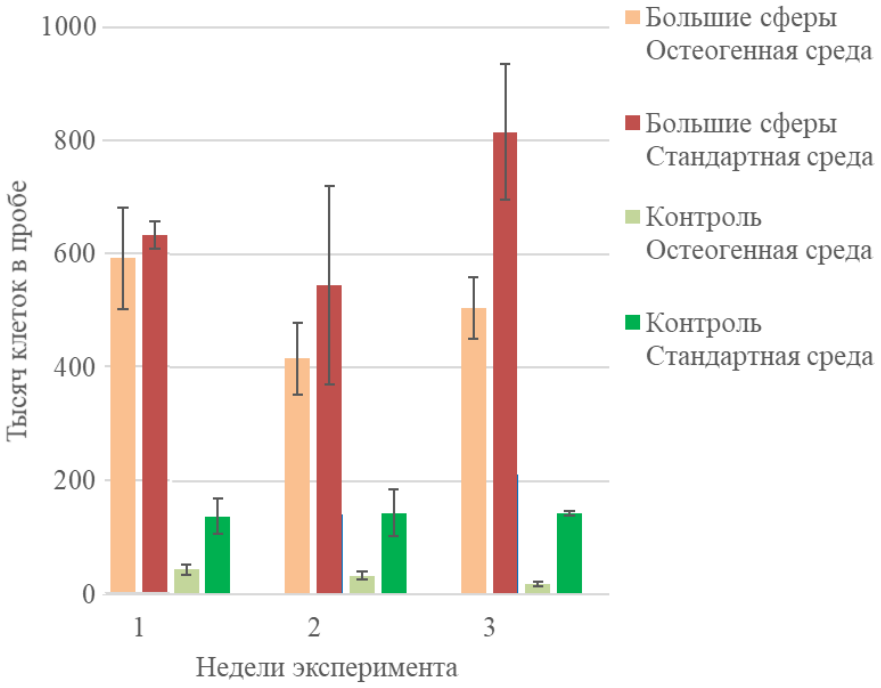


Рисунок 190. *Оценка численности клеток на 3D-конструкциях по общему белку.*

На Рисунке 190 видно, что число клеток при культивировании на 3D-матриксах из крупных микросфер намного превышает их число на культуральном пластике. Это объясняется тем, что в отличие от контроля на культуральном пластике на конструкциях не наблюдается угнетения роста.

На изображениях, полученных со стереомикроскопа, видно, что в образцах идет процесс минерализации матрикса (Рисунок 191), что свидетельствует о том, что клетки дифференцируются в остеобласты.

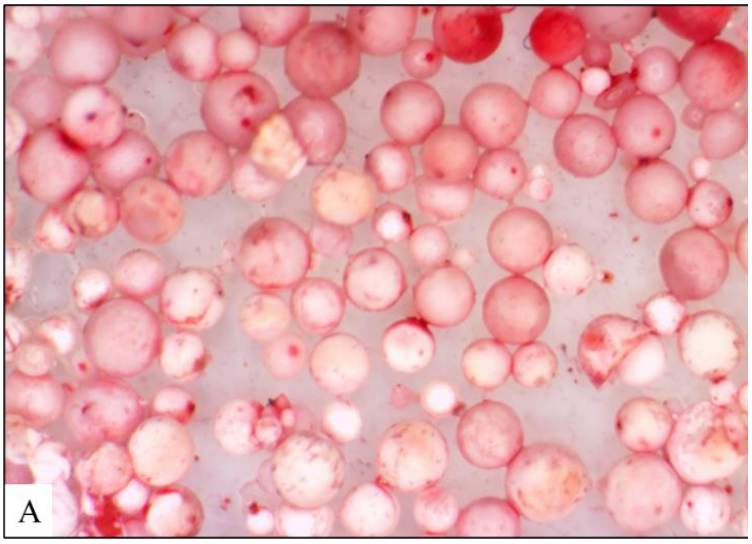


Рисунок 191. *Дифференцирующиеся МСК на матриксах из больших микросфер (увеличение ×10). Окрашивание ализариновым красным.*

Ниже представлены фотографии гистологических срезов, на которых видно, что уже на шестой день после имплантации матрикса из ПОБ на срезе внутри микросфер обнаруживаются кровеносные сосуды, проросшие сквозь поры (Рисунок 192, наиболее крупные сосуды отмечены маркерами).

На 14 сутки на поверхности микросфер можно обнаружить формирующуюся ретикуло-фиброзную костную ткань, которую можно видеть на Рисунок 192Б, отмеченную большими маркерами. Кровеносные сосуды в сферах становятся крупнее и лучше заметны на фотографии (отмечены овалами). К 30 дню на поверхности микросфер и внутри крупных пор обнаруживаются участки сформировавшейся пластинчатой кости (Рисунок 192В).

Через три месяца вокруг микросфер сформирована, постепенно сливающаяся в одну пластинчатая кость (Рисунок 192Г). Кроме того, тонкие трубочки костной ткани можно заполняют крупные поры микросфер. Внутри этих костных трубочек присутствуют кровеносные сосуды и появляется костномозговой канал с костным мозгом. Внутрипоровые

остеоиды имеют тенденцию сливаться и перестраиваться в более масштабные костные структуры, которые обведены на рисунке овалами.

В контрольном образце процессы заживления протекают нормально для изучаемого срока: костномозговой канал заполнен рыхловолокнистой соединительной тканью с кроветворными элементами.

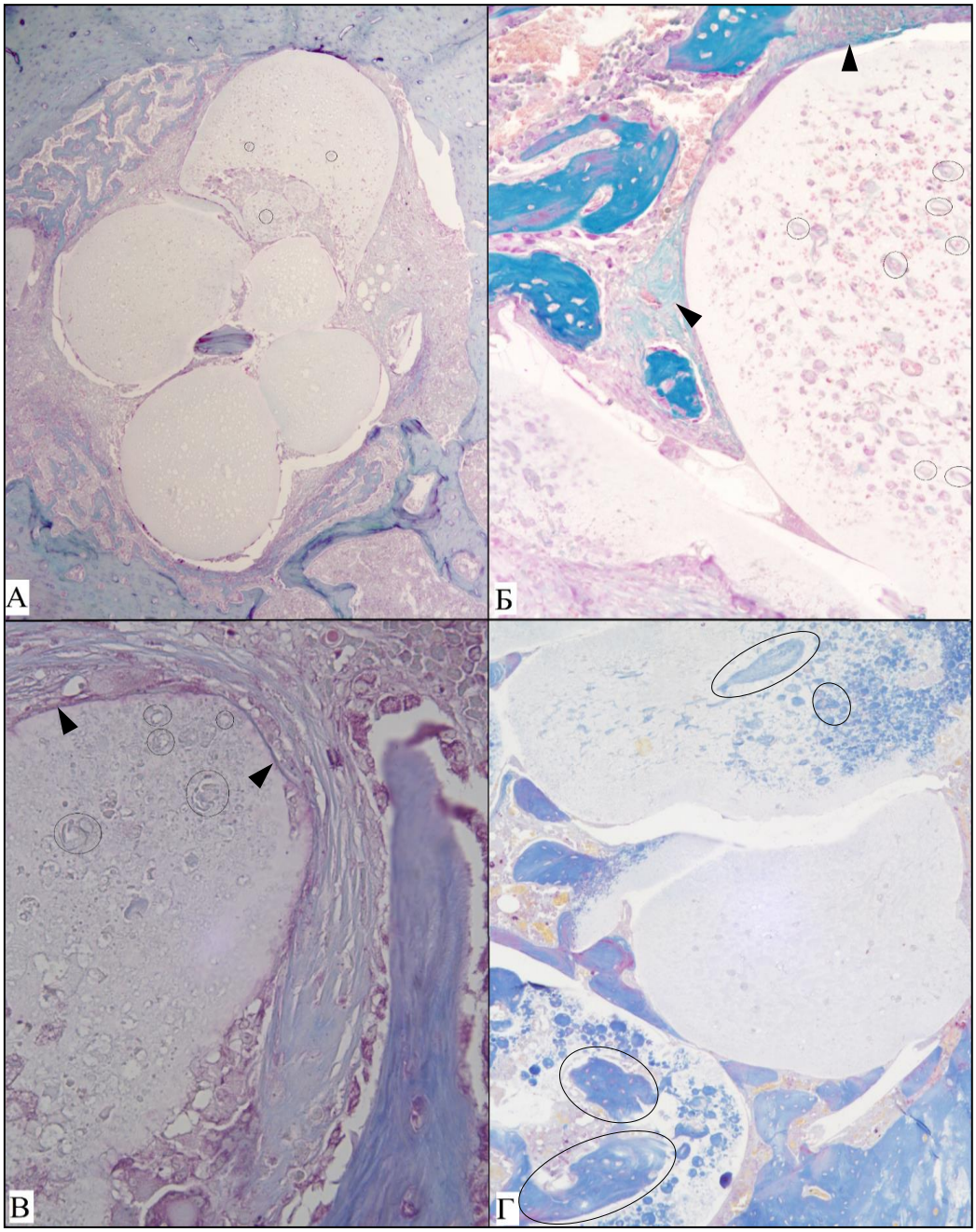
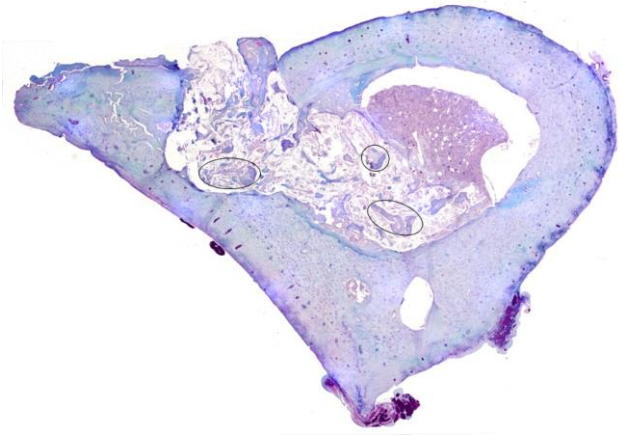


Рисунок 192. *Гистологический срез образцов матрикса из больших микросфер в бедренной кости крысы. Окраска по Маллори. А – через 6, Б – через 14, В – через 30 и Г – через 90 дней по операции. (Выполнено совместно со ст.науч.сотр. ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова» МЗ РФ Волковым А.В.).*

В препарате-сравнении с использованием матрикса из поли-L-лактида на 14 сутки наблюдаются участки формирования ретикуло-фиброзной ткани (Рисунок 193А). К 30-му дню эксперимента на поверхности полилактидной пленки присутствует костный матрикс с признаками его реконструкции, а спустя три месяца не обнаруживается никаких следов ни материала, ни новообразованной костной ткани (Рисунок 193Б). То есть происходит резорбция сформировавшихся остеоидов. Костномозговой канал через три месяца, как и в контроле, заполнен рыхноволокнистой соединительной тканью. Во всех исследуемых образцах через три месяца произошло зарастание костного дефекта.

А



Б

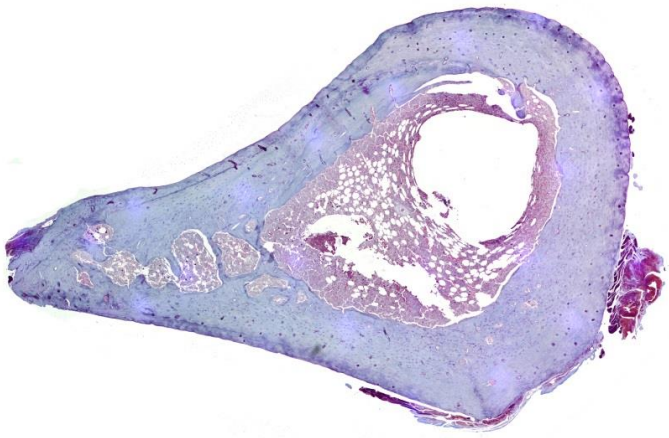


Рисунок 193. *Гистологический срез образцов матриксов на основе полилактида в бедренной кости крысы через 14 (А) и 90 суток (Б) после операции. Окраска по Маллори. Овалами отмечены участки формирования ретикуло-фиброзной ткани. (Выполнено совместно со ст.науч.сотр. ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова» МЗ РФ Волковым А.В.).*

В случае пористых микросфер мы видим не только проявление уже наблюдаемого остеоиндуктивного эффекта ПОБ, стимулирующего образование костной ткани в порах матрикса, но и более активное биорассасывание полимерного материала. Важную роль играет адгезия макрофагов на поверхности полимерного материала, было показано, что биодеградация полимерных мембран происходит только тогда, когда на их поверхности адгезируются макрофаги. Если же макрофаги не имеют физической возможности прикрепиться к мембране, деградации полимера не происходит (Bat et al., 2009). Для ПОБ показано, что макрофаги и остеокласты прочно адгезируются и пролиферируют на полимерных пленках (Cool et al., 2007). Интересные данные, раскрывающие механизм тканевой реакции, которая способствует биодеградации ПОБ, были получены Лёблер (Löbler) с соавторами. Ими отмечено значительное увеличение экспрессии двух типов липаз после 7 и 14 дней контакта ПОБ с тканями животных. Кроме того, в печени наблюдали увеличение экспрессии липаз этих же типов. Это кажется удивительным, но ферменты поджелудочной железы также индуцировались в стенке желудка после контакта с биоматериалом (Löbler, 2002). Saito T. с соавторами предположили присутствие, по крайней мере, двух ферментов деградации в тканях крыс: сериновой эстеразы печени с максимальной активностью в щелочной среде (pH = 9,5) и эстеразы почек с максимальной активностью в нейтральной среде (Saito et al., 1991). Участие макрофагов в биодеградации ПОБ было продемонстрировано в опытах на культивируемых макрофагах с частицами ПОБ низкой молекулярной массы (Saad et al., 1996). Установлено, что макрофаги и в меньшей степени фибробласты способны фагоцитировать частицы из ПОБ размером 1-10 мкм. При высоких концентрациях частиц из ПОБ (>10 мкг/мл) фагоцитоз сопровождается токсическим воздействием и изменением функционального состояния макрофагов, но не фибробластов (Saad et al., 1996), тогда как наночастицы (15-250 нм) из ПОБ и его сополимеров не оказывали значительного цитотоксического действия на макрофаги даже при такой большой концентрации как 1 мг/мл, в отличие от наночастиц из ПМК (Xiong et al., 2010). Фагоцитоз микрочастиц из ПОБ сопровождался увеличением продукции оксида азота (NO) и фактора некроза опухолей альфа (TNF-α) в активированных макрофагах, а при фагоцитозе большого количества микрочастиц происходила гибель макрофагов. Также было продемонстрировано, что фагоцитоз частиц из ПОБ со временем уменьшается благодаря активному процессу биодеградации ПОБ (Saad et al., 1996). Интересно, что к эндоцитозу микрочастиц из низкомолекулярного ПОБ *in vitro* были способны не только макрофаги, но и остеобласты. Причем, как было показано при сокультивировании этих клеток, фагоцитирующую способность остеобластов, как и их остеогенную активность (активность щелочной фосфатазы) стимулировали макрофаги, фагоцитирующие полимерные микрочастицы (Saad et al., 1998).

Косвенно о ведущей роли клеточной биодеградации ПОБ и его сополимеров также свидетельствует сильно различающаяся скорость биодеструкции ПОБ в зависимости от места имплантации полимерных изделий. Так, при подкожной имплантации скорость биодеградации происходит, как правило, медленнее, чем при имплантации в качестве заплаты кишечника или перикарда (Qu et al., 2006; Freier et al., 2002), тогда как при имплантации в область костного дефекта биодеструкция протекает быстрее всего. Так, при закрытии костного дефекта бедренной кости и теменной кости черепа крысы при помощи пористого матрикса из ПОБ и его сополимеров полная биодеструкция полимерного материала, замещаемого костной тканью, происходит за 3-9 месяцев (Shumilova et al., 2017; Бонарцев и др., 2018б; Freier et al., 2002; Иванов и др., 2015), тогда как биодеградация изделий из ПОБ при их имплантации в качестве заплаты стенки перикарда, легочной артерии, правого предсердия составляет от 12 до 24 месяцев (Malm et al., 1992a; Malm et al., 1992b; Malm et al., 1994; Malm et al., 1992c). По-видимому, это непосредственно связано с тем, что процессы перестройки и регенерации костной ткани, протекающие за счет фагоцитирующей активности остеокластов, происходят интенсивнее всего. С этим, по-видимому, связана и наибольшая популярность ПОА как биоматериалов для регенерации костной ткани (Lim et al., 2017; Бонарцев и др., 2011). Однако в экспериментах in vitro при культивировании в течение недели остеокластов на пленках из ПОБВ поверхностной эрозии полимерного материала не наблюдалось, что может указывать на сложность моделирования процессов клеточной биодеструкции этих полимеров (Cool et al., 2007). Как было показано выше, ПОБ имеет более медленную скорость деградации в организме по сравнению с ПМК, ПГК и их сополимеров. Замедление скорости биодеструкции приводит к снижению концентрации продуктов распада вблизи имплантата, среди которых для ПОБ доминирует 3-гидроксимасляная кислота, являющаяся гораздо более слабой кислотой (pKα 4,41), чем основной продукт биодеградации ПМК и ПМГК - молочная кислота (pKα 3,73). Соответственно, и закисления среды при биодеградации ПОБ и его сополимеров тоже не происходит (Qu et al., 2006; Freier et al., 2002; Taylor et al., 1994; Kose et al., 2003a).

Использование экспериментальных моделей некритического и критического костного дефектов на крысах позволило исследовать остеогенные свойства in vivo 2D- и 3D-матриксов и пористых микросфер на основе ПОБ (Рисунок 194). В качестве экспериментальных объектов были использованы 2D- и 3D-матриксы, исследованные на моделях более низкого - клеточного уровня. Используются следующие методы: хирургические методики удаления костной ткани, имплантация матриксов с закрытием дефектов, гистологические методы, прижизненное введение флуоресцентных меток для исследования динамики образования костной ткани. Уровень происходящих процессов с точки зрения организации живого – тканевой.



Полимер	Внешняя сторона, мкм		Внутренняя сторона, мкм		Пористость, %
	разрывные поры	лакуны	разрывные поры	лакуны	
ПОБ	103 ±37*	215 ±137	7 ±4	43 ±15	87 ±7
ПОБ/ПЭГ	33 ±18*	100 ±53	7 ±5	53 ±26	75 ±16
ПОБ-ПЭГ	16 ±5*#	105 ±74	5 ±3	38 ±14	69 ±12*

Рисунок 194. *Схема экспериментальной модели некритического и критического костного дефектов.*

Основная задача экспериментальной модели – анализ способности стимулировать рост новой костной ткани при имплантации полимерных 2D- и 3D-матриксов, а также пористых микросфер в область костного дефекта, т.е. остеогенные свойства изделий на основе ПОБ, его сополимеров и композитов. Моделируемый идеальный биообъект модели – поврежденная костная ткань некритического и критического размера. Временной масштаб экспериментальной модели – до 180 суток, что соответствует сроку регенерации костной ткани.

Показана способность пористых 2D-матриксов на основе поли-3-оксибутирата и его биоПЭГилированного сополимера, 3D-матриксов на основе ПОБ и его композитов с гидроксиапатитом и альгинатным гидрогелем, а также на основе пористых микросфер из ПОБ поддерживать и стимулировать рост костной ткани в объеме на модели некритического костного дефекта бедренной кости и на модели критического дефекта теменной кости крысы (Разделы 3.8, 3.9 и 3.10). Данные, полученные при использовании этих экспериментальных моделей легли в основу разработки и доклиническим исследованиям остеопластического материала на основе пористых микросфер из ПОБ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы была создана система междисциплинарного биотехнологического и биоинженерного исследования биомедицинских полимеров на примере поли-3-оксибутирата и его сополимеров, состоящая из 4-х блоков экспериментальных моделей и методик, принадлежащих к различным уровням организации живой материи и исследований в естественных науках:

1) Молекулярному: экспериментальная модель контролируемого биосинтеза поли-3-оксибутирата и его сополимеров с заданным мономерным составом и молекулярной массой;
2) Надмолекулярному: экспериментальная модель исследования взаимосвязи надмолекулярной структуры полимера с его физико-химическими свойствами; экспериментальная модель исследования гидролитической и ферментативной деградации полимеров in vitro; экспериментальная модель исследования кинетики высвобождения низкомолекулярных лекарственных веществ и белков из полимерных пленок и микрочастиц;
3) Клеточному: экспериментальная модель исследования биосовместимости in vitro полимеров и изделий из них, экспериментальная модель исследования влияния полимеров и изделий из них на остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток;
4) Тканевому: экспериментальная модель исследования биосовместимости полимеров in vivo, модели некритического и критического костных дефектов для изучения остеогенных свойств полимеров и изделий из них in vivo; тканеинженерная конструкция на основе полимерного матрикса.

Разработанная нами система экспериментальных исследований и каждая из используемых экспериментальных моделей для изучения полимеров позволяет также проводить комплексные исследования не только по указанным выше разным уровням организации живой материи, но и на длительном временном масштабе изменения свойств полимеров в процессе их эксплуатации на каждом из этих уровней. Исследования на каждом из указанных выше уровнях требует изготовления и разработки экспериментальных объектов возрастающей сложности: стандартных полимерных пленок, микрочастиц, 2D-матриксов, пористых микросфер, композитных 3D-матриксов, тканеинженерных конструкций (Рисунок 195).

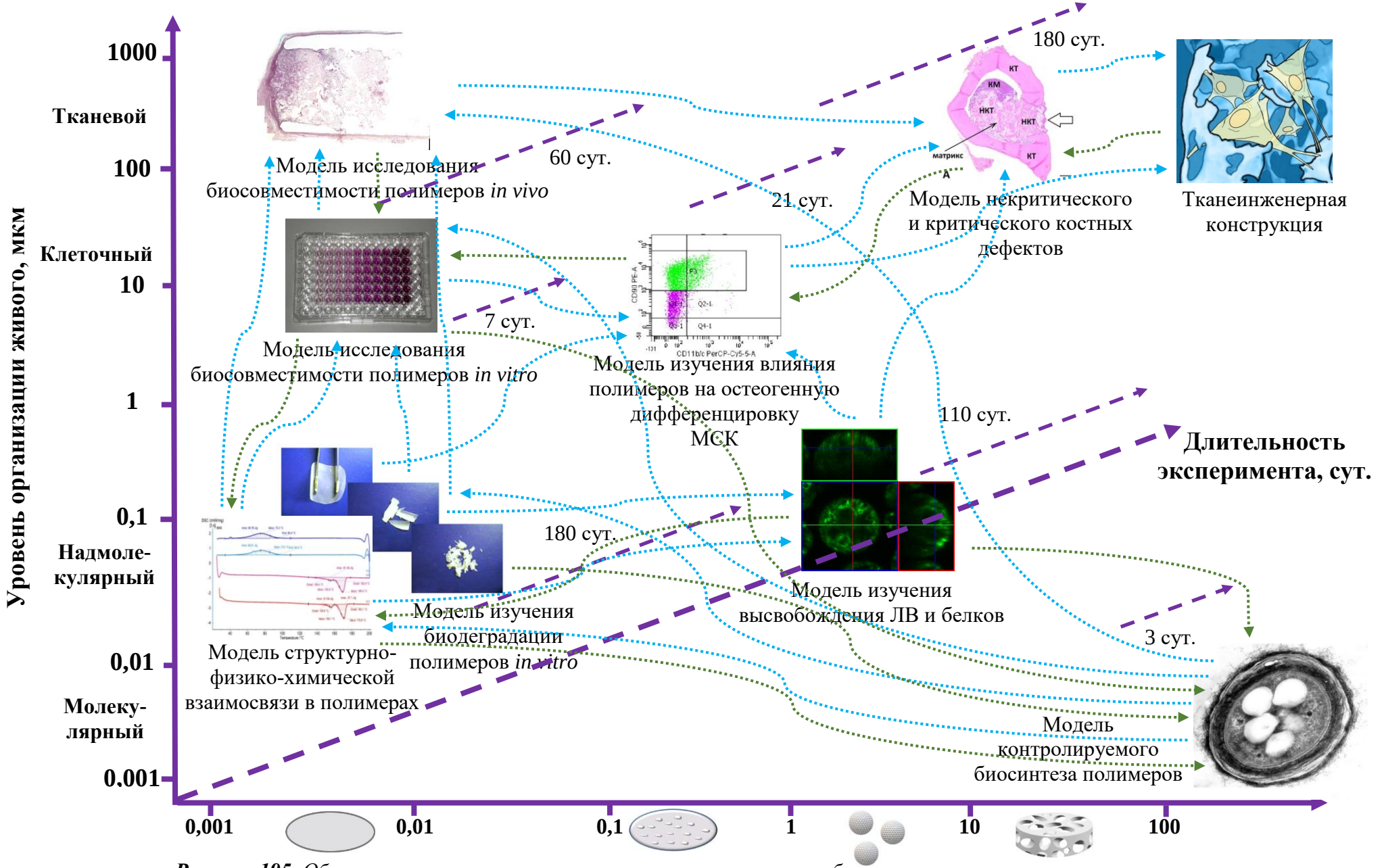


Рисунок 195. *Общая схема организации системы экспериментальных биоинженерных исследований ПОБ (пунктирными стрелками показаны прямые (голубые) и обратные (зеленые) связи между различными экспериментальными моделями).*

На представленной общей схеме системы экспериментальных исследований ПОБ экспериментальные модели, входящие в ее состав, мы для лучшего представления расположили в следующих координатах: x – конструкционная сложность экспериментальных объектов, y – уровень организации живого (в мкм), z – длительность эксперимента (в сут.). Уровни организации живого (жизни, живых систем), такие как молекулярный, клеточный, органный постулируются во многих литературных источниках (Шишкин и др., 2005-2009), но мы еще добавили промежуточный уровень, такой как надмолекулярный, что в нашем случае имеет важное значение. Координата в виде длительности эксперимента отражает в общей схеме динамический характер экспериментальных моделей и всей системы в целом. Наконец, мы введели в схему такую координату как конструкционная сложность экспериментального объекта. Для конструкционной сложности изделий используется следующее уровнение (Семенов, 2016):

$$K_{сл} = N / N_a \quad (24)$$

где N и N_a – число составных частей (элементов) разрабатываемого образца и изделия-аналога. В нашем случае это число различных материалов, входящих в состав изделия. В качестве изделия аналога мы выбрали стандартные пленки из ПОБ толщиной 50 мкм и размером 10 × 10 мм. Однако, для нашей системы мы ее дополнительно модифицировали для учета сложности внутренней микроструктуры изделий в общем виде через ее пористость, а также для учета формы изделия (как формфактор):

$$K_{сл} = N / N_a \times 100/(100 - P) \times d / l, \quad (25)$$

где P – пористость изделия, d – минимальный линейный размер, l – максимальный линейный размер изделия. Конструкционная сложность используемых в нашей работе изделий (пленок, плоских пористых матриксов, микрочастиц, пористых микросфер, композитных 3D-матриксов) была рассчитана по этой формуле и все входящие в состав системы экспериментальной модели, исходя из полученных параметров для изделий, используемых в той или иной из них, были размещены на общей схеме. Так, значение $K_{сл}$ для стандартных пленок составляет около 0,005 усл.ед., для плоских пористых матриксов из ПОБ – примерно 0,2 усл.ед., для микрочастиц из ПОБ/ГА, загруженных лизоцимом – приблизительно 3 усл.ед., а для композитных 3D-матриксов из ПОБ/ГА/АЛГ – около 30 усл.ед. Так как в моделях могут использоваться изделия разной конструкционной сложности, то они были расположены исходя из наиболее простых используемых в них изделий.

На самом нижнем уровне созданной нами системы, в ее основе лежит экспериментальная модель контролируемого биосинтеза ПОБ и его сополимеров с заданным мономерным составом и молекулярной массой, что позволяет получать полимерные материалы с достаточно широким спектром физико-химических свойств, т.е. это биоинженерная модель регуляции

надмолекулярной структуры и физико-химических свойств природных биополимеров. Экспериментальная модель была разработана на основе технологии контролируемого биосинтеза ПОБ и его сополимеров с использованием способности штамма-продуцента *Azotobacter chroococcum* 7Б использовать добавленные в культуральную среду карбоновые кислоты и производные этиленгликоля для синтеза сополимеров ПОБ и регуляции их молекулярной массы. Метод дает возможность для регуляции молекулярной массы синтезируемых полимеров (от $0{,}11\times10^6$ до $1{,}63\times10^6$ Да), получать сополимеры ПОБВ с различным молярным содержанием 3-оксивалерата (от 2,5 до 21,3 моль%) с заданной молекулярной массой (от $0{,}17\times10^6$ до $1{,}42\times10^6$ Да) и сополимеры с 3-окси-4-метилвалератом, и регулировать молярное содержание мономеров в синтезируемых сополимерах. Разработана модификация метода – синтез сополимеров ПОБ с синтетическими ди-, три- и полиэтиленгликолями – биоПЭГилирование, в результате чего получены новые ди-блок сополимеры ПОБ: ПОБ-ДЭГ, ПОБ-ТЭГ, ПОБ-ПЭГ 200, ПОБ-ПЭГ 300, ПОБВ-ПЭГ 300; максимальное содержание полиэтиленгликоля было в ПОБ-ПЭГ 300 и составляло 0,33 моль%. Разработан метод выделения ПОБ и его сополимеров из бактериальной биомассы и его очистки, позволяющий получать полимеры химической чистоты до 99,5% (вес.). Была получена экспериментальная серия полимеров (19 партий) с различным мономерным составом и молекулярной массой для всех других экспериментальных моделей системы, разработка этой модели позволяет при необходимости получать полимеры с заданными характеристиками для последующих исследований (Раздел 3.1). С использованием этой модели была разработана технология биосинтеза бактериального альгината (Дудун и др., 2019; Akoulina et al., 2019; Бонарцева и др., 2017; Бонарцев и др., 2021б), что не вошло в рамки настоящей работы.

Экспериментальная модель исследования взаимосвязи надмолекулярной структуры полимера с его физико-химическими свойствами включает целый ряд методик и экспериментальных подходов: получение стандартных и ультратонких пленок, атомно-силовой микроскопии, дифференциальной сканирующей калориметрии, наноиндентации, контактного угла смачивания водой, водопоглощения и других. Анализ кристалличности поли-3-оксибутирата является основной задачей для этой модели, т.к. кристалличность этого полимера определяет все прочие его свойства. Поли-3-оксибутират, будучи частично кристаллическим биополимером, обладает способностью образовывать различные надмолекулярные структуры: ламели (в виде параллельных полос шириной от 11 до 40 нм) в стандартных пленках и кристаллические наноструктуры из них более высокого порядка, такие как двумерные сплошные и разветвленные водорослевидные сферолиты (высотой 4,5±0,5 нм) в ультратонких пленках. Сополимер ПОБ-ПЭГ, полученный методом биоПЭГилирования, менее склонен к

образованию кристаллических наноструктур, его кристаллическая компонента проявлялась также в виде отдельных протяженных ламелей (от 0,7±0,1 до 1,5±0,3 нм высотой). Степень кристалличности ПОБ не зависит от его молекулярной массы, тогда как степень кристалличности сополимера ПОБВ линейно зависит как от молярного содержания 3-оксивалерата в сополимере, так и от молекулярной массы полимера. Модуль Юнга ПОБ также не зависит от его молекулярной массы, тогда как модуль Юнга сополимера ПОБВ обратно пропорционален молярному содержанию 3-оксивалерата в сополимере и его молекулярной массе. Гидрофильность поверхности (по контактному углу смачивания водой) ПОБ также не зависит от его молекулярной массы, тогда как гидрофильность поверхности сополимера ПОБВ прямо пропорциональна молярному содержанию 3-оксивалерата в сополимере и его молекулярной массе. Сополимер ПОБ-ПЭГ, полученный методом биоПЭГилирования, содержащий лишь 0,33 моль% звеньев этиленгликоля, значительно отличается от гомополимера по своим физико-химическим свойствам: обладает меньшей кристалличностью, меньшей жесткостью и пластичностью, большей гидрофильностью (Разделы 3.2 и 3.3). Эта экспериментальная модель позволяет прогнозировать физико-химические свойства полученных полимеров для их использования на более высоких уровнях экспериментального исследования. Эта модель служит в системе ключевую роль, т.к. на более высоких уровнях (клеточном и тканевом) при разработке и изготовлении новых экспериментальных объектов требуется характеризация и контроль их морфологии и физико-химических свойств, благодаря чему осуществляется коррекция хода исследований, например, изменение размера пор матриксов, выбор состава полимерного композита, изменение самой конструкции матрикса и др. Помимо указанных исследований, созданная экспериментальная модель позволила начать разработку покрытий титановых имплантатов поли-3-оксибутиратом (Sheremetyev et al., 2018), провести комплексное исследование пьезоэлектрических свойств поли-3-оксибутирата и его сополимеров, разработку композитов полиоксиалканоатов с магнетитами и графеном с усиленным пьезоэффектом (Chernozem et al., 2021), исследовать спонтанную структурированность пленок из поли-3-оксибутирата и его сополимеров и ее влияние на рост клеток на них (Бонарцев и др., 2019в), что осталось за рамками настоящей работы.

Экспериментальная модель исследования гидролитической и ферментативной деградации полимеров in vitro в отличие от предыдущей статической модели является динамической моделью, которая позволяет исследовать изменение физико-химических (и биологических) свойств полимеров в процессе их биодеградации. Важной характеристикой данной экспериментальной модели является изготовление стандартизованных образцов полимерных пленок. Показано, что при ферментативной деградации *in vitro* в течение 6 месяцев

масса пленок из ПОБ и его сополимеров снижается незначительно (не более 10%), наблюдается большое падение молекулярной массы полимеров, наиболее выраженное у высокомолекулярных образцов (до 5-кратного снижения). Ферментативная деградация in vitro большинства ПОБ и его сополимеров идет по двум механизмам – неавтокаталитическому и автокаталитическому. Обнаружены три вида изменения морфологии поверхности пленок из ПОБ в ходе ферментативной деградации *in vitro*: фрагментация ламелей, исчезновение ламелей и появление новых ламелей, которые происходят из-за расщепления кристаллических структур в области их дефектов и расщепления слоя аморфного полимера, покрывающего кристаллические структуры, соответственно. Показано, что содержание 3-оксивалерата в цепи сополимера ПОБВ более 5,7 моль% является границей, при пересечении которой меняется закономерность кинетики изменения степени кристалличности ПОБВ в процессе его биодеградации in vitro. БиоПЭГилирование ПОБ приводит к изменению кинетики ранней стадии биодеградации биополимера *in vitro*. Установленные при помощи этой модели закономерности позволяют прогнозировать изменение свойств полимеров и изделий из них на более высоких уровнях при их исследовании на клетках и животных. Временной масштаб модели (до 6 месяцев) соответствует продолжительности эксплуатации изделий из ПОБ и его сополимеров в моделях более высокого уровня – на лабораторных животных *in vivo* (Раздел 3.4). Созданная экспериментальная модель позволила в дальнейшем провести комплексное исследование кинетики ферментативной деградации in vitro композита ПОБ с полилактидом, что осталось за рамками настоящей работы (Zhuikov et al., 2021).

Другой динамической экспериментальной моделью является экспериментальная модель исследования кинетики высвобождения низкомолекулярных лекарственных веществ и белков из полимерных пленок и микрочастиц. Важной характеристикой модели является необходимость создания композитных микрочастиц, т.е. более сложных экспериментальных биообъектов, чем в предыдущих моделях. Для этого получены микрочастицы из ПОБ, загруженные различными лекарственными веществами, способные к их пролонгированному высвобождению. Кинетика высвобождения различных низкомолекулярных лекарственных веществ как из пленок, так и из микрочастиц на основе ПОБ зависит, прежде всего, от химической структуры этих соединений и их физико-химических свойств. Кинетика высвобождения паклитаксела из микрочастиц на основе ПОБ наилучшим образом соответствует кинетики биодеградации этого биополимера. БиоПЭГилирование ПОБ оказывает влияние на параметры кинетики диффузионного высвобождения паклитаксела из биополимерных микрочастиц на ранней стадии. Была разработана также оригинальная методика инкапсулирования белка лизоцима в микрочастицы на основе поли-3-оксибутирата и

его биоПЭГилированного сополимера с использованием гидроксиапатита, как носителя. Основной механизм высвобождения лизоцима из полимерных микрочастиц – диффузия белка из полимерной матрицы, но, по-видимому, деградация полимерной матрицы микрочастиц значительным образом влияет на высвобождение белка. Из микрочастиц на основе биоПЭГилированного ПОБ лизоцим высвобождался в течение 14 суток с кинетикой, наиболее близкой к кинетике диффузии белка по закону Фика с сохранением стабильности и ферментативной активности (Разделы 3.6 и 3.7). Созданная экспериментальная модель позволила также приступить к разработке форм пролонгированного высвобождения симвастатина из композитных 3D-матриксов и пористых микросфер на основе ПОБ (Акулина и др., 2021) и биоактивного ростового фактора BMP-2 из пористых микросфер на основе ПОБ (Бонарцев и др., 2019б), что также находится за пределами настоящей работы, так как эти проекты требуют завершения.

Экспериментальная модель исследования биосовместимости *in vitro* полимеров и изделий из них необходима для отбора полимеров, не обладающих цитотоксичностью и пригодных для выращивания на них клеток, а также для анализа противоопухолевой эффективности нано- и микрочастиц на основе ПОБ, загруженных противоопухолевыми ЛВ. Она также требует изготовления не только стандартных образцов полимерных пленок, но и более сложноустроенных экспериментальных объектов – 2D- и 3D-матриксов и композитных микрочастиц. Соответственно, эта модель позволяет исследовать также как морфология этих конструкций влияет на рост в них клеток. Использование этой модели показало, что ПОБ и его сополимеры не обладают цитотоксичностью по отношению к фибробластам линии 3Т3 и МСК, а также поддерживают рост этих клеток на поверхности пленок из этих биополимеров. Наиболее выраженный рост клеток наблюдается на пленках из биоПЭГилированных ПОБ и ПОБВ. Полученные 2D- и 3D-матриксы, пористые микросферы не проявляют цитотоксических свойств и способны к поддержанию роста фибробластов 3Т3 и МСК. Микро- и наночастицы на основе ПОБ, загруженные паклитакселом, обладают противоопухолевой эффективностью *in vitro* в течение 120 суток. Показано, что композитные микрочастицы с инкапсулированным модельным ферментом, лизоцимом, не обладают цитотоксичностью по отношению к мезенхимальным стволовым клеткам крысы. Полученные с использованием этой модели данные также позволяют корректировать состав и конструкцию экспериментальных объектов (Раздел 3.5). Созданная экспериментальная модель позволила в дальнейшем разработать биоинженерную конструкцию на основе подложки из ПОБВ с иммобилизированными на ней пористыми микросферами из ПОБ, заполненными гидрогелем из бактериального альгината с пробиотическими бактериями, используемой в качестве кишечной заплаты, и провести

комплексное ее исследование (Бонарцев и др., 2021б), что также осталось за рамками настоящей работы.

Экспериментальная модель исследования влияния полимеров и изделий из них на остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток также является биоинженерной динамической моделью. Эта модель требует изготовления 2D- и 3D-матриксов и других довольно сложно сконструированных конструкций, используемых одновременно и в предыдущей модели. Соответственно, эта модель позволяет исследовать также как морфология этих конструкций влияет на дифференцировку клеток. Получены матриксы на основе поли-3-оксибутирата и его биоПЭГилированного сополимера, обладающие высокой пористостью и средним размером пор около 100 мкм. Матриксы из поли-3-оксибутирата вызывают спонтанную дифференцировку МСК по остеогенному пути, а биоПЭГилирование этого полимера приводит к частичному подавлению этого эффекта. 3D-матриксы с регулируемой микроструктурой и формой из ПОБ и его композита ПОБ/ГА и на основе пористых микросфер из ПОБ также вызывают спонтанную остеогенную дифференцировку МСК (Разделы 3.8, 3.9 и 3.10). Эта экспериментальная модель позволила приступить к разработке и доклиническим исследованиям остеопластического материала на основе пористых микросфер из ПОБ, что не вошло в эту работу, т.к. этот проект требует завершения.

Использование экспериментальных моделей некритического и критического костного дефектов на крысах позволило исследовать остеогенные свойства in vivo 2D- и 3D-матриксов и пористых микросфер на основе ПОБ. В качестве экспериментальных объектов были использованы 2D- и 3D-матриксы, исследованные на моделях более низкого - клеточного уровня. Показана способность пористых 2D-матриксов на основе поли-3-оксибутирата и его биоПЭГилированного сополимера, 3D-матриксов на основе ПОБ и его композитов с гидроксиапатитом и альгинатным гидрогелем, а также на основе пористых микросфер из ПОБ поддерживать и стимулировать рост костной ткани в объеме на модели некритического костного дефекта бедренной кости и на модели критического дефекта теменной кости крысы (Разделы 3.8, 3.9 и 3.10). Наряду с предыдущей моделью данные, полученные при использовании этой модели легли в основу разработки и доклиническим исследованиям остеопластического материала на основе пористых микросфер из ПОБ, что не вошло в эту работу, т.к. этот проект требует завершения.

Тканеинженерная конструкция как экспериментальная модель также является биоинженерной динамической моделью, где в качестве экспериментального объекта необходимо изготовить гибридную конструкцию, состоящую из композитного полимерного мат 3D-матрикса и клеток – МСК, т.е. она является как моделью искусственной костной ткани,

так и сложным экспериментальным объектом, свойства которого можно исследовать только при использовании других экспериментальных моделей, прежде всего: модели исследования влияния полимеров и изделий из них на остеогенную дифференцировку МСК и модели некритического и критического костных дефектов для изучения остеогенных свойств полимеров и изделий из них *in vivo*. Такое комплексное исследование позволило продемонстрировать, что разработанные гибридные конструкции на основе матриксов ПОБ/ГА, заполненных МСК-содержащим альгинатным гидрогелем, усиливают регенерацию критического костного дефекта благодаря остеоиндуктивных свойств матрикса и регенеративного потенциала МСК, который проявляется при помещении клеток в биополимерно-минерально-гидрогелевые матриксы. Эти результаты подтверждают высокий потенциал природных биоматериалов как костезамещающих материалов и тканевой инженерии для регенерации костной ткани (Раздел 3.9). Разработка основ создания гибридных конструкций позволило разработать гибридную конструкцию с пробиотическими бактериями (Бонарцев и др., 2021б) и разработать экспериментальные модели рака головы и шеи с использованием пористых микросфер из ПОБ (Kholina et al., 2021; Menshikh et al., 2020; Бонарцев и др, 2020в), что не вошло в эту работу, т.к. находится далеко в стороне от основной темы исследования.

Основные характеристики созданной нами системы суммированы в Таблице 36. Связи между различными экспериментальными моделями показаны на схеме на Рисунке 195.

Таблица 36. *Характеристики экспериментальных моделей созданной системы исследования полимеров*

Экспериментальная модель	Методики	Исследуемые характеристики полимеров и изделий на их основе	Эксперимен-тальные объекты	Статические / динамические условия*	Основная задача	Моделируемый идеальный биообъект
Экспериментальная модель контролируемого биосинтеза ПОБ	Культивирование штамма-продуцента, биосинтез полимеров, выделение и очистка, ЯМР, ГХ, ГПХ, вискозиметрия	Мономерный состав, молекулярная масса	Бактериальный штамм-продуцент Azotobacter chroococcum 7Б	Динамический: 72 часа	Получение ПОБ и его сополимеров с заданным мономерным составом и молекулярной массой	Запасающие и защитные биополимеры бактерий
Экспериментальная модель исследования взаимосвязи надмолекулярной структуры полимера с его физико-химическими свойствами	Метод высаживания полимерных пленок из раствора, спин-коатинг, АСМ, СЭМ, ДСК, наноиндентация, контактный угол смачивания водой, водопоглощение	Термофизические свойства (степень кристалличности, температура плавления), механические свойства (модуль Юнга, удлинение на разрыв), гидрофильность (контактный угол смачивания, водопоглощение), параметры морфологии	Полимерные стандартные и ультратонкие пленки из синтезированного ПОБ и его сополимеров с заданными свойствами	Статические	Установление закономерностей взаимосвязи молекулярной структуры, надмолекулярной структуры и физико-химических свойств ПОБ и	Частично-кристаллические полимеры

		поверхности (в т.ч. надмолекулярных структур)			его сополимеров	
Экспериментальная модель исследования гидролитической, ферментативной и клеточной деградации полимеров in vitro	Метод высаживания полимерных пленок из раствора, АСМ, СЭМ, ДСК, наноиндентация, контактный угол смачивания водой, измерение активности ферментов, культивирование клеток на поверхности полимерных пленок	Кинетика изменения массы, ММ, термо-физических свойств (степень кристалличности), механических свойств (модуль Юнга), гидрофильности (контактный угол смачивания) полимеров, параметры морфологии поверхности (в т.ч. надмолекулярных структур)	Полимерные стандартные пленки из синтезированного ПОБ и его сополимеров с заданными свойствами	Динамические: до 180 сут.	Установление закономерностей кинетики изменения физико-химических свойств ПОБ и его сополимеров в процессе их биодеградации *in vitro* с помощью математических моделей (автокаталитической и неавтокаталитической)	Имплантированное в ткани человека полимерное медицинское изделие.
Экспериментальная	Методы одно- и	Диаметр частиц,	Пленки, нано-	Динамическ	Анализ кинетики	Лекарственна

модель исследования кинетики высвобождения низкомолекулярных лекарственных веществ и белков из полимерных пленок и микрочастиц	многоэтапного эмульгирования, мембранной фильтрации, распылительного высушивания, АСМ, СЭМ, конфокальная микроскопия, ДСК, УФ-спектроскопия, ИК-спектроскопия, электрофорез белков, круговой дихроизм, измерение активности ферментов.	морфология поверхности, эффективность инкапсулирования ЛВ, степень загруженности ЛВ, кинетика высвобождения ЛВ, термо-физические свойства (степень кристалличности, температура плавления).	и микрочастицы, пористые микросферы большого диаметра (более 100 мкм) на основе ПОБ, его сополимера и композитов с ПЭГ и ГА	ие: до 110 сут.	и установление механизма высвобождения низкомолекулярных ЛВ и белков из полимерных нано- и микрочастиц с помощью математических моделей (закона диффузии Фика, кинетики первого порядка, Хигучи, Пеппаса-Корсмейера)	я форма пролонгированного высвобождения ЛВ
Экспериментальная модель исследования биосовместимости *in vitro* полимеров и	ХТТ-тест, МТТ-тест, методы исследования адсорбции белка, СЭМ, конфокальная	Цитотоксичность и способность поддерживать жизнеспособность и пролиферацию клеток (фибробластов, МСК) при	Стандартные пленки, 2D- и 3D-матриксы, нано- и микрочастиц	Динамическое: до 7 сут.	Отбор полимеров по параметру цитотоксичности и динамике пролиферации на	Живая ткань.

изделий из них	микроскопия, методики моделирования гидролитической и ферментативной деградации *in vitro*.	росте на пленках из ПОБ и его сополимеров, а также микрочастиц и матриксов на их основе.	ы на основе ПОБ, его сополимеров и композитов.		полимерных пленках и матриксах; анализ противоопухолевой активности микрочастиц in vitro.	
Экспериментальная модель исследования влияния полимеров и изделий из них на остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток	Выделение МСК из костного мозга, культивирование клеток млекопитающих, СЭМ, конфокальная микроскопия, окраска ализариновым красным, измерение активности ЩФ, проточная цитометрия	Остеогенные свойства *in vitro*, 2D- и 3D-матриксов, пористых микросфер на основе ПОБ, его сополимеров и композитов.	2D- и 3D-матриксы, пористые микросферы на основе ПОБ, его сополимеров и композитов.	Динамические: до 21 сут.	Анализ способности ПОБ и его сополимеров, 2D- и 3D-матриксов, пористых микросфер на их основе стимулировать остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток, т.е. обладать	Костная ткань

					остеогенными свойствами in vitro.	
Экспериментальная модель исследования биосовместимости полимеров in vivo	Подкожная имплантация полимеров и изделий из них, гистологические методы.	Тканевая реакция на имплантированные полимерные пленки и матриксы.	Стандартные пленки, 2D- и 3D-матриксы, микрочастицы на основе ПОБ, его сополимеров и композитов.	Динамические: до 60 сут.	Анализ биосовместимости in vivo ПОБ, его сополимеров и композитов.	Заболевание с повреждением мягкой соединительной ткани.
Модели некритического и критического костных дефектов для изучения остеогенных свойств полимеров и изделий из них in vivo	Хирургические методики удаление костной ткани, имплантация матриксов с закрытием дефектов, гистологические методы, прижизненное	Остеогенные свойства полимерных матриксов	2D- и 3D-матриксы, пористые микросферы на основе ПОБ, его сополимеров и композитов.	Динамические: до 180 сут.	Анализ остеогенных свойств	Заболевание с повреждением костной ткани некритического и критического размера.

	введение флуоресцентных меток для исследование динамики образования костной ткани.					
Тканеинженерная конструкция на основе полимерного 3D-матрикса	Непрямая печать и выщелачивание для изготовления 3D-матриксов, выделение МСК из костного мозга, культивирование клеток млекопитающих в 3D-матриксах	Остеогенные свойства тканеинженерной конст-рукции *in vitro и in vivo* (гистоморфологические характеристики новообразующейся костной ткани, скорость регенерации костной ткани, площадь закрытия кристического костного дефекта)	Композитные 3D-матриксы на основе ПОБ/ГА с альгинатным гидрогелем, МСК	Динамическ ие: до 30 сут.	Анализ остеогенных свойств *in vivo*	Живая костная ткань

* по отношению к моделируемому биообъекту.

Таким образом, проведенное нами комплексное исследование с использованием созданной системы экспериментальных моделей показало, что полученный путем биосинтеза поли-3-оксибутират обладает целым рядом уникальных свойств: способностью к образованию кристаллических надмолекулярных структур, специфическим сочетанием физико-химических свойств, способностью к биодеструкции, биосовместимостью, контролируемому высвобождению низкомолекулярных лекарственных веществ и белка, и биоактивностью как по отношению к клеткам in vitro, так и на модели заболеваний in vivo, которые проявляются на разных уровнях биоинженерии этого биополимера: молекулярном, надмолекулярном, клеточном и тканевом и тесно связаны друг с другом. А биотехнологическая сополимеризация ПОБ с синтетическим ПЭГ - биоПЭГилирование приводит к изменению этих свойств на всех этих уровнях.

Полученные результаты могут быть использованы для создания новых отечественных имплантированных медицинских изделий (например, стентов-эндопротезов), лекарственных форм пролонгированного действия, отечественных остеопластических материалов, в т.ч. с пролонгированной лекарственной активностью, тканеинженерных конструкций для восстановления костной ткани и других медицинских изделий. Некоторые из этих изделий (остеопластический материал на основе пористых микросфер из ПОБ и парадонтологическая мембрана) уже находятся на стадии доклинических исследований.

ВЫВОДЫ

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

1. Разработана технология контролируемого биосинтеза поли-3-оксибутирата и его сополимеров с 3-оксивалератом и 3-окси-4-метилвалератом, а также с полиэтиленгликолем и его производными – метод биоПЭГилирования. Метод позволяет регулировать молекулярную массу синтезируемых полимеров и мономерный состав сополимеров.
2. Кристаллические структуры поли-3-оксибутирата представлены водорослеподобными и двумерными сферолитами, а также стопками ламелей; биоПЭГилирование поли-3-оксибутирата приводит к изменению надмолекулярной структуры биополимера: в качестве кристаллических структур появляются монослойные ламели. Степень кристалличности, модуль Юнга и гидрофильность поверхности поли-3-оксибутирата не зависят от его молекулярной массы, тогда как эти физико-химические свойства сополимера поли-3-оксибутирата с 3-оксивалератом линейно зависят от молярного содержания 3-оксивалерата в сополимере и его молекулярной массы. Механические свойства (модуль Юнга) поли-3-оксибутирата и его сополимеров с 3-оксивалератом линейно зависят от степени кристалличности полимера.
3. Для большинства образцов поли-3-оксибутирата и его сополимеров ферментативная деградация in vitro идет по двум механизмам – неавтокаталитическому и автокаталитическому, сопровождаясь незначительным снижением массы (не более 10%), значительным снижением молекулярной массы (до 5-кратного снижения) и изменением структуры поверхности. Показано, что содержание 3-оксивалерата в цепи сополимера поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерата более 5,7моль% является границей, при пересечении которой меняется закономерность кинетики изменения степени кристалличности ПОБВ в процессе его биодеградации in vitro. БиоПЭГилирование поли-3-оксибутирата приводит к изменению кинетики ранней стадии биодеградации биополимера in vitro.
4. Разработана оригинальная методика загрузки противоопухолевого вещества паклитаксела и инкапсулирования белка лизоцима в микрочастицы на основе поли-3-оксибутирата и его биоПЭГилированного сополимера. Кинетика пролонгированного (более 20 суток) высвобождения паклитаксела и лизоцима из микрочастиц на основе биоПЭГилированного поли-3-оксибутирата осуществляется за счет диффузии по закону

Фика, что позволяет ее прогнозировать с высокой точностью. Ферментативная активность лизоцима сохраняется в течение 2-х недель высвобождения белка из микрочастиц. Микрочастицы из поли-3-оксибутирата, загруженные паклитакселом, полученные методом электродинамического распылительного высушивания, обладают повышенной пролонгированной противоопухолевой эффективностью *in vitro* на опухолевых клетках и *in vivo* на моделях эпителиальных опухолей мышей по критерию локального торможения роста опухоли при сниженной острой токсичности в сравнении с традиционной противоопухолевой лекарственной формой (Таксолом).

5. Получены пленки и пористые матриксы на основе поли-3-оксибутирата и его биоПЭГилированного сополимера, а также пористые микросферы на основе поли-3-оксибутирата, способные к поддержанию роста фибробластов 3Т3 и мезенхимальных стволовых клеток. Пористые матриксы на основе поли-3-оксибутирата вызывают спонтанную дифференцировку МСК по остеогенному пути, а биоПЭГилирование этого полимера приводит к частичному подавлению этого эффекта.
6. Показана способность пористых матриксов из биоПЭГилированного поли-3-оксибутирата и пористых микросфер из поли-3-оксибутирата поддерживать и стимулировать рост костной ткани на модели некритического костного дефекта бедренной кости крысы, что позволяет разработать на их основе остеоиндуктивный материал. Тканеинженерная конструкция на основе 3D-матриксов из композита поли-3-оксибутирата и гидроксиапатита, полученная методом непрямой 3D-печати и заполненная альгинатным гидрогелем, содержащим мезенхимальные стволовые клетки, способствует почти полной регенерации критического костного дефекта у крыс *in vivo* за 1 месяц.
7. Таким образом, нами создана система биотехнологического и биоинженерного исследования природного поли-3-оксибутирата, полученного бактериальным биосинтезом, которая позволила исследовать целый ряд уникальных свойств этого биополимера и его сополимеров, проявляющихся на разных уровнях: молекулярном, надмолекулярном, клеточном и тканевом, и тесно связанных с их возможными биомедицинскими приложениями. БиоПЭГилирование приводит к мультиплицирующему изменению этих свойств: от молекулярной структуры до биологической активности.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность своей матери и отцу, которые для меня не только родители, но и научные наставники и своей супруге, которая всегда поддерживает меня во всех начинаниях, моя соратница и коллега в науке. Своему научному консультанту Шайтану Константину Вольдемаровичу за всестороннюю поддержку во всех начинаниях; всем сотрудникам, аспирантам и студентам моей научной группы «Биомедицинские полимеры» (кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ и лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН): Мышкиной В.Л., Махиной Т.К., Яковлеву С.Г., Зернову А.Л., Жарковой И.И., Акулиной Е.А., Жуйкову В.А., Дудуну А.А., Чесноковой Д.В. также за участие в работе, всем сотрудникам кафедры биоинженерии и лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота за помощь в работе Мышкиной В.Л. за проведение экспериментов по биосинтезу полимеров; Махиной Т.К.;, общефакультетской лаборатории электронной микроскопии в лице Давидовича Н.Д. за помощь в исследованиях методами сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии и за содействие в этой работе проф. Соколовой О.С., проф. Феофанову А.В. и Кудряшовой К.С. за помощь в работе с использованием метода конфокальной микроскопии, вед.науч.сотр. Багрову Д. В. за помощь в исследовании методом атомно-силовой микроскопии; ст.науч.сотр. кафедры биофизики Паршиной Е.Ю. за помощь в исследовании микро- и наночастиц методом динамического светорассеивания; ст.науч.сотр. кафедры клеточной биологии и гистологии Поташникову Д.М. за помощь в исследовании с использованием проточного цитометра FACSAria SORP, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета; Мойсеновичу М.М. за любезно предоставленную клеточную культуру фибробластов 3T3. термический анализ образцов методом дифференциальной сканирующей калориметрией проведен н.с. лаборатории химической термодинамики Химического факультета МГУ Быкову М.А за исследования полимеров методом ДСК. Лаборатории физики и технологии почв кафедры физики и мелиорации почв факультета почвоведения МГУ в лице ст.науч.сотр. Быкова Г.С., доцента Милановский Е.Ю., ст.науч.сотр. Тюгай З.Н. за исследование по измерению контактных углов смачивания водой полимеров. Центру общего пользования ФИЦ «Биотехнологии» РАН в лице Шубина В.В. за помощь в спектроскопических методах исследования, а также исследованиях методом кругового дихроизма. Вед. науч. сотр. Института нефтехимического синтеза им. А.В.Топчиева РАН. Реброву А.В. за исследование полимеров методом рентгеноструктурного анализа. Сотруднице ОАО «Института пластмасс» С. Г. Алексеевой за измерение молекулярной

массы полимеров. Ст.н.сотр. Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства Подгорскому В.В. за исследование мономерного состава полимеров методом ЯМР-спектроскопии. Профессору Института нефтехимического синтеза им. А.В.Топчиева РАН Бондаренко Г.Н. за исследование полимеров методом ИК-спектроскопии. Ст. науч. сотр. ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова» МЗ РФ Волкову А.В. за исследования с помощью гистологических методов, прежде всего, костной ткани. Доценту ФГАОУВО «Российский университет дружбы народов» МЗ РФ Мураевым А.А. за помощь в операциях на крысах, особенно, за проведение экспериментального моделирования критического костного дефекта. Профессору Новиковой С.П. и сотрудникам Лаборатории химии и технологии материалов для сердечно-сосудистой хирургии Национального медицинского исследовательского центра сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева МЗ РФ, которую она возглавляет. Научной группе Отдела исследования физико-механических свойств ФГБНУ ТИСНУМ (г. Троицк) в лице руководителей в.н.с., к.ф.-м.н. В.Н. Решетова и в.н.с., к.ф.-м.н. А.С. Усеинова. Научной группе под руководством проф., д.м.н. Бухмана В.М. и научной группе под руководством проф., д.м.н. Трещалиной Е.М. Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина.

Работы, описанные в диссертации, были поддержаны рядом российских грантов, в том числе, грантами Российского Научного Фонда № №№ 15-15-10014 и 17-74-20104, Российского Фонда Фундаментальных исследований №№ 15-29-04856 и 20-54-00021, ГК №№ 16.512.11.2019, 14.740.11.1077 и 16.740.11.0652 Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» и ГК № 12411.1008799.13.148 Министерства промышленности и торговли РФ в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу». Электронная микроскопия была выполнена на уникальном оборудовании «3D-EMS» МГУ, в работе использовано оборудование ЦКП «Электронная микроскопия в науках о жизни» МГУ им. М. В. Ломоносова. В работе было использовано оборудование Центров коллективного пользования МГУ имени М.В.Ломоносова (в т.ч. в рамках Программы развития МГУ имени М.В.Ломоносова до 2020 года) и Института биохимии им. А.Н.Баха РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акулина Е.А., Демьянова И.В., Жаркова И.И., Воинова В.В., Жуйков В.А., Хайдапова Д.Д., Чеснокова Д.В., Меньших К.А., Дудун А.А., Махина Т.К., Бонарцева Г.А., Волков А.В., Асфаров Т.Ф., Иванов С.Ю., Шайтан К.В., Бонарцев А.П. Рост мезенхимных стволовых клеток на матриксах на основе поли-3-оксибутирата, загруженных симвастатином // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2021. – № 1. – С. 70-76.
2. Аскадский А. Введение в физико-химию полимеров / Аскадский А., Хохлов А. – Москва: Научный мир. – 2009. – 384 с.
3. Багров Д.В., Бонарцев А.П., Босхомджиев А.П., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Филатова Е.В., Яковлев С.Г., Воинова В.В., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В. Исследование структуры и процесса разложения пленок из поли-3-гидроксибутирата и его композитов с лекарственными веществами // Третья Всероссийская конференция «Нанотехнологии в онкологии 2010» (Москва, Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена, 30 октября 2010 г.): сборник тезисов (электронный ресурс). – URL: https://rosoncoweb.ru/library/congress/ru/2010/10/30/index.pdf (дата обращения: 07.02.2022). – 2010. – С. 15-18.
4. «Биоинженерия» // Википедия. Свободная энциклопедия (страница сайта). – URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B8%D0%BE%D0%B8%D0%BD%D0%B6%D0%B5%D0%BD%D0%B5%D1%80%D0%B8%D1%8F (дата обращения: 07.02.2022).
5. «Биотехнология» // Википедия. Свободная энциклопедия (страница сайта). – URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B8%D0%BE%D1%82%D0%B5%D1%85%D0%BD%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%8F (дата обращения: 07.02.2022).
6. Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Яковлев С.Г., Шайтан К.В.; Патент 2 530 577, МПК A61K 9/14 (2006.01), A61K 47/34 (2006.01), A61K 31/34 (2006.01), A61K 31/35 (2006.01). Фармацевтическая композиция из полимерных микрочастиц для модификации кинетики высвобождения плохорастворимых лекарственных веществ / Патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова" (МГУ). – № 2012150080/15; заявл. 23.11.2012; опубл. 10.10.2014, Бюл. 28. – 2012.

7. Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Лучинина Е.С., Лившиц В.А., Босхомджиев А.П., Маркин В.С., Иорданский А.Л. Новые полимерные системы для контролируемого высвобождения дипиридамола и индометацина на основе поли-3-гидроксибутирата // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42. – № 6. – С. 710-715.
8. Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В., Кирпичников М.П. Поли-3-оксибутират и биополимерные системы на его основе // Биомедицинская химия. – 2011. – Т. 57. – № 4. – С. 374-391. (а)
9. Бонарцев А.П., Яковлев С.Г., Филатова Е.В., Соболева Г.М., Махина Т.К., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В., Попов В.О., Кирпичников М.П. Пролонгированное высвобождение противоопухолевого лекарственного вещества, паклитаксела, из микросфер на основе поли-3-оксибутирата // Биомедицинская химия. – 2011. – Т. 57. – № 2. – С. 232–240. (б)
10. Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Мышкина В.Л., Воинова В.В., Махина Т.К., Жаркова И.И., Яковлев С.Г., Зернов А.Л., Иванова Э.В., Акулина Е.А., Кузнецова Е.С., Жуйков В.А., Алексеева С.Г., Подгорский В.В., Бессонов И.В., Копицына М.Н., Морозов А.С., Милановский Е.Ю., Тюгай З.Н., Быкова Г.С., Кирпичников М.П., Шайтан К.В. Биосинтез сополимера поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерат штаммом *Azotobacter chroococcum* 7B // Acta Naturae. – 2016. – Т. 8. – № 3(30). – С. 85–96.
11. Бонарцев А.П., Воинова В.В., Бонарцева Г.А. Поли-3-оксибутират и микробиота человека (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54. – № 6. – С. 561–584. (а)
12. Бонарцев А.П., Мураев А.А., Деев Р.В., Волков А.В. Материал-ассоциированная костная резорбция // Современные технологии в медицине. – 2018. – Т. 10. – № 4. – С. 26–33. (б)
13. Бонарцев А.П., Воинова В.В., Акулина Е.А., Дудун А.А., Жаркова И.И., Жуйков В.А., Меньших К.А., Чеснокова Д.В., Махина Т.К., Бонарцева Г.А., Парий И.О., Сурменев Р.А., Сурменева М.А. Пьезоэлектрические свойства поли-3-оксибутирата-со-3-оксивалерата-полиэтиленгликоля, полученного методом контролируемого биосинтеза // Биологический журнал. – 2019. – № 10. – С. 4-10. (в)
14. Бонарцев А.П., Меньших К.А., Жаркова И.И., Самойлова С.И., Святославов Д.С., Решетов И.В., Шайтан К.В. Экспериментальная модель роста опухолевых клеток на полимерных микросферах // 7-я Троицкая конференция с международным участием «Медицинская физика» (Троицк, 19 октября - 21 декабря 2020 г.): сборник тезисов (электронный ресурс). – URL:

http://www.medphys.troitsk.ru/userfls/ufiles/Sbornik_tezisov.pdf (дата обращения: 07.02.2022). – 2020. – С. 196-197.

15. Бонарцев А.П., Воинова В.В., Бонарцева Г.А.; Патент 2 740 380. Российская федерация, МПК A61K 47/32 (2006.01), A61K 9/52 (2006.01), A61P 43/00 (2006.01), C12N 1/20 (2006.01). Биоинженерная конструкция на основе бактериального альгината и пробиотических бактерий и способ ее получения / Патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова" (МГУ). – № 2019143594; заявл. 24.12.2019; опубл. 13.01.2021, Бюл. 2. – 2021. (б)
16. Бонарцев А.П., Воинова В.В., Бонарцева Г.А.; Патент 2 740 086. Российская федерация, МПК C12N 1/04 (2006.01), C12N 11/02 (2006.01), A61K 47/36 (2006.01), A61K 35/74 (2015.01). Полимерный материал (гидрогель) на основе бактериального альгината для размещения пробиотических бактерий и способ его получения / Патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова" (МГУ). – № 2019141379; заявл. 13.12.2019; опубл. 11.01.2021, Бюл. 2. – 2021. (а)
17. Бонарцева Г.А., Мышкина В.Л., Загреба Е.Д., Николаева Д.А.; Патент 2 201 453. Российская федерация, МПК C12P 7/04 (2006.01), C12N 1/20 (2006.01), C12R 1/065 (2006.01). Способ получения полиоксибутирата заданной молекулярной массы / патентообладатель Бонарцева Г.А. – № 2001128134/13; заявл. 18.10.2001; опубл. 27.03.2003. – 2001. (б)
18. Бонарцева Г.А., Мышкина В.Л., Загреба Е.Д., Фурина Е.К.; Патент 2 194 759. Российская федерация, МПК C12P 7/62 (2006.01), C12N 1/20 (2006.01). Штамм Azotobacter chroococcum - продуцент поли-β-оксибутирата / патентообладатель Бонарцева Г.А. – № 2001128135/13; заявл. 18.10.2001; опубл. 20.12.2002. – 2001. (а)
19. Бонарцева Г.А., Мышкина В.Л., Николаева Д.А., Ребров А.В., Герасин В.А., Махина Т.К. Биоразложение поли-β-гидроксибутирата (ПОБ) в модельных условиях почвенного сообщества: влияние условий среды на скорость процесса разложения и физико-механические характеристики полимера // Микробиология. – 2002. – Т. 71. – № 2. – С. 258–263.
20. Бонарцева Г.А., Бонарцев А.П., Иорданский А.Л., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Попов В.О.; Патент 2 307 159. Российская федерация, МПК C12N 1/20 (2006.01), C12R 1/065 (2006.01). Штамм бактерий Azotobacter chroococcum 12A – продуцент поли-3-

оксибутирата и сополимера 3-оксибутирата с 3-оксивалератом / патентообладатель Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН. – № 2006115627/13; заявл. 06.05.2006; опубл. 27.09.2007. – 2006.

21. Бонарцева Г.А., Акулина Е.А., Мышкина В.Л., Воинова В.В., Махина Т.К., Бонарцев А.П. Биосинтез альгинатов бактериями рода *Azotobacter* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53. – № 1. – С. 61-68.
22. Босхомджиев А.П., Бонарцев А.П., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Иванов Е.А., Багров Д.В., Филатова Е.В., Иорданский А.Л., Бонарцева Г.А. Сравнительное изучение кинетики биодеградации биополимерных систем на основе поли-3-оксибутирата // Биомедицинская химия. – 2009. – Т. 55. – № 6. – С. 702-712.
23. Вавилова Т. П. Биохимия тканей и жидкостей полости рта / Вавилова Т. П. – Москва: ГЭОТАР-Медиа. – 2008. – 201 с. – С. 9-40.
24. Волова Т.Г. Биотехнология / Волова Т.Г. – Новосибирск: СО РАН. – 1999. – 140 с.
25. Гаева Т. Что такое биотехнология? // Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (ОБР) (электронный ресурс). – URL: https://biorosinfo.ru/chto-takoe-biotekhnologija/ (дата обращения: 07.02.2022). – 2004-2020.
26. Глик Б. Молекулярная биотехнология: принципы и применение / Глик Б., Пастернак Д. – Москва: Мир. – 2002. – 589 с.
27. ГОСТ ISO 10993-1-2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследование. – Москва: Стандартинформ. – 2014. – 19 с.
28. ГОСТ ISO 10993-5-2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы in vitro. – Москва: Стандартинформ. – 2014. – 15 с.
29. ГОСТ 4650-2014 (ISO 62:2008). "Пластмассы. Методы определения водопоглощения"; введ. 29.05.2014. – Москва: Стандартинформ. – 2014. – 20 с.
30. ГОСТ Р 57095-2016. Биотехнологии. Термины и определения. – Москва: Стандартинформ. – 2018. – 20 с.
31. Дебабов В.Г. Биотехнология // Большая Российская энциклопедия, Министерство культуры Российской Федерации (электронный ресурс). – URL: https://bigenc.ru/biology/text/1867792 (дата обращения: 07.02.2022). – 2005-2019.
32. 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.

33. Деев Р.В., Цупкина Н.В., Бозо И.Я., Калигин М.С., Гребнев А.Р., Исаев А.А., Пинаев Г.П. Тканеинженерный эквивалент кости: методологические основы создания и биологические свойства // Гены и клетки. – 2011. – Т. 6. – № 1.
34. Долгих Д.А. Биоинженерия // Большая Российская энциклопедия, Министерство культуры Российской Федерации (электронный ресурс). – URL: https://bigenc.ru/biology/text/1866811 (дата обращения: 07.02.2022). – 2005-2019.
35. Дудун А.А., Акулина Е.А., Воинова В.В., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Жуйков В.А., Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А. Биосинтез альгината и поли(3-оксибутирата) бактериальным штаммом *Azotobacter agile* 12 // Прикладная биохимия и микробиология. – 2019. – № 55 (6). – С. 559-565.
36. Егорова Т.А. Основы биотехнологии / Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухин Е.А. – Москва: Академия. – 2003. – 207 с.
37. Жаркова И.И. Матриксы из биосинтетического сополимера поли-3-оксибутирата с полиэтиленгликолем для инженерии костной ткани: дис. … канд. биол. наук: 03.01.06 / Жаркова И.И.; место защиты: МГУ имени М.В. Ломоносова совет Д 501.001.21. – Москва. – 2017. – 142 с.
38. 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 // Биомедицинская химия. – 2012. – Т. 58. – № 5. – С. 579-591.
39. Жуйков В.А., Бонарцев А.П., Махина Т.К., Мышкина В. Л., Воинова В. В., Бонарцева Г.А. Жуйков В.А. и др. Гидролитическая деградация поли-3-оксибутирата и его сополимера с 3-оксивалератом различной молекулярной массы *in vitro* // Биофизика. – 2018. – Т. 63. – № 2. – С. 249-257.
40. Залепугин Д.Ю., Тилькунова Н.А., Королев В.Л., Глухан Е.Н., Мишин В.С. Получение пористых полимерных материалов с использованием диоксида углерода в сверхкритическом состоянии // Сверхкритические флюиды: Теория и практика. – 2006. – Т. 1. – № 2. – С. 36-48.
41. Зернов А.Л., Бонарцев А.П., Иванов Е.А., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Самсонова О.В., Феофанов А.В., Волков А.В., Гажва Ю.В., Рябова В.М., Мураев А.А., Иванов С.Ю., Шайтан К.В., Бонарцева Г.А. Микрокапсулы из поли(3-гидроксибутирата) для пролонгированного высвобождения белка // Современные технологии в медицине. – 2015. – Т. 7. – № 4. – С. 50–57.

42. Зернов А.Л., Бонарцев А.П., Яковлев С.Г., Мышкина В.Л., Махина Т.К., Паршина Е.С., Харитонова Е.П., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В. Микрочастицы из низкомолекулярного поли(3-гидроксибутирата) для пролонгированного высвобождения паклитаксела, полученные методом пьезоэлектрического распылительного высушивания // Российские нанотехнологии. – 2017. – Т. 12. – № 3-4. – С. 84-90. (а)
43. Зернов А.Л. Микрочастицы из биосинтетических полиоксиалканоатов для пролонгированного высвобождения белков: дис. … канд. биол. наук: 03.01.06 / Зернов А.Л.; место защиты: МГУ имени М.В. Ломоносова совет Д 501.001.21. – Москва. – 2017. – 152 с. (б)
44. Иванов С.Ю., Бонарцев А.П., Гажва Ю.В., Жаркова И.И., Мухаметшин Р.Ф., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Бонарцева Г.А., Андреева Н.В., Акулина Е.А., Харитонова Е.С., Шайтан К.В., Мураев А.А. Разработка и доклинические исследования изолирующей мембраны на основе сополимера поли-3-оксибутирата-со-3-оксивалерата для направленной костной регенерации // Биомедицинская химия. – 2015. – Т. 61. – № 6. – С. 717-723.
45. Кабанов В.А. (ред.). Практикум по высокомолекулярным соединениям: Учебное пособие / Антипина А.Д., Банацкая М.И., Барановский В.Ю. и др.; ред. Кабанов В.А. – Москва: Химия. – 1985. – 165 с.
46. Каркищенко Н. Н. Основы биомоделирования / Каркищенко Н. Н. – Москва: ВПК. – 2004. – 608 с.
47. КлассИнформ, Справочник кодов общероссийских классификаторов (электронный ресурс). – URL: https://classinform.ru/ (дата обращения 08.02.2022).
48. Конвенция о биологическом разнообразии от 13 июня 1992 (электронный ресурс) // официальный сайт Организации Объединённых Наций (сайт). – URL: https://www.un.org/ru/documents/decl_conv/conventions/biodiv.shtml (дата обращения 08.02.2022). – Статья 2. – 1993.
49. Коржавых Э.А., Румянцев А.С. Стандартизация информации о лекарственной форме: пять вопросов и ответов // Российские аптеки. – 2004. - №3. – С. 34-36.
50. Кривандин А.В., Шаталова О.В., Иорданский А.Л. Текстура мембран из поли-3-оксибутирата // Высокомолек. Соед. – 1997. – № 39(3). – С. 540-544.
51. Кузнецова Д.С., Тимашев П.С., Баграташвили В.Н., Загайнова Е.В. Костные имплантаты на основе скаффолдов и клеточных систем в тканевой инженерии (обзор) // Современные технологии в медицине. – 2014. – Т. 6. – № 4. – С. 201–212.

52. Курочкин И.Н. Биотехнология / Курочкин И.Н., Максименко А.В. // Словарь нанотехнологических и связанных с нанотехнологиями терминов (электронный ресурс) / АО «Роснано» (страница сайта). – URL: https://thesaurus.rusnano.com/wiki/article597 (дата обращения 08.02.2022). – 2009-2020.
53. Лившиц В.А., Бонарцев А.П., Иорданский А.Л., Иванов Е.А., Махина Т.А., Мышкина В.Л., Бонарцева Г.А. Микросферы из поли-3-оксибутирата для пролонгированного высвобождения лекарственных веществ // Высокомолекулярные соединения. – 2009. – Т. 51. – № 7. – С. 1243-1251.
54. Лысак И.В. Междисциплинарность: преимущества и проблемы применения // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 5. – С. 264.
55. Лысенок Л.Н. Путь от открытия до теоретических концепций Колумба биокерамики профессора Лари Хенча. Проблемы современного биоматериаловедения // Клиническая имплантология и стоматология. – 1997. – Т. 2. – С. 59-63.
56. Майбородин И.В., Кузнецова И.В., Береговой Е.А., Шевела А.И., Баранник М.И., Майбородина В.И., Манаев А.А. Реакция тканей крыс на имплантацию биодеградируемого полимера на основе молочной кислоты // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 156. – № 12. – С. 848-853.
57. Мойся Е.Г. Структурные особенности полимеров / Мойся Е.Г. – Киев: Наукова Думка. – 1978. – 104 с.
58. Мышкина В.Л., Николаева Д.А., Махина Т.К., Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А. Влияние условий культивирования на молекулярную массу поли-3-гидроксибутирата, синтезируемого *Azotobacter chroococcum* 7 Б // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44. – № 5. – С. 533-538.
59. 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-гидроксибутирата-3-гидроксивалерата штаммом *Azotobacter chroococcum* 7Б // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46. – № 3. – С. 1-8.
60. Николаева Д.А. Биосинтез поли-3-гидроксибутирата разной молекулярной массы культурой *Azotobacter chroococcum* и его биодеградация: дис. … канд. биол. наук: 03.00.04 / Николаева А.Д.; место защиты Ин-т биохимии им. АН Баха РАН. – Москва. – 2004. – 133 с.
61. Переводчикова Н.И. (ред.). Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний / Артамонова Е.В., Базин И.С., Баранова О.Ю. и др.; ред. Переводчикова Н.И. – Москва: Практическая медицина. – 2011. – 518 с.

62. Прудскова Т.Н., Кириллович В.И., Заковряшина Н.А., Ермилина Н.И., Андреева Т.И., Бонарцева Г.А., Бонарцев А.П., Иорданский А.Л., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Попов В.О.; Патент 2 333 962 Российская Федерация, МПК C12P 7/62 (2006.01). Способ выделения полигидроксибутирата из сухой биомассы микроорганизма / Прудскова Т.Н., Кириллович В.И., Заковряшина Н.А., Ермилина Н.И., Андреева Т.И., Бонарцева Г.А., Бонарцев А.П., Иорданский А.Л., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Попов В.О.; патентообладатель открытое акционерное общество Институт пластмасс имени Г.С. Петрова. – № 2006136401/13; заявл. 17.10.2006; опубл. 20.09.2008, Бюл. 26. – 7с. – 2006.
63. Рафиков С.Р. Введение в физико-химию растворов полимеров / Рафиков С.Р., Будтов В.П., Монаков Ю.Б. – Москва: Наука. – 1978. – 328 с.
64. Ребров А.В., Дубинский В.А., Некрасов Ю.П., Бонарцева Г.П., Антипов Е.М., Stamm M.M. Структурные особенности высокоориентированного полигидроксибутирата при его упругой деформации // Высокомол. Соед., сер. А. – 2002. – Т. 44. – С. 1-5.
65. Самылина И.А., Рудакова И.П., Аладышева Ж.И., Ковалева С.В. Определение сахаров спектрофотометрическими методами // Фармация. – 2009. – № 4. – С. 3-5.
66. Сафронова М.И. Основы практической биохимии белка: учебно-методическое пособие для практических занятий по биохимии / Сафронова М.И., Зайцева Н.Н., Рубцов А.М., Гривенникова В.Г., Рыжавская А.С., Гусев Н.Б. – Москва: Цифровичок. – 2009. – 115 с.
67. Севастьянов В.И. Биоматериалы, системы доставки лекарственных веществ и биоинженерия // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. 11. – № 3. – С. 69-80.
68. Севастьянов В.И., Кирпичников М.П. (ред.). Биосовместимые материалы: учебное пособие для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению 020200 "Биология" и смежным специальностям / Агапов И.И. и др.; ред. Севастьянов В.И., Кирпичников М.П. – Москва: Медицинское информационное агентство. – 2011. – 544 с.
69. Семенов А.Н. Технологичность конструкции изделия машиностроения. Рыбинск: РГАТУ имени П.А. Соловьева, 2016. – 217 с.
70. Тагер А.А. Физико-химия полимеров / Тагер А.А. – Москва: Рипол Классик. – 2007.
71. Тищенко П.Д. Био-власть в эпоху биотехнологий / Тищенко П.Д. – Москва: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт философии Российской академии наук. – 2001. – 178 с.
72. Токсикологическое заключение: № 38899. Полиоксибутират медицинского назначения / ВНИИИ Медицинской техники МЗ РФ. – Москва. – 10.01.2000.

73. Трещалина Е.М. Коллекция опухолевых штаммов человека / Трещалина Е.М.; ред. Давыдов М.И. – Москва: Практическая медицина. – 2009. – 171 с.
74. Трещалина Е.М. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств / Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. и др. – Москва: Гриф и К. – 2012. – Гл. 39. – С. 642-657.
75. Трещалина Е.М. Иммунодефицитные мыши разведения ГУ РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН / Трещалина Е.М. – Москва: РОНЦ. – 2012. – С. 26.
76. Финкельштейн А.В. Физика белка: Курс лекций: Учеб. пособие для студентов вузов, обучающихся по биол. специальностям / Финкельштейн А.В., Птицын О.Б.; Ин-т белка РАН. – Москва: Кн. дом Университет. – 2005. – 374 с.
77. Харбиев Р.У. (ред.). Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ: учеб. пособие для системы послевуз. проф. образования врачей / Федер. служба по надзору в сфере здравоохранения и соц. развития Федер. гос. учреждение Науч. центр экспертизы средств мед. применения; ред. Хабриев Р.У. – Москва: Медицина. – 2005. – 832 с.
78. Шевелуха В.С. Сельскохозяйственная биотехнология: учебник для студентов высших учебных заведений, обучающихся по сельскохозяйственным и педагогическим, естественнонаучным и педагогическим специальностям / Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Воронин Е.С. и др.; ред. Шевелуха В.С. - 3-е изд., перераб. и доп. - Москва: Высш. шк. – 2003. – С. 469.
79. Шевлюк Н.Н. Культура животных клеток: практическое руководство / Шевлюк Н.Н., Стадников А.А., Фрешни Р.Я.; пер. с 5-го с англ. изд. Ю.Н. Хомякова, Т.И. Хомяковой. – Москва: Бином. Лаб. знаний. – 2010. – 691 с.
80. Ширинский В.П. Биоинженерия / Ширинский В.П. // Словарь нанотехнологических и связанных с нанотехнологиями терминов (электронный ресурс) / АО «Роснано» (страница сайта). – URL: https://thesaurus.rusnano.com/wiki/article565?sphrase_id=20006 (дата обращения 09.02.2022). – 2009-2020.
81. Шишкин В.С., Иванов В.Т., Наточин Ю.В., Павлов Д.С., Чернов Ю.И. Биотехнология // Большая Российская энциклопедия, Министерство культуры Российской Федерации (электронный ресурс). – URL: https://bigenc.ru/biology/text/1867258 (дата обращения: 07.02.2022). – 2005-2019.

82. Штильман М.И. Биоматериалы / Штильман М.И. // Большая Российская энциклопедия (электронный ресурс) / Министерство Культуры Российской Федерации (страница сайта). – URL: https://bigenc.ru/chemistry/text/1867408 (дата обращения 09.02.2022). – 2005-2019.
83. Abdelwahab M.A., Flynn A., Chiou B. Sen, Imam S., Orts W., Chiellini E. Thermal, mechanical and morphological characterization of plasticized PLA-PHB blends // Polymer Degradation and Stability. – 2012. – V. 9. - № 97. – P. 1822-1828.
84. Abdelwahab M., Salahuddin N., Gaber M., Mousa M. Poly(3-hydroxybutyrate)/ polyethylene glycol-NiO nanocomposite for NOR delivery: Antibacterial activity and cytotoxic effect against cancer cell lines // Int. J. Biol. Macromol. – 2018. – № 114. – P. 717-727.
85. Abe H., Doi Y. Structural effects on enzymatic degradability for poly((R)-3-hydroxybutyric acid) and its copolymers: mini-review // Int. J. Biol. Macromol. – 1999. – V. 25. – P. 185-192.
86. Abe H., Doi Y. Side-chain effect of second monomer units on crystalline morphology, thermal properties, and enzymatic degradability for random copolyesters of (R)-3-hydroxybutyric acid with (R)-3-hydroxyalkanoic acids // Biomacromolecules. – 2002. – V. 3. – № 1. – P. 133-138.
87. Abu Hajleh M.N., AL-Samydai A., Al-Dujaili E.A.S. Nano, micro particulate and cosmetic delivery systems of polylactic acid: A mini review // Journal of Cosmetic Dermatology. – 2020. – V. 19. – № 11. – P. 2805-2811.
88. Agrawal C.M., Athanasiou K.A. Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA-PGA implants // J. Biomed. Mater. Res. – 1997. – V. 38. – № 2. – P. 105-114.
89. Agarwal R., García A. J. Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair // Advanced drug delivery reviews. – 2015. – V. 94. – P. 53-62.
90. Akhtar S., Pouton C.W., Notarianni L.J. The influence of crystalline morphology and copolymer composition on drug release from solution cast and melting processed P(HB-HV) copolymer matrices // J. Controlled Release. – 1991. – V. 17. – P. 225-234.
91. Akhtar S., Pouton C.W., Notarianni L.J. Crystallisation behaviour and drug release from bacterial polyhydroxyalkanoates // Polymer. – 1992. – V. 33. – № 1. – P. 117-126.
92. Akita S., Einada Y., Miyaki Y., Fugita H. Properties of poly(β-hydroxybutyrate) as a solution // Macromol. – 1976. – V. 9. – P. 774-780.
93. Akoulina E., Dudun A., Bonartsev A., Bonartseva G., Voinova V. Effect of bacterial alginate on growth of mesenchymal stem cells // International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials. – 2019. – V. 68. – № 1-3. – P. 115-118.

94. Alimba C.G., Faggio C. Microplastics in the marine environment: Current trends in environmental pollution and mechanisms of toxicological profile // Environ. Toxicol. Pharmacol. – 2019. – V. 68. – P. 61-74.
95. Alizadeh B., Bahari Javan N., Akbari Javar H., Khoshayand M.R., Dorkoosh F. Prolonged injectable formulation of Nafarelin using in situ gel combination delivery system // Pharm Dev Technol. – 2018. – V. 23. – № 2. – P. 132-144.
96. Alpar H.O., Somavarapu S., Atuah K.N., Bramwell V.W. Biodegradable mucoadhesive particulates for nasal and pulmonary antigen and DNA delivery // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2005. – V. 57. – P. 411-430.
97. Altankov G., Grinnell F., Groth T. Studies on the biocompatibility of materials: fibroblast reorganization of substratum-bound fibronectin on surfaces varying in wettability // J. Biomed. Mater. Res. – 1996. – V. 30. – № 3. – P. 385-391.
98. Amini A.R., Laurencin C.T., Nukavarapu S.P. Bone tissue engineering: recent advances and challenges // Crit. Rev. Biomed. Eng. – 2012. – V. 40. – № 5. – P. 363-408.
99. Amor S.R., Rayment T., Sanders J.K.M. Poly(hydroxybutyrate) *in Vivo*: NMR and X-ray Characterization of the Elastomeric State // Macromolecules. – 1991. – V. 16. – № 24. – P. 4583-4588.
100. An Y.H. Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage / An Y.H., Martin K.L. – New York: Humana Press. – 2003. – V. XVIII. – 588 pp.
101. Anderson A.J, Dawes E.A. Occurence, metabolism, metabolic rate, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates // Microbiol. Rev. – 1990. – V. 54. - № 4. – P. 450-472.
102. Anderson J.M., Rodriguez A., Chang D.T. Foreign body reaction to biomaterials // Semin. Immunol. – 2008. – V. 20. – № 2. – P. 86-100.
103. Anjum A., Zuber M., Zia K.M., Noreen A., Anjum M.N., Tabasum S. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements // International Journal of Biological Macromolecules. – 2016. – V. 89. – P. 161-74.
104. Annaz B., Hing K.A., Kayser M., Buckland T., Di Silvio L. Porosity variation in hydroxyapatite and osteoblast morphology: a scanning electron microscopy study // Journal of Microscopy. – 2004. – V. 215. – № 1. – P. 100-110.
105. Antheunis H., van der Meer J.C., de Geus M., Heise A., Koning C.E. Autocatalytic equation describing the change in molecular weight during hydrolytic degradation of aliphatic polyesters // Biomacromolecules. – 2010. – V. 11. № 4. – P. 1118-1124.

106. Aoyagia Y., Doi Y., Iwata T. Mechanical properties and highly ordered structure of ultra-high-molecular-weight poly((R)-3-hydroxybutyrate) films: Effects of annealing and two-step drawing // Polymer Degradation and Stabilityю – 2003. – V. 79. – № 2. – P. 209-216.
107. Aplin A.E., Howe A., Alahari S.K., Juliano R.L. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins // Pharmacological reviews. – 1998. – V. 50. – №. 2. – P. 197-264.
108. Apte G., Repanas A., Willems C., Mujtaba A., Schmelzer C.E.H., Raichur A., Syrowatka F., Groth T., Effect of different crosslinking strategies on physical properties and biocompatibility of freestanding multilayer films made of alginate and chitosan // Macromol. Biosci. – 2019. – V. 19. – № 11. – (электронный ресурс). – URL: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mabi.201900181 (дата обращения 09.02.2022).
109. Arifin D.Y., Lee L.Y., Wang C.H. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2006. – V. 58. – P. 1274-1325.
110. Arkhipova A.Y., Kotlyarova M.C., Novichkova S.G., Agapova O.I., Kulikov D.A., Kulikov A.V., Drutskaya M.S., Agapov I.I., Moisenovich M.M. New Silk Fibroin-Based Bioresorbable Microcarriers // Bull. Exp. Biol. Med. – 2016. – V. 160. – № 4. – P. 491-494.
111. Arnold M., Cavalcanti-Adam E.A., Glass R., Blümmel J., Eck W., Kantlehner M., Kessler H., Spatz J.P. Activation of Integrin Function by Nanopatterned Adhesive Interfaces // ChemPhysChem. – 2004. – V. 5. – № 3. – P. 383-388.
112. Arpagaus C., Collenberg A., Rütti D., Assadpour E., Jafari S.M. Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals // International journal of pharmaceutics. – 2018. – V. 546. – № 1-2. – P. 194-214.
113. Ashby R.D., Shi F., Gross R.A. Use of poly(ethylene glycol) to control the end group structure and molecular weight of poly(3-hydroxybutyrate) formed by Alcaligenes latus DSM 1122 // Tetrahedron. – 1997. – V. 53. – P. 15209-15223.
114. Ashby R.D., Shi F., Gross R.A. A tunable switch to regulate the synthesis of low and high molecular weight microbial polyesters // Biotechnol. Bioeng. – 1999. – V. 62. – P. 106–113.
115. Ashby R.D., Solaiman D.K.Y., Foglia T.A. Poly(ethylene glycol)-mediated molar mass control of short-chain- and medium-chain-length poly(hydroxyalkanoates) from Pseudomonas oleovorans // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – V. 60. – P. 154-159.
116. Asrar J. Biodegradable Polymer (Biopol®) / Asrar J., Gruys K.J. // Series of Biopolymers / ed. A. Steinbuchel, Wiley-VCY. – Berlin: GmbH. – 2002. – V. 4. – P. 55-86.

117. Asuthkar S., Velpula K.K., Elustondo P.A., Demirkhanyan L., Zakharian E. TRPM8 channel as a novel molecular target in androgen-regulated prostate cancer cells // Oncotarget. – 2015. – V. 6. – № 19. – P. 17221-17236.
118. Atala A. Methods of tissue engineering / Atala A., Lanza R.P.; 1st edition. – Cambridge, USA: Academic Press. – 2002. – 1328 p.
119. Athanasiou K.A., Niederauer G.G., Agrawal C.M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers // Biomaterials. – 1996. – V. 17 № 2. – P. 93-102.
120. Athlan A., Braud C., Vert M. Abiotic aging of water-soluble 3-hydroxybutyric acid oligomers as monitored by capillary zone electrophoresis // Journal of Polymers and the Environment. – 1997. – V. 5 № 4. – P. 243-247.
121. Atkins T.W., Peacock S.J. The incorporation and release of bovine serum albumin from poly(beta-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) microspheres // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. – 1996. – V. 7. № 12. – P. 1065-1073.
122. Avella M., Matuscelli E. Poly-d(−)(3-hydroxybutyrate)/poly(ethylene oxide) blends: phase diagram, thermal and crystallization behavior // Polymer. – 1988. – V. 29. – P. 1731-1735.
123. Avella M., Martuscelli E., Raimo M. Review Properties of blends and composites based on poly(3-hydroxy)butyrate (PHB) and poly(3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) (PHBV) copolymers // Journal of Materials Science. – 2000. – V. 35. № 3. – P. 523-545.
124. Azab A.K., Doviner V., Orkin B., Kleinstern J., Srebnik M., Nissan A., Rubinstein A. Biocompatibility evaluation of crosslinked chitosan hydrogels after subcutaneous and intraperitoneal implantation in the rat // J. Biomed. Mater. Res. Part A. – 2007. – V. 83. № 2. – P. 414-422.
125. Azevedo H., Reis R. Understanding the Enzymatic Degradation of Biodegradable Polymers and Strategies to Control Their Degradation Rate // Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. – 2004. – P. 177-202.
126. Bachmann B.M., Seebach D. Investigation of the enzymatic cleavage of diastereomeric oligo(3-hydroxybutanoates) containing two to eight HB units. A model for the stereoselectivity of PHB depolymerase from Alcaligenes faecalis T1 // Macromolecules. –1999. – V. 6. – № 32. – P. 1777-1784.
127. Bagde A.D., Kuthe A.M., Quazi S., Gupta V., Jaiswal S., Jyothilal S., Lande N., Nagdeve S. State of the art technology for bone tissue engineering and drug delivery // IRBM. – 2019. – V. 40. № 3. – P. 133-144.

128. Bagrov D.V., Prokhorov V.V., Klinov D.V., Agapov I.I., Iaminskiĭ I.V., Bogush V.G. Study of lamellae of a recombinant spider-web protein by atomic force microscopy // Biophysics. – 2011. – P. 56. – № 1. – P. 3-7.
129. Bai H.Y., Chen G.A., Mao G.H., Song T.R., Wang Y.X. Three step derivation of cartilage like tissue from human embryonic stem cells by 2D-3D sequential culture in vitro and further implantation in vivo on alginate/PLGA scaffolds // J. Biomed. Mater. Res. Part A. – 2010. – V. 94. – P. 539-546.
130. Baker R. Controlled release of biologically active agents / Baker R. – Cambridge: Academic Press. – 1987. – 279 p.
131. Balcerzak M., Hamade E., Zhang L., Pikula S., Azzar G., Radisson J., Bandorowicz-Pikula J., Buchet R. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process // Acta Biochim Pol. – 2003. – V. 50. № 4. – P. 1019-1038.
132. Baptist J. N., Ziegler J. B. Method of making absorbable surgical sutures from poly beta hydroxy acid // US Patent № 3 229 766. – 1965.
133. Baptista D., Teixeira L., van Blitterswijk C., Giselbrecht S., Truckenmüller R. Overlooked? Underestimated? Effects of Substrate Curvature on Cell Behavior // Trends Biotechnol. – 2019. – V. 37. № 8. – P. 838-854.
134. Barboza F.M., Machado W.M., Olchanheski Junior L.R., Padilha de Paula J., Zawadzki S.F., Fernandes D., et al. PCL/PHBV microparticles as innovative carriers for oral controlled release of manidipine dihydrochloride // Scientific World Journal. – 2014. – P. 268107.
135. Barham P.J., Keller A., Otun E.L., Holmes P.A. Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate // Journal of Materials Science. – 1984. – V. 19. – № 9. – P. 2781-2794.
136. Barham P.J., Keller A. The relationship between microstructure and mode of fracture in polyhydroxybutyrate // Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics. – 1986. – V. 1. – № 24. – P. 69-77.
137. Barcham P.J. Physical properties of poly(hydroxybutyrate) and poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvaleate) // Novel biosynthetic biodegradable polymers: Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on New Biosynthetic Biodegradable Polymers of Industrial Interest from Microorganisms / Edwin A.D.; North Atlantic Treaty Organization, Scientific Affairs Division. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. – 1990. – P. 81-96.
138. Barham P.J., Barker P., Organ S.J. Physical properties of poly(hydroxybutyrate) and copolymers of hydroxybutyrate and hydroxyvalerate // FEMS Microbiology Letters. – 1992. – V. 2-4. – № 103. – P. 289-298.

139. Barnard G.N., Sanders J.K., The poly-β-hydroxybutyrate granule in vivo. A new insight based on NMR spectroscopy of whole cells // J. Biol. Chem. – 1989. – V. 264. – № 6. – P. 3286-3291.
140. Bat E., van Kooten T.G., Feijen J., Grijpma D.W. Macrophage-mediated erosion of gamma irradiated poly(trimethylene carbonate) films // Biomaterials. – 2009. – V. 30. – № 22. – P. 3652-3661.
141. Batten P., Rosenthal N.A., Yacoub M.H. Immune response to stem cells and strategies to induce tolerance // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. – 2007. – V. 362. – № 1484. – P. 1343-1356.
142. Batycky R.P., Hanes J., Langer R., Edwards D.A. A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres // Journal of pharmaceutical sciences. – 1997. – V. 86. – №. 12. – P. 1464-1477.
143. Bazzo G.C., Caetano D.B., Boch M.L., Mosca M., Branco L.C., Zétola M. et al. Enhancement of felodipine dissolution rate through its incorporation into Eudragit® E-PHB polymeric microparticles: in vitro characterization and investigation of absorption in rats // J. Pharm. Sci. – 2012. – V. 101. № 4. – P. 1518-1523.
144. Beaucage G., Rane S., Sukumaran S., Satkowski M.M., Schechtman L.A., Doi Y. Persistence Length of Isotactic Poly(hydroxybutyrate) // Macromolecules. – 1997. – V. 30. – № 14. P. 4158-4162.
145. Bernd H.A., Qi Q., Beermann B.B., Hinz H.J., Steinbüchel A. Matrix-assisted *in vitro* refolding of Pseudomonas aeruginosa class II polyhydroxyalkanoate synthase from inclusion bodies produced in recombinant *Escherichia coli* // Biochemical Journal. – 2001. – V. 358. – №. 1. – P. 263-268.
146. Bhat S., Kumar A. Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare // Biomatter. – 2013. – V. 3. – № 3. – P. e24717.
147. Bianco A., Calderone M., Cacciotti I. Electrospun PHBV/PEO co-solution blends: microstructure, thermal and mechanical properties // Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. – 2013. – V. 33. – № 3. – P. 1067-1077.
148. Bibers I. et al. Improvement of the deformative characteristics of poly-β-hydroxybutyrate by plasticization // Mechanics of composite materials. – 1999. – V. 35. – №. 4. – P. 357-364.
149. Bioengineering // Glossary of Terms / National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering (NIBIB), National Institutes of Health (electronic resource). – URL: https://www.nibib.nih.gov/science-education/glossary/b (date of application 09.02.2022).

150. Bioengineering // Dictionary by Merriam-Webster (electronic resource). – URL: https://www.merriam-webster.com/dictionary/bioengineering (date of application 09.02.2022).
151. Biotechnology // Dictionary by Merriam-Webster (electronic resource) . – URL: https://www.merriam-webster.com/dictionary/biotechnology (date of application 09.02.2022).
152. Biotechnology // Wikipedia (electronic resource). – URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Biotechnology (date of application 09.02.2022).
153. Birley C., Briddon J., Sykes K.E., Barker P.A., Organ S.J., Barham P.J. Morphology of single crystals of poly (hydroxybutyrate) and copolymers of hydroxybuty rate and hydroxyvalerate // Journal of Materials Science. – 1995. – V. 3. – № 30. – P. 633-638.
154. Blanco E., Bey E.A., Dong Y., Weinberg BD, Sutton DM, Boothman DA, Gao J. β-Lapachone-containing PEG–PLA polymer micelles as novel nanotherapeutics against NQO1-overexpressing tumor cells // J. Control. Release. – 2007. – V. 122. – P. 365-374.
155. Bloembergen S., Holden D.A., Hamer G.K., Bluhm T.L., Marchessault R.H. Studies of composition and crystallinity of bacterial poly (β-hydroxybutyrate-co-β-hydroxyvalerate) // Macromolecules. – 1986. – V. 19. – №. 11. – P. 2865-2871.
156. Blog Article: What's The Difference Between Bioengineering vs Biomedical Engineering / US Riverside: Online master of Science in Engineering (electronic resource) / University of California (UCR). – URL: https://engineeringonline.ucr.edu/blog/whats-the-difference-between-bioengineering-vs-biomedical-engineering (date of application 09.02.2022).
157. Bonartsev AP, Postnikov AB, Myshkina VL, Artemieva MM, Medvedeva NA. A new system of nitric oxide donor prolonged delivery on basis of controlled-release polymer, polyhydroxybutyrate // American Journal of Hypertension. – 2005. – V. 18. № 5A. – P. A51.
158. Bonartsev A.P., Myshkina V.L., Nikolaeva D.A., Furina E.K., Makhina T.A., Livshits V.A., Boskhomdzhiev A.P., Ivanov E.A., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A. Biosynthesis, biodegradation, and application of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers - natural polyesters produced by diazotrophic bacteria // Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology / Méndez-Vilas A. (editor). – Spain: Formatex. – 2007. – V. 1. – P. 295-307. (a)
159. Bonartsev A.P., Livshits V.A., Makhina T.A., Myshkina V.L., Bonartseva G.A., Iordanskii A.L. Controlled release profiles of dipyridamole from biodegradable microspheres on the base of poly(3-hydroxybutyrate) // Express Polymer Letters. – 2007. – V. 1. – № 12. – P. 797-803. (б)
160. Bonartsev A.P., Postnikov A.B., Mahina T.K., Myshkina V.L., Voinova V.V., Boskhomdzhiev A.P. A new in vivo model of prolonged local nitric oxide action on arteries on basis of

biocompatible polymer // The Journal of Clinical Hypertension. – 2007. – V. 9. – № 5A. – P. A152. (в)

161. Bonartsev A.P., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A. and Zaikov G.E. Biodegradation and Medical Application of Microbial Poly (3-Hydroxybutyrate) // Journal of the Balkan tribological association. – 2008. – V. 14. – № 3. – P. 359-395.

162. Bonartsev A.P., Yakovlev S.G., Boskhomdzhiev A.P., Zharkova I.I., Bagrov D.V., Myshkina V.L., Mahina T.K., Charitonova E.P., Samsonova O.V., Zernov A.L., Zhuikov V.A., Efremov Yu.M., Voinova V.V., Bonartseva G.A., Shaitan K.V. The terpolymer produced by Azotobacter chroococcum 7B: effect of surface properties on cell attachment // PLoS ONE. – 2013. – V. 8. – № 2. – P. e57200. (a)

163. Bonartsev A.P., Yakovlev S.G., Zharkova I.I., Boskhomdzhiev A.P., Bagrov D.V., Myshkina V.L., Makhina T.K., Kharitonova E.P., Samsonova O.V., Feofanov A.V., Voinova V.V., Zernov A.L., Efremov Yu.M., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P. Cell attachment on poly(3-hydroxybutyrate)-poly(ethylene glycol) copolymer produced by *Azotobacter chroococcum* 7B // BMC Biochemistry. – 2013. – V. 14. – P. 12.(b)

164. Bonartsev A.P., Bonartseva G.A., Myshkina V.L., Voinova V.V., Mahina T.K., Zharkova I.I., Yakovlev S.G., Zernov A.L., Ivanova E.V., Akoulina E.A., Kuznetsova E.S., Zhuikov V.A., Alekseeva S.G., Podgorskii V.V., Bessonov I.V., Kopitsyna M.N., Morozov A.S., Milanovskiy E.Y., Tyugay Z.N., Bykova G.S., Kirpichnikov M.P., Shaitan K.V. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrateco-3-hydroxy-4-methylvalerate) by Strain *Azotobacter chroococcum* 7B // Acta Naturae. – 2016. – V. 8. – № 3. – P. 77-87 (a)

165. Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Mahina T.K., Voinova V.V., Zernov A.L., Zhuikov V.A., Akoulina E.A., Ivanova E.V., Kuznetsova E.S., Shaitan K.V., Bonartseva G.A. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) copolymers by *Azotobacter chroococcum* 7B: a precursor feeding strategy // Preparative Biochemistry and Biotechnology. – 2017. – V. 47. – № 2. – P. 173-184. (a)

166. Bonartsev A.P., Zernov A.L., Yakovlev S.G., Zharkova I.I., Myshkina V.L., Mahina T.K., Bonartseva G.A., Andronova N.V., Smirnova G.B., Borisova J.A., Kalishjan M.S., Shaitan K.V., Treshalina H.M. New poly(3-hydroxybutyrate) microparticles with paclitaxel sustained release for intraperitoneal administration // Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry. – 2017. – V. 17. – № 3. – P. 434-441. (в)

167. Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Voinova V.V., Kuznetsova E.S., Zhuikov V.A., Makhina T.K., Myshkina V.L., Potashnikova D.M., Chesnokova D.V., Khaydapova D.D., Bonartseva G.A., Shaitan K.V. Poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ethylene glycol) scaffolds with different

microstructure: the effect on growth of mesenchymal stem cells // 3 Biotech. – 2018. – V. 8. – P. 328. (a)

168. Bonartsev A.P. Poly(3-hydroxybutyrate): applications // Encyclopedia of Polymer Applications / Mishra M. (editor). – Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group. – 2018. – V. 3. – P. 2061-2076. (б)

169. Bonartseva G.A., Myshkina V.L., Nikolaeva D.A., Kevbrina M.V., Kallistova A.Y., Gerasin V.A., Iordanskii A.L., Nozhevnikova A.N. Aerobic and anaerobic microbial degradation of poly-beta-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum* // Appl Biochem Biotechnol.– 2003. – V. 109. – № 1-3. – P. 285-301.

170. Bonartseva G.A., Myshkina V.L., Nikolaeva D.A., Kevbrina M.V., Kallistova A.Y., Gerasin V.A., Iordanskii A.L., Nozhevnikova A.N. Aerobic and anaerobic microbial degradation of poly-beta-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum* // Appl Biochem Biotechnol. – 2003. – V. 109. – № 1-3. – P. 285-301.

171. Bongio M., Beucken J.J.J.P. van den, Leeuwenburgh S.C.G., Jansen J.A. Development of bone substitute materials: from 'biocompatible' to 'instructive' // J. Mater. Chem. – 2010. – V. 20. – № 40. – P. 8747-8759.

172. Boni L.T., Hah J.S., Hui S.W., Mukherjee P., Ho J.T., Jung C.Y. Aggregation and fusion of unilamellar vesicles by poly(ethylene glycol) // Biochim. Biophys. Acta. – 1984. – V. 775. – P. 409-418.

173. Boon N., Defoirdt T., De Windt W., Van De Wiele T., Verstraete W. // Patent US 8,603,518 B2, – 10.12.2013

174. Borden M., Attawia M., Khan Y., Laurencin C.T. Tissue engineered microsphere-based matrices for bone repair: design and evaluation // Biomaterials. – 2002. – V. 23. – № 2. – P. 551-559.

175. Borenfreund E., Babich H., Martin-Alguacil N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests // Toxicol. In Vitro. – 1988. – V. 2. – № 1. – P. 1-6.

176. Bosch C., Melsen B., Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials // J. Craniofac. Surg. – 1998. – V. 9. – P. 310-316.

177. Bose S., Vahabzadeh S., Bandyopadhyay A. Bone tissue engineering using 3D printing // Mater. Today. – 2013. – T. 16. – № 12. – P. 496-504.

178. Böstman O., Pihlajamäki H. Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review // Biomaterials. – 2000. – V. 21. – № 24. – P. 2615-2621.

179. Boxall S.A., Jones E. Markers for Characterization of Bone Marrow Multipotential Stromal Cells // Stem Cells Int. – 2012. – V. 2012. – P. 975871.
180. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding //Analytical biochemistry. – 1976. – V. 72. – №. 1-2. – p. 248-254.
181. Brandl H. Plastics from bacteria and for bacteria: Poly(3-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible and biodegradable polyesters / Brandl H., Gross R.A., Lenz R.W., Fuller R.C. // Microbial Bioproducts / Fiechter A. (editor) // Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. – Berlin: Springer. – 1990. – V. 41. – P. 77-93.
182. Brigger I., Dubernet C., Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis // Adv Drug Deliv Rev. – 2002. – V. 54. – P. 631-651.
183. Bronzino J.D. Biomedical Engineering: A Definition / Bronzino J.D. (Ed.) // Biomedical Engineering Handbook 2. – 2nd edition. – Boca Raton, Florida, USA: CRC Press LLC. – 2000. – V.1. – 3189 p. – P. 6-8.
184. Brückner S., Meille S.V., Malpezzi L., Ceslro A., Navarini L., Tombolini R. The structure of poly(D-beta-hydroxybutyrate). A refinement based on the Rietveld method // Macromolecules. – 1988. – V. 4. – № 21. – P. 967-972.
185. Bud R. Introduction / Bud R. // Bud R. The uses of life: a history of biotechnology / Bud R. – Cambridge: Cambridge University Press. – 1994. – P. 1-2.
186. Burr D.B. (editor) Basic and Applied Bone Biology / Burr D.B., Allen M.R. (editors). – 2nd Edition. – Cambridge, USA: Academic Press. – 2019. – 478 p.
187. Byrne E.M., Farrell E., McMahon L.A., Haugh M.G., O'Brien F.J., Campbell V.A., Prendergast P.J., O'Connell B.C. 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. – V. 19. – №. 11. – P. 3455-3463.
188. Cai Q., Shi G., Bei J., Wang S. Enzymatic degradation behavior and mechanism of poly(lactide-co-glycolide) foams by trypsin // Biomaterials. – 2003. – V. 24. № 4. – P. 629-638.
189. Caliari 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. – V. 3. – №. 7. – P. 1086-1096.
190. Cao C., Yudin Y., Bikard Y., Chen W., Liu T., Li H., Jendrossek D., Cohen A., Pavlov E., Rohacs T., Zakharian E. Polyester modification of the mammalian TRPM8 channel protein: implications for structure and function // Cell Rep. – 2013. – V. 4. № 2. – P. 302-315.

191. Capitan M.J., Rueda D.R., Ezquerra T.A. Inhibition of the crystallization in nanofilms of poly(3-hydroxybutyrate) // Macromolecules. – 2004. – V. 15. – № 37. – P. 5653-5659.
192. Caplan A. I. Mesenchymal stem cells //Journal of orthopaedic research. – 1991. – V. 9. – №. 5. – P. 641-650.
193. Castellano D., Blanes M., Marco B., Cerrada I., Ruiz-Saurí A., Pelacho B., Araña M., Montero J.A., Cambra V., Prosper F., Sepúlveda P. A comparison of electrospun polymers reveals poly(3-hydroxybutyrate) fiber as a superior scaffold for cardiac repair // Stem. Cells Dev. – 2014. – V. 23. – № 13. – P. 1479-1490.
194. Castellanos I.J., Griebenow K. Improved α-chymotrypsin stability upon encapsulation in PLGA microspheres by solvent replacement // Pharmaceutical research. – 2003. – V. 20. – №. 11. – P. 1873-1880.
195. Castuma C.E., Huang R., Kornberg A., Reusch R.N. Inorganic polyphosphates in the acquisition of competence in *Escherichia coli* // J. Biol. Chem. – 1995. – V. 270. – № 22. – P. 12980-12983.
196. Ceonzo K., Gaynor A., Shaffer L., Kojima K., Vacanti C.A., Stahl G.L. Polyglycolic acid-induced inflammation: role of hydrolysis and resulting complement activation // Tissue Eng. – 2006. – V. 12. – № 2. – P. 301-308.
197. Chahal S., Kumar A., Jahir Hussian F.S. Development of biomimetic electrospun polymeric biomaterials for bone tissue engineering. A review // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. – 2019. – V. 30. – № 14. – P. 1308-1355.
198. Chan C.M., Li L. Direct observation of the growth of lamellae and spherulites by AFM // Advances in Polymer Science. – 2005. – V. 188. – P. 1-41.
199. Chan R. T., Marçal H., Ahmed, T., Russell, R.A., Holden, P.J. and Foster, L.J.R. Poly (ethylene glycol)-modulated cellular biocompatibility of polyhydroxyalkanoate films // Polymer International. – 2013. – V. 62. – № 6. – P. 884-892.
200. Chang H.C., Sun T., Sultana N., Lim M.M., Khan T.H., Ismail A.F. Conductive PEDOT: PSS coated polylactide (PLA) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) electrospun membranes: Fabrication and characterization // Materials Science and Engineering: C. – 2016. – V. 61. – P. 396-410.
201. Chang W., Zhang M., Zheng S., Li Y., Li X., Li W., Li G., Lin Z., Xie Z., Zhao Z., Lou H. Trapping toxins within lipid droplets is a resistance mechanism in fungi // Sci Rep. – 2015. – V. 5. – P. 15133.
202. Chawla H.S. Introduction // Introduction to plant biotechnology / Chawla H.S. (editor). – 3rd Edition. – Enfield (NH): CRC Press, Taylor & Francis group. – 2009. – 697 p. – P. 4-5.

203. Chen C., Cheng Y.C., Yu C.H., Chan S.W., Cheung M.K., Yu P.H. In vitro cytotoxicity, hemolysis assay, and biodegradation behavior of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate)-poly(ethylene glycol)-poly(3-hydroxybutyrate) nanoparticles as potential drug carriers // J. Biomed. Mater. Res A. – 2008. – V. 87. – № 2. – P. 290-298.
204. Chen C.T., Shih Y.R., Kuo T.K., Lee O.K., Wei Y.H. Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells // Stem Cells. – 2008. – V. 26. – №. 4. – P. 960-968.
205. Chen G.Q. Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications / G.Q. Chen // Microbiology Monographs / Steinbüchel A. (editor). – 2010. – V. 14. – P. 17-37.
206. Chen G.Q., Wu Q. Microbial production and applications of chiral hydroxyalkanoates // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2005. – V. 67. – № 5. – P. 592-599.
207. Chen G., Dong C., Yang L., Lv Y. 3D scaffolds with different stiffness but the same microstructure for bone tissue engineering //ACS applied materials & interfaces. – 2015. – V. 7. – № 29. – P. 15790-15802.
208. Chen R.R., Mooney D. J. Polymeric growth factor delivery strategies for tissue engineering // Pharmaceutical research. – 2003. – V. 20. – № 8. – P. 1103-1112.
209. Chen X.D., Qian H.Y., Neff L., Satomura K., Horowitz M.C. Thy-1 Antigen Expression by Cells in the Osteoblast Lineage // Journal of Bone and Mineral Research. – 1999. – V. 14. – № 3. – P. 362-375.
210. Cheng G., Cai Z., Wang L. Biocompatibility and biodegradation of poly(hydroxybutyrate)/poly(ethylene glycol) blend films // J. Mater. Sci. Mater. Med. – 2003. – V. 14. – № 12. – P. 1073-1078.
211. Cheng H., Wu Z., Wu C., Wang X., Liow S.S., Li Z. et al. Overcoming STC2 mediated drug resistance through drug and gene co-delivery by PHB-PDMAEMA cationic polyester in liver cancer cells // Mater Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. – 2018. – V. 83. – P. 210-217.
212. Cheng S., Yang F., Xu M., Wu Q., Leski M., Chen G.Q. Influence of DL-3-hydroxybutyric acid on cell proliferation and calcium influx // Biomacromolecules. – 2005. – V. 6. – P. 593-597.
213. Cheng S., Chen G.Q., Leski M., Zou B., Wang Y., Wu Q. The effect of D,L-b-hydroxybutyric acid on cell death and proliferation in L929 cells // Biomaterials. – 2006. – V. 27. – P. 3758-3765.
214. Chernozem R.V., Pariy I.O., Pryadko A., Bonartsev A.P., Voinova V.V., Zhuikov V.A., Makhina T.K., Shvartsman V.V., Lupascu D.C., Surmenev R.A., Maria A. Surmeneva M.A. Molecular, structural, topographical and piezoelectric characteristics of bio-degradable

polyhydroxybutyrate-based films for tissue engineering applica-tions: impact of thickness, molecular weight and 3-hydroxyvalerate content // Polymer. – 2021. – in print.

215. Choi G.G., Kim H.W., Rhee Y.H. Enzymatic and non-enzymatic degradation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolyesters produced by *Alcaligenes* sp. MT-16 // J. Microbiol. – 2004. – V. 42. – № 4. – P. 346-352.
216. Chou J., Ito T., Bishop D., Otsuka M., Ben-Nissan B., Milthorpe B. Controlled release of simvastatin from biomimetic β-TCP drug delivery system // PLoS One. – 2013. – V. 8. – N 1. – P. e54676.
217. Chung H.J., Kim H.K., Yoon J.J., Park T.G. Heparin Immobilized Porous PLGA Microspheres for Angiogenic Growth Factor Delivery // Pharm Res. – 2006. – V. 23. – P. 1835-1841.
218. Clark D.P. Introduction / Clark D.P., Pazdernik N.J. // Biotechnology / Clark D.P., Pazdernik N.J. (editors). – 2nd Edition. – Newnes: Academic Cell, Elsevier. – 2015. – 833 p.
219. Cochran D., Simpson J., Weber H., Buser D. Attachment and growth of periodontal cells on smooth and rough titanium // Int. J. Oral. Max. Impl. – 1994. – V. 9. – P. 289-297.
220. 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. – V. 21. – №. 11. – P. 1095-1102.
221. Coimbra P.A., De Sousa H.C., Gil M.H. Preparation and characterization of flurbiprofen-loaded poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) microspheres // J. Microencapsul. – 2008. – V. 25. – № 3. – P. 170-178.
222. Cooke M.N., Fisher J.P., Dean D., Rimnac C., Mikos A.G. Use of stereolithography to manufacture critical-sized 3D biodegradable scaffolds for bone ingrowth // Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. – 2003. – V. 64. – №. 2. – P. 65-69.
223. Cool S.M., Kenny B., Wu A., Nurcombe V., Trau M., Cassady A.I., Grøndahl L. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) composite biomaterials for bone tissue regeneration: in vitro performance assessed by osteoblast proliferation, osteoclast adhesion and resorption, and macrophage proinflammatory response // J. Biomed. Mater. Res A. – 2007. – V. 82. – № 3. – P. 599-610.
224. Coskun S., Korkusuz F., Hasirci V. Hydroxyapatite reinforced poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) based degradable composite bone plate // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. – 2005. – V. 12. – № 16. – P. 1485-1502.
225. Costa M.S., Duarte A.R., Cardoso M.M., Duarte C.M. Supercritical antisolvent precipitation of PHBV microparticles // Int. J. Pharm. – 2007. – V. 328. – № 1. – P. 72-77.

226. Council of Europe. European convention for the protection of pets animals // Eur. Treaty Ser. – 1987. – V. 10. – № 102. – P. 1-8.
227. Crank J. The Mathematics of Diffusion / Crank J. – second edition. – Oxford: Clarendon Press. – 1975. – 414 p.
228. Criscenti G., Vasilevich A., Longoni A., De Maria C., van Blitterswijk C.A., Truckenmuller R., Vozzi G., De Boer J., Moroni L. 3D screening device for the evaluation of cell response to different electrospun microtopographies // Acta Biomater. – 2017. – V. 55. – P. 310-322.
229. Croteau R., Ketchum R.E.B., Long R.M., Kaspera R., Wildung M.R. Taxol biosynthesis and molecular genetics // Phytochemistry Reviews. – 2006. – V. 5. – P. 75-97.
230. Cruz D.M., Gomes M., Reis R.L., Moratal D., Salmerón-Sánchez M., Ribelles J.L., Mano J.F. Differentiation of mesenchymal stem cells in chitosan scaffolds with double micro and macroporosity // J. Biomed Mater Res A. – 2010. – V. 95ю – # 4. – P. 1182-1193.
231. Dai D., Reusch R.N. Poly-3-hydroxybutyrate synthase from the periplasm of *Escherichia coli* // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2008. – V. 374. – № 3. – P. 485-489.
232. Daniel I.M. (editor) Engineering Mechanics of Composite Materials / Daniel I.M., Ishai O. (editors). – 2nd edition. – New York: Oxford university press. – 2006. – V. 1994. – 464 p.
233. Das S., Lengweiler U.D., Seebach D., Reusch R.N. Proof for a nonproteinaceous calcium-selective channel in *Escherichia coli* by total synthesis from (R)-3-hydroxybutanoic acid and inorganic polyphosphate // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – V. 94. – № 17. – P. 9075-9079.
234. Dawes E.A., Senior P.J. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms // Adv. Microb. Physiol. – 1973. – V. 10. – P. 135-266.
235. de Boer J. (editor) Materiomics: High-Throughput Screening of Biomaterial Properties / de Boer J., van Blitterswijk C.A. (editors). – Cambridge: University Press. – 2013. – 219 p.
236. de Koning G.J.M., Lemstra P.J. Crystallization phenomena in bacterial poly((R)-3-hydroxybutyrate): 2. Embrittlement and rejuvenation // Polymer. – 1993. – V. 19. – № 34. – P. 4089-4094.
237. de Koning G.J.M., Scheeren A.H.C., Lemstra P.J., Peeters M., Reynaers H. Crystallization phenomena in bacterial poly((R)-3-hydroxybutyrate): 3. Toughening via texture changes // Polymer. – 1994. – V. 21. – № 35. – P. 4598-4605.
238. de Paula A.C., Zonari A.A., Martins T.M., Novikoff S., da Silva A.R., Correlo V.M., Reis R.L., Gomes D.A., Goes A.M. Human serum is a suitable supplement for the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells seeded on poly-3-hydroxibutyrate-co-3-hydroxyvalerate scaffolds // Tissue Eng. Part A. – 2013. – V. 19. – № 1-2. – P. 277-289.

239. de Peppo G. M., Marolt D. Modulating the biochemical and biophysical culture environment to enhance osteogenic differentiation and maturation of human pluripotent stem cell-derived mesenchymal progenitors // Stem Cell Research & Therapy. – 2013. – V. 4. – № 5. – P. 1-11.
240. Defoirdt T., Halet D., Vervaeren H., Boon N., Van de Wiele T., Sorgeloos P., Bossier P., Verstraete W. The bacterial storage compound poly-β-hydroxybutyrate protects Artemia franciscana from pathogenic *Vibrio campbellii* // Environ. Microbiol. – 2007. – V. 9. – № 2. – P. 445-452.
241. Defoirdt T., Boon N., Sorgeloos P., Verstraete W., Bossier P. Short-chain fatty acids and poly-beta-hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production // Biotechnol. Adv. – 2009. – V. 27. – № 6. – P. 680-685.
242. Degli Esposti M., Chiellini F., Bondioli F., Morselli D., Fabbri P., Highly porous PHB-based bioactive scaffolds for bone tissue engineering by in situ synthesis of hydroxyapatite // Mater. Sci. Eng. C. – 2019. – V. 100. – P. 286-296.
243. Deligianni D.D., Katsala N.D., Koutsoukos P.G., Missirlis Y.F. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength // Biomaterials. – 2000. – V. 22. – № 1. – P. 87-96.
244. Demirel M.C., So E., Ritty T.M., Naidu S.H., Lakhtakia A. Fibroblast cell attachment and growth on nanoengineered sculptured thin films // J. Biomed Mater Res B Appl Biomater. – 2007. – V. 81. – № 1. – P. 219-23.
245. Deschamps A.A., Claase M.B., Sleijster W.J., de Bruijn J.D., Grijpma D.W., Feijen J. Design of segmented poly (ether ester) materials and structures for the tissue engineering of bone // Journal of controlled release. – 2002. – V. 78. – №. 1. – P. 175-186.
246. Di Lorenzo M.L., Raimo M., Cascone E., Martuscelli E. Poly(3-Hydroxybutyrate)-Based Copolymers and Blends: Influence of a Second Component on Crystallization and Thermal Behavior // Journal of Macromolecular Science, Part B. – 2001. – V. 5. – № 40. – P. 639-667.
247. Doi Y., Kanesawa Y., Kunioka M., Saito T. Biodegradation of microbial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) // Macromolecules. – 1990. – V. 1. – № 23. – P. 26-31.
248. Doi Y., Kitamura S., Abe H. Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) // Macromolecules. – 1995. – V. 14. – № 28. – P. 4822-4828.
249. Domb A. J., Turovsky L., Nudelman R. Chemical interactions between drugs containing reactive amines with hydrolyzable insoluble biopolymers in aqueous solutions // Pharmaceutical research. – 1994. – V. 11. – № 6. – P. 865-868.

250. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement //Cytotherapy. – 2006. – V. 8. – № 4. – P. 315-317.
251. Dong Y., Feng S.S. Poly(D,L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs // Biomaterials. – 2005. – V. 26. – P. 6068-6076.
252. Dowling D.P., Miller I.S., Ardhaoui M., Gallagher W.M. Effect of Surface Wettability and Topography on the Adhesion of Osteosarcoma Cells on Plasma-modified Polystyrene // J. Biomat. Appl. – 2010. – V. 26. – № 3. – P. 327-347.
253. Doyle C., Tanner E.T., Bonfield W. In vitro and in vivo evaluation of polyhydroxybutyrate and of polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxyapatite // Biomaterials. – 1991. – V. 9. – № 12. P. 841-847.
254. DrugBank Online (electronic resource). – URL: https://go.drugbank.com/ (date of application 10.02.2022).
255. Dudun A.A., Akoulina E.A., Zhuikov V.A., Makhina T.K., Voinova V.V., Belishev N.V., Shaitan K.V., Bonartseva G.A., Bonartsev A.P. The competitive biosynthesis of bacterial alginate by *Azotobacter vinelandii* 12 for tissue engineering application // Polymers. – 2021. – in print.
256. Duggal S., Frønsdal K.B., Szöke K., Shahdadfar A., Melvik J.E., Brinchmann J.E. Phenotype and gene expression of human mesenchymal stem cells in alginate scaffolds // Tissue Eng. Part A. – 2009. – V. 15. – № 7. – P. 1763-1773.
257. Dutta Roy T., Simon J.L., Ricci J.L., Rekow E.D., Thompson V.P., Parsons J.R. Performance of hydroxyapatite bone repair scaffolds created via three-dimensional fabrication techniques // Journal of biomedical materials research Part A. – 2003. – V. 67. – №. 4. – P. 1228-1237.
258. Einhorn T.A., Gerstenfeld L.C. Fracture healing: mechanisms and interventions // Nat. Rev. Rheumatol. – 2014. – V. 11. – № 1. – P. 45-54.
259. Eisenstark A., McMahon K.J., Eisenstark R. A cytological study of a pleomorphic strain of *Azotobacter* with the electron and phase microscopes and the Robinow nuclear staining technique // J. Bacteriol. – 1950. – V. 59. – № 1. – P. 75-81.
260. El-Hadi A., Schnabel R., Straube E., Müller G., Henning S. Correlation between degree of crystallinity, morphology, glass temperature, mechanical properties and biodegradation of poly (3-hydroxyalkanoate) PHAs and their blends // Polymer Testing. – 2002. – V. 21. – № 6. – P. 665-674.

261. Elustondo P., Zakharian E., Pavlov E. Identification of the polyhydroxybutyrate granules in mammalian cultured cells // Chem. Biodivers. – 2012. – V. 9. – № 11. – P. 2597-2604.
262. Enderle J. (editor) What is Biomedical Engineering? // Introduction to biomedical engineering / Enderle J., Bronzino J. (editors). – 3rd edition. – Cambridge, USA: Academic Press, Elsevier. – 2012. – 1253 p. – P. 16-21.
263. Engelberg I., Kohn J. Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: a comparative study // Biomaterials. – 1991. – V. 12. – № 3. – P. 292-304.
264. Engler A.J., Sen S., Sweeney H.L., Discher D.E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification // Cell. – 2006. – V. 126. – № 4. – P. 677-689.
265. Eriksson C., Nygren H., Ohlson K. Implantation of hydrophilic and hydrophobic titanium discs in rat tibia: cellular reactions on the surfaces during the first 3 weeks in bone // Biomaterials. – 2004. – V. 25. – P. 4759-4766.
266. Ermakova N.P., Bonartsev A.P., Zernov A.L., Konyaeva O.I., Kulbachevskaya N.Y., Merkulova I.B., Abramova T.V., Chaley V.A., Yakovlev S.G., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Bukhman V.M. Preclinical toxicity evaluation of paclitaxel biopolymer formulation // Anticancer Agents Med Chem. – 2017. – V. 17. – № 15. – P. 1661-1668.
267. Errico C., Bartoli C., Chiellini F., Chiellini E. Poly(hydroxyalkanoates)-based polymeric nanoparticles for drug delivery // J. Biomed. Biotechnol. – 2009. – P. 571702.
268. Fan M.R., Gong M., Da L.C., et al. Tissue engineered esophagus scaffold constructed with porcine small intestinal submucosa and synthetic polymers // Biomed Mater. – 2014. – V. 9. – № 1. – P. 015012.
269. Farah S., Anderson D. G., Langer R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications—a comprehensive: review // Advanced drug delivery reviews. – 2016. – V. 107. – P. 367-392.
270. Farrance O.E., Jones R.A.L., Hobbs J.K. The observation of rapid surface growth during the crystallization of polyhydroxybutyrate // Polymer. – 2009. – V. 15. – № 50. – P. 3730-3738.
271. Filatova E.V., Yakovlev S.G., Bonartsev A.P., Mahina T.K., Myshkina V.L., Bonartseva G.A. Prolonged release of chlorambucil and etoposide from poly-3-oxybutyrate-based microspheres // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2012. – V. 48. – № 6. – P. 598-602.
272. Findlay R.H., White D.C. Polymeric beta-hydroxyalkanoates from environmental samples and Bacillus megaterium // Appl. Environ. Microbiol. – 1983. – V. 45. – P. 71-78.
273. Finelli L., Sarti B., Scandola M. Miscibility and bidegradation behavior of melt-processed blends of bacterial PHB with poly(epichlorohydrin) // JMS. Pure Appl. Chem. – 1997. – V. A34. – № 1. – P. 13-33.

274. Fischer D., Li Y., Ahlemeyer B., Krieglstein J., Kissel T. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis // Biomaterials. – 2003. – V. 24. – № 7. – P. 1121-1131.
275. Flier L.G. van der, Clevers H. Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium // Annu. Rev. Physiol. – 2009. – V. 71. – № 1. – P. 241-260.
276. Flores-Bustamante Z.R., Rivera-Orduña F.N., Martínez-Cárdenas A., Flores-Cotera L.B. Microbial paclitaxel: advances and perspectives // J. Antibiot, Tokyo. – 2010. – V. 63. – № 8. – P. 460-467.
277. Forsyth W.G.C., Hayward A.C., Roberts J.B. Occurrence of poly-b-hydroxybutyric acid in aerobic gram-negative bacteria // Nature. – 1958. – V. 182. – P. 800-801.
278. Foster L.J.R. PEGylation and bioPEGylation of polyhydroxyalkanoates: synthesis, characterisation and applications. – INTECH Open Access Publisher, 2010.
279. Francis L., Meng D., Knowles J., Keshavarz T., Boccaccini A.R., Roy I. Controlled delivery of gentamicin using poly(3-hydroxybutyrate) microspheres // Int. J. Mol. Sci. – 2011. – V. 12. – № 7. – P. 4294-314.
280. Frank A., Rath S.K., Venkatraman S.S. Controlled release from bioerodible polymers: effect of drug type and polymer composition // J. Control Release. – 2005. – V. 102. – № 2. – P. 333-344.
281. Freier T., Kunze C., Nischan C., Kramer S., Sternberg K., Sass M., Hopt U.T., Schmitz K.P. *In vitro* and *in vivo* degradation studies for development of a biodegradable patch based on poly(3-hydroxybutyrate) // Biomaterials. – 2002. – V. 23. – № 13. – P. 2649-2657.
282. 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. – V. 3. – № 4. – P. 393-403.
283. 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. – V. 20. – № 3. – P. 263-272.
284. Fu Y., Kao W.J. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems // Expert Opin. Drug. Deliv. – 2010. – V. 7. – № 4. – P. 429-444.
285. Gagliardi M., Silvestri D., Cristallini C., Guadagni M., Crifaci G., Giusti P. Combined drug release from biodegradable bilayer coating for endovascular stents // J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. – 2010. – V. 93. – № 2. – P. 375-385.

286. Gantenbein-Ritter B., Sprecher C.M., Chan S., Illien-Jünger S., Grad S. Confocal imaging protocols for live/dead staining in three-dimensional carriers // Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols. – 2011. – V. 740. – P. 127-140.

287. Garg T., Singh O., Arora S., Murthy R.S.R. Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery // Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst. – 2012. – V. 29. – P. 1-63.

288. Ge M., Ge K., Gao F., Yan W., Liu H., Xue L., Jin Y., Ma H., Zhang J. Biomimetic mineralized strontium-doped hydroxyapatite on porous poly(l-lactic acid) scaffolds for bone defect repair // Int. J. Nanomedicine. – 2018. – V. 13. – P. 1707-1721.

289. Geng Y. et al. Formulating erythropoietin-loaded sustained-release PLGA microspheres without protein aggregation // Journal of Controlled Release. – 2008. – V. 130. – № 3. – P. 259-265.

290. Gerngross T.U., Martin D.P. Enzyme-catalyzed synthesis of poly {(R)-(-)-3-hydroxybutyrate}: formation of macroscopic granules in vitro // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1995. – V. 92. – № 14. – P. 6279-6283.

291. Giavaresi G., Tschon M., Daly J.H., Liggat J.J., Sutherland D.S., Agheli H., Fini M., Torricelli P., Giardino R. *In vitro* and *in vivo* response to nanotopographically-modified surfaces of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. – 2006. – V. 17. – № 12. – P. 1405-1423.

292. Gizdavic-Nikolaidis M., Ray S., Bennett J.R., Easteal A.J., Cooney R.P. Electrospun functionalized polyaniline copolymer-based nanofibers with potential application in tissue engineering // Macromolecular bioscience. – 2010. – V. 10. – № 12. – P. 1424-1431.

293. Golub E.E., Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization // Current Opinion in Orthopaedics. – 2007. – V. 18. – P. 444-448.

294. Goodwin H.S., Bicknese A.R., Chien S.N., Bogucki B.D., Quinn C.O., Wall D.A. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers // Biology of Blood and Marrow Transplantation. – 2001. – V. 7. – № 11. – P. 581-588.

295. Göpferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion // Biomaterials. – 1996. – V. 2. – № 17. – P. 103-114.

296. Gorodzha S.N., Muslimov A.R., Syromotina D.S., Timin A.S., Tcvetkov N.Y., Lepik K.V., Petrova A.V., Surmeneva M.A., Gorin D.A., Sukhorukov G.B., Surmenev R.A. A comparison study between electrospun polycaprolactone and piezoelectric poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) scaffolds for bone tissue engineering // Colloids Surfaces B Biointerfaces. – 2017. – V. 160. – P. 48-59.

297. Griebel R., Smith Z., Merrick J.M. Metabolism of poly-beta-hydroxybutyrate. I. Purification, composition, and properties of native poly-beta-hydroxybutyrate granules from Bacillus megaterium // Biochemistry. – 1968. – V. 7. – № 10. – P. 3676-3681.
298. Griebenow K., Klibanov A. M. Can conformational changes be responsible for solvent and excipient effects on the catalytic behavior of subtilisin Carlsberg in organic solvents? // Biotechnology and Bioengineering. – 1997. – V. 53. – № 4. – P. 351-362.
299. Griffiths J.F. Biotechnology / Griffiths J.F. // Encyclopedia Britannica (electronic resource). – URL: https://www.britannica.com/technology/biotechnology (date of application 10.02.2022).
300. Gu F.X., Karnik R., Wang A.Z., Alexis F., Levy-Nissenbaum E., Hong S., et al. Targeted nanoparticles for cancer therapy // Nano Today. – 2007. – V. 2. – P. 14-21.
301. Guenther J.C., Hallen-Adams H.E., Bücking H., Shachar-Hill Y., Trail F. Triacylglyceride metabolism by Fusarium graminearum during colonization and sexual development on wheat // Mol. Plant Microbe Interact. – 2009. – V. 22. – № 12. – P. 1492-1503.
302. Guilak F., Cohen D.M., Estes B.T., Gimble J.M., Liedtke W., Chen C.S. Control of Stem Cell Fate by Physical Interactions with the Extracellular Matrix // Cell Stem Cell. – 2009. – V. 5. – № 1. – P. 17-26.
303. Gursel I., Hasirci V. Properties and drug release behaviour of poly(3-hydroxybutyric acid) and various poly(3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) copolymer microcapsules // J. Microencapsul. – 1995. – V. 12. – № 2. – P. 185-193.
304. Gursel I., Korkusuz F., Turesin F., Alaeddinoglu N.G., Hasirci V. *In vivo* application of biodegradable controlled antibiotic release systems for the treatment of implant-related osteomyelitis // Biomaterials. – 2001. – V. 22. – № 1. – P. 73-80.
305. Gursel I., Yagmurlu F., Korkusuz F., Hasirci V. *In vitro* antibiotic release from poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) rods // J. Microencapsul. – 2002. – V. 19. – P. 153-164.
306. Gutwald R., Pistner H., Reuther J., Mühling J. Biodegradation and tissue-reaction in a long-term implantation study of poly(L-lactide) // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 1994. – V. 5. – № 6–7. – P. 485-490.
307. Habibovic P., Yuan H., van der Valk C.M., Meijer G., van Blitterswijk C.A., de Groot K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials // Biomaterials. – 2005. – V. 26. – № 17. – P. 3565-3575.
308. Hadjicharalambous C., Mygdali E., Prymak O., Buyakov A., Kulkov S., Chatzinikolaidou M. Proliferation and osteogenic response of MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells on porous zirconia ceramics stabilized with magnesia or yttria // J. Biomed. Mater. Res. Part A. – 2015. – V. 103A. – P. 3612-3624.

309. Hahn J.J., Eschenlauer A.C., Sleytr U.B., Somers D.A., Srienc F. Peroxisomes as sites for synthesis of polyhydroxyalkanoates in transgenic plants // Biotechnol. Prog. – 1999. – V. 15. – № 6. – P. 1053-1057.

310. Hajiali H., Hosseinalipour M., Karbasi S., Shokrgozar M.A. The influence of bioglass nanoparticles on the biodegradation and biocompatibility of poly (3-hydroxybutyrate) scaffolds // Int. J. Artif. Organs. – 2012. – V. 35. – P. 1015-1024.

311. Han J., Wu L.P., Hou J., Zhao D., Xiang H. Biosynthesis, characterization, and hemostasis potential of tailor-made poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) produced by *Haloferax mediterranei* // Biomacromolecules. – 2015. – V. 2. – № 16. – P. 578-588.

312. Han J., Wu L.P., Liu X.B., Hou J., Zhao L.L., Chen J.Y., Zhao D.H., Xiang H. Biodegradation and biocompatibility of haloarchaea-produced poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymers // Biomaterials. – 2017. – V. 139. – P. 172-186.

313. Handrick R., Reinhardt S., Focarete M.L., Scandola M., Adamus G., Kowalczuk M., Jendrossek D. A new type of thermoalkalophilic hydrolase of Paucimonas lemoignei with high specificity for amorphous polyesters of short chain-length hydroxyalkanoic acids // J. Biol. Chem. – 2001. – V. 276. – № 39. – P. 36215-36224.

314. Hao L., Yang H., Du C., Fu X., Zhao N., Xu S., Cui F., Mao C., Wang Y. Directing the fate of human and mouse mesenchymal stem cells by hydroxyl–methyl mixed self-assembled monolayers with varying wettability // J. Mater. Chem. B. – 2014. – V. 2. – P. 4794-4801.

315. Harley B.A., Kim H.D., Zaman M.H., Yannas I.V., Lauffenburger D.A., Gibson L.J. Microarchitecture of three-dimensional scaffolds influences cell migration behavior via junction interactions // Biophysical journal. – 2008. – V. 95. – № 8. – P. 4013-4024.

316. Harrison S.T., Chase H.A., Amor S.R., Bonthrone K.M., Sanders J.K. Plasticization of poly(hydroxybutyrate) *in vivo* // Int. J. Biol. Macromol. – 1992. – V. 14. – № 1. – P. 50-56.

317. Harting M., Jimenez F., Pati S., Baumgartner J., Cox C. Immunophenotype characterization of rat mesenchymal stromal cells // Cytotherapy. – 2008. – V. 10. – № 3. – P. 243-253.

318. Hasirci V. Fundamentals of Biomaterials / Hasirci V., Hasirci N. – New York, USA: Springer. – 2018. – 338 p.

319. Hazari A., Johansson-Ruden G., Junemo-Bostrom K.,. Ljungberg C., Terenghi G., Green C., Wiberg M. A new resorbable wrap-around implant as an alternative nerve repair technique // Journal of Hand Surgery, British and European Volume. – 1999. – V. 24. – № 3. – P. 291-295.

320. Heng D., Lee S.H., Ng W.K., Tan R.B. The nano spray dryer B-90 // Expert opinion on drug delivery. – 2011. – V. 8. – № 7. – P. 965-972.

321. Hezi-Yamit A., Sullivan C., Wong J., David L., Chen M., Cheng P., Shumaker D., Wilcox J.N., Udipi K. Impact of polymer hydrophilicity on biocompatibility: implication for DES polymer design // J. Biomed. Mater. Res A. – 2009. – V. 90. – № 1. – P. 133-141.
322. Higuchi T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspensions // J. Pharm. Sci. – 1961. – V. 50. – P. 874-875.
323. Hocking P.J., Marchessault R.H., Timmins M.R., Lenz R.W., Fuller R.C. Enzymatic degradation of single crystals of bacterial and synthetic poly(β-hydroxybutyrate) // Macromolecules. – 1996. – V. 29. – № 7. – P. 2472-2478.
324. Hoffman A.S. Hydrogels for biomedical applications // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2002. – V. 54. – P. 3-12.
325. Holland S.J., Jolly A.M., Yasin M., Tighe B.J. Polymers for biodegradable medical devices. II. Hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers: hydrolytic degradation studies // Biomaterials. – 1987. – V. 4. – № 8. – P. 289-295.
326. Hollinger J.O. (editor) Bone tissue engineering / Hollinger J.O., Einhorn T.A., Doll B., Sfeir C. (editors). – New York, USA: CRC press. – 2004. – 352 p.
327. 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. – V. 23. – № 20. – P. 4095-4103.
328. Holmes P.A. Biologically produced (R)-3-hydroxyalkanoate polymers and copolymers / Holmes P.A. // Developments in crystalline polymers / Bassett D.C. (editor). – Netherlands: Springer. – 1998. – V. 2. – P. 1-65.
329. Horner C.B., Ico G., Johnson J. et al. Microstructure-dependent mechanical properties of electrospun core–shell scaffolds at multi-scale levels // Journal of the mechanical behavior of biomedical materials. – 2016. – V. 59. – P. 207-219.
330. Hoshino A., Isono Y. Degradation of aliphatic polyester films by commercially available lipases with special reference to rapid and complete degradation of poly(L-lactide) film by lipase PL derived from *Alcaligenes* sp. // Biodegradation. – 2002. – V. 2. – № 13. – P. 141-147.
331. Hosseini F.S., Soleimanifar F., Ardeshirylajimi A., Vakilian S., Mossahebi-Mohammadi M., Enderami S.E., Khojasteh A., Zare Karizi S. *In vitro* osteogenic differentiation of stem cells with different sources on composite scaffold containing natural bioceramic and polycaprolactone // Artif. cells, nanomedicine, Biotechnol. – 2019. – V. 47. – № 1. – P. 300-307.

332. Houben A., Van Hoorick J., Van Erps J., Thienpont H., Van Vlierberghe S., Dubruel P., Indirect rapid prototyping: opening up unprecedented opportunities in scaffold design and applications // Ann. Biomed. Eng. – 2017. – V. 45. – P. 58-83.

333. Hrabak O. Industrial production of poly-β-hydroxybutyrate // FEMS Microbiol. Rev. – 1992. – V. 103. – P. 251-256.

334. Huang R., Reusch R.N. Poly(3-hydroxybutyrate) is associated with specific proteins in the cytoplasm and membranes of *Escherichia coli* // J. Biol. Chem. – 1996. – V. 271. – № 36. – P. 196-202.

335. Huang Y.C., Connell M., Park Y., Mooney D.J., Rice K.G. Fabrication and in vitro testing of polymeric delivery system for condensed DNA // Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2003. – V. 67. – № 4. – P. 1384-1392.

336. Huang M.H., Li S., Hutmacher D.W., Schantz J.T., Vacanti C.A., Braud C., Vert M. 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. – V. 69. – № 3. – P. 417-427.

337. Hubbell J.A. Biomaterials in Tissue Engineering // Biotechnology. – 1995. – V. 13. – № 6. – P. 565-576.

338. Hutmacher D.W., Schantz T., Zein I., Ng K.W., Teoh S.H., Tan K.C. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling // Journal of Biomedical Materials Research. – 2001. – V. 55. – № 2. – P. 203-216.

339. Hutmacher D. W., Sittinger M., Risbud M. V. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems // Trends in Biotechnology. – 2004. – V. 22. – № 7. – P. 354-362.

340. Hutmacher D.W., Schantz J.T., Lam C.X., Tan K.C., Lim T.C. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective // J. Tissue Eng. Regen. Med. – 2007. – V. 1. – № 4. – P. 245–260.

341. Ignatius A.A., Claes L.E. *In vitro* biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(L, DL-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide) // Biomaterials. – 1996. – V. 17. – № 8. – P. 831-839.

342. Im J.Y., Min W.K., You C., Kim H.O., Jin H.K., Bae J.S. Bone regeneration of mouse critical-sized calvarial defects with human mesenchymal stem cells in scaffold // Laboratory animal research. – 2013. – V. 29. – № 4. – P. 196-203.

343. Iordanskii A.L, Zaikov G.E.The General Aspects of Diffusion of Water in Polymers // International Journal of Polymeric Materials. – 1994. – V. 24. – № 1-4. – P. 193-209.

344. Iordanskii A.L., Ol'khov A.A., Pankova Yu.N., Bonartsev A.P., Bonartseva G.A., Popov V.O. Hydrophilicity impact upon physical properties of the environmentally friendly poly(3-hydroxybutyrate) blends: modification via blending. Fillers, Filled Polymers and Polymer Blends // Willey-VCH. Macromolecular symposia. – 2006. – V. 233. – P. 108-116.

345. Iwata T. Doi Y., Nakayama S., Sasatsuki H., Teramachi S. Structure and enzymatic degradation of poly(3-hydroxybutyrate) copolymer single crystals with an extracellular PHB depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1 // Int. J. Biol. Macromol. – 1999. – V. 25. – № 1-3. – P. 169-176.

346. Iwata T., Doi Y., Tanaka T., Akehata T., Shiromo M., Teramachi S. Enzymatic Degradation and Adsorption on Poly((R)-3-hydroxybutyrate) Single Crystals with Two Types of Extracellular PHB Depolymerases from *Comamonas acidovorans* YM1609 and *Alcaligenes faecalis* T1 // Macromolecules. – 1997. – V. 97. – № 30. – P. 5290-5296.

347. Iwata T., Shiromo M., Doi Y. Surface structures of poly((R)-3-hydroxybutyrate) and its copolymer single crystals before and after enzymatic degradation with an extracellular PHB depolymerase // Macromolecular Chemistry and Physics. – 2002. – V. 10–11. № 203. – P. 1309-1316.

348. Iyer S.S., Rojas M. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies // Expert Opin. Biol. Ther. – 2008. – V. 8. – № 5. – P. 569-581.

349. Jackson F.A., Dawes E.A. Regulation of the tricarboxylic acid cycle and poly-β -hydroxybutyrate metabolism in A*zotobacter beijerinkii* // J. Gen. Microbiol. – 1976n – V. 97. – P. 303-312.

350. Jacobs T., Declercq H., De Geyter N., Cornelissen R., Dubruel P., Leys C., Beaurain A., Payen E., Morent R. Plasma surface modification of polylactic acid to promote interaction with fibroblasts // J. Mater. Sci. Mater. Med. – 2013. – V. 24. – № 2. – P. 469-478.

351. Jaeger K.E., Steinbuchel A., Jendrossek D. Substrate specificities of bacterial polyhydroxyalkanoate depolymerases and lipases: Bacterial lipases hydrolyze poly(omega-hydroxyalkanoates) // Applied and Environmental Microbiology. – 1995. – V. 8. – № 61. – P. 3113-3118.

352. Jahangir S., Hosseini S., Mostafaei F., Sayahpour F.A., Eslaminejad M.B. 3D-porous β-tricalcium phosphate–alginate–gelatin scaffold with DMOG delivery promotes angiogenesis and bone formation in rat calvarial defects // J. Mater. Sci. Mater. Med. – 2019. – V. 30. – № 1. – P. 1.

353. Jayasekara R., Harding I., Bowater I., Christie G.B.Y., Lonergan G.T. Preparation, surface modification and characterisation of solution cast starch PVA blended films // Polymer Testing. – 2004. – V. 1. – № 23. – P. 17-27.
354. Jendrossek D., Handrick R. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates // Annual Review of Microbiology. – 2002. – V. 56. – P. 403-432.
355. Jendrossek D., Pfeiffer D. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate) // Environ Microbiol. – 2014. – V. 16. – № 8. – P. 2357-2373.
356. Jenkins M. (editor) Biomedical polymers / Jenkins M. (editor). – Birmingham, UK: University of Birmingham. – 2007. – 224 p.
357. Jeong J.C., Lee J., Cho K. Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly(epsilon-caprolactone) microspheres // J. Control. Release. – 2003. – V. 92. – № 3. – P. 249-258.
358. Jeong J., Kim J.H., Shim J.H., Hwang N.S., Heo C.Y. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration // Biomater. Res. – 2019. – V. 23. – P. 4.
359. Jevševar S., Kunstelj M., Porekar V. G. PEGylation of therapeutic proteins // Biotechnology journal. – 2010. – V. 5. – № 1. – P. 113-128.
360. Ji Y, Li XT, Chen GQ. Interactions between a poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) terpolyester and human keratinocytes // Biomaterials. – 2008. – V. 29. – P. 3807-3814.
361. Jiang T., Xu G., Chen X., Huang X., Zhao J., Zheng L. Impact of hydrogel elasticity and adherence on osteosarcoma cells and osteoblasts // Adv. Healthc. Mater. – 2019. – V. 8. – P. 1801587.
362. Jiang Y., Zhou J.J., Li L., Xu J., Guo B.H., Zhang Z.M., Wu Q., Chen G.Q., Weng L.T., Cheung Z.L., Chan C.M. Jiang Y., et. al. Surface Properties of Poly(3-hydroxybutyrate- co -3-hydroxyvalerate) Banded Spherulites Studied by Atomic Force Microscopy and Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry // Langmuir. – 2003. – V. 18. – № 19. – P. 7417-7422.
363. Johnson O.F.L., Cleland J.L., Lee H.J., Charnis M., Duenas E., Jaworowicz W., Shepard D., Shahzamani A., Jones A.J., Putney S.D. A month–long effect from a single injection of microencapsulated human growth hormone // Nature medicine. – 1996. – V. 2. – № 7. – P. 795-799.
364. Aim and Scope // Journal of Biological Engineering (JBE) / BioMed Central., Springer-Nature (electronic resource). – URL: https://jbioleng.biomedcentral.com/ (date of application 10.02.2022). – 2021.

365. Jung Y.K., Lee S.Y. Efficient production of polylactic acid and its copolymers by metabolically engineered *Escherichia coli* // J. Biotechnol. – 2011. – V. 151. – № 1. – P. 94-101.

366. Kanmani P., Kumaresan K., Aravind J., Karthikeyan S., Balan R. Enzymatic degradation of polyhydroxyalkanoate using lipase from *Bacillus subtilis* // International Journal of Environmental Science and Technology. – 2016. – V. 6. – № 13. – P. 1541-1552.

367. Karahaliloğlu Z., Ercan B., Taylor E.N., Chung S., Denkbaş E.B., Webster T.J. Antibacterial Nanostructured Polyhydroxybutyrate Membranes for Guided Bone Regeneration // J. Biomed. Nanotechnol. – 2015. – V. 11. – № 12. – P. 2253-2263.

368. Karavelidis V., Karavas E., Giliopoulos D., Papadimitriou S., Bikiaris D. Evaluating the effects of crystallinity in new biocompatible polyester nanocarriers on drug release behavior // Int. J. Nanomedicine. – 2011. – V. 6. – P. 3021-3032.

369. Kassab A.C., Xu K., Denkbas E.B., Dou Y., Zhao S., Piskin E. Rifampicin carrying polyhydroxybutyrate microspheres as a potential chemoembolization agent // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. – 1997. – V. 8. – P. 947-961.

370. Kassab A.C., Piskin E., Bilgic S., Denkbas E.B., Xu K. Embolization with polyhydroxybutyrate (PHB) micromerspheres: *in vivo* studies // J. Bioact. Compat. Polym. – 1999. – V. 14. – P. 291-303.

371. Kasuya K., Inoue Y., Doi Y. Adsorption kinetics of bacterial PHB depolymerase on the surface of polyhydroxyalkanoate films // International journal of biological macromolecules. – 1996. – V. 1. – № 19. – P. 35-40.

372. Kawaguchi T., Tsugane A., Higashide K., Endoh H., Hasegawa T., Kanno H., Seki T., Juni K., Fukushima S, Nakano M. Control of drug release with a combination of prodrug and polymer matrix: antitumor activity and release profiles of 2',3'-Diacyl-5-fluoro-2'-deoxyuridine from poly(3-hydroxybutyrate) microspheres // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 1992. – V. 87. – № 6. – P. 508-512.

373. Kehail A.A., Boominathan V., Fodor K., Chalivendra V., Ferreira T., Brigham C.J. *In Vivo* and *In Vitro* Degradation Studies for Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) Biopolymer // Journal of Polymers and the Environment. – 2017. – V. 25. – № 2. – P. 296-307.

374. Keskin D.S., Wise D.L., Hasirci V. Pain control via opioid analgesic-local anesthetic loaded IPNs // Curr Drug Deliv. – 2004. – V. 1. – № 1. – P. 57-64.

375. Khandal D. Polyhydroxyalkanoate-based Multiphase Materials / D. Khandal, E. Pollet, L. Averous // Polyhydroxyalkanoate (PHA) based Blends, Composites and Nanocomposites / Ipsita R., Visakh P.M. (editors). – The Royal Society of Chemistry's (electronic resource). –

URL: https://pubs.rsc.org/en/content/chapter/9781782622314-00119/978-1-78262-231-4 (date of application 10.02.2022). – 2015. – chapter 6. – 22 p.

376. Khang G., Kim S.W., Cho J.C., Rhee J.M., Yoon S.C., Lee H.B. Preparation and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) microspheres for the sustained release of 5-fluorouracil // Biomed. Mater. Eng. – 2001. – V. 11. –P. 89-103.

377. Khanna S., Srivastava A.K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates // Process. Biochem. – 2005. – V. 40. – P. 607-619.

378. Kholina M.S., Menshikh K.A., Voinova V.V., Denisova K.R., Makhina T.K., Bonartseva G.A., Svyatoslavov D.S., Samoylova S.I., Reshetov I.V., Shaitan K.V., Bonartsev A.P. The co-cultivation of human cancer HEp-2 with rat mesenchymal stem cells: low attachment vs. hanging drop spheroid culturing techniques // ESAO/TERMIS-EU Winter School 2021 (Zaragoza, Spai, February 24-26, 2021. Online conference): Book of abstracts. – p. 26. https://www.esao.org/wp-content/uploads/2021/01/ESAO-TERMIS-Winter-School-2021-program.pdf

379. Khouw I.M., van Wachem P.B., de Leij L.F., van Luyn M.J. Inhibition of the tissue reaction to a biodegradable biomaterial by monoclonal antibodies to IFN-gamma // J. Biomed. Mater. Res. – 1998. – V. 41. – P. 202-210.

380. Kim J.K., Won Y.J., Nikoh N., Nakayama H., Han S.H., Kikuchi Y., Rhee Y.H., Park H.Y., Kwon J.Y., Kurokawa K., Dohmae N., Fukatsu T., Lee B.L. Polyester synthesis genes associated with stress resistance are involved in an insect-bacterium symbiosis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2013. – V. 110. – № 26. – P. E2381-E2389.

381. Kim M.S., Ahn H.H., Shin Y.N., Cho M.H., Khang G., Lee H.B. An *in vivo* study of the host tissue response to subcutaneous implantation of PLGA- and/or porcine small intestinal submucosa-based scaffolds // Biomaterials. – 2007. – V. 28. – № 34. – P. 5137-5143.

382. Kim S.H., Ha H.J., Ko Y.K., Yoon S.J., Rhee J.M., Kim M.S., Lee H.B., Khang G. Correlation of proliferation, morphology and biological responses of fibroblasts on LDPE with different surface wettability // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. – 2007. – V. 18. – № 5. – P. 609-622.

383. Kim S.-S., Ahn K.-M., Park M.S., Lee J.-H., Choi C.Y., Kim B.-S. A poly(lactide-coglycolide)/hydroxyapatite composite scaffold with enhanced osteoconductivity // J. Biomed. Mater. Res. Part A. – 2007. – V. 80. – P. 206-215.

384. Kim T.H., Mount C.W., Dulken B.W., Ramos J., Fu C.J., Khant H.A., Chiu W., Gombotz W.R., Pun S.H. Filamentous, mixed micelles of triblock copolymers enhance tumor

localization of indocyanine green in a murine xenograft model // Mol. Pharm. – 2012. – V. 9. – № 1. – P. 135-143.

385. Klawitter J.J., Bagwell J.G., Weinstein A.M., Sauer B.W., Pruitt J.R. An evaluation of bone growth into porous high density polyethylene // Journal of biomedical materials research. – 1976. – V. 10. – № 2. – P. 311-323.

386. Klech C.M., Simonelli A.P. Examination of the moving boundaries associated with non-Fickian water swelling of glassy gelatin beads: Effect of solution pH // Journal of Membrane Science. – 1989. – V. 43. – P. 87-101.

387. Kode J.A., Mukherjee S., Joglekar M.V., Hardikar A.A. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration // Cytotherapy. – 2009. – V. 11. – № 4. – P. 377-391.

388. Kokubo T., Kim H. M., Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties // Biomaterials. – 2003. – V. 24. – № 13. – P. 2161-2175.

389. Konan S., Haddad F.S. A clinical review of bioabsorbable interference screws and their adverse effects in anterior cruciate ligament reconstruction surgery // Knee. – 2009. – V. 16. – № 1. – P. 6-13.

390. 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. – V. 96. – №. 19. – P. 10711-10716.

391. Korkusuz F., Korkusuz P., Eksioglu F., Gursel I., Hasirci V. *In vivo* response to biodegradable controlled antibiotic release systems // J. Biomed. Mater. Res. – 2001. – V. 55. – № 2. – P. 217-228.

392. Korsatko W., Wabnegg B., Tillian H.M., Braunegg G., Lafferty R.M. Poly-D-hydroxybutyric acid a biologically degradable vehicle to regard release of a drug // Pharm Ind. – 1983. – V. 45. – P. 1004-1007.

393. Korsatko W., Wabnegg B., Tillian H.M., Egger G., Pfragner R., Walser V. Poly D(-)-3-hydroxybutyric acid (poly-HBA)-a biodegradable former for long-term medication dosage. 3. Studies on compatibility of poly-HBA implantation tablets in tissue culture and animals // Pharm Ind. – 1984. – V. 46. – P. 952-954.

394. Korsmeyer R.W., Gurny R., Doelker E., Buri P. and Peppas N.A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers // Int. J. Pharm. – 1983. – V. 15. – P. 25-35.

395. Korzhikov V., Averianov I., Litvinchuk E., Tennikova T.B. Polyester-based microparticles of different hydrophobicity: the patterns of lipophilic drug entrapment and release // J. Microencapsul. – 2016. – V. 33. – № 3. – P. 199-208.
396. Köse G.T., Korkusuz F., Korkusuz P., Purali N., Ozkul A., Hasirci V. Bone generation on PHBV matrices: an in vitro study // Biomaterials. – 2003. – V. 24. – № 27. – P. 4999-5007.
397. Kosenko R.Yu., Iordanskii A.L., Markin V.S., Arthanarivaran G., Bonartsev A.P., Bonartseva G.A. Controlled release of antiseptic drug from poly(3-hydroxybutyrate)-based membranes. Combination of diffusion and kinetic mechanisms // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2007. – V. 41. – № 12. – P. 652-655.
398. Kosmidis K., Argyrakis P., Macheras P. Fractal kinetics in drug release from finite fractal matrices // Journal of Chemical Physics. – 2003. – V. 119. – P. 6373-6377.
399. Kostopoulos L., Karring T. Guided bone regeneration in mandibular defects in rats using a bioresorbable polymer // Clin. Oral. Implants Res. – 1994. – V. 5. – № 2. – P. 66-74.
400. Kovalcik A., Obruca S., Kalina M., Machovsky M., Enev V., Jakesova M., Sobkova M., Marova I. Enzymatic Hydrolysis of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Scaffolds // Materials. – 2020. – V. 13. – № 13. – P. 2992.
401. Koyama N., Doi Y. Morphology and biodegradability of a binary blend of poly((R)-3-hydroxybutyric acid) and poly((R,S)-lactic acid) // Canadian journal of microbiology. – 1995. – V. 13. – № 41. – Suppl. 1. – P. 316-22.
402. Kramp B., Bernd H.E., Schumacher W.A., Blynow M., Schmidt W., Kunze C., Behrend D., Schmitz K.P. Polyhydroxybuttersäure (PHB)-Folien und -Platten zur Defektdeckung des knöchernen Schädels im Kaninchenmodell // Laryngorhinootologie. – 2002. – V. 81. – № 5. – P. 351-356.
403. Kravchuk K.S., Torskaya E.V., Useinov A.S., Frolov N.N. Experimental and theoretical study of what causes spallation for multicomponent oxide-based coatings under friction loading // Mechanics of Solids. – 2015. – V. 1. – № 50. – P. 52-61.
404. Krishnan V., Lakshmi T. Bioglass: A novel biocompatible innovation // J. Adv. Pharm. Technol. Res. – 2013. – V. 4. – № 2. – P. 78-83.
405. Kulikouskaya V.I., Pinchuk S.V., Hileuskaya K.S., Kraskouski A.N., Vasilevich I.B., Matievski K.A., Agabekov V.E., Volotovski I.D. Layer-by-layer buildup of polysaccharide-containing films: physico-chemical properties and mesenchymal stem cells adhesion // J. Biomed. Mater. Res. Part A. – 2018. – V. 106. – P. 2093-2104,

406. Kumagai Y., Doi Y. Enzymatic degradation and morphologies of binary blends of microbial poly(3-hydroxy butyrate) with poly(ε-caprolactone), poly(1,4-butylene adipate and poly(vinyl acetate) // Polymer Degradation and Stability. – 1992. – V. 3. – № 36. – P. 241-248. (a)
407. Kumagai Y., Kanesawa Y., Doi Y. Enzymatic degradation of microbial poly(3 - hydroxybutyrate) films // Macromol. Chem. – 1992. – V. 193. – P. 53-57. (б)
408. Kundu J. Biomaterials for biofabrication of 3D tissue scaffolds / Kundu J., Pati F., Jeong Y.H., Cho D.W. // Biofabrication Micro- and Nano-fabrication, Printing, Patterning and Assemblies / Grabor F., Wei S. (editors). – edition 1. – Applied Science Publishers, William Andrew Publishing. – 2013. – P. 23-46.
409. Kunze C., Edgar Bernd H., Androsch R., Nischan C., Freier T., Kramer S., Kramp B., Schmitz K.P. *In vitro* and *in vivo* studies on blends of isotactic and atactic poly (3-hydroxybutyrate) for development of a dura substitute material // Biomaterials. – 2006. – V. 27. – № 2. – P. 192-201.
410. Kuo S.M., Tsai S.W., Huang L.H., Wang Y.J. Plasma-modified nylon meshes as supports for cell culturing // Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology. – 1997. – V. 25. – № 6. – P. 551-562.
411. Kusaka S., Iwata T., Doi Y. Microbial synthesis and physical properties of ultra-high-molecular-weight poly ((R)-3-hydroxybutyrate) //Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry. – 1998. – V. 35. – № 2. – P. 319-335.
412. Kushner A.M., Guan Z. Modular design in natural and biomimetic soft materials // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. – 2011. – V. 50. – № 39. – P. 9026-9057.
413. Kuznetsova D.S., Timashev P.S., Dudenkova V.V., Meleshina A.V., Antonov E.A., Krotova L.I., Popov V.K., Bagratashvili V.N., Zagaynova E.V. Comparative analysis of proliferation and viability of multipotent mesenchymal stromal cells in 3D scaffolds with different architectonics // Bull. Exp. Biol. Med. – 2016. – V. 160. – № 4. – P. 535-541.
414. Kwon Y.M., Baudys M., Knutson K., Kim S.W. *In situ* study of insulin aggregation induced by water-organic solvent interface // Pharmaceutical research. – 2001. – V. 18. – № 12. – P. 1754-1759.
415. Kyoung K.T., Yoon Jin Y.J., Doo L., Sung P.T.G. Gas foamed open porous biodegradable polymeric microspheres // Biomaterials. – 2006. – V. 27. – № 2. – P. 152-159.
416. Kyriakidis D.A., Theodorou M.C., Filippou P.S., Kyriakidis K.D., Tiligada E. Effect of histamine on the signal transduction of the AtoS-AtoC two component system and involvement in poly-(R)-3-hydroxybutyrate biosynthesis in *Escherichia coli* // Amino Acids. – 2008. – V. 35. – № 1. – P. 45-52.

417. Kyriakidis D.A., Tiligada E. Signal transduction and adaptive regulation through bacterial two-component systems: the *Escherichia coli* AtoSC paradigm // Amino Acids. – 2009. – V. 37. – № 3. – P. 443-458.
418. Laemmli U.K. Glycine-SDS-PAGE for separation of proteins // Nature. – 1970. – V. 227. – № 5. – P. 680.
419. Lageveen R.G., Huisman G.W., Preusting H., Ketelaar P., Eggink G., Witholt B. Formation of polyesters by Pseudomonasoleovorans: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates // Appl. Environ. Microbiol. – 1988. – V. 54. – P. 2924-2932.
420. Lai M. C., Topp E. M. Solid-state chemical stability of proteins and peptides // Journal of pharmaceutical sciences. – 1999. – V. 88. – № 5. – P. 489-500.
421. Langer R., Vacanti J. Tissue engineering // Science. – 1993. – V. 260. – № 5110. – P. 815-818.
422. Larsen T., Nielsen N.I. Fluorometric determination of beta-hydroxybutyrate in milk and blood plasma // J. Dairy Sci. – 2005. – V. 88. – № 6. – P. 2004-2009.
423. 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. – V. 89. – № 5. – P. 1599-1609.
424. Lauzier C., Revol J.F., Marchessault R.H. Topotactic crystallization of isolated poly(β-hydroxybutyrate) granules from *Alcaligenes eutropha* // FEMS Microbiol. Rev. – 1992. – V. 103. – P. 299-310.
425. Lavenus S., Pilet P., Guicheux J., Weiss P., Louarn G., Layrolle P. Behaviour of mesenchymal stem cells, fibroblasts and osteoblasts on smooth surfaces // Acta Biomaterialia . – 2011. – V. 7. – № 4. – P. 1525-1534.
426. Lee K.Y., Mooney D.J. Alginate: properties and biomedical applications // Prog. Polym. Sci. – 2012. – V. 37. – P. 106-126.
427. Lee TH, Wang J, Wang CH. Double-walled microspheres for the sustained release of a highly water soluble drug: characterization and irradiation studies // J. Control. Release. – 2002. – V. 83. – P. 437-452.
428. Lemperle G., Gauthier-Hazan N., Wolters M., Eisemann-Klein M., Zimmermann U., Duffy D.M. Foreign body granulomas after all injectable dermal fillers: part 1. Possible causes // Plast. Reconstr. Surg. – 2009. – V. 123. – № 6. – P. 1842-1863.
429. Lentz, B.R.; Lee, J.K. Poly(ethylene glycol) (PEG)-mediated fusion between pure lipid bilayers: a mechanism in common with viral fusion and secretory vesicle release? // Mol. Membr. Biol. – 1999. – V. 16. – № 4. – P. 279-296.

430. Lenz R.W., Marchessault R.H. Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology // Biomacromolecules. – 2005. – V. 6. – № 1. – P. 1-8.

431. Lewis R. Bioengineering // Encyclopaedia Britannica (electronic resource). – URL: https://www.britannica.com/technology/bioengineering (date of application 10.02.2022).

432. Li G., Li P., Qiu H., Li D., Su M., Xu K. Synthesis, characterizations and biocompatibility of alternating block polyurethanes based on P3/4HB and PPG-PEG-PPG // Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2011. – V. 98. – № 1. – P. 88-99.

433. Li G., Li P., Qiu H., Li D., Su M., Xu K. Synthesis, characterizations and biocompatibility of alternating block polyurethanes based on P3/4HB and PPG-PEG-PPG // J. Biomed. Mater. Res. A. – 2011. – V. 98. – № 1. – P. 88-99.

434. Li G., Liu Y., Li D., Zhang L., Xu K. A comparative study on structure-property elucidation of P3/4HB and PEG-based block polyurethanes // J. Biomed. Mater. Res. A. – 2012. – V. 100. – № 9. – P. 2319-2329.

435. Li H., Zhang F., Zhang Y., Ye M., Zhou B., Tang Y.Z., Yang H.J., Xie M.Y., Chen S.F., He J.H., Fang H.P., Hu J. Peptide diffusion and self-assembly in ambient water nanofilm on mica surface // Journal of Physical Chemistry B. – 2009. – V. 113. – N. 26. – P. 8795–8799.

436. Li J, Li X, Ni X, Wang X, Li H, Leong K.W. Self-assembled supramolecular hydrogels formed by biodegradable PEO–PHB–PEO triblock copolymers and a-cyclodextrin for controlled drug delivery // Biomaterials. – 2006. – V. 27. – P. 4132-4140.

437. Li X., Loh X.J., Wang K., He C., Li J. Poly(ester urethane)s consisting of poly((R)-3-hydroxybutyrate) and poly(ethylene glycol) as candidate biomaterials: characterization and mechanical property study // Biomacromolecules. – 2005. – V. 6. – № 5ю – P. 2740-2747.

438. Li Z., Yang X., Wu L., Chen Z., Lin Y., Xu K., Chen G.Q. Synthesis, characterization and biocompatibility of biodegradable elastomeric poly(ether-ester urethane)s based on poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) and poly(ethylene glycol) via melting polymerization // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. – 2009. – V. 20. – № 9. – P. 1179-1202.

439. Lickorish D., Chan J., Song J., Davies J.E. An *in-vivo* model to interrogate the transition from acute to chronic inflammation // Eur. Cell. Mater. – 2004. – V. 8. – P. 12-19.

440. Liebschner M. A. K. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone // Biomaterials. – 2004. – V. 25. – № 9. – P. 1697-1714.

441. 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. – V. 5. – № 2. – P. 670-679.

442. Liggins R.T., Burt H.M. Paclitaxel loaded poly(L-lactic acid) microspheres: properties of microspheres made with low molecular weight polymers // Int. J. Pharm. – 2001. – V. 222. – P. 19-33.
443. Lim J., You M., Li J., Li Z. Emerging bone tissue engineering via polyhydroxyalkanoate (PHA)-based scaffolds // Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. – 2017. – V. 79. – P. 917-929.
444. Lin C.-C., Anseth K.S. The Biodegradation of Biodegradable Polymeric Biomaterials // Elsevier. – 2013. – P. 716–728.
445. Ling S.C., Tsuge T., Sudesh K. Biosynthesis of novel polyhydroxyalkanoate containing 3-hydroxy-4-methylvalerate by *Chromobacterium* sp. USM2 // Journal of applied microbiology. – 2011. – V. 111. – № 3. – P. 559-571.
446. Liu Y., Zhou Y., Feng H., Ma G.E., Ni Y. Injectable tissue-engineered bone composed of human adipose-derived stromal cells and platelet-rich plasma // Biomaterials. – 2008. – V. 29. – № 23. – P. 3338-3345.
447. Liu Y.X., Chen E.Q. Polymer crystallization of ultrathin films on solid substrates // Coordination Chemistry Reviews. – 2010. – V. 254. – № 9-10. – P. 1011-1037.
448. Lizarraga-Valderrama L.R., Nigmatullin R., Taylor C., Haycock J.W., Claeyssens F., Knowles J.C., Roy I. Nerve tissue engineering using blends of poly(3-hydroxyalkanoates) for peripheral nerve regeneration // Eng. Life Sci. – 2015. – V. 15. – P. 612-621.
449. Löbler M., Sass M., Kunze C., Schmitz K.P., Hopt U.T. Biomaterial patches sutured onto the rat stomach induce a set of genes encoding pancreatic enzymes // Biomaterials. – 2002. – V. 23. – № 2. – P. 577-583.
450. Löbler M., Sass M., Schmitz K.P., Hopt U.T. Biomaterial implants induce the inflammation marker CRP at the site of implantation // J. Biomed. Mater. Res. – 2003. – V. 61. – P. 165-167.
451. Löbler M., Sternberg K., Stachs O., Allemann R., Grabow N., Roock A. et al. Polymers and drugs suitable for the development of a drug delivery drainage system in glaucoma surgery // J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. – 2011. – V. 97. – № 2. – P. 388-395.
452. Lomas A.J., Chen G.G., El Haj A.J., Forsyth N. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) supports adhesion and migration of mesenchymal stem cells and tenocytes // World J. Stem Cells. – 2012. – V. 4. – P. 94-100.
453. Lu B, Wang ZR, Yang H. Long-acting delivery microspheres of levo-norgestrol-poly(3-hydroxybutyrate): their preparation, characterization and contraceptive tests on mice // J. Microencapsul. – 2001. – V. 18. – № 1. – P. 55-64.
454. Lü L.-X., Zhang X.-F., Wang Y.-Y., Ortiz L., Mao X., Jiang Z.-L., Xiao Z.-D., Huang N.-P. Effects of hydroxyapatite-containing composite nanofibers on osteogenesis of mesenchymal

stem cells *in vitro* and bone regeneration *in vivo* // ACS Appl. Mater. Interfaces. – 2013. – V. 5. – P. 319-330.

455. Lu W., Park T. G. Protein release from poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres: protein stability problems // PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology. – 1995. – V. 49. – № 1. – P. 13-19.

456. Lu X.Y, Li M.C., Zhu X.L., Fan F., Wang L.L., Ma J.G. Microbial synthesized biodegradable PHBHHxPEG hybrid copolymer as an efficient intracellular delivery nanocarrier for kinase inhibitor // BMC Biotechnol. – 2014. – V. 14. – P. 4.

457. Lucey P., Goldberg D.J. Complications of collagen fillers // Facial. Plast. Surg. – 2014. – V. 30. – № 6. – P. 615-622.

458. Lyu S., Untereker D. Degradability of Polymers for Implantable Biomedical Devices // International Journal of Molecular Sciences. – 2009. – V. 9. – № 10. – P. 4033-4065.

459. Ma P. X., Zhang R. Microtubular architecture of biodegradable polymer scaffolds // Journal of biomedical materials research. – 2001. – V. 56. – № 4. – P. 469-477.

460. Macrae R.M., Wilkinson J.R. Poly-β-hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of Bacillus cereus and *Bacillus megaterium* // J. Gen. Microbiol. – 1958. – V. 19. – P. 210-222.

461. Madison L.L., Huisman G.W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1999. – V. 63. – № 1. – P. 21-53.

462. Maksymiak M., Debowska R., Jelonek K., Kowalczuk M., Adamus G. Structural characterization of biocompatible lipoic acid–oligo-(3-hydroxybutyrate) conjugates by electrospray ionization mass spectrometry // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2013. – V. 27. – P. 773-783.

463. Makuch A.M., Skalski K.R. Human cancellous bone mechanical properties and penetrator geometry in nanoindentation tests // Acta Bioeng Biomech. – 2018. – V. 20. – № 4. – P. 153-164.

464. Malm T., Bowald S., Karacagil S., Bylock A., Busch C. A new biodegradable patch for closure of atrial septal defect. An experimental study // Scand J. Thorac Cardiovasc. Surg. – 1992. – V. 26. – № 1. – P. 9-14 (a).

465. Malm T., Bowald S., Bylock A., Busch C. Prevention of postoperative pericardial adhesions by closure of the pericardium with absorbable polymer patches. An experimental study // The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. – 1992. – V. 104. – P. 600-607. (б)

466. Malm T., Bowald S., Bylock A., Saldeen T., Busch C. Regeneration of pericardial tissue on absorbable polymer patches implanted into the pericardial sac. An immunohistochemical,

ultrastructural and biochemical study in the sheep // Scandinavian Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. – 1992. – V. 26. – № 1. – P. 15-21 (в).

467. Malm T., Bowald S., Bylock A., Busch C., Saldeen T. Enlargement of the right ventricular outflow tract and the pulmonary artery with a new biodegradable patch in transannular position // European Surgical Research. – 1994. – V. 26. – P. 298-308.

468. Maniatopoulos C., Sodek J., Melcher A.H. // Cell and tissue research. – 1998. – V. 254. – № 2. – P. 317-330.

469. Marçal H., Wanandy N.S., Sanguanchaipaiwong V. et al. BioPEGylation of polyhydroxyalkanoates: Influence on properties and satellite-stem cell cycle // Biomacromolecules. – 2008. – V. 9. – № 10. – P. 2719-2726.

470. Marshall D.G., Jackson T.A., Unelius C.R., Wee S.L., Young S.D., Townsend R.J., Suckling D.M. *Morganella morganii* bacteria produces phenol as the sex pheromone of the New Zealand grass grub from tyrosine in the colleterial gland // Naturwissenschaften. – 2016. – V. 103. – № 7-8. – P. 59.

471. Masaeli E., Morshed M., Rasekhian P., Karbasi S., Karbalaie K., Karamali F., Abedi D., Razavi S., Jafarian-Dehkordi A., Nasr-Esfahani M.H., Baharvand H. Does the tissue engineering architecture of poly (3-hydroxybutyrate) scaffold affects cell–material interactions? // Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2012. – V. 100. – № 7. – P. 1907-1918.

472. Maslenikov I.I., Reshetov V.N., Useinov A.S. Mapping the elastic modulus of a surface with a NanoScan 3D scanning microscope // Instruments and experimental techniques. – 2015. – V. 58. – № 5. – P. 711-717.

473. Mathur A., Moore S.W., Sheetz M.P., Hone J. The role of feature curvature in contact guidance // Acta Biomater. – 2012. – V. 8. – № 7. – P. 2595-2601.

474. 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. – V. 21. – № 3-4. – P. 486-497.

475. Matsuo K., Yonehara R., Gekko K. Secondary-structure analysis of proteins by vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy // Journal of biochemistry. – 2004. – V. 135. – № 3. – P. 405-411.

476. Matyash M., Despang F., Ikonomidou C., Gelinsky M. Swelling and mechanical properties of alginate hydrogels with respect to promotion of neural growth // Tissue Eng. Part C Methods. – 2014. – V. 20. – P. 401-411.

477. McBeath R., Pirone D.M., Nelson C.M., Bhadriraju K., Chen C.S. Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment // Dev. Cell. – 2004. – V. 6. – № 4. – P. 483-495.
478. McChalicher C.W., Srienc F. Investigating the structure-property relationship of bacterial PHA block copolymers // J. Biotechnol. – 2007. – V. 132. – № 3. – P. 296-302.
479. McDermott T.R., Griffith S.M., Vance C.P., Graham P.H. Carbon metabolism in Bradyrhizobium japonicum bacteroids // FEMS Microbiol. Rev. – 1989. – V. 63. – P. 327-340.
480. McKee C.T., Last J.A., Russell P., Murphy C.J. Indentation Versus Tensile Measurements of Young's Modulus for Soft Biological Tissues // Tissue Eng. Part B Rev. – 2011. – V. 17. – № 3. – P. 155-164.
481. McKenzie H.A., White F.H. Determination of lysozyme activity at low levels with emphasis on the milk enzyme // Analytical biochemistry. – 1986. – V. 157. – № 2. – P. 367-374.
482. Menshikh K.A., Voinova V.V., Makhina T.K., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Bonartsev A.P. The experimental model of 3D tumor cell growth using poly(3-hydroxybutyrate) microspheres // ESAO Winter School (Wittenberg, Germany, February 26-29, 2020), P7: Book of abstracts. – 2020. – P. 21.
483. Mergaert J., Anderson C., Wouters A., Swings J., Kersters K. Biodegradation of polyhydroxyalkanoates // FEMS Microbiol. Rev. – 1992. – V. 9. – № 2-4. – P. 317-321.
484. Mergaert J., Webb A., Anderson C., Wouters A., Swings J. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils // Applied and environmental microbiology. – 1993. – V. 59. – № 10. – P. 3233-3238.
485. Meyers J., Craig J., Odde D.J. Potential for Control of Signaling Pathways via Cell Size and Shape // Curr. Biol. – 2006. – V. 16. – № 17. – P. 1685-1693.
486. Middleton J.C., Tipton A.J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices // Biomaterials. – 2000. – V. 21. – № 23. – P. 2335-2346.
487. Mikus J.L., Koufman J.A., Kilpatrick S.E. Fate of liposuctioned and purified autologous fat injections in the canine vocal fold // Laryngoscope. – 1995. – V. 105. – № 1. – P. 17-22.
488. Millán M., Segura D., Galindo E., Peña C. Molecular mass of poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) produced by *Azotobacter vinelandii* is determined by the ratio of synthesis and degradation under fixed dissolved oxygen tension // Process Biochem. – 2016. – V. 51. – P. 950-958.
489. Miller N.D., Williams D.F. On the biodegradation of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) homopolymer and poly-β-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers // Biomaterials. – 1987. – V. 2. – № 8. – P. 129-137.

490. Miroiu F.M., Stefan N., Visan A.I., Nita C., Luculescu C.R., Rasoga O., Socol M., Zgura I., Cristescu R., Craciun D., et al. Composite biodegradable biopolymer coatings of silk fibroin—Poly(3-hydroxybutyric-acid-co-3-hydroxyvaleric-acid) for biomedical application // Appl. Surf. Sci. – 2015. – V. 355. – P. 123-1131.
491. Mironov A.V., Grigoryev A.M., Krotova L.I., Skaletsky N.N., Popov V.K., Sevastianov V.I. 3D printing of PLGA scaffolds for tissue engineering // Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2017. – V. 105. – № 1. – P. 104-109.
492. Mironov V., Boland T., Trusk T., Forgacs G., Markwald R.R. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering // TRENDS in Biotechnology. – 2003. – V. 21. – № 4. – P. 157-161.
493. Misra S.K., Ansari T., Mohn D., Valappil S.P., Brunner T.J., Stark W.J., Roy I., Knowles J.C., Sibbons P.D., Jones E.V., Boccaccini A.R., Salih V. Effect of nanoparticulate bioactive glass particles on bioactivity and cytocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate) composites // J. R. Soc. Interface. – 2010. – V. 7. – № 44. – P. 453-465.
494. Misra S.K., Valappil S.P., Roy I., Boccaccini A.R. Polyhydroxyalkanoate (PHA)/inorganic phase composites for tissue engineering applications // Biomacromolecules. – 2006. – V. 7. – № 8. – P. 2249-2258.
495. Misra S.K., Ansari T.I., Valappil S.P., Mohn D., Philip S.E., Stark W.J., Roy I., Knowles J.C., Salih V., Boccaccini A.R. Poly(3-hydroxybutyrate) multifunctional composite scaffolds for tissue engineering applications // Biomaterials. – V. 31. – № 10. – P. 2806-2815.
496. Mitomo H., Barham P. J., Keller A. Crystallization and morphology of poly (β-hydroxybutyrate) and its copolymer // Polymer Journal. – 1987. – V. 19. – № 11. – P. 1241-1253.
497. Moisenovich M.M., Malyuchenko N.V., Arkhipova A.Y., Kotlyarova M.S., Davydova L.I., Goncharenko A.V., Agapova O.I., Drutskaya M.S., Bogush V.G., Agapov I.I., Debabov V.G., Kirpichnikov M.P. Novel 3d-microcarriers from recombinant spidroin for regenerative medicine // Dokl. Biochem. Biophys. – V. 463. – P. 232-235.
498. Moisenovich M.M., Pustovalova O.L., Arhipova A.Y., Vasiljeva T.V., Sokolova O.S., Bogush V.G., Debabov V.G., Sevastianov V.I., Kirpichnikov M.P., Agapov I.I. *In vitro* and *in vivo* biocompatibility studies of a recombinant analogue of spidroin 1 scaffolds // J. Biomed. Mater. Res. A. – 2011. – V. 96. – № 1. – P. 125-131.
499. Mokeeva V., Chekunova L., Myshkina V., Nikolaeva D., Gerasin V., Bonartseva G. Biodestruction of poly(3-hydroxybutyrate) by microscopic fungi: tests of polymer on

resistance to fungi and fungicidal properties // Mikologia and Fitopatologia. – 2002. – V. 36. – № 5. – P. 59-63.

500. Mokhtarzadeh A., Alibakhshi A., Hejazi M., Omidi Y., Dolatabadi J.E.N. Bacterial-derived biopolymers: advanced natural nanomaterials for drug delivery and tissue engineering // Trends in Analytical Chemistry. – 2016. – V. 82. – P. 367-384.

501. Moldes C., García P., García J.L., Prieto M.A. *In vivo* immobilization of fusion proteins on bioplastics by the novel tag BioF // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – V. 70. – № 6. – P. 3205-3212.

502. Montoya C., Du Y., Gianforcaro A.L., Orrego S., Yang M., Lelkes P.I. On the road to smart biomaterials for bone research: definitions, concepts, advances, and outlook // Bone Res. – 2021. – V. 9. – № 1. – P. 12.

503. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // Journal of immunological methods. – 1983. – V. 65. – № 1-2. – P. 55-63.

504. Mottaghitalab F., Motasadizadeh H., Shokrgozar M.A., Shojaei S., Farokhi M. Fabrication of Silk Scaffold Containing Simvastatin-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles for Regenerating Bone Defects. Iran Biomed. J. // 2022 – V. 26. – N. 2. – P. 116-123.

505. Muller B., Jendrossek D. Purification and properties of poly(3-hydroxyvaleric acid) depolymerase from *Pseudomonas lemoignei* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1993. – V. 38. – P. 487-492.

506. Müller W.E.G., Tolba E., Schröder H.C., Muñoz-Espí R., Diehl-Seifert B., Wang X. Amorphous polyphosphate-hydroxyapatite: A morphogenetically active substrate for bone-related SaOS-2 cells *in vitro* // Acta Biomater. – 2016. – V. 31. – P. 358-367.

507. Munoz-Pinto D.J., Jimenez-Vergara A.C., Hou Y., Hayenga H.N., Rivas A., Grunlan M., Hahn M.S. Osteogenic potential of poly(ethylene glycol)–poly(dimethylsiloxane) hybrid hydrogels // Tissue Eng. Part A. – 2012. – V. 18. – P. 1710-1719.

508. Murase T., Iwata T., Doi Y. Enzymatic degradation mechanism of a solution-grown poly((R)-3-hydroxybutyrate) single crystal with an extracellular polyhydroxybutyrate depolymerase purified from *Alcaligenes faecalis* T1 // Macromolecules. – 2001. – V. 42. – № 42. – P. 19-22.

509. Murphy C.M., Haugh M.G., O'Brien F.J. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering // Biomaterials. – 2010. – V. 31. – № 3. – P. 461-466.

510. Murphy D.J. The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals // Protoplasma. – 2012. – V. 249. – № 3. – P. 541-85.

511. Murphy M.B., Moncivais K., Caplan A.I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine // Experimental & molecular medicine. – 2013. – V. 45. – № 11. – P. e54-e54.
512. Mushahary D., Spittler A., Kasper C., Weber V., Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells // Cytometry. A. – 2018. – V. 93. – № 1. – P. 19-31.
513. Mygind T., Stiehler M., Baatrup A., Li H., Zou X., Flyvbjerg A., Kassem M., Bünger C. Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds // Biomaterials. – 2007. – V. 28. – № 6. – P. 1036-1047.
514. Naderi P., Zarei M.,, Karbasi S., Salehi H. Evaluation of the effects of keratin on physical, mechanical and biological properties of poly (3-hydroxybutyrate) electrospun scaffold: Potential application in bone tissue engineering // European Polymer Journal. – 2020. – V. 124. – P. 109502.
515. Nam Y.S., Park T.G. Biodegradable polymeric microcellular foams by modified thermally induced phase separation method // Biomaterials. – 1999. – V. 20. – № 19. – P. 1783-1790.
516. 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. – V. 53. – № 1. – P. 1-7.
517. Nano Spray Dryer B-90 Application Booklet, Application note for PLA (Polylactic acid) R 202 H, Order no. 092243 / en / July 09
518. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry / Nelson D.L., Cox M.M.. – 5th Edition. – New-York: W.H. Freeman and Company. – 2008 – P. 852-860.
519. Nguyen A., Marsaud V., Bouclier C., Top S., Vessieres A., Pigeon P., Gref R., Legrand P., Jaouen G., Renoir J.M. Nanoparticles loaded with ferrocenyl tamoxifen derivatives for breast cancer treatment // Int. J. Pharm. – 2008. – V. 347. – P. 128-135.
520. Nieminen T., Kallela I., Wuolijoki E., Kainulainen H., Hiidenheimo I., Rantala I. Amorphous and crystalline polyetheretherketone: Mechanical properties and tissue reactions during a 3-year follow-up // J. Biomed. Mater. Res A. – 2008. – V. 84. – № 2. – P. 377-383.
521. Nobes G.A.R., Marchessault H.R., Chanzy H., Briese B.H., Jendrossek D. Splintering of Poly(3-hydroxybutyrate) Single Crystals by PHB-Depolymerase A from *Pseudomonas lemoignei* // Macromolecules. – 1996. – V. 96. – № 29. – P. 8330-8333.
522. Nobes G.A.R., Marchessault R.H., Briese B.H., Jendrossek D. Microscopic visualization of the enzymatic degradation of poly(3HB-co-3HV) and poly(3HV) single crystals by PHA

depolymerases from *Pseudomonas leimoignei* // Journal of Environmental Polymer Degradation. – 1998. – V. 2. – № 6. – P. 99-107.

523. Nojiri M., Saito T. Structure and function of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1 // J. Bacteriol. – 1997. – V. 179. – P. 6965-6970.

524. Nombela-Arrieta C., Ritz J., Silberstein L.E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2011. – V. 12. – № 2. – P. 126-131.

525. Norde W., Lyklema J. Why proteins prefer interfaces // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. – 1991. – V. 2. – № 3. P. 183-202.

526. Norris V., Bresson-Dumont H., Gardea E., Reusch R.N., Gruber D. Hypothesis: poly-(R)-3-hydroxybutyrate is a major factor in intraocular pressure // Med. Hypotheses. – 2009. – V. 73. – № 3. – P. 398-401.

527. Nosenko M.A., Maluchenko N.V., Drutskaya M.S., Arkhipova A.Y., Agapov I.I., Nedospasov S.A., Moisenovich M.M. Induction of ICAM-1 expression in mouse embryonic fibroblasts cultured on fibroin-gelatin scaffolds // Acta Nat. – 2017. – V. 9. – P. 89-93.

528. Novikov L.N., Novikova L.N., Mosahebi A., Wiberg M., Terenghi G., Kellerth J.O. A novel biodegradable implant for neuronal rescue and regeneration after spinal cord injury // Biomaterials. – 2002. – V. 23. – P. 3369-3376.

529. Nublat C., Braud C., Garreau H., Vert M. 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. – V. 17. – № 12. – P. 1333-1346.

530. Numata K., Abe H., Iwata T. Biodegradability of poly(hydroxyalkanoate) materials // Materials. – 2009. – V. 3. – № 2. – P. 1104-1126.

531. Numata K., Kikkawa Y., Tsuge T., Iwata T., Doi Y., Abe H. Enzymatic degradation processes of poly((R)-3-hydroxybutyric acid) and poly((R)-3-hydroxybutyric acid-co-(R)-3-hydroxyvaleric acid) single crystals revealed by atomic force microscopy: Effects of molecular weight and second-monomer composition on erosion // Biomacromolecules. – 2005. – V. 4. – № 6. – P. 2008-2016.

532. Numata K., Yamashita K., Fujita M., Tsuge T., Kasuya K., Iwata T., Doi Y., Abe H. Adsorption and hydrolysis reactions of poly(hydroxybutyric acid) depolymerases secreted from *Ralstonia pickettii* T1 and *Penicillium funiculosum* onto poly((R)-3-hydroxybutyric acid) // Biomacromolecules. – 2007. – V. 7. – № 8. – P. 2276-2281.

533. O'Brien F.J., Harley B.A., Yannas I.V., Gibson L.J. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds // Biomaterials. – 2005. – V. 26. – № 4. – P. 433-441.

534. O'Connor S., Szwej E., Nikodinovic-Runic J., O'Connor A., Byrne A.T., Devocelle M., O'Donovan N., Gallagher W.M., Babu R., Kenny S.T., Zinn M., Zulian Q.R., O'Connor K.E. The anti-cancer activity of a cationic anti-microbial peptide derived from monomers of polyhydroxyalkanoate // Biomaterials. – 2013. – V. 34. – № 11. – P. 2710-2708.
535. Odgaard A., Linde F. The underestimation of Young's modulus in compressive testing of cancellous bone specimens // J. Biomech. – 1991. – V. 24. – P. 691-698.
536. Oh S.H., Park I.K., Kim J.M., Lee J.H. *In vitro* and *in vivo* characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method // Biomaterials. – 2007. – V. 28. – № 9. – P. 1664-1671.
537. Orts W.J., Marchessault R.H., Bluhm T.L. Thermodynamics of the Melting Point Depression in Poly(β-hydroxybutyrate-co-β-hydroxyvalerate) Copolymers // Macromolecules. – 1991. – V. 24. – № 24. – P. 6435-6438.
538. Oryan A., Alidadi S., Moshiri A., Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions // J. Orthop. Surg. Res. – 2014. – V. 9. – P. 1-27.
539. Overgaard S., Bromose U., Lind M., Bünger C., Søballe K. The influence of crystallinity of the hydroxyapatite coating on the fixation of implants // J. Bone Joint Surg. Br. – 1999. – V. 81. – P. 725.
540. Page W.J., Knosp O. Hyperproduction of poly-β -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD // Appl. Environ. Microbiol. – 1989. – V. 55. – P. 1334-1339.
541. Page W.J., Manchak J. The role of β-oxidation of short-chain alkanoates in polyhydroxyalkanoate copolymer synthesis in *Azotobacter vinelandii* UWD // Can. J. Microbiol. – 1995. – V. 41. – № 13. – P. 106-114.
542. Pan J. Modelling degradation of semi-crystalline biodegradable polyesters // Modelling Degradation of Bioresorbable Polymeric Medical Devices. – Amsterdam, The Netherlands: Elsevier. – 2015. – P. 53-69.
543. Pan J., Li G., Chen Z., Chen X., Zhu W., Xu K. Alternative block polyurethanes based on poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(ethylene glycol) // Biomaterials. – 2009. – V. 30. – № 16. – P. 2975-2984.
544. Park A., Cima L.G. *In vitro* cell response to differences in poly-L-lactide crystallinity // J. Biomed. Mater. Res. – 1996. – V. 31. – № 1. – P. 117-130.
545. Park J.S., Yang H.N., Jeon S.Y., Woo D.G., Na K., Park K.H. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells using RGD-modified BMP-2 coated microspheres // Biomaterials. – 2010. – V. 31. – № 24. – P. 6239-6248.

546. Park S.J., Kang K.H., Lee H., Park A.R., Yang J.E., Oh Y.H., Song B.K., Jegal J., Lee S.H., Lee S.Y. Propionyl-CoA dependent biosynthesis of 2-hydroxybutyrate containing polyhydroxyalkanoates in metabolically engineered *Escherichia coli* // J. Biotechnol. – 2013. – V. 165. – № 2. – P. 93-98.

547. Parlane N.A., Grage K., Mifune J., Basaraba R.J., Wedlock D.N., Rehm B.H. et al. Vaccines displaying mycobacterial proteins on biopolyester beads stimulate cellular immunity and induce protection against tuberculosis // Clin. Vaccine Immunol. – 2012. – V. 19. – № 1. – P. 37-44.

548. Parra D. F., Fusaro J., Gaboardi F., Rosa D.S. Influence of poly (ethylene glycol) on the thermal, mechanical, morphological, physical–chemical and biodegradation properties of poly (3-hydroxybutyrate) // Polymer degradation and stability. – 2006. – V. 91. – № 9. – P. 1954-1959.

549. Paula A.C.C., Carvalho P.H., Martins T.M.M., Boeloni J.N., Cunha P.S., Novikoff S., Correlo V.M., Reis R.L., Goes A.M. Improved vascularisation but inefficient *in vivo* bone regeneration of adipose stem cells and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate scaffolds in xeno-free conditions // Mater. Sci. Eng. – 2020. – V. 107. – P. 110301.

550. Pavlov E., Zakharian E., Bladen C., Diao C.T., Grimbly C., Reusch R.N., French R.J. A large, voltage-dependent channel, isolated from mitochondria by water-free chloroform extraction // Biophys J. – 2005. – V. 88. – № 4. – P. 2614-2625.

551. Pearce R.P., Marchessault R.H. Melting and crystallization in bacterial poly(β-hydroxyvalerate), PHV, and blends with poly(β-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) // Macromolecules. – 1994. – V. 27. – P. 3869-3874.

552. Peister A., Mellad J.A., Larson B.L, Hall B.M., Gibson L.F., Prockop D.J. 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. – V. 103. – № 5. – P. 1662-1668.

553. Peñaloza J.P., Márquez-Miranda V., Cabaña-Brunod M., Reyes-Ramírez R., Llancalahuen F.M., Vilos C., Maldonado-Biermann F., Velásquez L.A., Fuentes J.A., González-Nilo F.D., Rodríguez-Díaz M., Otero C. Intracellular trafficking and cellular uptake mechanism of PHBV nanoparticles for targeted delivery in epithelial cell lines // J. Nanobiotechnology. – 2017. – V. 15 – № 1. – P. 1.

554. Peng Q., Sun X., Gong T., Wu C.Y., Zhang T., Tan J., et al. Injectable and biodegradable thermosensitive hydrogels loaded with PHBHHx nanoparticles for the sustained and controlled release of insulin // Acta Biomater. – 2013. – V. 9. – № 2. – P. 5063-5069.

555. Peng Q., Zhang Z.R., Gong T., Chen G.Q., Sun X. A rapid-acting, long-acting insulin formulation based on a phospholipid complex loaded PHBHHx nanoparticles // Biomaterials. – 2012. – V. 33. – № 5. – P. 1583-1588.

556. Peppas N.A. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers // Pharmaceutica Acta Helvetiae. – 1985. – V. 60. – P. 110-111.

557. De Peppo G.M., Marolt D. Modulating the biochemical and biophysical culture environment to enhance osteogenic differentiation and maturation of human pluripotent stem cell-derived mesenchymal progenitors // Stem Cell Res. Ther. – 2013. – V. 4. – № 5. – P. 106.

558. Perego G., Cella G. D., Bastioli C. Effect of molecular weight and crystallinity on poly (lactic acid) mechanical properties // Journal of Applied Polymer Science. – 1996. – V. 59. – № 1. – P. 37-43.

559. Pereira H., Correlo V.M., Silva-Correia J., Oliveira J.M., Reis R.L., Espregueira-Mendes J. Migration of "bioabsorbable" screws in ACL repair. How much do we know? A systematic review // Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. – 2013. – V. 21. – № 4. – P. 986-994.

560. Pettinari M.J., Vázquez G.J., Silberschmidt D., Rehm B., Steinbüchel A., Méndez B.S. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis genes in *Azotobacter sp*. strain FA8 // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – V. 67. – № 11. – P. 5331-5334.

561. 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. – V. 13. – № 10-12. – P. 690-696.

562. Piersma A.H., Brockbank K.G., Ploemacher R.E., van Vliet E., Brakel-van Peer K.M., Visser P.J. Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow // Experimental hematology. – 1985. – V. 13. – № 4. – P. 237-243.

563. Pignatello R., Musumeci T., Impallomeni G., Carnemolla G.M., Puglisi G., Ballistreri A. Poly(3-hydroxybutyrate-co-epsilon-caprolactone) copolymers and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-epsilon-caprolactone) terpolymers as novel materials for colloidal drug delivery systems // Eur. J. Pharm. Sci. – 2009. – V. 37. – № 3-4. – P. 451-462.

564. Pillai O., Panchagnula R. Polymers in drug delivery // Current Opinion in Chemical Biology. – 2001. – V. 5. – № 4. – P. 447-451.

565. Piskin E. Biodegradable polymers as biomaterials // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. – 1995. – V. 6. – № 9. – P. 775-795.

566. Pitt C.G., Zhong-wei G. Modification of the rates of chain cleavage of poly(β(lunate)-caprolactone) and related polyesters in the solid state // Journal of Controlled Release. 1987. – V. 4. – № 4. – P. 283-292.

567. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // Science. – 1999. – V. 284. – № 5411. – P. 143-147.

568. Polo-Corrales L., Latorre-Esteves M., Ramirez-Vick J.E. Scaffold Design for Bone Regeneration // J. Nanosci. Nanotechnol. – 2014. – V. 14. – № 1. – P. 15-56.

569. Pontailler M., Illangakoon E., Williams G.R., Marijon C., Bellamy V., Balvay D., Autret G., Vanneaux V., Larghero J., Planat-Benard V., Perier M.C., Bruneval P., Menasché P., Kalfa D. Polymer-Based Reconstruction of the Inferior Vena Cava in Rat: Stem Cells or RGD Peptide? // Tissue Eng. Part A. – 2015. – V. 21. – № 9-10. – P. 1552-1564.

570. Ponzoni, M., Arrigoni, G., Gould, V. E. Lack of CD 29 (β1 integrin) and CD 54 (ICAM-1) adhesion molecules in intravascular lymphomatosis // Human pathology. – 2000. – V. 31. – № 2. – P. 220-226.

571. Porter J.R., Ruckh T.T., Popat K.C. Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies // Biotech. Prog. – 2009. – V. 25. – № 6. P.

572. Pötter M., Steinbüchel A. Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation // Biomacromolecules. – 2005. – V. 6. – № 2. – P. 552-560.

573. Pouton CW, Akhtar S. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery // Adv. Drug. Deliver. Rev. – 1996. – V. 18. – P. 133-162.

574. 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. – V. 17. – № 2. – P. 110-124.

575. Qi F., Wu J., Li H., Ma G. Recent research and development of PLGA/PLA microspheres/nanoparticles: A review in scientific and industrial aspects // Frontiers of Chemical Science and Engineering. – 2019. – V. 13. – № 1. – P. 14-27.

576. Qu X.H., Wu Q., Liang J., Zou B., Chen G.Q. Effect of 3-hydroxyhexanoate content in poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) on in vitro growth and differentiation of smooth muscle cells // Biomaterials. – 2006. – V. 27. – № 15. – P. 2944-2950. (a)

577. Qu X.H., Wu Q., Zhang K.Y., Chen G.Q. *In vivo* studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) based polymers: biodegradation and tissue reactions // Biomaterials. – 2006. – V. 27. – № 19. – P. 3540-3548. (б)

578. Quang D.N., Hashimoto T., Toyota M., Asakawa Y. Occurrence of a high concentration of spider pheromones in the ascomycete fungus Hypoxylon truncatum // J. Nat. Prod. – 2003. – V. 66. – № 12. – P. 1613-1614.

579. Radivojevic J., Skaro S., Senerovic L., Vasiljevic B., Guzik M., Kenny S.T., Maslak V., Nikodinovic-Runic J., O'Connor K.E. Polyhydroxyalkanoate-based 3-hydroxyoctanoic acid and its derivatives as a platform of bioactive compounds // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2016. – V. 100. – № 1. – P. 161-172.

580. Ramanathan M., Darling S.B. Mesoscale morphologies in polymer thin films // Progress in Polymer Science (Oxford). – 2011. – V. 6. – № 36. – P. 793-812.

581. Rasal R.M., Janorkar A.V., Hirt D.E. Poly(lactic acid) modifications // Prog. Polym. Sci – 2010. – V. 35. – P. 338-356.

582. Ray S.S., Okamoto M. Biodegradable polylactide and its nanocomposites: opening a new dimension for plastics and composites // Macromol. Rapid Commun. – 2003. – V. 24. – P. 815-840.

583. Rehm B.H. Polyester synthases: natural catalysts for plastics // Biochem. J. – 2003. – V. 376. – Pt. 1. – P. 15-33.

584. Reilly G.C., Engler A.J. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation // J. Biomech. – 2010. – V. 43. – № 1. – P. 55-62.

585. Renstad R., Karlsson S., Albertsson A.C. The influence of processing induced differences in molecular structure on the biological and non-biological degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), P(3-HB-co-3-HV) // Polym. Degrad. Stab. – 1999. – V. 63. – P. 201-211.

586. Rentsch C., Rentsch B., Breier A., Hofmann A., Manthey S., Scharnweber D., Biewener A., Zwipp H. Evaluation of the osteogenic potential and vascularization of 3D poly(3)hydroxybutyrate scaffolds subcutaneously implanted in nude rats // J. Biomed. Mater. Res. Part A. – 2010. – V. 92. – P. 185-195.

587. Repaske R., Repaske A.C. Quantitative requirements for exponentional growth of Alcaligenes eutrophus // Appl. Environ. Microbiol. – 1976. – V. 32. – P. 585-591.

588. Reusch R.N., Hiske T.W., Sadoff H.L. Poly-beta-hydroxybutyrate membrane structure and its relationship to genetic transformability in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. – 1986. – V. 168. – № 2. – P. 553-562.

589. Reusch R.N., Sadoff H.L. Putative structure and functions of a poly-β-hydroxybutyrate/ calcium polyphosphate channel in bacterial plasma membranes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1988. – V. 85. – P. 4176-4180.

590. Reusch R.N. Poly-beta-hydroxybutyrate/calcium polyphosphate complexes in eukaryotic membranes // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1989. – V. 191. – № 4. – P. 377-381.

591. Reusch R.N., Sparrow A.W., Gardiner J. Transport of poly-beta-hydroxybutyrate in human plasma // Biochim. Biophys. Acta. – 1992. – V. 1123. – № 1. – P. 33-40.
592. Reusch R.N. Low molecular weight complexed poly(3-hydroxybutyrate): a dynamic and versatile molecule *in vivo* // Can. J. Microbiol. (Suppl). – 1995. – V. 41. – № 1. – P. 50-54.
593. Reusch R.N., Huang R., Kosk-Kosicka D. Novel components and enzymatic activities of the human erythrocyte plasma membrane calcium pump // FEBS Lett. – 1997. – V. 412. – № 3. – P. 592-596.
594. Reusch R.N., Bryant E.M., Henry D.N. Increased poly-(R)-3-hydroxybutyrate concentrations in streptozotocin (STZ) diabetic rats // Acta Diabetol. – 2003. – V. 40. – № 2. – P. 91-94.
595. Reusch R.N. Physiological importance of poly-(R)-3-hydroxybutyrates // Chemistry and Biodiversity. – 2012. – V. 9. – P. 2343-2366.
596. Reusch R.N. The role of short-chain conjugated poly-(R)-3-hydroxybutyrate (cPHB) in protein folding // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – V. 14. – P. 10727-10748.
597. Rezaie Shirmard L., Bahari Javan N., Khoshayand M.R., Kebriaee-Zadeh A., Dinarvand R., Dorkoosh F.A. Nanoparticulate fingolimod delivery system based on biodegradable poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV): design, optimization, characterization and *in-vitro* evaluation // Pharm. Dev. Technol. – 2017. – V. 22. – № 7. – P. 860-870.
598. Rezwan K., Chen Q.Z., Blaker J.J., Boccaccini A.R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering // Biomaterials. – 2006. – V. 27. – P. 3413-3431.
599. Ribeiro-Samy S., Silva N.A., Correlo V.M., Fraga J.S., Pinto L., Teixeira-Castro A., Leite-Almeida H., Almeida A., Gimble J.M., Sousa N., Salgado A.J., Reis R.L. Development and characterization of a PHB-HV-based 3 D scaffold for a tissue engineering and cell-therapy combinatorial approach for spinal cord injury regeneration // Macromolecular bioscience. – 2013. – V. 13. – № 11. – P. 1576-1592.
600. Richardson S.M., Curran J.M., Chen R., Vaughan-Thomas A., Hunt J.A., Freemont A.J., Hoyland J.A. The differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells on poly-L-lactic acid (PLLA) scaffolds // Biomaterials. – 2006. – V. 27. – № 22. – P. 4069-4078.
601. Riekes M.K., Junior L.R., Pereira R.N., Borba P.A., Fernandes D., Stulzer H.K. Development and evaluation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone microparticles of nimodipine // Curr. Pharm. Des. – 2013. – V. 19. – № 41. – P. 7264-7270.

602. Rihova B. Biocompatibility of biomaterials: hemocompatibility, immunocompatibility and biocompatibility of solid polymeric materials and soluble targetable polymeric carriers // Adv. Drug. Delivery Rev. – 1996. – V. 21. – P. 157-176.
603. Rodrigues J.A.F.R., Parra D.F., Lugão A.B. Crystallization on films of PHB/PEG blends // Journal of Thermal analysis and Calorimetry. – 2005. – V. 79. – № 2. – P. 379-381.
604. Rumian Ł., Wojak I., Scharnweber D., Pamuła E. Resorbable scaffolds modified with collagen type I or hydroxyapatite: *in vitro* studies on human mesenchymal stem cells // Acta Bioeng. Biomech. Orig. Pap. – 2013. – V. 15. – P. 61-67.
605. Saad B., Ciardelli G., Matter S., Welti M., Uhlschmid G. K., Neuenschwander P., Suterl U.W. Characterization of the cell response of cultured macrophages and fibroblasts td particles of short-chain poly((R)-3-hydroxybutyric acid) // Journal of Biomedical Materials Research. – 1996. – V. 30. – P. 429-439.
606. Saad B., Ciardelli G., Matter S., Welti M., Uhlschmid G.K., Neuenschwander P., Suter U.W. Degradable and highly porous polyesterurethane foam as biomaterial: effects and phagocytosis of degradation products in osteoblasts // J. Biomed. Mater. Res. – 1998. – V. 39. – № 4. – P. 594-602.
607. Saadat A., Behnamghader A., Karbasi S., Abedi D., Soleimani M., Shafiee A. Comparison of acellular and cellular bioactivity of poly 3-hydroxybutyrate / hydroxyapatite nanocomposite and poly 3-hydroxybutyrate scaffolds // Biotechnol. Bioprocess Eng. – 2013. – V. 18. – P. 1-7.
608. Sachs E.M., Haggerty J.S., Cima M.J., Williams P.A.. Three-dimensional printing techniques: Patent USA 5340656A – 1993.
609. Şahin A., Eke G., Buyuksungur A., Hasirci N., Hasirci V. Nuclear targeting peptide-modified, DOX-loaded, PHBV nanoparticles enhance drug efficacy by targeting to Saos-2 cell nuclear membranes // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. – 2018. – V. 29. – № 5. – P. 507-519.
610. Saika A., Watanabe Y., Sudesh K., Tsuge T. 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. – V. 117. – № 6. – P. 670-675.
611. Saito T., Tomita K., Juni K., Ooba K. *In vivo* and *in vitro* degradation of poly(3-hydroxybutyrate) in rat // Biomaterials. – 1991. – V. 12. – № 3. – P. 309-312.
612. Salinas C.N., Anseth K.S. Mesenchymal stem cells for craniofacial tissue regeneration: designing hydrogel delivery vehicles // J. Dent. Res. – 2009. – V. 88. – P. 681-692.

613. Salman M.A., Sahin A., Onur M.A., Oge K., Kassab A., Aypar U. Tramadol encapsulated into polyhydroxybutyrate microspheres: *in vitro* release and epidural analgesic effect in rats // Acta Anaesthesiol. Scand. – 2003. – V. 47. – P. 1006-1012.

614. Santos H.A., Riikonen J., Salonen J., Mäkilä E., Heikkilä T., Laaksonen T., Peltonen L., Lehto V.P., Hirvonen J. *In vitro* cytotoxicity of porous silicon microparticles: effect of the particle concentration, surface chemistry and size // Acta biomaterialia. – 2010. – V. 6. – № 7. – P. 2721-2731.

615. Santo V.E. Gomes M.E., Mano J.F., Reis R.L. Controlled Release Strategies for Bone, Cartilage, and Osteochondral Engineering. Part I: Recapitulation of Native Tissue Healing and Variables for the Design of Delivery Systems // Tissue Eng. Part B Rev. – 2013. – V. 19. – № 4. – P. 308-326.

616. Sato Y., Araki H., Kato J., Nakamura K., Kawano Y., Kobune M., Sato T., Miyanishi K., Takayama T., Takahashi M., Takimoto R., Iyama S., Matsunaga T., Ohtani S., Matsuura A., Hamada H., Niitsu Y. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion // Blood. – 2005. – V. 106. – № 2. – P. 756-763.

617. Savencova L., Gercberga Z., Bibers I., Kalnins M. Effect of 3-hydroxyvalerate content on some physical and mechanical properties of polyhydroxyalkanoates produced by *Azotobacter chroococcum* // Process Biochem. – 2000. – V. 36. – P. 445-450.

618. Scandola M., Focarete M.L., Adamus G., Sikorska W., Baranowska I., Swierczek S., Gnatowski M., Kowalczuk M., Jedlinski Z. Polymer Blends of Natural Poly(3-hydroxybutyrate- co -3-hydroxyvalerate) and a Synthetic Atactic Poly(3-hydroxybutyrate). Characterization and Biodegradation Studies // Macromolecules. – 1997. – V. 9. – № 30. – P. 2568-2574.

619. Schirmer A., Jendrossek D., Schlegel H.G. Degradation of poly(3-hydroxyoctanoic acid) (P(3HO)) by bacteria: purification and properties of a P(3HO) depolymerase from *Pseudomonas fluorescens* GK13 // Appl. Environ. Microbiol. – 1993. – V. 59. – P. 1220-1227.

620. Schliecker G., Schmidt C., Fuchs S., Wombacher R., Kissel T. Hydrolytic degradation of poly(lactide-co-glycolide) films: effect of oligomers on degradation rate and crystallinity // Int. J. Pharm. – 2003. – V. 266. – № 1-2. – 39-49.

621. Schmitz J.P., Hollinger J.O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions // Clin. Orthop. Relat. Res. – 1986. – V. 205. – P. 299-308.

622. Schnable P.S., Ware D., Fulton R.S., Stein J.C., Wei F., Pasternak S., Liang C., Zhang J., Fulton L., Graves T.A., at al. … Wilson R.K. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics // Science. – 2009. – V. 326. – № 5956. – P. 1112-1115.
623. Schrepfer S., Deuse T., Lange C., Katzenberg R., Reichenspurner H., Robbins R.C., Pelletier M.P. Simplified protocol to isolate, purify, and culture expand mesenchymal stem cells // Stem cells and development. – 2007. – V. 16. – № 1. – P. 105-108.
624. Schugens C., Laruelle N., Nihant N., Grandfils Ch., Jérome R., Teyssié Ph. Effect of the emulsion stability on the morphology and porosity of semicrystalline poly l-lactide microparticles prepared by w/o/w double emulsion-evaporation // Journal of Controlled Release. – 1994. – V. 32. – № 2. – P. 161-176.
625. Schultz J. M. Unusual “twisting” morphology in poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) spherulites // Macromolecules. – 2013. – V. 46. – № 10. – P. 4227-4229.
626. Schulz S., Toft S. Identification of a sex pheromone from a spider // Science. – 1993. – V. 260. – № 5114. – P. 1635-1637.
627. Schwarze T., Fiedler I., Leyhausen G., Geurtsen W. The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period // J. Endod. – 2002. – V. 28. – № 11. – P. 784-786.
628. Scudiero D.A., Shoemaker R.H., Paull K.D., Monks A., Tierney S., Nofziger T.H., Currens M.J., Seniff D., Boyd M.R. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines // Cancer Res. – 1988. – V. 48. – № 17. – 4827-4833.
629. Seebach D., Brunner A., Bürger H.M., Schneider J., Reusch R.N. Isolation and 1H-NMR spectroscopic identification of poly(3-hydroxybutanoate) from prokaryotic and eukaryotic organisms. Determination of the absolute configuration (R) of the monomeric unit 3-hydroxybutanoic acid from *Escherichia coli* and spinach // Eur. J. Biochem. – 1994. – V. 224. – № 2. – P. 317-328.
630. Seitz H., Rieder W., Irsen S., Leukers B., Tille C. Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering // Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. – 2005. – V. 74. – № 2. – p. 782-788.
631. Sendil D, Gursel I, Wise DL, Hasirci V. Antibiotic release from biodegradable PHBV microparticles // J. Control. Release. – 1999. – V. 59. – P. 207-217.
632. Shah M., Naseer M., Choi M.H., Kim M.O., Yoon S.C. Amphiphilic PHA-mPEG copolymeric nanocontainers for drug delivery: preparation, characterization and *in vitro* evaluation // Int. J. Pharm. – 2010. – V. 400. – № 1-2. – P. 165-175.

633. Shahriari D., Koffler J., Lynam D.A., Tuszynski M.H., Sakamoto J.S., Characterizing the degradation of alginate hydrogel for use in multilumen scaffolds for spinal cord repair // J. Biomed. Mater. Res. Part A. – 2016. – V. 104. – P. 611-619.

634. Shakibaei, M., Shayan P., Busch F., Aldinger C., Buhrmann C., Lueders C., Mobasheri A. Resveratrol mediated modulation of Sirt-1/Runx2 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: potential role of Runx2 deacetylation // PLoS One. – 2012. – V. 7. – № 4. – P. e35712.

635. Sharma S., Chatterjee S. Microplastic pollution, a threat to marine ecosystem and human health: a short review // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. – 2017. – V. 24. – № 27. – P. 21530-21547.

636. Sheremetyev V.A., Bonartsev A.P., Dubinskiy S.M., Zhukova Y.S., Bonartseva G.A., Makhina T.K., Akulina E.A., Ivanova E.V., Maria S. Kotlyarova M.S., Prokoshkin S.D., Brailovski S.D., Shaitan K.V. Surface Modification of Ti-Nb-Zr Foams by Poly(3-Hydroxybutyrate) // 3rd International Conference on Shape Memory Alloys, SMA (Chelyabinsk, RUSSIA, AUG 16-20, 2018): Materials Research Proceedings, Shape Memory Alloys, SMA. – 2018. – V. 9. – P. 74-79.

637. Sheridan M.H., Shea L.D., Peters M.C., Mooney D.J. Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery // Journal of Controlled Release. – 2000. – V. 64. – № 1. – P. 91-102.

638. Shi X., Zhou K., Huang F., Zhang J., Wang C. Endocytic mechanisms and osteoinductive profile of hydroxyapatite nanoparticles in human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells // Int. J. Nanomedicine. – 2018. – V. 13. – P. 1457-1470.

639. Shi F., Ashby R., Gross R.A. Use of poly(ethylene glycol)s to regulate poly(3-hydroxybutyrate) molecular weight during Alcaligenes eutrophus cultivation // Macromolecules. – 1996. – V. 29. – P. 7753-7758. (a)

640. 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. – V. 29. – P. 10-17. (б)

641. Shikanov A., Xu M., Woodruff T.K., Shea L.D. Interpenetrating fibrin-alginate matrices for in vitro ovarian follicle development // Biomaterials. – 2009. – V. 30. – № 29. – P. 5476-5485.

642. Shimizu R.N., Demarquette N.R. Evaluation of surface energy of solid polymers using different models // J. Appl. Polym. Sci. – 2000. – V. 76. – № 12. – P. 1831-1845.

643. Shirazi R.N., Aldabbagh F., Ronan W., Erxleben A., Rochev Y., McHugh P. Effects of material thickness and processing method on poly(lactic-co-glycolic acid) degradation and mechanical performance // J. Mater. Sci. Mater. Med. – 2016. – V. 27. – № 10. – P. 154.
644. Shishatskaya E.I., Volova T.G., Gordeev S.A., Puzyr A.P. Degradation of P(3HB) and P(3HB-co-3HV) in biological media // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. – 2005. – V. 16. – № 5. – 643-657.
645. Shishatskaya E. I., Khlusov I. A., Volova T. G. A hybrid PHB–hydroxyapatite composite for biomedical application: production, *in vitro* and *in vivo* investigation // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. – 2006. – V. 17. – № 5. – P. 481-498.
646. Shishatskaya E.I., Goreva A.V., Voinova O.N., Inzhevatkin E.V., Khlebopros R.G., Volova T.G. Evaluation of antitumor activity of rubomycin deposited in absorbable polymeric microparticles // Bull. Exp. Biol. Med. – 2008. – V. 145. – № 3. – 358-361.
647. Shishatskaya E.I., Kamendov I.V., Starosvetsky S.I., Vinnik Y.S., Markelova N.N., Shageev A.A., Khorzhevsky V.A., Peryanova O.V., Shumilova A.A. An *in vivo* study of osteoplastic properties of resorbable poly-3-hydroxybutyrate in models of segmental osteotomy and chronic osteomyelitis //Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology. – 2014. – V. 42. – № 5. – P. 344-355.
648. Shkand T.V., Chizh M.O., Sleta I.V., Sandomirsky B.P., Tatarets A.L., Patsenker L.D. Assessment of alginate hydrogel degradation in biological tissue using viscosity-sensitive fluorescent dyes // Methods Appl. Fluoresc. – 2016. – V. 4. – P. 044002.
649. Shrivastav A., Kim H.Y., Kim Y.R. Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system // BioMed research international. – 2013. – V. 2013. – P. 581684.
650. Shtilman M.I. Polymeric biomaterials. Part 1 Polymer implants / Shtilman M.I. – Leiden, Netherlands: VSP. – 2003. – 293 p.
651. Shumilova A.A., Myltygashev M.P., Kirichenko A.K., Nikolaeva E.D., Volova T.G., Shishatskaya E.I. Porous 3D implants of degradable poly-3-hydroxybutyrate used to enhance regeneration of rat cranial defect // J. Biomed. Mater. Res. A. – 2017. – V. 105. – № 2. – P. 566-577.
652. Siepmann J., Faisant N., Benoit J.P. A new mathematical model quantifying drug release from bioerodible microparticles using Monte Carlo simulations // Pharm. Res. – 2002. – V. 19. – P. 1885-1893.
653. Siepmann J., Elkharraz K., Siepmann F., Klose D. How Autocatalysis Accelerates Drug Release from PLGA-Based Microparticles: A Quantitative Treatment // Biomacromolecules. – 2005. – V. 6. – P. 2312-2319.

654. Siepmann J., Siepmann F. Microparticles used as drug delivery systems // Colloid Polym. Sci. – 2006. – V. 133. – P. 15-21.

655. Sikhosana S.T., Gumede T.P., Malebo N.J., Ogundeji A.O. Poly(lactic acid) and its composites as functional materials for 3-D scaffolds in biomedical applications: A mini-review of recent trends // eXPRESS Polymer Letters. – 2021. – V. 15. – № 6. – P. 568-580.

656. Simon-Colin C., Alain K., Raguénès G., Schmitt S., Kervarec N., Gouin C., Crassous P., Costa B., Guezennec J.G. Biosynthesis of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl PHAs) from cosmetic co-products by *Pseudomonas raguenesii* sp. nov., isolated from Tetiaroa, French Polynesia // Bioresource technology. – 2009. – V. 100. – № 23. – P. 6033-6039.

657. Skalak R., Fox C.F. Tissue engineering // Workshop (Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26-29, 1988): proceedings of a workshop // Alan. Liss. New York. – 1988. – V. 107. – P. 22.

658. Slepecky R.A., Law J.H. Synthesis and degradation of poly-β-hydroxybutyric acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium* // J. Bacteriol. – 1961. – V. 82, pp. 37-42.

659. Smithen M., Elustondo P.A., Winkfein R., Zakharian E., Abramov A.Y., Pavlov E. Role of polyhydroxybutyrate in mitochondrial calcium uptake // Cell Calcium. – 2013. – V. 54. – № 2. – P. 86-94.

660. Solheim E., Sudmann B., Bang G., Sudmann E. Biocompatibility and effect on osteogenesis of poly(ortho ester) compared to poly(DL-lactic acid) // J. Biomed. Mater. Res. – 2000. – V. 49. – № 2. – P. 257-263.

661. Soliman S.S., Greenwood J.S., Bombarely A., Mueller L.A., Tsao R., Mosser D.D., Raizada M.N. An Endophyte Constructs Fungicide-Containing Extracellular Barriers for Its Host Plant // Curr. Biol. – 2015. – V. 25. – № 19. – P. 2570-2576.

662. Spicer P.P., Kretlow J.D., Young S., Jansen J.A., Kasper F.K., Mikos A.G. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect // Nat. Protoc. – 2012. – V. 7. – P. 1918-1929.

663. Spyros A., Kimmich R., Briese B.H., Jendrossek D. H-1-NMR imaging study of enzymatic degradation in poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate - evidence for preferencial degradation of the amorphous phase by PHB depolymerase from *Pseudomonas lemoignei* // Macromolecules. – 1997. – V. 30. – P. 8218-8225.

664. Stefanescu E.A., Stefanescu C., Negulescu I.I. Biodegradable polymeric capsules obtained via room temperature spray drying: preparation and characterization // J. Biomater. Appl. – 2011. – V. 25. – № 8. – P. 825-849.

665. Stein G.S., Lian J.B. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype // Endocrine reviews. – 1993. – V. 14. – № 4. – P. 424-442.
666. Steinbuchel A. Polyhydroxyalkanoic acids // Biomaterials / Byrom D. (editor). – Basingstoke: MacMillan. – 1991. – P. 125-213.
667. Steinbuchel A., Hustede E., Liebergesell M., Pieper U., Timm A., Valentin H. Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria // FEMS Microbiol. Rev. – 1992. – V. 103. – P. 217-230.
668. Steinbuchel A., Aerts K., Babel W., Follner C., Liebergesell M., Madkour M.H., Mayer F., Pieper-Furst U., Pries A., Valentin H.E., Wieczorek R. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions // Can. J. Microbiol. – 1995. – V. 41. – Suppl. 1. – P. 94-105.
669. Steinbuchel A., Valentin H.E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids // FEMS Microbiol. Lett. – 1995. – V. 128. – P. 219-228.
670. Stevanovic M., Pavlovic V., Petkovic J. ROS-inducing potential, influence of different porogens and *in vitro* degradation of poly (D, L-lactide-co-glycolide)-based material // Express Polymer Letters. – 2011. – V. 5. – № 11. – P. 996-1008.
671. Stock P., Burton R.J.F. Defining terms for integrated (multi-inter-trans-disciplinary) sustainability research // Sustainability. – 2011. – V. 3. – № 8. – P. 1090-1113.
672. Su S.H., Nguyen K.T., Satasiya P., Greilich P.E., Tang L., Eberhart R.C. Curcumin impregnation improves the mechanical properties and reduces the inflammatory response associated with poly(L-lactic acid) fiber // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. – 2005. – V. 16. – № 3. – P. 353-370.
673. Sudesh K., Abe H., Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters // Progress in Polymer Science (Oxford). – 2000. – V. 10. – № 25. – P. 1503-1555.
674. Sun K.-H., Liu Z., Liu C.-J., Yu T., Zhou M., Liu C., Ran F., Pan L.-J., Zhang H. *In vivo* study of alginate hydrogel conglutinating cells to polycaprolactone vascular scaffolds fabricated by electrospinning // J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. – 2017. – V. 105. – P. 2443-2454.
675. 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. – V. 27. – № 3. – P. 283-289.

676. Suzuki Y., Esumi Y., Koshino H., Doi Y. Isolation and structure determination of complexed poly(3-hydroxyalkanoate) from beet (*Beta vulgaris L.*) // Macromol Biosci. – 2005. – V. 5. – № 9. – P. 853-862.

677. Szwej E., Devocelle M., Kenny S., Guzik M., O'Connor S., Nikodinovic-Runic J., Radivojevic J., Maslak V., Byrne A.T., Gallagher W.M., Zulian Q.R., Zinn M., O'Connor K.E. The chain length of biologically produced (R)-3-hydroxyalkanoic acid affects biological activity and structure of anti-cancer peptides // J. Biotechnol. – 2015. – V. 204. – P. 7-12.

678. Tan W.-H., Takeuchi S. Monodisperse alginate hydrogel microbeads for cell encapsulation. Adv. Mater. 19 (2007) 2696–2701.

679. Tanadchangsaeng N., Tsuge T., Abe H. Comonomer compositional distribution, physical properties, and enzymatic degradability of bacterial poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-4-methylvalerate) copolyesters // Biomacromolecules. – 2010. – V. 11. – № 6. – P. 1615-1622.

680. Taylor M.S., Daniels A.U., Andriano K.P., Heller J. Six bioabsorbable polymers: *in vitro* acute toxicity of accumulated degradation products // J. Appl. Biomater. – 1994. – V. 5. – № 2. – P. 151-157.

681. About, What is Bioengineering? // University of California, The Department of Bioengineering (BioE), Berkeley (UCB) (electronic resource). – URL: https://bioeng.berkeley.edu/about-us/what-is-bioengineering (date of application 11.02.2022).

682. What is Biological Engineering? // The Institute of Biological Engineering (IBE) (electronic resource). – URL: https://ibe.org/about/what-is-biological-engineering (date of application 11.02.2022).

683. What is Bioengineering? About the Munich School of BioEngineering // The Munich School of BioEngineering (MSB) of the Technical University of Munich (TUM) (electronic resource). – URL: https://www.bioengineering.tum.de/en/about-the-mibe (date of application 11.02.2022).

684. What is Biotechnology? // The School of Biotechnology, Dublin City University (DCU) (electronic resource). – URL: https://www.dcu.ie/biotechnology/what-is-biotechnology-school-of-biotechnology (date of application 11.02.2022).

685. Tian J., Sinskey A. J., Stubbe J. A. Kinetic studies of polyhydroxybutyrate granule formation in Wautersia eutropha H16 by transmission electron microscopy // Journal of bacteriology. – 2005. – V. 187. – V. 11. – P. 3814-3824.

686. Titushkin I., Cho M. Modulation of Cellular Mechanics during Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells // Biophys. J. – 2007. – V. 93. – № 10. – P. 3693-3702.

687. Tokiwa, Y, Suzuki T., Tokiwa Y., Suzuki T. Hydrolysis of polyesters by lipase // Nature. – 1977. – V. 5632. – № 270. – P. 76-78.

688. Tokiwa Y., Suzuki T. Hydrolysis of copolyesters containing aromatic and aliphatic ester blocks by lipase // Journal of Applied Polymer Science. – 1981. – V. 2. – № 26. – P. 441-448.
689. Tokiwa Y., Suzuki T., Takeda K. Hydrolysis of Polyesters By *Rhizopus Arrhizus* Lipase // Agricultural and Biological Chemistry. – 1986. – V. 50. – № 5. – P. 1324-1325.
690. Tokiwa Y., Calabia B.P. Degradation of microbial polyesters // Biotechnology Letters. – 2004. – V. 15. – № 26. – P. 1181-1189.
691. Toma C., Pittenger M.F., Cahill K.S., Byrne B.J., Kessler P.D. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart // Circulation. – 2002. – V. 105. – № 1. – P. 93-98.
692. Townsend K.J., Busse K., Kressler J., Scholz C. Contact Angle, WAXS, and SAXS Analysis of Poly (β-hydroxybutyrate) and Poly (ethylene glycol) Block Copolymers Obtained via *Azotobacter vinelandii* UWD // Biotechnology progress. – 2005. – V. 21. – № 3. – P. 959-964.
693. Trindade R., Albrektsson T., Galli S., Prgomet Z., Tengvall P., Wennerberg A. Osseointegration and foreign body reaction: Titanium implants activate the immune system and suppress bone resorption during the first 4 weeks after implantation // Clin. Implant Dent. Relat. Res. – 2018. – V. 20. – № 1. – P. 82-91.
694. Tsuda H., Shiraki M., Inoue E., Saito T. Generation of poly-β-hydroxybutyrate from acetate in higher plants: Detection of acetoacetyl CoA reductase- and PHB synthase- activities in rice // J. Plant. Physiol. – 2016. – V. 201. – P. 9-16.
695. Turesin F., Gumusyazici Z., Kok F.M., Gursel I., Alaeddinoglu N.G., Hasirci V. Biosynthesis of polyhydroxybutyrate and its copolymers and their use in controlled drug release // Turk J. Med. Sci. – 2000. – V. 30. – P. 535-541.
696. Turesin F., Gursel I., Hasirci V. Biodegradable polyhydroxyalkanoate implants for osteomyelitis therapy: *in vitro* antibiotic release // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. – 2001. – V. 12. – № 2. – P. 195-207.
697. Uccelli A., Moretta L., Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease // Nature Reviews Immunology. – 2008. – V. 8. – № 9. – P. 726-736.
698. Biotechnology (Applied Molecular Biology), BSc. // University of Aberdeen (UA) (electronic resource). – URL: https://www.abdn.ac.uk/study/undergraduate/degree-programmes/472/J700/biotechnology-applied-molecular-biology/ (date of application 11.02.2022).
699. Unverdorben M., Spielberger A., Schywalsky M., Labahn D., Hartwig S., Schneider M., Lootz D., Behrend D., Schmitz K., Degenhardt R., Schaldach M., Vallbracht C. A

polyhydroxybutyrate biodegradable stent: preliminary experience in the rabbit // Cardiovasc. Intervent. Radiol. – 2002. – V. 25. – № 2. – P. 127-132.

700. Vacanti N.M., Cheng H., Hill P.S., Guerreiro J.D., Dang T.T., Ma M., Watson S., Hwang N.S., Langer R., Anderson D.G. Localized delivery of dexamethasone from electrospun fibers reduces the foreign body response // Biomacromolecules. – 2012. – V. 13. – № 10. – P. 3031-3038.

701. Valamehr B., Jonas S.J., Polleux J., Qiao R., Guo S., Gschweng E.H., Stiles B., Kam K., Luo T.J., Witte O.N., Liu X., Dunn B., Wu H. Hydrophobic surfaces for enhanced differentiation of embryonic stem cell-derived embryoid bodies // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – V. 105. – № 38. – P. 14459-14464.

702. Van Cauwenberghe L., Janssen C.R. Microplastics in bivalves cultured for human consumption // Environ. Pollut. – 2014. – V. 193. – P. 65-70.

703. van de Weert M., Hoechstetter J., Hennink W.E., Crommelin D.J. The effect of a water/organic solvent interface on the structural stability of lysozyme // Journal of controlled release. – 2000. – V. 68. – № 3. – P. 351-359.

704. Van S.N., Minh H.D., Anh D.N. Study on chitosan nanoparticles on biophysical characteristics and growth of Robusta coffee in green house // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2013. – V. 2. – № 4. – P. 289-294.

705. Van Tassel P.R., Guemouri L., Ramsden J.J., Tarjus G., Viot P., Talbot J. A particle-level model of irreversible protein adsorption with a postadsorption transition // Journal of colloid and interface science. – 1998. – V. 207. – № 2. – P. 317-323.

706. Vardhan H., Mittal P., Adena S.K.R., Upadhyay M., Mishra B. Development of long-circulating docetaxel loaded poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) nanoparticles: Optimization, pharmacokinetic, cytotoxicity and *in vivo* assessments // Int. J. Biol. Macromol. – 2017. – V. 103. – P. 791-801.

707. Vela G.R., Rosenthal R.S. Effect of peptone on *Azotobacter* morphology // J. Bacteriol. – 1972. – V. 111. – № 1. – P. 260-266.

708. Venkatesan J., Bhatnagar I., Manivasagan P., Kang K.H., Kim S.K., Alginate composites for bone tissue engineering: a review // Int. J. Biol. Macromol. – 2015. – V. 72. – P. 269-281.

709. Vergnaud J.M. Controlled Drug Release of Oral Dosage Forms / Vergnaud J.M. – London, U.K.: CRC Press. – 1993. – 426 p.

710. Vert M., Doi Y., Hellwich K.H., Hess M., Hodge P., Kubisa P., Rinaudo M., Schue F. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012) // Pure Appl. Chem. – 2012. – V. 84. – № 2. – P. 377-410.

711. Vidensek N., Lim P., Campbell A., Carlson C. Taxol content in bark, wood, root, leaf, twig, and seedling from several Taxus species // J. Nat. Prod. – 1990. – V. 53. – № 6. – P. 1609-1610.
712. Vilos C., Constandil L., Rodas P.I., Cantin M., Zepeda K., Herrera N., et al. Evaluation of ceftiofur-PHBV microparticles in rats // Drug Des. Devel. Ther. – 2014. – V. 8. – P. 651-66.
713. Vincent J.F., Bogatyreva O.A., Bogatyrev N.R., Bowyer A., Pahl A.K. Biomimetics: its practice and theory // J. R. Soc. Interface. – 2006. – V. 3. – № 9. – P. 471-482.
714. Vogel C., Wessel E., Siesler H.W. FT-IR imaging spectroscopy of phase separation in blends of poly(3-hydroxybutyrate) with poly(L-lactic acid) and poly(epsilon-caprolactone) // Biomacromolecules. – 2008. – V. 9. – № 2. – P. 523-527.
715. Vogel V., Sheetz M. Local force and geometry sensing regulate cell functions // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2006. – V. 7. – № 4. – P. 265-275.
716. Volkov A.V., Muraev A.A., Zharkova I.I., Voinova V.V., Akoulina E.A., Zhuikov V.A., Khaydapova D.D., Chesnokova D.V., Menshikh K.A., Dudun A.A., Makhina T.K., Bonartseva G.A., Asfarov T.F., Stamboliev I.A., Gazhva Y.V., Ryabova V.M., Zlatev L.H., Ivanov S.Y., Shaitan K.V., Bonartsev A.P. Poly(3-hydroxybutyrate)/hydroxyapatite/alginate scaffolds seeded with mesenchymal stem cells enhance the regeneration of critical-sized bone defect // Materials Science and Engineering: C, Materials for biological application. – 2020. – V. 114. – P. 110991.
717. Wakitani S., Saito T., Caplan A. I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine // Muscle & nerve. – 1995. – V. 18. – № 12. – P. 1417-1426.
718. Wallen L.L., Rohwedder W.K. Poly-b-hydroxyalkanoate from activated sludge // Environ Sci. Technol. – 1974. – V. 8. – P. 576-579.
719. Wang C, Ye W, Zheng Y, Liu X, Tong Z. Fabrication of drug-loaded biodegradable microcapsules for controlled release by combination of solvent evaporation and layer-by-layer self-assembly // Int. J. Pharm. – 2007. – V. 338. – № 1-2. – P. 165-173.
720. Wang H., Li X., Chen G.Q. Production and characterization of homopolymer polyhydroxyheptanoate (P3HHp) by a fadBA knockout mutant Pseudomonas putida KTOY06 derived from P. putida KT2442 // Process Biochemistry. – 2009. – V. 1. – № 44. – P. 106-111.
721. Wang K., Cai L., Hao F., Xu X., Cui M., Wang S. Distinct cell responses to substrates consisting of poly(ε-caprolactone) and poly(propylene fumarate) in the presence or absence of cross-links // Biomacromolecules. – 2010. – V. 11. – № 10. – P. 2748-2759.

722. Wang L., Wang Z.H., Shen C.Y., You M.L., Xiao J.F., Chen G.Q. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells grown in terpolyesters of 3-hydroxyalkanoates scaffolds into nerve cells // Biomaterials. – 2010. – V. 31. – № 7. – P. 1691-1698.

723. 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. – V. 25. – № 4. – P. 669-675.

724. Wang Y., Wang X., Wei K., Zhao N., Zhang S., Chen J. Fabrication, characterization and long-term *in vitro* release of hydrophilic drug using PHBV/HA composite microspheres // Materials Letters. – 2007. – V. 61. – № 4. – P. 1071-1076.

725. Wang Y., Jiang X.L., Yang S.C., Lin X., He Y., Yan C., Wu L., Chen G.Q., Wang Z.Y., Wu Q. MicroRNAs in the regulation of interfacial behaviors of MSCs cultured on microgrooved surface pattern // Biomaterials. – 2011. – V. 32. – № 35. – P. 9207-9217.

726. Wang Y., Gao R., Wang P.P., Jian J., Jiang X.L., Yan C., Lin X., Wu L., Chen G.Q, Wu Q. The differential effects of aligned electrospun PHBHHx fibers on adipogenic and osteogenic potential of MSCs through the regulation of PPARγ signaling // Biomaterials. – 2012. – V. 33. – № 2. – 485-93.

727. Wang Y., Jiang X.L., Peng S.W., Guo X.Y., Shang G.G., Chen J.C., Wu Q., Chen G.Q. Induced apoptosis of osteoblasts proliferating on polyhydroxyalkanoates. Biomaterials, 2013, 34(15), 3737-3746, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.088.

728. Ward A.C., Rowley B.I., Dawes E.A. Effect of nitrogen and oxygen limitation on poly-β-hydroxybutyrate biosynthesis in ammonium-grown *Azotobacter beijerinkii* // J. Gen. Microbiol. – 1977. – V. 102. – P. 61-68.

729. Webb K., Hlady V., Tresco P.A. Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization // J. Biomed. Mater. Res. – 1998. – V. 41. – № 3. – P. 422-430.

730. Wei X., Hu Y.J., Xie W.P., Lin R.L., Chen G.Q. Influence of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) on growth and osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells // J. Biomed. Mater. Res A. – 2009. – V. 90. – № 3. – P. 894-905.

731. Weir N.A., Buchanan F.J., Orr J.F., Dickson G.R. Degradation of poly-L-lactide. Part 1: *in vitro* and *in vivo* physiological temperature degradation // Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine. – 2004. – V. 5. – № 218. – P. 307-319.

732. Weiss D.J., Bertoncello I., Borok Z., Kim C., Panoskaltsis-Mortari A., Reynolds S., Rojas M., Stripp B., Warburton D., Prockop D.J. Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases // Proc. Am. Thorac. Soc. – 2011. – V. 8. – № 3. – P. 223-272.

733. Whitaker J.R., Granum P.E. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm //Analytical biochemistry. – 1980. – V. 109. – № 1. – P. 156-159.

734. Wiesmann A., Bühring H.J., Mentrup C., Wiesmann H.P. Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation // Head & face medicine. – 2006. – V. 2. – № 1. – P. 1.

735. Wiggam M.I., O'Kane M.J., Harper R., Atkinson A.B., Hadden D.R., Trimble E.R., Bell P.M., Treatment of diabetic ketoacidosis using normalization of blood 3-hydroxy-butyrate concentration as the endpoint of emergency management // Diabetes Care. – 1997. – V. 20. – P. 1347-1352.

736. Wildemann B., Kadow-Romacker A., Haas N.P., Schmidmaier G. Quantification of various growth factors in different demineralized bone matrix preparations // Journal of biomedical materials research Part A. – 2007. – V. 81. – № 2. – P. 437-442.

737. Williams D.F. On the mechanisms of biocompatibility // Biomaterials. – 2008. – V. 29. – № 20. – P. 2941-2953.

738. Williams J.M., Adewunmi A., Schek R.M. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering // Biomaterials. – 2005. – V. 26. – № 23. – P. 4817-4827.

739. Witkowski A., Joshi A. K., Smith S. Characterization of the interthiol acyltransferase reaction catalyzed by the β-ketoacyl synthase domain of the animal fatty acid synthase // Biochemistry. – 1997. – V. 36. – № 51. – P. 16338-16344.

740. Wodzinska J., Snell K.D., Rhomberg A., Sinskey A.J., Biemann K., Stubbe J.Polyhydroxybutyrate synthase: evidence for covalent catalysis // Journal of the American Chemical Society. – 1996. – V. 118. – № 26. – P. 6319-6320.

741. Wright S.L., Kelly F.J. Plastic and Human Health: A Micro Issue? // Environ Sci. Technol. – 2017. – V. 51. – № 12. – P. 6634-6647.

742. Wrobel M., Zebrowski J., Szopa J. Polyhydroxybutyrate synthesis in transgenic flax // J. Biotechnol. – 2004. – V. 107. – № 1. – P. 41-54.

743. Wrobel-Kwiatkowska M., Zuk M., Szopa J., Dymińska L., Maczka M., Hanuza J. Poly-3-hydroxy butyric acid interaction with the transgenic flax fibers: FT-IR and Raman spectra of

the composite extracted from a GM flax // Spectrochim Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. – 2009. – V. 73. – № 2. – 286-294.

744. Wu A.C., Grøndahl L., Jack K.S., Foo M.X., Trau M., Hume D.A., Cassady A.I. Reduction of the in vitro pro-inflammatory response by macrophages to poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) // Biomaterials. – 2006. – V. 27. – № 27. – P. 4715-4725.

745. Wu L., Zhang H., Zhang J., Ding J. Fabrication of three-dimensional porous scaffolds of complicated shape for tissue engineering. I. Compression molding based on flexible-rigid combined mold // Tissue engineering. – 2005. – V. 11. – № 7-8. – P. 1105-1114.

746. Xian M., Fuerst M.M., Shabalin Y., Reusch R.N. Sorting signal of *Escherichia coli* OmpA is modified by oligo-(R)-3-hydroxybutyrate // Biochim. Biophys. Acta. – 2007. – V. 1768. – № 11. – P. 2660-2666.

747. Xiao R.Z., Zeng Z.W., Zhou G.L., Wang J.J., Li F.Z., Wang A.M. Recent advances in PEG-PLA block copolymer nanoparticles // Int. J. Nanomedicine. – 2010. – V. 26. – № 5. – 1057-1065.

748. Xiong Y.C., Yao Y.C., Zhan X.Y., Chen G.Q. Application of polyhydroxyalkanoates nanoparticles as intracellular sustained drug-release vectors // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. – 2010. – V. 21. – № 1. – P. 127-140.

749. Xu J., Guo B.H., Zhang Z.M., Zhou J.J., Jiang Y., Yan S., Li L., Wu Q., Chen G.Q., Schultz J.M. Direct AFM observation of crystal twisting and organization in banded spherulites of chiral poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) // Macromolecules. – 2004. – V. 11. – № 37. – P. 4118-4123.

750. Yagi H., Soto-Gutierrez A., Kitagawa Y., Tilles A.W., Tompkins R.G., Yarmush M.L. Bone marrow mesenchymal stromal cells attenuate organ injury induced by LPS and burn // Cell Transplant. – 2010. – V. 19. – № 6–7. – P. 823-830.

751. Yagmurlu M.F., Korkusuz F., Gursel I., Korkusuz P., Ors U., Hasirci V. Sulbactam-cefoperazone polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV) local antibiotic delivery system: *In vivo* effectiveness and biocompatibility in the treatment of implantrelated experimental osteomyelitis // J. Biomed. Mater. Res. – 1999. – V. 46. – P. 494-503.

752. Yamashita K., Funato T., Suzuki Y., Teramachi S., Doi Y. Characteristic Interactions between Poly(hydroxybutyrate) Depolymerase and Poly((R)-3-hydroxybutyrate) Film Studied by a Quartz Crystal Microbalance // Macromolecular Bioscience. – 2003. – V. 11. – № 3. – P. 694-702.

753. Yamazaki Y., Meirelles P.M., Mino S., Suda W., Oshima K., Hattori M., Thompson F.L., Sakai Y., Sawabe T., Sawabe T. Individual Apostichopus japonicus fecal microbiome reveals a link

with polyhydroxybutyrate producers in host growth gaps // Sci. Rep. – 2016. – V. 6. – P. 21631.

754. Yamazaki M., Ito T. Deformation and instability in membrane structure of phospholipid vesicles caused by osmophobic association: mechanical stress model for the mechanism of poly(ethylene glycol)-induced membrane fusion // Biochemistry. – 1990. – V. 29. – P. 1309-1314.

755. Yang C., Plackett D., Needham D., Burt H.M. PLGA and PHBV microsphere formulations and solid-state characterization: possible implications for local delivery of fusidic acid for the treatment and prevention of orthopaedic infections // Pharm. Res. – 2009. – V. 26. – № 7. – P. 1644-1656.

756. Yang M., Zhu S., Chen Y., Chang Z., Chen G., Gong Y., Zhao N., Zhang X. Studies on bone marrow stromal cells affinity of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) // Biomaterials. – 2004. – V. 25. – № 7-8. – P. 1365-1373.

757. Yang X., Zhao K., Chen G.-Q. Effect of surface treatment on the biocompatibility of microbial polyhydroxyalkanoates // Biomaterials. – 2002. – V. 5. – № 23. – P. 1391-1397.

758. Yang X.D., Zou X.H., Dai Z.W., Luo R.C., Wei C.J., Chen G.Q. Effects of oligo(3-hydroxyalkanoates) on the viability and insulin secretion of murine beta cells // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. – 2009. – V. 20. – № 12. – P. 1729-1746.

759. Yilgor P., Tuzlakoglu K., Reis R.L., Hasirci N., Hasirci V. Incorporation of a sequential BMP-2/BMP-7 delivery system into chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering // Biomaterials. – 2009. – V. 30. – № 21. – P. 3551-3559.

760. Yilgor P., Hasirci N., Hasirci V. Sequential BMP-2/BMP-7 delivery from polyester nanocapsules // J. Biomed. Mater. Res. A. – 2010. – V. 93. – № 2. – P. 528-536.

761. Yoon J.S., Oh S.H., Kim M.N. Compatibility of poly (3-hydroxybutyrate)/poly (ethylene-co-vinyl acetate) blends // Polymer. – 1998. – V. 39. – № 12. – P. 2479-2487.

762. Yoshikawa T., Ohgushi H., Tamai S. Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite // Journal of biomedical materials research. – 1996. – V. 32. – № 3. – P. 481-492.

763. Yu G., Marchessault R.H. Characterization of low molecular weight poly (β-hydroxybutyrate) s from alkaline and acid hydrolysis // Polymer. – 2000. – V. 41. – № 3. – P. 1087-1098.

764. Yu J., Wang Y., Qian H., Zhao Y., Liu B., Fu C. Polyprenols from the needles of Taxus chinensis var. mairei // Fitoterapia. – 2012. – V. 83. – № 5. – P. 831-837.

765. Yu W., Li R., Long J., Chen P., Hou A., Li L., Sun X., Zheng G., Meng H., Wang Y., Wang A., Sui X., Guo Q., Tao S., Peng J., Qin L., Lu S., Lai Y. Use of a three-dimensional printed

polylactide-coglycolide/tricalcium phosphate composite scaffold incorporating magnesium powder to enhance bone defect repair in rabbits // J. Orthop. Transl. – 2019. – V. 16. – P. 62-70.

766. Zakharian E., Thyagarajan B., French R.J., Pavlov E., Rohacs T. Inorganic polyphosphate modulates TRPM8 channels // PLoS One. – 2009. – V. 4. – № 4. – P. e5404.

767. Zanzig J., Marimuthu B., Werka J., Scholz C. Investigation of the impact of poly(ethylene glycol)-modulation of poly(β-hydroxybutyrate) syntheses on cell interactions of the resulting polymers // Journal of bioactive and compatible polymers. – 2003. – V. 18. – № 5. – P. 339-354.

768. Zevenhuisen L.P. Cellular glycogen, β-1,2-glucan, poly-β-hydroxybutyric acid and extracellular polysaccharides in fast-growing species of Rhisobium // Antonie van Leeuwenhoek. – 1981. – V. 47. – P. 481-497.

769. Zhang C, Dong Y, Zhao L. Preparation and characterization of novel microparticles based on poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyoctanoate) // J. Microencapsul. – 2014. – V. 31. – № 1. – P. 9-15.

770. Zhang G., Fang X., Guo X., Li L., Luo R., Xu F., Yang P., Zhang L., Wang X., Qi H., Xiong Z., Que H., Xie Y., Holland P.W., at al. … Wang J. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation // Nature. – 2012. – V. 490. – № 7418. – P. 49-54.

771. Zhang J., Cao Q., Li S., Lu X., Zhao Y., Guan J.S., Chen J.C., Wu Q., Chen G.Q. 3-Hydroxybutyrate methyl ester as a potential drug against Alzheimer's disease via mitochondria protection mechanism // Biomaterials. – 2013. – V. 34. – № 30. – P. 7552-7562.

772. Zhang M., Thomas N.L. Blending polylactic acid with polyhydroxybutyrate: The effect on thermal, mechanical, and biodegradation properties // Advances in Polymer Technology. – 2011. – V. 2. – № 30. – P. 67-79.

773. Zhang N., Gao T., Wang Y., Wang Z., Zhang P., Liu J. Environmental pH-controlled loading and release of protein on mesoporous hydroxyapatite nanoparticles for bone tissue engineering // Materials Science and Engineering: C. – 2015. – V. 46. – P. 158-165.

774. Zhang S., Prabhakaran M.P., Qin X., Ramakrishna S. 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. – V. 29. – № 10. – P. 1394-1406.

775. Zhang Y., Fan W., Ma Z., Wu C., Fang W., Liu G., Xiao Y. The effects of pore architecture in silk fibroin scaffolds on the growth and differentiation of mesenchymal stem cells expressing BMP7 // Acta Biomater. – 2010. – V. 6. – № 8. – P. 3021-3028.

776. Zhang Y, Chan HF, Leong KW. Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future // Adv. Drug. Deliv. Rev. – 2013. – V. 65. – № 1. – P. 104-120.

777. Zhao K., Yang X., Chen G.Q., Chen J.C. Effect of lipase treatment on the biocompatibility of microbial polyhydroxyalkanoates // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2002. – V. 9. – № 13. – P. 849-854.

778. Zhao Y., Zou B., Shi Z., Wu Q., Chen G.Q. The effect of 3-hydroxybutyrate on the *in vitro* differentiation of murine osteoblast MC3T3-E1 and *in vivo* bone formation in ovariectomized rats // Biomaterials. – 2007. – V. 28. – № 20. – P. 3063-3073.

779. Zheng Z., Bei F.F., Tian H.L., Chen G.Q. Effects of crystallization of polyhydroxyalkanoate blend on surface physicochemical properties and interactions with rabbit articular cartilage chondrocytes // Biomaterials. – 2005. – V. 26. – № 17. – P. 3537-3548.

780. Zhou Y. S., Liu Y. S., Tan J. G. Is 1,25-dihydroxyvitamin D3 an ideal substitute for dexamethasone for inducing osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells *in vitro*? // Chinese medical journal. – 2006. – V. 119. – № 15. – P. 1278-1286.

781. Zhou Y., Chen F., Ho S.T., Woodruff M.A., Lim T.M., Hutmacher D.W. Combined marrow stromal cell-sheet techniques and high-strength biodegradable composite scaffolds for engineered functional bone grafts // Biomaterials. – 2007. – V. 28. – № 5. – P. 814-824.

782. Zhou H., Lee J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering // Acta biomaterialia. – 2011. – V. 7. – № 7. – P. 2769-2781.

783. Zhu H., Ji J., Lin R., Gao C., Feng L., Shen J. Surface engineering of poly(dl-lactic acid) by entrapment of alginate-amino acid derivatives for promotion of chondrogenesis // Biomaterials. – 2002. – V. 23. – P. 3141-3148,

784. Zhu H., Yang F., Tang B., Li X.M., Chu Y.N., Liu Y.L., Wang S.G., Wu D.C., Zhang Y. Mesenchymal stem cells attenuated PLGA-induced inflammatory responses by inhibiting host DC maturation and function // Biomaterials. – 2015. – V. 53. – P. 688-698.

785. Zhu X.H., Wang C.H., Tong Y.W. *In vitro* characterization of hepatocyte growth factor release from PHBV/PLGA microsphere scaffold // J. Biomed. Mater. Res. A. – 2009. – V. 89. – № 2. – P. 411-423.

786. Zhuikov V.A., Bonartsev A.P., Bagrov D.V., Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Makhina T.K., Bessonov I.V., Kopitsyna M.N., Morozov A.S., Rusakov A.A., Useinov A.S., Shaitan K.V., Bonartseva G.A. Mechanics and surface ultrastructure changes of poly(3-hydroxybutyrate) films during enzymatic degradation in pancreatic lipase solution // Molecular Crystals and Liquid Crystals. – 2017. – V. 648. – № 1. – P. 236-243.

787. Zhuikov V., Bonartsev A., Bagrov D., Rusakov A., Useinov A., Myshkina V., Mahina T., Shaitan K., Bonartseva G. The changes in surface morphology and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymer films during *in vitro* degradation // Solid State Phenomena. – 2017. – V. 258. – P. 354-357. (б)

788. Zhuikov V.A., Bonartsev A.P., Zharkova I. I., Bykova G.S., Taraskin N.Y., Kireynov A.V., Kopitsyna M.N., Bagrov D.V., Bonartseva G.A., Shaitan K.V. Effect of poly(ethylene glycol) on the ultrastructure and physicochemical properties of the poly(3-hydroxybutyrate) // Macromolecular Symposia. – 2017. – V. 375. – P. 1600189. (в)

789. Zhuikov V.A., Zhuikova Y.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Rusakov A., Useinov A., Voinova V.V., Bonartseva G.A., Berlin A.A., Bonartsev A.P., Iordanskii A.L. Comparative structure-property characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)s films under hydrolytic and enzymatic degradation: finding a transition point in 3-hydroxyvalerate content // Polymers (Basel). – 2020. – V. 12. – № 3. – P. E728.

790. Zhuikov V.A., Akoulina E.A., Chesnokova D.V., Wenhao Y., Makhina T.K., Demyanova I.V., Zhuikova Y.V., Voinova V.V., Belishev N.V., Surmenev R.A., Surmeneva M.A., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Bonartsev A.P. The growth of 3T3 fibroblasts on PHB, PLA and PHB/PLA blend films at different stages of their biodegradation *in vitro* // Polymers. – 2021. – V. 13. – P. 108.

791. Zou X.H., Li H.M., Wang S., Leski M., Yao Y.C., Yang X.D., Huang Q.J., Chen G.Q. The effect of 3-hydroxybutyrate methyl ester on learning and memory in mice // Biomaterials. – 2009. – V. 30. – № 8. – 1532-1541.