

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель магистерской
программы

_____ Волова Т.Г.
подпись Инициалы, фамилия
« _____ » _____ 2019г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

06.04.01.09 - Фундаментальная и прикладная биология

**БИОАКТИВНЫЙ КОМПОЗИЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ ПГА
ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ В СТОМАТОЛОГИИ**

Руководитель

подпись, дата

д.б.н. профессор
Т.Г. Волова

Соруководитель

подпись, дата

к.б.н. А.А. Шумилова

Выпускник _____

номер группы, зачетной книжки _____
подпись, дата

А.А. Федченко

Рецензент

подпись, дата

д.м.н. профессор
Н.М. Маркелова

Красноярск 2019

Аннотация

В настоящее время существует необходимость поиска оптимальных материалов для восстановления костных дефектов в стоматологии. Важно, чтобы такие материалы могли полностью заполнить дефект, несмотря на его определенные форму и объем, и в то же время не препятствовать восстановлению костной ткани, а в некоторых случаях обладать и остеоиндукционными свойствами. Полигидроксиалканоаты – полиэфиры алкановых кислот микробиологического происхождения, благодаря своим хорошим физико-химическим свойствам, являются хорошими кандидатами в качестве основы для биоактивного композиционного материала. В работе были сконструированы изделия разной геометрии: пломбирочная крошка, гранулы, микро- и макрочастицы. В зависимости от используемого метода получения биоактивные материалы обладали разным набором характеристик (размер, форма, пористость).

Для получения гранул использовали метод осаждения полимера из раствора с использованием и без порообразователей. Микро- и макрочастицы получали эмульсионным методом. Было установлено, что изменение концентрации полимерного раствора и включение в него гидроксиапатита оказывают влияние на диаметр частиц, что в свою очередь влияет на их свойства.

МТТ-тестом и окрашиванием DAPI была подтверждена биосовместимость изделий. Антибактериальную активность проверяли и засвидетельствовали с помощью диско-диффузионного метода в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* и грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*.

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Биоактивный композиционный материал на основе ПГА для замещения костных дефектов в стоматологии» содержит 65 страниц текстового документа, 21 иллюстрация, 3 таблицы, 56 использованных источников.

ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЫ (ПГА), ПОЛИМЕРНАЯ КРОШКА, ГРАНУЛЫ, МИКРОЧАСТИЦЫ, МАКРОЧАСТИЦЫ, БИОСОВМЕСТИМОСТЬ, АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ.

Цель диссертационной работы: получение и исследование характеристик биоактивного композиционного материала на основе ПГА в виде пломбировочной крошки, гранул, микро- и макрочастиц.

Задачи исследования:

1. Синтезировать образцы ПГА различного химического состава.
2. Получить и исследовать пломбировочную крошку на основе гомополимера в композиции с антибактериальным препаратом.
3. Методом осаждения растворителя получить пористые гранулы и исследовать их характеристики.
4. Эмульсионным методом получить микро- и макрочастицы из растворов ПГА с гидроксиапатитом и лекарственными препаратами, изучить их характеристики.
5. Исследовать выход лекарственных препаратов *in vitro* из полученных форм и их биологические свойства в культуре клеток МСК и патогенных микроорганизмов.

Актуальность диссертационной работы в том, что в зависимости от используемого метода можно сконструировать биоактивные композиционные материалы различной формы, размера и с разными характеристиками, что позволяет расширить спектр изделий для применения в стоматологии.

ABSTRACT

The master's thesis on the topic « Bioactive composite material based on PHA for replacement of bone defects in dentistry » contains 65 pages of a text document, 21 illustrations, 3 tables, 56 sources used.

POLYHYDROXYALKANOATES (PHA), POLYMER CRUMB, GRANULES, MICROPARTICLES, PARTICULATES, BIOSCOMPATIBILITY, ANTIBACTERIAL ACTIVITY.

The purpose of the thesis: to obtain and study the characteristics of a bioactive composite material based on PHA in the form of filling chips, granules, micro- and particulates.

Objectives of the study:

1. Synthesize PHA samples of different chemical composition.
2. Obtain and investigate a crumb based on homopolymer in combination with an antibacterial drug.
3. Using a solvent deposition method, obtain porous granules and investigate their characteristics.
4. Using the emulsion method, obtain micro- and particulates from PHA solutions with hydroxyapatite and drugs, and study their characteristics.
5. To investigate the yield of drugs in vitro from the obtained forms and their biological properties in the cell culture of MSCs and pathogenic microorganisms.

The relevance of the thesis is that, depending on the method used, bioactive composite materials of various shapes, sizes and characteristics can be constructed, which allows expanding the range of products for use in dentistry.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Остеопластические материалы в стоматологии.....	10
1.2 Биоразрушаемые полимеры как основа пломбировочных материалов.....	15
1.3 Полимерные микро- и макрочастицы в стоматологии.....	20
1.4 ПГА для восстановления костной ткани.....	23
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	28
2.1 Материалы исследования.....	28
2.2 Синтез и выделение ПГА.....	28
2.2.1 Определение состава образцов ПГА.....	29
2.3 Методы получения полимерных биоактивных материалов.....	29
2.3.1. Метод получения пломбировочного материала.....	29
2.3.2 Метод получения гранул.....	29
2.3.3 Метод получения микро- и макрочастиц.....	30
2.4 Методы исследования полимерных биоактивных материалов.....	30
2.4.1 Изучение влагопоглощения и суммарной пористости.....	30
2.4.2 Электронная микроскопия.....	31
2.4.3 Электрокинетический потенциал (дзета-потенциал).....	31
2.4.4 Дегградация полимерных биоактивных материалов.....	32
2.4.5 Выход лекарственного препарата.....	32
2.4.6 Исследования антибактериальной активности макрочастиц <i>in vitro</i>	32
2.5 Исследование биосовместимости <i>in vitro</i>	33
2.5.1 Инкубация в плазме.....	33
2.5.2 Исследование биосовместимости <i>in vitro</i> в культуре МСК.....	34
2.5.3 Засев клетками и МТТ.....	34
2.5.4 Прижизненная окраска DAPI.....	35

2.5.5 Статистическая обработка результатов	35
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	36
3.1 Синтез образцов ПГА, использованных для конструирования биоактивного композиционного материала.....	36
3.2 Пломбировочный материал.....	37
3.3 Характеристика гранул.....	37
3.3.1 Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ).....	Ошибка! Закладка не определена.
3.3.2 Измерение влагопоглощения гранул и суммарной пористости	40
3.3.3 Исследование биосовместимости гранул in vitro.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.4 Характеристика микро- и макрочастиц.....	42
3.4.1 Сканирующая электронная микроскопия	Ошибка! Закладка не определена.
3.4.2 Деградация микро- и макрочастиц	Ошибка! Закладка не определена.
3.4.3 Выход лекарственного препарата.....	45
3.4.4 Эффективность бактерицидного действия гранул in vitro	Ошибка! Закладка не определена.
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	46
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	48

ВВЕДЕНИЕ

Проблема восстановления дефектов костной ткани разной геометрии в стоматологии, образующихся при хирургическом лечении ряда заболеваний и механических повреждений кости является актуальной проблемой для медицины [1].

На сегодняшний день для замещения костных дефектов и восстановления костного объема в хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии широко используют остеопластические материалы. Данные биоматериалы, в зависимости от индуктивного потенциала, можно разделить на следующие категории: остеоиндуктивные (аутокость), остеокондуктивные (алло- или ксеноматериал), остеонейтральные (металлические винты и пластины) и материалы, обеспечивающие направленную тканевую регенерацию (коллаген, полимерные пластины). Безусловно, наиболее эффективными биоматериалами являются аутооттрансплантаты, так как они органотопичны. Однако они обладают достаточно весомыми недостатками, такими как риск резорбции, ограниченность в объеме и нанесение дополнительной травмы при заборе необходимого пластического материала, трудоемкий процесс консервирования, а также возможность биологической несовместимости тканей донора и реципиента [2].

Перед реконструктивно-восстановительной операцией, чтобы не совершить ошибку в выборе костно-пластического материала, важной и необходимой задачей является оценка размера дефекта кости [3]. Предпочтительнее использовать сыпучий материал в виде пломбирочной крошки, микро- и макрочастиц, гранул который может заполнить дефект, определенной формы и объема, и в то же время не препятствовать восстановлению костной ткани.

В связи с этим необходимо получение такого материала, который одновременно был бы направлен на обезвреживание микроорганизмов в костном дефекте и на формировании новой костной ткани. Для решения поставленной задачи был сделан выбор в пользу разработки композиционных материалов, в основе которых лежат полимеры, способные оптимально выполнять свои функции в живом организме, при этом, не нанося вреда. При внедрении этого материала в рану, атрофированная ткань должна полностью восстанавливаться, по мере его резорбции, должна отсутствовать аллергическая реакция, влекущая за собой отторжение полимера. Помимо всего прочего материал должен обладать такими характеристиками, как пористость, прочность и эластичность [4].

Одним из наиболее перспективных полимеров, обладающих перечнем необходимых свойств, являются полигидроксиалканоаты (ПГА). Несмотря на большое количество работ, посвященных применению полимеров в стоматологии, работы по ПГА немногочисленны. В основном в данных работах используют микро- и наночастицы, однако при заполнении более крупных дефектов кости предпочтительнее макрочастицы и гранулы [5,6]. Что и стало целью данной работы.

Цель работы – получение и исследование характеристик биоактивного композиционного материала на основе ПГА в виде пломбировочной крошки, гранул, микро- и макрочастиц.

Исходя из поставленной цели, были сформулированы следующие задачи:

1. Синтезировать образцы ПГА различного химического состава.
2. Получить и исследовать пломбировочную крошку на основе гомополимера в композиции с антибактериальным препаратом.
3. Методом осаждения растворителя получить пористые гранулы и исследовать их характеристики.

4. Эмульсионным методом получить микро- и макрочастицы из растворов ПГА с гидроксиапатитом и лекарственными препаратами, изучить их характеристики.

5. Исследовать выход лекарственных препаратов *in vitro* из полученных форм и их биологические свойства в культуре клеток МСК и патогенных микроорганизмов.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Остеопластические материалы в стоматологии

В настоящий момент врачи-стоматологи и челюстно-лицевые хирурги в клинической практике все чаще сталкиваются с необходимостью замещения разнообразных костных дефектов у различных групп пациентов, что связано с ростом травм; развитием имплантологии (в 1/3 случаев операций имплантации необходим дополнительный костный материал); патологической резорбцией костной ткани на поздних стадиях пародонтита и пародонтоза; внедрением в практику новых методик лечения; естественной потребностью в ней при реконструкции альвеолярного отростка [7].

Современная челюстно-лицевая хирургия предполагает использование традиционных материалов для остеопластики, в случае наличия у пациента костных дефектов. Такие материалы служат матрицей для замещения и восстановления костной ткани, и в зависимости от происхождения подразделяются на четыре основные группы:

- аутогенные (пациент сам для себя донор);
- аллогенные (в качестве донора может выступать любой другой здоровый человек);
- ксеногенные (в качестве донора выступает здоровое животное)
- аллопластические (синтетический материал) [7, 8].

Такое разнообразие материалов приводит в отдельных случаях к непростому выбору врачей. Каждая группа остеопластических материалов обладает как плюсами, так и минусами [7].

На протяжении значительно долгого времени в качестве золотого стандарта трансплантации кости было принято считать аутооттрансплантат. Причиной тому являлись положительные характеристики материала, благодаря ему обеспечивались необходимые трехмерные структуры, физиологическая механика. При этом показатель успешности проведенных

операций достигал 80-90%. В аутокости не присутствуют антигены, и потому вероятность аллергии практически отсутствует. Несмотря на большое количество плюсов, данный материал не идеален и имеет свои недостатки: место локализации донорской кости и ее количество ограничены, при заборе аутокости необходима дополнительная операция, которая часто приводит к высокому осложнению – от 8,6 до 20,6% (повреждением сосудов и нервов, гематомы, занесение инфекции) [8]. К тому же после проведенной операции по пересадке аутокости, большая ее часть разрушается до наступления момента восстановления. [9, 10].

В качестве альтернативы аутокости, могут выступать аллотрансплантаты. Данные материалы подразделяются на три вида в зависимости от способа предварительной химической обработки: нативный, деминерализованный и депротеинизированный. В первом случае материал обладает костной структурой, в которой сохраняются соотношения следующих компонентов: органический и минеральный. Во втором и третьем случаях присутствует только один компонент, соответственно, деминерализованный включает органический, а депротеинизированный - минеральный. Аллокость медленнее интегрируется в костную ткань и хорошо стимулирует остеогенез, в отличие от аутокости, однако количество ее недостатков не позволяет считать данный материал более перспективным. Аллергия, связанные с пересадкой осложнения, такие как развитие инфекции и реакция гистонесовместимости, дороговизна и низкая доступность – все это указывает на рентабельность данного материала [8,10].

Некоторые проблемы этического и юридического характера, а также широкий доступ к тканям животных, способствовали внедрению в качестве костно-пластических материалов такой альтернативы, как ксенокость. Основными источниками для изготовления ксенотрансплантатов выступают природный коралл и бычья кость [8]. Данные источники вызывают интерес в разных отделах медицины: травматология, ортопедии и стоматология.

Ксенотрансплантат из бычьей кости по структуре очень напоминает человеческую кость, он легкодоступен, его хранения не вызывает трудностей и самое главное данный материал может служить матрицей для новообразования костной ткани. Несмотря на все положительные характеристики, ксеногенная кость, как и аллотрансплантаты может приводить к аллергической реакции, нести в себе различные инфекции бактериальной или вирусной этиологии, что также не дает в полной мере гарантии полного выздоровления пациента [7].

Синтетическая кость обладает теми же положительными характеристиками, что и ксеногенная. Однако она не вызывает аллергию, риск инфицирования реципиента отсутствует, к тому же такая кость более переменчива при использовании. Главным минусом синтетических материалов является отсутствие у них свойств остеоиндукции [9,11]. Данный термин отображает способность привлекать мезенхимальные клетки из расположенных рядом некостных тканей и направлять их дифференцировку в остеобразующие (хондроциты и остеобласты). При этом возникают такие процессы как цементогенез и рост периодонтальной связки [12].

Материалы также могут проявлять и остеокондуктивные свойства. Остеокондуктивные материалы являются пассивным матриксом для новой кости. Они способствуют пролиферации и дифференцировке недифференцированных клеток в остеобласты, активность остеобластических клеток окружающей кости значительно возрастает. В результате метаболических взаимодействий остеокондуктивные материалы резорбируются и вызывают интенсивное образование новой костной ткани. [13, 14, 15].

На протяжении последних 30 лет в клиническую стоматологическую практику было внедрено большое количество различных синтетических костозамещающих материалов [16]. К наиболее перспективным материалам относят биокерамики. Биокерамики – биосовместимые керамические

материалы. Они обладают промежуточными свойствами между металлическими и неметаллическими материалами. Из преимуществ данного материала выделяют высокую точку плавления, высокие прочность, химическая стабильность и плотность. Материалы этого типа могут варьировать по многим параметрам: биомеханическим, адгезионности, биологической активности (остеокондуктивность, остеоиндуктивность) [16]. Наиболее известной керамикой является гидроксипатит, который составляет от 30 до 70% биоapatитов костной ткани и зубов [17]. Препараты синтетического гидроксипатита известны с конца 60-х годов, при этом их исследования в области технологии и синтеза проводятся до сих пор. Гидроксипатит – совершенный аналог минерального вещества кости млекопитающих, что подтверждает наличие у него следующих свойств: абсолютная иммунная совместимость и биоактивность. Усредненный состав гидроксипатита обычно изображается как $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ [8]. В исследовании, проводившемся на тканевом материале от пациентов со злокачественными опухолями челюстно-лицевой области с помощью иммуногистохимических и количественных методов, было обнаружено, что синтетический гидроксипатит эффективен для стимуляции остеогенеза [18].

Таким образом, синтетические материалы обладают рядом преимуществ по сравнению с остальными заменителями кости. Их считают ведущими материалами для замещения различных костных дефектов в будущем, успешное применение данных биоматериалов в мире растет, а сферы их использования расширяются [7]. На данный момент уже имеется определенный клинический опыт в применении имплантатов-заменителей, и это позволяет предъявить необходимые требования к ним: 1) заполнение костного дефекта на определенный период времени; 2) отсутствие иммунологического отторжения; 3) резорбция с постепенным замещением новообразованной костью [19]. Также имплантаты-заменители должны обладать такими свойствами, как биосовместимость, биодеградация,

пористость, возможность стерилизации без весомых изменений качеств, доступность и удобство в применении [20].

Разработка остеопластических материалов ведется на протяжении долгого времени и в разных направлениях. Начало было положено с применения аутокостных трансплантатов, затем поиск таких костьзамещающих материалов, которые бы не обладали токсичностью и позволяли бы предупредить риск развития осложнений. Сегодня наряду с биокерамиками, обладающими остеокондуктивными свойствами, существуют синтетические материалы, которые обладают остеоиндуктивными свойствами и вызывают образование новой кости.

Однако широкий круг применяемых в медицине природных (аллогенных и ксеногенных) и синтетических материалов (препараты на основе коллагена, гидроксиапатита, керамика и другие), не снимает актуальности проблемы, так как пока не разработан материал, отвечающий всем необходимым требованиям, предъявляемым к материалам для регенерации дефектов костной ткани [1].

1.2 Биоразрушаемые полимеры как основа пломбировочных материалов

В последние годы непрерывно растет интерес к биodeградируемым полимерам природного биологического происхождения – полисахариды и их производные (альгинаты, целлюлоза, хитозан, гепарин, гиалуроновая кислота), белки (коллаген, фибрин, фибронектин) и синтетического – полиамиды, полигликолиды, полилактиды (ПЛК) [21, 22]. Биоразлагаемые полимеры относятся к классу высокомолекулярных соединений, которые в своем составе содержат продукты жизнедеятельности биологических организмов, такие как белок, целлюлоза, крахмал, природная смола и другие [23]. При соответствующих условиях биополимеры способны разлагаться на нейтральные для окружающей среды компоненты [24].

Разработка биосовместимых и биоразрушаемых в биологических средах материалов является остро стоящей и сложной задачей. Так как такие материалы и изделия из них, предназначенные для временного действия, необходимы для восполнения дефектов тканей и органов с последующим замещением биологическими структурами в строго заданные сроки [22]

К одним из наиболее перспективных биоразлагаемых материалов относят алифатические полиэфиры – полилактиды [23]. Полилактид – полимер молочной кислоты, атомы углерода которого, за счет асимметричной расположенности могут приводить к образованию лактидов или, по-другому, циклических димеров [25].

ПЛК получают методами поликонденсации молочной кислоты или полимеризации лактида; в качестве сырья могут выступать рис, кукуруза, сахарный тростник [23]. Мономер молочной кислоты имеют следующую особенность: он может существовать в двух стереохимических формах.

За счет этого полилактиды можно получать в четырех морфологически различных формах: стереорегулярные полимеры D и L формы, поли(мезо-

лактиды) и полимеризованную смесь D и L-молочных кислот. При производстве ПЛК важно учитывать степень кристалличности данного полимера, так как от этого будет зависеть скорость разложения этих соединений и воды. В клинической практике данный критерий оказывает влияние на биорезорбцию соединения в живом организме [25].

Полилактиды нашли широкое применение в биомедицине и фармацевтике, за счет своей способности к постепенному биологическому разложению в организме. Матрица из ПЛК может служить для лекарственных препаратов в качестве адресной доставки, как временная защита от слишком быстрого расщепления ферментами и пептидами, а также как контроль скорости выхода активных молекул. Все это оказывает влияние на срок терапевтического воздействия, а именно значительное его увеличение. Для этого лекарственный препарат инкапсулируют в полимерный носитель и вводят в организм перорально или с помощью инъекций [25, 26].

В тканевой инженерии для получения высокогидрофильных, иммунологически инертных и биосовместимых гидрогелей часто используют полимеры альгиновой кислоты с добавлением ионов кальция. Данный полимер является природным линейным полисахаридом, полученным из морских водорослей и принадлежащим к семейству маннуроновой и гиалуриноновой кислот. Коммерческие альгинаты (АЛГ) производятся в основном из водорослей *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera* и *Ascophyllum nodosum*, при этом наиболее высокое содержание α -D-гиалуриноновой кислоты обычно характерно для АЛГ, изготовленных из *L. Hyperborea* [27].

Альгинаты используются как материал для получения зубных слепков [28]. Химически модифицированные альгинаты с высоким содержанием гиалуриноновой кислоты часто используют в качестве матрикса для депонирования и доставки алло-, ксено- и генетически модифицированных

клеток и тканей, лекарственных препаратов. Альгинаты также используют в качестве ранозаживляющего материала, в виде пленок и волокон используют для обработки ран и ожогов [29, 30]. К недостаткам данного материала можно отнести его неспособность резорбироваться естественным образом под действием ферментов, так как альгинат не имеет лиганд для клеточной адгезии [31].

Коллаген получил широкое распространение после признания его способности стимулировать регенерацию костной ткани [32]. Коллаген – природный полимерный материал, полученный из сухожилий, хрящей, связок, костной ткани, кожи. Этот фибриллярный белок является одним из основных компонентов тканей: костной, хрящевой и соединительной. Молекула коллагена имеет стержневидную форму и состоит из трех α -цепей, которые формируют правозакрученную тройную спираль [33].

Основными достоинствами коллагена как пластического биоматериала являются низкая токсичность и антигенность [34]. Однако для восстановления крупных и долго восстанавливающихся костных дефектов коллаген является не подходящим материалом, так как имеет относительно низкие прочностные характеристики и достаточно быструю биорезорбцию в организме. Для значительного повышения механической прочности и свойств материалов, имплантируемых в организм, была выбрана альтернатива, в качестве которой выступали композиты коллагена с керамиками и синтетическими полимерами (полиэтиленом, поливиниловым спиртом). В стоматологии для восстановления дефектов костной ткани используют композиты коллагена и гидроксиапатита [21].

Белки группы фибрина представляют особый интерес для медицины. Фибрин – это мономер, который участвует в процессе тромбообразования. Он образуется под действием фермента тромбина при отщеплении от гликопротеина крови фибриногена двух низкомолекулярных пептидов. Фибрин может быть использован в виде

фибрин-полимерного сгустка для покрытия пораженных участков кожного покрова, а также в составе пломбирующей крошки для заполнения дефектов костей [21].

Из натурального полимера коллагена, который является основным компонентом кожи, костей и соединительной ткани, можно получить такой материал, как желатин. Желатин, как и другие биоматериалы обладает рядом свойств, которые позволяют использовать его в медицине: биосовместимость, биоразлагаемость и биобезопасность. Желатин задействован в фармацевтических препаратах, раневых повязках и клеях. При этом данный материал имеет высокое содержание аминокислот (глицин, пролин и оксипролин), что способствует ускорению заживления мягких тканей [35].

Помимо всего прочего желатин используется в качестве носителя лекарственных препаратов. Он поглощает раствор препарата, за счет своей гидрофильности, и после контакта формирует гидрогель. Свободный гель матрицы способен связывать молекулы препарата и впоследствии контролировать высвобождение лекарственного средства посредством диффузии или контролируемого механизма деградации [35].

Способностью к биоразложению обладает хитозан. Помимо этого полимер обладает такими положительными качествами, как безвредность для пищевых продуктов, хорошие химические и физические свойства [36]. Хитозан по химической структуре относят к классу полисахаридов. Мономером хитина является N-ацетил-1,4-β-Д-глюкопиранозамин [37]. Хитозан обладает длинным перечнем положительных качеств: высокие сорбционные свойства, нетоксичность, ранозаживляющее действие, антикоагулянтная, антитромбогенная, бактерицидная и противоопухолевая способность. Он имеет способность угнетать секрецию соляной кислоты, связывать соли тяжелых металлов и снижать уровень холестерина в крови [38].

Хитозан часто используют для получения пленок, гелей и трехмерных каркасов, используемых в тканевой инженерии. Трехмерные каркасы на основе хитозана нашли широкое применение в ортопедии и стоматологии.

Наиболее перспективными в медицине являются полимеры, синтезируемые микроорганизмами - полигидроксиалканоаты. Они относятся к классу сложных полиэфиров, природного происхождения. В их состав входят более 100 различных мономеров, что делает их крупнейшей группой полимеров [39]. ПГА обладают многими свойствами, которые являются привлекательными для биомедицины. К ним относятся такие, как высокая эластичность, прочность, термопластичность, также они обладают высокой степенью биосовместимости [40].

1.3 Полимерные микро- и макрочастицы в стоматологии

В настоящее время нано-, микро- и макрочастицы могут быть сконструированы из множества природных или синтетических материалов различными способами. В качестве синтетических материалов используются полиуретаны, поливинилхлорид, силаны, полиэтиленгликоль, поливиниловый спирт и метакрилаты. Из природных материалов используют целлюлозу, крахмал, хитозан, лигнин, зеин, альбумин. Наиболее популярными материалами для получения микро- и наночастиц являются биodeградируемые сложные полиэфиры, такие как полигидроксиалканоаты [41,42]. Микрочастицы из биосовместимых и биodeградируемых полимеров – это современные лекарственные формы, способные элиминировать побочные эффекты и неидеальную фармакокинетику уже существующих лекарственных препаратов [43].

Системы непрерывной доставки лекарственных препаратов для регулирования терапевтических концентраций применяется достаточно давно и в течение длительного времени. Успех в получении таких систем определяется выбором материала, который используется в качестве матрикса для депонирования лекарства. Такие материалы должны иметь определенные физико-механические свойства, не причинять вред организму, обладать биоразрушаемостью, не выделять токсичных продуктов, не препятствовать выходу лекарственных средств. Система непрерывной доставки лекарства может считаться идеальной, если обладает следующими характеристиками: инертность, биосовместимость, прочность, высокое содержание лекарства, невозможность бесконтрольного высвобождения средства. К тому же такие материалы должны быть просто изготавливаться, стерилизоваться, имплантироваться и извлекаться, не вызывая дискомфорта у пациента [44].

Среди полимерных изделий наиболее пригодными для такой системы являются микро- и наночастицы за счет их гибкости при подготовке и использовании. Микрочастицы и наночастицы обладают широким рядом преимуществ, таких как меньший размер частиц, который облегчает проникновение в клетки, более высокая эффективность для увеличения выхода лекарств, более низкий минимум ингибирующей концентрации и минимальные концентрации бактерий, за счет которых достигается лучшая антибактериальная активность с меньшим количеством лекарственного средства [6]

Среди медицинских применений микро- и наночастиц на основе ПГА можно выделить такие как доставка гена, противоопухолевая терапия и вакцины. Микрочастицы на основе ПГА изучали в широком спектре стоматологических областей: эндодонтическая терапия, вакцинация зубов от кариеса, регенеративная стоматология, стоматологическая хирургия или пародонтология. В эндодонтии с помощью полимерных микрочастиц смогли доставить амоксициллин на значительный уровень в корневой канал, при этом достигнув уровня концентрации, необходимой для соответствующей эндодонтической дезинфекции. Амоксициллин был выбран не случайно, данный препарат эффективен против *Enterococcus faecalis*, микроорганизма, который приводит к инфекциям внутри корневой канальной системы [5, 45].

В пародонтологии микрочастицы также успешно используются для локального лечения пародонтоза, при этом включая в полимерные изделия тетрациклин, доксициклин или хлоргексидин. ПГА-микрочастицы, в состав которых включались гидроксиапатит и офлоксацин, были использованы в качестве системы местной доставки лекарств для лечения периодонтита и показали хорошие результаты против грамположительных *Staphylococcus aureus* и грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* [46, 47].

Самое большое количество исследований, связанных с использованием полимерных микрочастиц, проводится в области стоматологии, основанной

на регенерации кости. ПГА-микрочастицы, нагруженные симвастатином, факторами роста или дексаметазоном значительно улучшали образование костной ткани. Также микрочастицы из ПГА, включающие факторы роста используются для лучшей остеоинтеграции титановых имплантов, тогда как бифосфонатные ПГА-микрочастицы могут быть использованы в будущем для лечения резорбции альвеолярной кости [47].

Моноциклиновые наночастицы на основе ПГА показали лучшую антибактериальную активность, чем использование свободного моноциклина, к тому же частицы могут обеспечить потенциальную транспортную систему для переноса антибиотиков к периодонтальным тканям. Зона ингибирования наночастиц, нагруженных моноциклинами (9,2 мкм), была больше чем свободный моноциклин (3,5 мкм) против *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, являющегося самым частым патогеном в периодонтальных инфекциях. Скорость высвобождения лекарственного средства из микрочастиц PLGA зависит от различных факторов, включая структуру, размер и растворимость инкапсулированных молекул, а также высокую структуру и деградацию свойств полимера [46].

В стоматологии широкие исследования проводятся также с наночастицами, полученными на основе оксида цинка, двуокиси титана и меди. Данные частицы планируется использовать в качестве противомикробных средств, но в настоящее время это невозможно из-за недостаточного изучения токсичного влияния на объект [6].

1.4 ПГА для восстановления костной ткани

Полигидроксиалканоаты – природные полиэфиры, различной химической структуры, образованных мономерами с длиной С-цепи от C₂H₄ до C₆H₁₂ и выше. Получают данные полимеры синтезом различных микроорганизмов царства бактерий и архей, которые аккумулируют энергию в виде хранения углеродных соединений в условиях ограниченного питания (азот, кислород или фосфор), но в присутствии избытка источника углерода. В качестве специализированных штаммов-продуцентов выступают: *Wautersia eutropha* B5786, *Ralstonia eutropha* H16, *Pseudomonas putida* KT2442, *Rhodococcus ruber*, *Aeromonas caviae* и другие [39, 48].

ПГА были открыты относительно недавно, в 1926 году М. Lemoigne, и сразу привлекли внимание ученых по всему миру [49]. С тех пор было открыто и описано более 300 видов, в том числе и грам-положительных, и грам-отрицательных бактерий, которые имели способность к синтезу таких полимеров [50].

ПГА применяют в самых разных областях, к таковым можно отнести и сельское хозяйство, и радиоэлектронику, и фармакологию. Однако большие надежды на них возлагают именно в медицине. Данные полимеры используются в качестве основы для разработки изделий медико-биологического назначения. Среди таковых можно выделить перевязочные материалы, шовные, системы доставки лекарств. На сегодняшний день большое количество исследований посвящено восстановительной хирургии и трансплантологии. Полигидроксиалканоаты используют в качестве костнозамещающего материала, способствующего новообразованию кости. В отличие от других полимеров ПГА имеют значительные преимущества [1].

Самым главным достоинством полигидроксиалканоатов является их высокая биосовместимость. Эта характеристика связана с мономерами,

составляющими данный полимер. Они являются естественными метаболитами клеток и тканей организма.

Деградация ПГА имеет биологическое происхождение и может протекать двумя путями: клеточным и гуморальным. Образующиеся в результате данного процесса мономеры гидроксимасляной кислоты не приводят к воспалительной реакции выраженного характера, а значит закисления тканей не происходит. Срок службы изделий, выполненных из полигидроксиалканоатов, может достигать до 2–3 лет. Это происходит за счет еще одного значимого свойства полимера, скорость его распада существенно ниже, чем у других полимеров [1].

Полигидроксиалканоаты занимают второе место среди разрабатываемых биопластиков на сегодняшний день. Технология получения ПГА не является сложным процессом, требующим серии технологических этапов. Синтез ПГА производят методом прямой ферментации, при этом в качестве сырья могут использоваться различные сахара, органические кислоты, смеси CO₂ и H₂, спирты и многие другие [51].

Свойства ПГА напрямую зависят от состава среды или химической структуры в процессе ферментации. Варьируя эти параметры, можно задавать свойства полимера (кристалличность, механическая прочность, температурные характеристики, скорости биораспада) [51].

ПГА могут подвергаться переработке из любых фазовых состояний: порошков, гелей, растворов и другие. [52].

Полигидроксиалканоаты в зависимости от мономерного состава и, соответственно, согласно их свойствам подразделяют на три класса:

- короткоцепочечные (short-chain-length) - состав мономеров включает 3–5 атомов углерода, природные термопластики;
- среднецепочечные ПГА (medium-chain-length) - мономерный состав, включающий 6–14 углеродных атомов, природные эластомеры;

- длинноцепочечные ПГА (long-chain-length) - сополимеры коротко- и среднецепочечных ПГА, их мономерный состав включает свыше 14 атомов углерода [52].

На эти полимеры возлагают большие надежды, так как помимо термопластичности, которая свойственна также полипропилену и полиэтилену, для ПГА характерны следующие особенности и преимущества:

1) Возможность получения полимеров различной химической структуры и с разным набором характеристик (кристалличность, механическая прочность, скорость биodeградации) при варьировании параметров во время биосинтеза ПГА.

2) За счет уже имеющихся базовых свойств, полигидроксиалканоаты могут перерабатываться различными способами, такими как прессование из расплавов и порошков, переработка из эмульсий, экструзия из расплавов. При этом в зависимости от используемого способа, можно получить большое разнообразие изделий (пленки, мембраны, матриксы, шовные волокна, эндопротезы разного типа);

3) Основным компонентом ПГА является естественный продукт обмена клеток и тканей - 3-гидроксимасляная кислота, а конечными продуктами биodeградации – диоксид углерода и вода. Такие характеристики являются важными для разработки медицинских изделий высокой биосовместимости. В этом случае имплантация не будет приводить к образованию токсичных продуктов, изменяющих рН тканей, вызывать воспаление или иные негативные реакции;

4) При варьировании состава полигидроксиалканоатов, опираясь на истинную биологическую деградацию, есть возможность устанавливать время и кинетику разрушения [53].

Среди алифатических полиэфиrow класса полигидроксиалканоатов наиболее изученным является поли-3-гидроксибутират П(ЗГБ) – гомополимер β -оксимасляной кислоты. Данный полимер используется в

медицине в качестве имплантатов, матриц, мембран, а также систем доставки лекарственных препаратов. Поли-3-гидроксибутират является стереорегулярным, оптически активным полимером, который в растворе может кристаллизоваться в спирали и сферолиты [32].

Низкомолекулярный П(ЗГБ) обладает высокой биосовместимостью, так как является естественным компонентом клеточных мембран животных и присутствует в крови человека. В процессе деградации поли-3-гидроксибутирата образуется гидроксимасляная кислота, не оказывающая токсического влияния на организм, а наоборот являющаяся естественным метаболитом клеток человека. Помимо этого данный полимер в качестве кетоновых тел образуются в печени после деградации длинноцепочечных жирных кислот [52].

Было установлено, что пломбировочный материал на основе полигидроксиалканоатов может использоваться в качестве костьзамещающего средства для заполнения костных полостей, в том числе, в условиях гнойной инфекции за счет наличия у него остеоиндуктивных свойств [52].

В одном из исследований, объектом которого выступали животные с экспериментальной формой хронического остеомиелита, было отмечено положительное влияние используемой пломбировочной крошки из П(ЗГБ)/тиенам и только П(ЗГБ) на восстановление костного дефекта. Установлено, что полимерное изделие в совокупности с лекарственным препаратом обладало противомикробным действием, за счет которого происходило значительное подавление микроорганизмов *Staphylococcus aureus*. При этом в сравнении с контролем (аллокостью) костные новообразования протекали значительно быстрее [32].

Еще один эксперимент, доказывающий эффективность применения полимера поли-3-гидроксибутирата, проводился на модели костного дефекта нижней стенки глазной орбиты кроликов. Было установлено, что

использование данного полимерного биоматериала способствует более быстрому заживлению кожных ран. Также по сравнению с ксенотрансплантатом воспалительная реакция практически отсутствовала, а костные структуры восстанавливались в разы быстрее [53].

Следует отметить, что в настоящее время количество работ, посвященных исследованию ПГА невелико, в отличие от аналогичных на основе производных монокарбоновых кислот (полилактиды и полигликолактиды) [53].

Однако применение таких полимеров, как полилактиды и полигликолиды, ограничено. Это связано с высокой скоростью их деструкции, что может привести к увеличению локальной концентрации продуктов разложения полимера в организме. Исходя из таких данных полигидроксиалканоаты наиболее перспективны для создания новых лекарственных носителей в виде 3D- форм, пленочных матриксов, микро- и макрочастиц, пломбирочного материала [54].

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

В качестве материалов исследования использовали гомогенный полимер 3-гидроксимасляной кислоты П(ЗГБ) M_v (723 кДа \pm 6,0), $T_{пл}$ 179,7 °С \pm 0,5, ПД (1,66 \pm 0,04), двухкомпонентный сополимер 3-гидроксibuтирата и 3-гидроксивалерата П(ЗГБ/ЗГВ) с включением 3-гидроксивалерата 17 мол.% M_v (300 кДа \pm 4,7), $T_{пл}$ 169 °С \pm 0,5, ПД (3,26 \pm 0,05) и полилактид (ПЛК) M_v (200 кДа) $T_{пл}$ 180 °С.

2.2 Синтез и выделение ПГА

Для получения ПГА использовали штамм водородных бактерий *Cupriavidus Eutrophus* B10646 [56]. Культивирование бактерий проводили на основе солевой среды Шлегеля ($Na_2HPO_4 \cdot H_2O$, KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot H_2O$, $Fe_3C_6H_5O_7 \cdot 7H_2O$). В строго стерильных условиях выращивали водородные бактерии в условиях несбалансированного роста при дефиците источника азота в среде с использованием ферментационного автоматизированного комплекса BioFlo/CelliGen115 («New Brunswick», США). При автотрофном культивировании в качестве источников углерода и энергии была использована смесь газов CO_2 - O_2 - H_2 в соотношении по объему 1:2:7. При гетеротрофном культивировании бактерий в качестве источников углерода и энергии использовали фруктозу и масляную кислоту. Для синтеза сополимеров П(ЗГБ/ЗГВ) в субстрат добавляли калиевые соли пентановой кислоты.

Выделение и очистку полимера из экстракта бактериальной биомассы *Cupriavidus Eutrophus* осуществляли с помощью хлороформа с последующим осаждением полимера этанолом. Проводили процедуру многократного растворения полимера в хлороформе и осаждение гексаном. Полученный полимер высушивали при 40 °С.

2.2.1 Определение состава образцов ПГА

Состав полимеров определяли хроматографией после предварительного метанолиза образцов по метиловым эфирам жирных кислот с применением хромато-масс-спектрометра «Agilent Technologies» 7890A (США).

2.3 Методы получения полимерных биоактивных материалов

2.3.1. Метод получения пломбировочного материала

Пломбировочную крошку получали методом размола в ультрацентрифужной мельнице ZM 200 из прессованного порошка полимера П(ЗГБ) в таблетированной форме, полученном на автоматизированном прессе (CARVER «AutoPellet») при 18000 оборотов.

2.3.2 Метод получения гранул

Полимерные гранулы получали техникой осаждения полимера из раствора. Раствор полимера концентрацией 10% нагревали на водяной бане при 45° С до получения однородной вязкой жидкости. Полученный раствор капельно дозировали:

а) в осадительную ванну с гексаном (высота осадителя – 200 мм), в котором происходила кристаллизация полимера и образование гранул. Полученные гранулы собирали и сушили в течение 24 часов в ламинарном шкафу с вытяжной вентиляцией.

б) на подложки, установленные на шейкере и заполненные порообразующим веществом. Полученные гранулы помещали в осадительную ванну с гексаном, а затем промывали дистиллированной водой для удаления порообразующего вещества. Гранулы собирали и сушили в течение 24 часов в ламинарном шкафу с вытяжной вентиляцией.

2.3.3 Метод получения микро- и макрочастиц

Микро- и макрочастицы получали эмульсионным методом.

а) Для получения микрочастиц использовали 2% раствор ПЗГБ в дихлорметане.

б) Для макрочастиц использовали растворы полимера 2%, 6% и 10% в дихлорметане. В полученный раствор добавляли гидроксиапатит и/или лекарственное средство (дексаметазон – DEX, гентамицин), и распределяли частицы данных веществ с помощью диспергатора (Heldolph; Silentcrusher M.) в 2% растворе полимера и с помощью ультразвука (MISONIX; Sonicator® 3000) в 6 и 10% растворах полимера.

Для получения двухкомпонентной эмульсии полученные растворы вливали в 1% раствор поливинилового спирта (Mw 30-50 кДа, Sigma-Aldrich, США). При этом осуществляли постоянное механическое перемешивание эмульсии с применением магнитной мешалки MR Hei-Standard при 750 об/мин (Heidolph, Германия) в течение суток до полного испарения растворителя. Микро- и макрочастицы собирали центрифугированием Centrifuge 5810 R, 5417 R (Eppendorf, Германия; 10000 об/мин, 7 мин.) и промывали 4 раза дистиллированной водой.

2.4 Методы исследования полимерных биоактивных материалов

2.4.1 Изучение влагопоглощения и суммарной пористости

Влагопоглощение

Влагопоглощение образцов определяли по формуле: $EWC = (W_s - W_d) / W_s * 100$, где:

W_d – вес высушенного образца,

W_s – вес образца после экспозиции в жидкости.

Влагопоглощение – это способность материала впитывать и удерживать влагу; зависит от величины открытой пористости и смачиваемости материала.

Суммарная пористость

Суммарную пористость высчитывали по формуле:

$$V \Sigma = G_{в.м} - G_{с.м} / G_{с.м} * \rho_{в}, \text{ где:}$$

$G_{с.м}$ – вес сухого матрикса, г;

$G_{в.м}$ – вес матрикса после помещения в жидкость, г;

$\rho_{в}$ – плотность воды, г/см (принимается за 1 г/см³)

Метод основан на определении объема воды, заполняющей практически все поры полимерного изделия при периодическом механическом встряхивании.

Эффективность всех материалов зависит от их пористых характеристик, поскольку пористая структура управляет потоком и кинетикой биохимических процессов.

2.4.2 Электронная микроскопия

Микроструктуру поверхности полимерных изделий исследовали с применением сканирующей электронной микроскопии (микроскоп HITACHI™-3000 с системой микроанализа BRUKERX Flash 430 H, Япония и рентгеноспектрального анализа (программа QUANTAX 70).

2.4.3 Электрокинетический потенциал (дзета-потенциал)

Размерное распределение микрочастиц определяли на анализаторе частиц Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания) с использованием метода динамического светорассеивания. Поверхностный заряд микрочастиц охарактеризован величиной электрокинетического потенциала (дзета(ζ)-потенциала), которая определялась электрофоретической подвижностью частиц в суспензии с применением уравнения Генри на Zetasizer Nano ZS.

2.4.4 Дегградация полимерных биоактивных материалов

Для проведения исследования использовались микрочастицы на основе ПЗГБ и макрочастицы из П(ЗГБ/ЗГВ), включающие в себя лекарственный препарат гентамицин и гидроксиапатит с концентрацией 10 и 25% от массы полимера. Микро- и макрочастицы в двух повторностях взвешивали и помещали в пробирки с 5 мл фосфатно-буферного раствора (PBS) в течение заданных интервалов: 1, 2, 4, 6 и 8 недель. PBS меняли еженедельно. В определенные интервалы времени полимерные изделия извлекали из среды, сушили и определяли массу.

2.4.5 Выход лекарственного препарата

В качестве лекарственных препаратов были выбраны противовоспалительный препарат Дексаметазон (SIGMA-ALDRICH, USA) и антибиотик Гентамицин (ОАО «Дальхимфарм», Россия). Полимерные макрочастицы с включенными в них лекарственными препаратами поместили в пробирки с 10 мл фосфатно-буферного раствора в 3-х повторностях в количестве 0,015 г при 37° на срок до 28 дней в статистическом (термостат) и динамическом режимах. Фосфатный буфер собирали в заданные интервалы времени: 1, 3 и 6 часы, 1, 3, 7, 14 и 28 дни. Количество высвобожденного лекарственного препарата определяли с помощью спектрофотометра Genesys 10 S UV-Vis при 190-1000 нм.

Длина волны, соответствующая максимуму поглощения для дексаметазона, равна 240 нм; для гентамицина – 203 нм.

2.4.6 Исследования антибактериальной активности макрочастиц *in vitro*

Эффективность антибактериальной активности макрочастиц, нагруженных антибиотиком, определяли с использованием диско-диффузионного метода в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* и грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*.

В качестве питательной среды использовали Агар Мюллера-Хинтона. Для приготовления среды в 250 мл дистиллированной воды суспендировали 9,5 г сухого агара и кипятили до полного его растворения. Затем среду стерилизовали автоклавированием и разлили на 6 стерильных чашек Петри в равном количестве и оставили в ламинарном шкафу до полного застывания. Для приготовления бактериальных суспензий в две пробирки с простерилизованной дистиллированной водой с помощью петли было занесено незначительное количество колоний грамположительных и грамотрицательных бактерий. Полученные суспензии инокулируются на поверхность агара, при этом в двух контрольных чашках Петри данное действие проводится по всей поверхности среды, а в четырех других до этого вырезается отверстие диаметром 1 см, в которое бактериальная суспензия не заносится. Для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам на контрольные чашки были помещены стандартизированные бумажные диски с гентамицином, а в вырезанные отверстия всех остальных чашек были помещены простерилизованные ультрафиолетом макрочастицы, содержащие тот же антибиотик. Спустя 24 часа был произведен замер зоны подавления роста.

2.5 Исследование биосовместимости *in vitro*

Предварительно изделия были простерилизованы. Стерилизацию проводили обработкой H₂O₂-плазмой (плазменный стерилизатор Sterrad NX, («Johnson&Johnson», США), время стандартного цикла – 47 мин, температура в цикле (46 ± 4) °C.

2.5.1 Инкубация в плазме

Для исследования были получены препараты PRP (Platelet Rich Plasma – обогащенная тромбоцитами плазма крови, жидкая форма препарата или суспензия). Сначала производят забор крови с добавлением к ней

антикоагулянта на основе солей цитрата натрия и раствора глюкозы, как с аденином, так и без него, а также сукцината натрия. Эти антикоагулянты препятствуют спонтанной активации тромбоцитов, что важно для правильного приготовления препаратов PRP. Далее выполняют двухкратное центрифугирование крови. При первом центрифугировании происходит разделение крови на три слоя: нижний – эритроциты, верхний – бедная тромбоцитами плазма (PPP) и средний слой, («buffy coat»), содержащий основное количество тромбоцитов и лейкоциты. При втором центрифугировании достигается концентрирование тромбоцитов, что приводит к получению препарата PRP в виде суспензии.

2.5.2 Исследование биосовместимости *in vitro* в культуре МСК

Биосовместимость полученных изделий оценивали в культуре МСК крыс. Для получения ММСК использовали ранее описанную методику [55], в ходе которой костный мозг выделяли в асептических условиях после удаления шейки кости; в открытый костномозговой канал с помощью шприца вводили 1 мл среды α -MEM с добавлением 20% телячьей сыворотки и 50 ЕД гепарина, костный мозг вымывали и тщательно суспендировали. Клетки дважды отмывали питательной средой при центрифугировании. Суспензию клеток переносили в чашку Петри диаметром 90 мм и помещали в CO₂-инкубатор. Через 24 ч среду заменяли свежей, удаляя при этом неприкрепившиеся клетки, что позволяет избавиться практически от всех клеток гемопозитического происхождения и получить популяцию мезенхимных клеток чистотой до 90%. Для дальнейших исследований использованы клетки после 3–4 пассажей.

2.5.3 Засев клетками и МТТ

Перед засевом клетками инкубировали гранулы разного химического состава (П(ЗГБ), П(ЗГБ/ЗГВ) и ПЛА) в плазме в течение двух часов.

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста: для этого в лунку с каждым типом носителя было добавлено по 50 мкл раствора МТТ (5 %) и 950 мкл полной питательной среды. Через 3,5 часа культивирования среду с раствором МТТ замещали ДМСО для растворения образовавшихся кристаллов МТТ-формаза. Через 30 минут супернатант переносили в 96-луночный планшет и проводили измерение оптической плотности при длине волны 540 нм на микропланшетном фотометре Bio-Rad 680 («BioRad LABORATORIES Inc.»). Количество клеток оценивали по калибровочному графику.

2.5.4 Прижизненная окраска DAPI

DAPI – это флуоресцентный краситель, избирательно связывающийся с двойной спиралью ДНК. Способность DAPI проникать через клеточные мембраны позволяет использовать его как для фиксированных, так и для живых клеток. DAPI флуоресцирует синим цветом при освещении ультрафиолетом.

2.5.5 Статистическая обработка результатов

Обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel. Оценивали средние значения и ошибки среднего.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Синтез образцов ПГА, использованных для конструирования биоактивного композиционного материала

Для биосинтеза образцов полимеров штамм водородных бактерий *Cupriavidus Eutrophus* выращивали в периодическом режиме по принятой технологии с использованием ферментационного автоматизированного комплекса BioFlo/CelliGen115 («New Brunswick», США). При использовании моноуглеродного субстрата (фруктоза или глюкоза) за 50–60 часов выращивания урожай биомассы бактерий составлял 60–80 г/л (по весу абсолютно сухого вещества); содержание поли-3-гидроксibuтирата П(ЗГБ) – 80–85 %. Для получения сополимеров поли-3-гидроксibuтирата с 3-гидроксивалератом П(ЗГБ/ЗГВ) в состав среды дополнительно вносили валерат калия в концентрации 2 г/л.

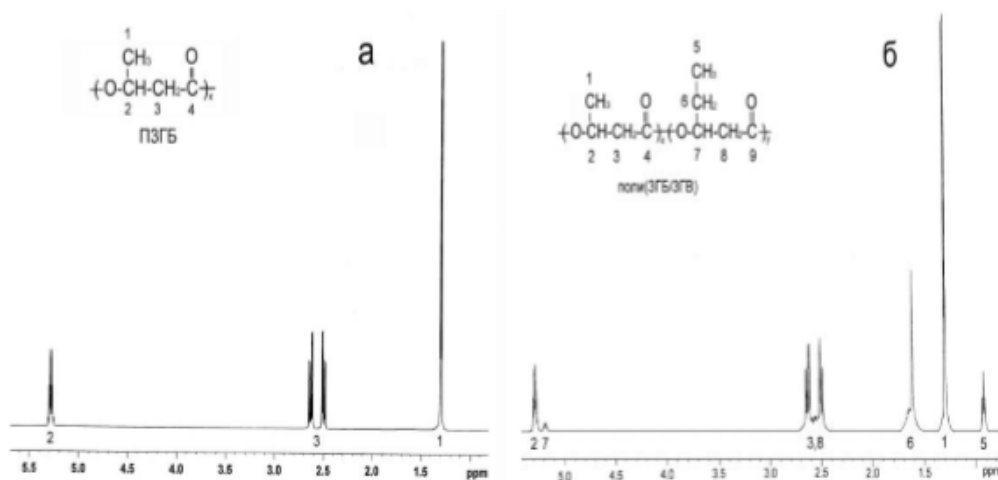


Рисунок 1 - ¹H-ЯМР спектры: а – П(ЗГБ); б – П(ЗГБ/ЗГВ)

Получены образцы ПГА различного химического состава. Гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты – изотактический полиэфир с регулярными, одинаково ориентированными (head-to-tail) последовательными единицами 3-гидроксимасляной кислоты:

$[-O-CH(CH_3)-CH_2-CO-]_x$. Второй тип – это сополимеры 3-гидроксимасляной и 3-гидроксивалериановой $[-CH(C_2H_5)-CH_2-CO-]_y$ кислот.

Химический состав образцов ПГА подтвержден снятыми 1H ЯМР спектрами (рисунок 1).

На основе гомогенного полимера 3-гидроксимасляной кислоты П(ЗГБ), двухкомпонентного сополимера 3-гидроксипропириата и 3-гидроксивалерата П(ЗГБ)/(ЗГВ) с включением ЗГВ (17 мол.%) и полилактида (ПЛК) был получен биоактивный композиционный материал в виде пломбировочной крошки, гранул, микро- и макрочастиц.

3.2 Пломбировочный материал

С помощью ультрацентрифужной лабораторной мельницы ZM 200 получен порошкообразный пломбировочный материал из П(ЗГБ), представленный частицами анизодиаметрической формы. В составе материала зафиксированы несимметричные и разноостные частицы в виде пластинок размером от 10 до 600 мкм (рисунок 2(б)).

Использование таких материалов при лечении костных полостей, часто инфицированных патогенной микрофлорой, предполагает введение дополнительной антибактериальной терапии или непосредственно антибиотика в сам порошок. Для этого в пломбировочный материал на этапе получения был добавлен антибактериальный препарат (цефтриаксон) в соотношении полимер/антибиотик как 90/10. Включение антибактериального препарата в материал подтверждали диско-диффузионным методом на условно-патогенных микроорганизмах (рисунок 20).

3.3 Характеристика гранул

На первом этапе методом осаждения полимера из раствора концентрацией 10% были получены гранулы на основе П(ЗГБ) без и с

использованием подложки, установленной на шейкере, и порообразующего вещества. Различия в методах получения оказали значительное влияние на морфологические характеристики полимерных изделий. Гранулы без порообразователя имели неправильную форму, полимерные хвостики, были полые внутри и не имели видимых пор на поверхности, что вероятно связано с вязкой консистенцией раствора полимера. При раскапывании дозатором капля растягивалась и застывала в таком положении при соприкосновении с растворителем.



Рисунок 3 – Макрофото гранул на основе П(ЗГБ), без порообразующего вещества (а) и с порообразующим веществом (сахароза)

Второй образец, полученный с экспозицией в сахарозе, отличался сферической формой и наличием пор как внутри, так и на поверхности. Сахароза выступала в качестве связующего вещества, капли полимерного раствора не растекались, а, наоборот, за счет шейкера формировались в сферические гранулы.

Средний диаметр образцов был различным. В случае с первыми гранулами он составил $1,68 \pm 0,15$ мм (рисунок 3а), вторые - $2,36 \pm 0,2$ мм (рисунок 3б). Полученные результаты показывают, что метод с использованием порообразователей является более подходящим для получения биоактивных материалов, и он был задействован в дальнейших исследованиях.

На втором этапе были получены гранулы на основе сополимера П(ЗГБ/ЗГВ) и ПЛК. В качестве порообразователя помимо сахарозы, была выбрана полимерная крошка.

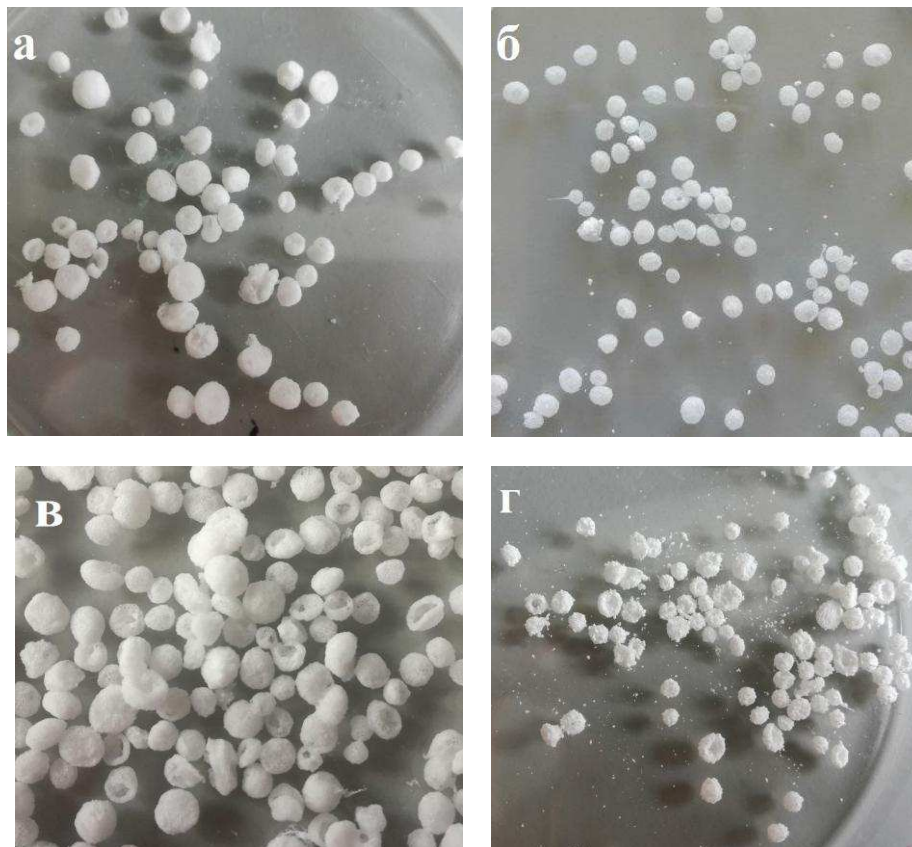


Рисунок 4 – Гранулы на основе П(ЗГБ/ЗГВ) и ПЛА после вымывания порообразующего вещества: а, б – гранулы из П(ЗГБ/ЗГВ) с использованием сахарозы, наконечник на 200 и 1000 мкл соответственно; в – гранулы на основе из ПЛА с сахарозой; г – гранулы из П(ЗГБ/ЗГВ) с полимерной крошкой

При получении гранул из сополимера с сахарозой были использованы разные наконечники дозатора (200 мкл, 1000мкл). Необходимо было убедиться, на сколько значительным будет влияние на размер гранул в зависимости от объема дозирования раствора полимера. Установлено, что в зависимости от использованного наконечника диаметр полученных гранул менялся, но не существенно. При использовании наконечника на 200 мл размер гранул составил $1,97 \text{ мм} \pm 0,3$ (Рисунок 4 (а)), при 1000 мкл $2,39 \pm 0,3$ мм (Рисунок 4 (б)).

Следующие гранулы, также были получены из П(ЗГБ/ЗГВ), но в качестве порообразователя использовали полимерную крошку (Рисунок 4(г)). Оказалось, что варьирование порообразующих веществ не оказывает влияния на средний размер гранул ($1,82 \pm 0,3$ мм), однако в сравнении с ранее полученными гранулами с сахарозой, структура данных изделий отличалась хрупкостью.

В качестве группы сравнения получены гранулы на основе ПЛК с сахарозой (Рисунок 4(в)). Вне зависимости от синтетического происхождения, гранулы также имели сферическую форму, поры и средний размер практически не отличался от остальных образцов и составил $2,23 \pm 0,25$ мм.

3.3.2 Измерение влагопоглощения гранул и суммарной пористости

По данным результатов влагопоглощения, установлено, что максимум влагопоглощения зарегистрирован для пористых гранул на основе П(ЗГБ) (Таблица 1). Это скорее всего связано с разной структурой пор внутри гранулы.

Таблица 1 – Влагопоглощение гранул различного состава, полученных методом осаждения из раствора с порообразующим веществом и без него

Образец	Влагопоглощение (%)
Гранулы из П(ЗГБ) без порообразующего в-ва	9
Гранулы из П(ЗГБ), сахар	55
Гранулы из П(ЗГБ/ ЗГВ), полимер	5,5
Гранулы из П(ЗГБ/ЗГВ), сахар	29
Гранулы из ПЛА, сахар	20

Максимальные показатели суммарной пористости (таблица 2) по сравнению с другими образцами также зарегистрированы для пористых гранул на основе П(ЗГБ). В то время как самые низкие значения суммарной пористости характерны для гранул на основе П(ЗГБ/ЗГВ), полученных при экспозиции в полимерном порошке.

Таблица 2 – Суммарная пористость гранул различного состава, полученных методом осаждения из раствора с порообразующим веществом и без него

Образец	Суммарная пористость (см ³ / г)
Гранулы из П(ЗГБ) без порообразующего в-ва	0,1
Гранулы из П(ЗГБ), сахара	1,23
Гранулы из П(ЗГБ/ ЗГВ), полимер	0,06
Гранулы из П(ЗГБ/ЗГВ), сахара	0,41
Гранулы из ПЛА, сахара	0,24

Таким образом, сконструирована серия полимерных гранул. Гранулы на основе П(ЗГБ), полученные без использования порообразующего вещества не подходят в качестве пломбировочного материала, также как и гранулы с экспозицией в полимерной крошке, так как первые имеют неподходящую форму, полимерные хвостики и отсутствие пор, а вторые слишком хрупкую структуру. Для исследования биосовместимости *in vitro* в культуре клеток были отобраны гранулы разного химического состава П(ЗГБ), П(ЗГБ/ЗГВ) и ПЛА с наличием пор и правильной сферической формы.

3.4 Характеристика микро- и макрочастиц

Эмульсионным методом на основе П(ЗГБ) получены микрочастицы различного диаметра. При этом условия для их получения были различны: изменялись температура, скорость вращения магнитной мешалки и размер магнита. На первом этапе исследования было установлено, что температура может оказывать влияние на размер и форму частиц.

Размер микрочастиц полученных при температуре 50 °С находился в пределах от 100 до 300 мкм, при этом частицы имели более гладкую поверхность; микрочастицы, полученные без нагревания имели рельефную поверхность с небольшими порами и их размер колеблется от 20 до 100 мкм.

На втором этапе было необходимо убедиться, что свойства частиц также могут варьировать при незначительных изменениях одновременно двух параметров в заданной методике: скорость перемешивания эмульсии и размер магнита. Стандартный метод подразумевает получение микрочастиц при полном отсутствии температурного режима, скорости магнитной мешалки 750 об/мин и использование среднего магнита. Для исследования были сконструированы частицы, получение которых проводилось при следующих параметрах: большой магнит и скорость перемешивания эмульсии 500 об/мин, и овальный магнит, скорость – 625 об/мин.

Все ранее полученные образцы были использованы в дальнейшем исследовании на дзета-потенциал.

Установлено, что на ζ -потенциал, а эта величина является одной из важнейших характеристик микрочастиц, широко используемой для прогнозирования стабильности дисперсий, влияет любое отклонение от стандартных условий, частицы могут менять свой размер, форму и становиться менее стабильными и менее однородными.

При исследовании ζ -потенциала микрочастиц из ПГА в деионизированной воде получены следующие результаты (рисунок 11): наиболее низкое отрицательное значение ζ -потенциала характерно для микрочастиц, полученных при стандартных условиях ($-52,9 \pm 1,28$), что определяет их лучшую стабильность, так как согласно литературным данным, абсолютное значение ζ -потенциала свыше 30 мВ обеспечивает хорошую, а свыше 60 мВ - отличную физическую стабильность. Самое высокое значение ζ -потенциала имели микрочастицы, полученные с использованием овального магнита и скоростью вращения мешалки 625 оборотов в минуту ($-24,9 \pm 1,11$).

Микрочастицы вполне могут использоваться в качестве пломбирочного материала, но для заполнения крупных полостей и получения биологически активной композиции более подходящими являются макрочастицы. Изменения таких параметров, как температура, скорость перемешивания эмульсии и размер магнита, не помогли добиться желаемых размеров частиц, поэтому следующий этап исследований связан с варьированием концентраций раствора полимера и добавлением гидроксиапатита (SIGMA-ALDRICH, USA).

Эмульсионным методом были получены макрочастицы на основе сополимера П(ЗГБ/ЗГВ) разной концентрации (2, 6 и 10%) с добавлением гидроксиапатита.

Установлено, что концентрация раствора влияет на размер частиц. Так минимальная концентрация 2% позволяет получить частицы микроразмера. При повышении концентрации раствора полимера до 6% размер частиц заметно увеличивается, однако происходит их агломерация. В то время как частицы при максимальной концентрации 10% преимущественно имеют круглую форму со средним диаметром $1,6 \pm 0,3$ мкм.

В дальнейших исследованиях использовалась максимальная концентрация раствора полимера 10%, так как она оказалась самой подходящей для получения макрочастиц.

Так как наиболее изученным из класса полигидроксиалканоатов является поли-3-гидроксибутират П(ЗГБ), то следующие сконструированные макрочастицы были получены из данного полимера.

Было выявлено, что П(ЗГБ) не подходит для получения частиц с высокой концентрацией раствора, и для получения макрочастиц с лекарственными препаратами был выбран сополимер П(ЗГБ/ЗГВ).

На следующем этапе эмульсионным методом были получены макрочастицы из ПЗГБ/ЗГВ с добавлением лекарственных препаратов (гентамицина и дексаметазона) и биологически активной композицией гидроксиапатита. В случае с антибиотиком гентамицином использовалось разное количество гидроксиапатита (10 и 25% от массы полимера), дексаметазон – 10% от массы полимера.

Макрочастицы с гентамицином в обоих случаях имели преимущественно круглую форму и были достаточно твердыми. Их средний размер в зависимости от количества добавленного гидроксиапатита различался сравнительно незначительно. При добавлении 10% гидроксиапатита от массы полимера средний размер макрочастиц составил $1,6 \pm 0,2$ мкм, 25% гидроксиапатита – $1,56 \pm 0,1$ мкм. Макрочастицы с дексаметазоном были также шарообразной формы размером $1,4 \pm 0,4$ мкм.

Также были получены макрочастицы с добавлением исключительно лекарственных препаратов: гентамицина и дексаметазона (рисунок 15).

(б)

Макрочастицы с гентамицином агломерировали, и в дальнейшем исследовании участия принимать не будут.

Макрочастицы с дексаметазоном имели круглую форму, и их средний размер составил $1,06 \pm 0,15$ мкм.

3.4.3 Выход лекарственного препарата

Для проведения исследования были взяты макрочастицы с включенными в них лекарственными препаратами (гентамицин и дексаметазон). Полимерные макрочастицы инкубировали в фосфатно-буферном растворе в статистическом и динамическом режимах в течение 28 дней. Пробы снимали в определенные интервалы времени: 1, 3 и 6 часы, 1, 3, 7, 14 и 28 дни.

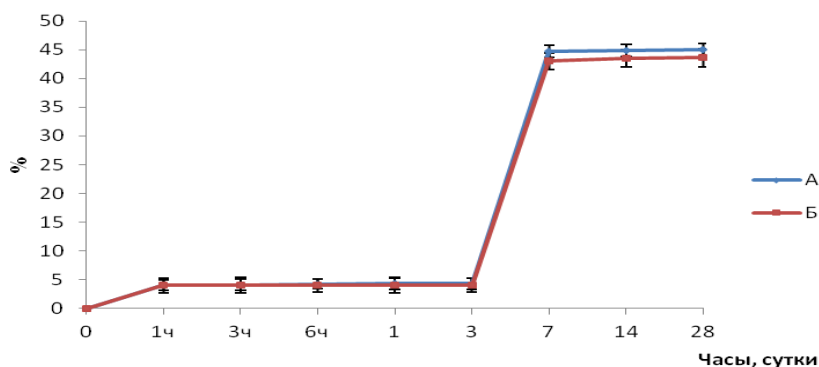


Рисунок 19 – Кривые высвобождения гентамицина из П(ЗГБ/ЗГВ)-макрочастиц в фосфатный буфер в режиме статики (А) и динамики (Б)

При инкубировании макрочастиц, нагруженных гентамицином, вне зависимости от используемого режима полный выход препарата был зафиксирован на 7 сутки (рисунок 19) и на протяжении дальнейшего исследования концентрация препарата практически не менялась.

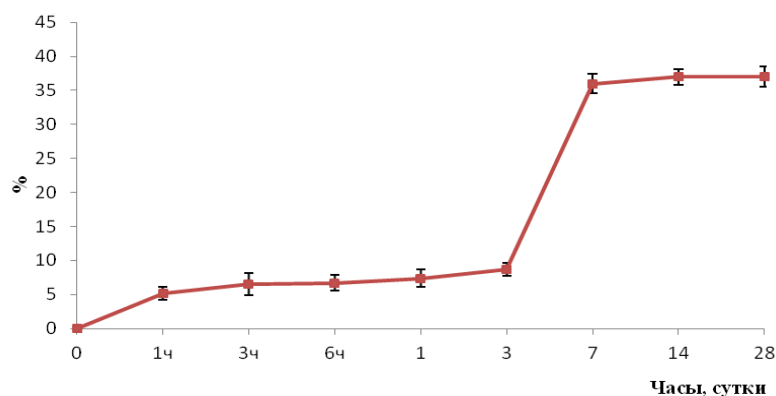


Рисунок 20 - Кривая высвобождения дексаметазона из П(ЗГБ/ЗГВ)-микрочастиц в фосфатный буфер в режиме статики

Высвобождение дексаметазона (рисунок 20) также было постепенным в течение недели. На седьмые сутки был отмечен полный выход лекарственного препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Синтезированы образцы ПГА различного химического состава: поли-3-гидроксibuтират П(ЗГБ), сополимер 3-гидроксibuтирата и 3-гидроксисвалерата П(ЗГБ/ЗГВ).

2. Получена и исследована пломбировочная крошка на основе гомополимера П(ЗГБ) в композиции с антибактериальным препаратом. На культурах клеток *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* доказан антибактериальный эффект.

3. Получены гранулы на основе полимеров различного химического состава. Установлено, что в зависимости от используемых порообразователей (сахароза, полимерная крошка) меняется диаметр гранул (от 1,82 до 2,39) и размер пор (от 50 до 500 мкм). Выявлено, что обработка плазмой способствует наибольшей адгезии клеток, что подтверждается МТТ-тестом и окрашиванием DAPI в культуре клеток МСК.

4. Сконструирована серия микрочастиц на основе П(ЗГБ) эмульсионным методом. Установлено, влияние параметров (температура,

скорость перемешивания эмульсии, размер магнита) на размер (20-300 мкм), форму и ζ -потенциал (от -52,9 до -24,9).

5. Получены и исследованы макрочастицы с гидроксиапатитом и лекарственными препаратами (гентамицин, дексаметазон). Установлено, что выход лекарства происходит за счет вымывания препарата с поверхности полученных макрочастиц и вымывания частиц гидроксиапатита. Отмечена антибактериальная эффективность на культурах клеток условно патогенных бактерий *S.aureus* и *E.coli*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волова, Т. Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии: учебно-электронный курс / Т.Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П.В.Смирнов – Красноярск: ИПК СФУ. – 2009.
2. Посохова В.Ф. Osteопластические материалы для костной регенерации: перспективы и актуальность проблемы / В.Ф. Посохова [и др.] // Российская стоматология. – 2016. - №2. – С. 54-55.
3. Ушаков А.И. Дентальная имплантация и выбор костно-пластических материалов в зависимости от типа костной ткани челюстей / А.И. Ушаков [и др.] // Российская стоматология. – 2016. - №2. – С. 12-17.
4. Яременко А.И. Возможности применения полимерной матрицы на основе хитозана для возмещения дефекта верхней челюсти. Экспериментальное исследование / А.И. Яременко [и др.] // Российская стоматология. – 2016. - №2. – С. 50-51.
5. Virlan M.J.R. Current uses of Poly(lactic-co-glycolic acid) in the dental field: a comprehensive review / [Maria Justina Roxana Virlan] // Journal of Chemistry. – 2015. – P. 1-12.
6. Padovani G.C. Advances in dental materials through nanotechnology: facts, perspectives and toxicological aspects / [Gislane C. Padovani] // Trends in Biotechnology. – 2015. – P. 1-16.
7. Яременко А.И. Современные остеопластические и остеоиндуктивные материалы. Состояние проблемы. Перспективы применения в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии / А.И. Яременко [и др.] // Обзор литературы в стоматологии. – 2011.

8. Кирилова И.А. Сравнительная характеристика материалов для костной пластики: состав и свойства / И.А. Кирилова [и др.] // Хирургия позвоночника. – 2012. – С. 72-83.
9. Иванов С.Ю. Синтетические материалы, используемые в стоматологии для замещения дефектов костной ткани / С.Ю. Иванов [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2013. - № 1.
10. Mish Craig M. Методика наращивания альвеолярного гребня с помощью костного аутотрансплантата, полученного из ветви нижней челюсти с целью установки дентальных имплантатов // Институт Стоматологии. - 1999. - №5. - С. 42-46.
11. Павленко А.В. Остеопластические материалы в стоматологии: прошлое, настоящее, будущее / А.В. Павленко [и др.] // Denta Blitz. - 2008. - №1. - С. 1-8.
12. Марченко Е.И. Остеоинтегрирующие материалы в терапевтической стоматологии / Е.И. Марченко [и др.] // Вестник ВГМУ. – 2012. – Т. 11. - № 1. – С. 146-151.
13. Берченко Г.Н. Костные трансплантаты в травматологии и ортопедии / Г.Н. Берченко [и др.] // Поликлиника. – 2013. - №5. – С. 156-157.
14. Григорьян А.С. Современное состояние и основные направления исследований, посвященных разработке остеопластических материалов / А.С. Григорьян [и др.] // Стоматология. – 2016. – № 5. – С. 69-74.
15. Habibovic P. Osteoinductive biomaterials properties and relevance in bone repair / P. Habibovic // Journal of tissue engineering and regenerative medicine. – 2007. – P. 25-32.

16. Павленко А.В. Синтетические остеотропные материалы для замещения костных дефектов в стоматологической практике / А.В. Павленко [и др.] // Дентальная имплантология и хирургия. – С. 16-24.
17. Moore WR. Synthetic bone graft substitutes / WR. Moore // ANZ Journal of Surgery. – 2001. - №71. – P.354-361.
18. Ghanaati S. Synthetic bone substitute material comparable with xenogeneic material for bone tissue regeneration in oral cancer patients: First and preliminary histological, histomorphometrical and clinical results / S. Ghanaati // Ann Maxillofac Surg. – 2013. №3(2). – P. 126-138.
19. Кирилова И.А. Деминерализованный костный трансплантат как стимулятор остеогенеза: современные концепции // Хирургия позвоночника. - 2004. - №3. - С. 105-110
20. Десятниченко К.С., Курдюмов С.Г. Тенденции в конструировании тканеинженерных систем для остеопластики // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2008. - №1. - С. 62-69.
21. Волова Т.Г. Современные биоматериалы: мировые тренды, место и роль микробных полигидроксиалканоатов / Т.Г. Волова // Сибирский Федеральный Университет. – 2014. – С. 103-133.
22. Gisha, E. Luckachan Biodegradable Polymers- A Review on Recent Trends and Emerging Perspectives / E. Luckachan Gisha, C. K. S. Pillai // Journal of Polymers and the Environment. – 2012. – Vol. 19, № 3. – P. 637-676.
23. Вильданов Ф.Ш. Биоразлагаемые полимеры – современное состояние и перспективы использования / Ф.Ш. Вильданов [и др.] // Башкирский химический журнал. – 2012. – Т. 19. - №1. – С. 135-139.

24. Фомин В.А. Биоразлагаемые полимеры, состояние и перспективы использования / В.А. Фомин // Пластические материалы. – 2001. - №2. – С. 42-48.
25. Колотова Е.С. Цитотоксические и иммунохимические свойства вискумина, инкапсулированного в полилактидные микрочастицы / Е.С. Колотова [и др.] // Экспериментальные статьи. – 2012. – Т. 4. - №1. – С. 105-110.
26. Chandy T. Development of polylactide microspheres for protein encapsulation and delivery / T. Chandy // Journal of Applied Polymer Science. – 2014. - № 86. – P. 1286-1295.
27. Гурин А.Н. Сравнительная характеристика материалов на основе хитозана, альгината и фибрина в комплексе с трикальцийфосфатом для остеопластики / А.Н. Гурин [и др.] // Стоматология. - №1. – 2014. – С. 4-10.
28. Желудев С.Е. Адгезивные средства в ортопедической стоматологии / С.Е. Желудев // М: Стоматология. – 2007.
29. Гажва, Ю. В. Разработка и исследование *in vivo* и *in vitro* костно-пластического материала на основе композиции гидроксиапатита, поли-3-оксибутирата и альгината натрия / Ю. В. Гажва [и др.] // GTM: Разработка и исследование нового костно-пластического материала. – 2014. – Т.6. - №1. – С. 6-13.
30. Хотимченко Ю.С. Биосовместимые матриксные имплантаты на основе природных и синтетических полимеров как перспективные средства для терапии дегенеративных и посттравматических заболеваний центральной нервной системы / Ю.С. Хотимченко // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2012. - №2. – С. 54-60.

31. Smetana K. Jr. Cell biology of hydrogels / K. Jr. Smetana // *Biomaterials*. - 1993. - №14. – P. 1046-1050.
32. Шумилова А.А. Материалы для восстановления костной ткани / А.А. Шумилова [и др.] // *Сибирский Федеральный университет*. – 2014. – С. 209-221.
33. Николаева Е.Д. Биополимеры для клеточной и тканевой инженерии / Е.Д. Николаева // *Journal of Siberian Federal University*. – 2014. – Т. 2. - №7. – С. 222-223.
34. Иванов С.Ю. Разработка биоматериалов для остеопластики на основе коллагена костной ткани / С.Ю. Иванов [и др.] // *Клиническая стоматология*. – 2005. - №4. – С. 1-3.
35. Shi M. Antibiotic-releasing porous polymethylmethacrylate/ gelatin/antibiotic constructs for craniofacial tissue engineering/ M. Shi // *Journal of Controlled Release* – 2011. – P. 196–205.
36. Dutta P.K. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications / P.K. Dutta // *Food Chemistry*. – 2009. - № 114. - P. 1173–1182.
37. Lazaridou A. Biliaderis Thermophysical properties of chitosan, chitosan-starch and chitosan-pullulan films near the glass transition / A. Lazaridou // *Carbohydrate polymers*. – 2002. - № 48. - P. 179 - 190.
38. Романовская Д.П. Технология получения биополимера хитозана с высокой степенью химической чистоты / Д.П. Романовская // *Всероссийская олимпиада молодых ученых «Наноструктурные, волокнистые и композиционные материалы»*. – 2012. – С. 67.


39. Hazer, B. Preparation of poly(ethylene glycol) grafted poly(3-hydroxyalkanoate) networks / B. Hazer // *Macromol. Chem. Phys.*. 200. – 1999. – P. 1903-1907.
40. Arias, S. et al. Poly-3-hydroxyalkanoate synthases from *Pseudomonas putida* U: substrate specificity and ultrastructural studies [Электронный ресурс] / S. Arias et al. // *Microbial biotechnology*. – 2008. – Vol.1. – P. 170–176.
41. Gould, P. L. et al. Polymers for biodegradable medical devices. Hydroxybutyrate-valerate copolymers as non-disintegrating matrices for controlled release oral dosage forms / P. L. Gould et al. // *International Journal of Pharmaceutics*. 1997. – vol. 38, p. 231–237
42. Beisl S. Lignin from Micro- to Nanosize: Production Methods [Электронный ресурс] / S. Beisl [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – vol. 18. – №6. – P. 1244-1281.
43. Yang L. Nanotechnology controlled drug delivery for treating bone diseases / Lei Yang // *Expert opinion on drug delivery*. – 2013.
44. Zhang Zh. Injectable biomaterials for stem cell delivery and tissue regeneration / Zhanpeng Zhang // *Expert opinion on biological therapy*. – 2017.
45. Park S. Evaluation of poly(lactidoglycolic acid) plate and screw system for bone fixation / S. Park [et al.] // *The Journal of Craniofacial Surgery*. – 2013 - vol. 24 - P.1021–1025.
46. Chang P.C. Dual delivery of PDGF and simvastatin to accelerate periodontal regeneration in vivo / P.C. Chang [et al.] // *Biomaterials*. – 2013. – P. 9990-9997.
47. Jamal T. Formulation, antimicrobial and toxicity evaluation of bioceramic based ofloxacin loaded biodegradable microspheres for periodontal infection / T. Jamal [et al.] // *Current drug delivery*. – 2012. – Vol. 9. – P. 515-526.

48. Arias S. Poly-3-hydroxyalkanoate synthases from *Pseudomonas putida* U: substrate specificity and ultrastructural studies / S. Arias et al. // *Microbial biotechnology*. – 2008.- Vol.1,P. 170–176.
49. Luef K. P. Poly(hydroxy alkanoate)s in Medical Applications /K. P. Luef et al. // *Chem. Biochem. Eng. Q.* -2015.- vol.29, p. 287–297.
50. Singh M. *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates / M. Singh et al. // *Microb Cell Fact.* – 2009. P.17-33.
51. Волова, Т. Г. Физико-химические свойства полигидроксиалканоатов различного химического строения / Т. Г. Волова [и др.] // *Высокомолекулярные соединения*. – 2013. – Серия А. - Т. 55. - № 7. - С. 775–786.
52. Маркелова Н.М. Обоснование применения высокотехнологичных изделий медицинского назначения из биodeградируемых полимеров в реконструктивной хирургии / Н.М. Маркелова // -2013.
53. Shi X. A protein/antibiotic releasing poly(lactic-co-glycolic acid)/lecithin scaffold for bone repair applications / X. Shi // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2009. – P. 373.
54. Шишацкая, Е. И. Исследование лекарственной эффективности доксорубицина, депонированного в микрочастицы из резорбируемого «Биопластотана» на лабораторных животных с солидной формой карциномы Эрлиха / Е. И. Шишацкая [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2012. – Т.154. - №12.
55. Шахов В.П. Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей / В.П. Шахов [и др.] // - Томск:СТТ. - 2004: 141–2.

56. Волова, Т.Г. Биосовместимые полимеры / Т.Г. Волова [и др.] // Наука в России. – 2010. – № 1. – С. 4–8.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель магистерской
программы

 Волова Т.Г.
подпись Инициалы, фамилия
« 5 » волова 2019 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

06.04.01.09 - Фундаментальная и прикладная биология

БИОАКТИВНЫЙ КОМПОЗИЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ ПГА
ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ В СТОМАТОЛОГИИ

Руководитель



подпись, дата

д.б.н. профессор
Т.Г. Волова

Соруководитель



подпись, дата

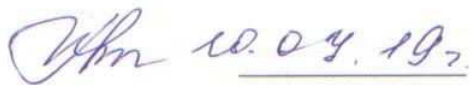
к.б.н. А.А. Шумилова

Выпускник

_____ 
номер группы, зачетной книжки подпись, дата

А.А. Федченко

Рецензент



подпись, дата

д.м.н. Н.М. Тюхтева

Красноярск 2019