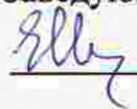


Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Е. И. Шишацкая

« 23 » июня 2017 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

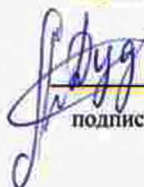
ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕРМАЛЬНОГО ЭКВИВАЛЕНТА НА БАЗЕ
БИОПОЛИМЕРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ

Научный руководитель

 28.06.17
подпись, дата

профессор, д.б.н. Е.И. Шишацкая

Выпускник

 28.06.17
подпись, дата

А.Е. Дудаев

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1. 1 Тканевая инженерия	6
1. 2 Материалы, используемые в тканевой инженерии	8
1. 2. 1 Природные полимеры.....	11
1. 2. 1. 1 Коллаген	12
1. 2. 1. 2 Фибрин.....	12
1. 2. 1. 3 Гиалуроновая кислота	13
1. 2. 1. 4 Альгинаты.....	13
1. 2. 1. 5 Хитозан	15
1. 2. 2 Синтетические полимеры	16
1. 2. 2. 1 Поликапролактон.....	19
1. 2. 2. 2 Полимерные гидрогели	20
1. 2. 2. 3 Поливиниловый спирт	21
1. 2. 3 Полигидроксиалканоаты	23
1. 3 Особенности тканевой инженерии мягких тканей.....	26
1. 3. 1 Кожа	27
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	31
2. 1 Объекты исследования	31
2. 2 Изготовление и стерилизация плёночных образцов	32
2. 3 Исследование физико-химических свойств полученных образцов.....	33
2. 4 Выделение и ведение клеточных культур.....	34
2. 4. 1 Эмбриональные фибробласты мышцы линии NIH 3T3	34
2. 4. 2 Кератиноциты человека	35

2. 4. 3 Мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани крысы	35
2. 5 Исследование абсолютного количества адгезированных клеток	36
2. 6 Исследование биосовместимости полученных плёночных образцов <i>in vitro</i>	37
2. 7 Окраска клеток флуоресцентным красителем DAPI.....	38
2. 8 Исследование биополимерных сферических частиц из полигидроксиалканоатов в качестве носителя для дермального эквивалента	38
2. 9 Статистическая обработка	39
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	40
3. 1 Конструирование полимерных плёночных образцов и исследование их физико-химических свойств	Ошибка! Закладка не определена.
3. 2 Выделение и ведение клеточных культур	Ошибка! Закладка не определена.
3. 2. 1 Эмбриональные фибробласты мышцы линии NIH 3T3	Ошибка! Закладка не определена.
3. 2. 2 Кератиноциты человека	Ошибка! Закладка не определена.
3. 2. 3 Мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани крысы ...	Ошибка! Закладка не определена.
3. 3 Исследование биосовместимости матриц <i>in vitro</i>	Ошибка! Закладка не определена.
3. 4 Исследование биополимерных сферических частиц из полигидроксиалканоатов в качестве потенциального материала для создания дермального эквивалента	Ошибка! Закладка не определена.
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	Ошибка! Закладка не определена.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	40
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	42

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время медицина сталкивается с рядом трудностей, в частности трансплантация органов и тканей – одна из насущных её проблем. По оценке экспертов, реальная потребность в трансплантации органов в России составляет в год не менее 11 000 трансплантаций почки; 2000 – печени; 1100 – сердца (включая комплекс «сердце–легкие»); 800 – легких; 300 – поджелудочной железы [1].

Для трансплантации используются донорские органы, ксеногенные протезы, изготовленные из органов животных, и, наконец, трансплантаты из синтетических полимерных материалов. При этом имплантаты природного происхождения имеют ряд существенных недостатков, среди которых проблемы, связанные с иммунологической совместимостью, изменением размеров трансплантата со временем и возможным несовпадением размеров трансплантата и заменяемого органа, а также трудности с получением и хранением донорского материала. Искусственные имплантаты лишены некоторых из этих недостатков и позволяют восстановить утраченные органы и ткани.

Имеющиеся на сегодня искусственные имплантаты отличаются по механическим свойствам от природных; кроме того, они плохо интегрируются в ткани пациента и на их поверхности не формируется нормальный клеточный слой. Несмотря на немалый прогресс в создании материалов для протезирования за последние пятьдесят лет, таких как дакрон или политетрафторэтилен, возможности этих материалов на сегодняшний день практически исчерпаны.

Также одной из наиболее важных и сложных проблем современности являются злокачественные опухоли. В проблеме злокачественных опухолей

важны как изучение этиологии и патогенеза, так и разработка новых методов лечения и реабилитации. При этом роль медицинской реабилитации в решении многих проблем онкологии существенно возросла. Это связано с внедрением новых технологий в медицинскую практику. Одним из наиболее перспективных и результативных направлений современной биомедицины является тканевая инженерия. Огромный интерес как в практическом отношении, так и в научном плане представляют культивирование, ауто- и аллотрансплантация выращенных вне организма клеток, формирование тканеинженерных конструкций (ТИК) с целью восстановления пораженных тканей.

С развитием тканевой инженерии одним из перспективных направлений для замещения тканей является создание клеточных графтов из биodeградируемых материалов в сочетании с донорскими клетками, способных восстанавливать поврежденный орган или ткань. Однако для успешной индукции пролиферации и дифференцировки в месте имплантации необходимо создать высокую начальную концентрацию клеток, поэтому возникает необходимость поиска адекватного носителя для закрепления трансплантируемых клеток в организме реципиента. Среди материалов, разрабатываемых и исследуемых применительно к этим задачам, – полигидроксиалканоаты (ПГА), линейные полиэфиры микробиологического происхождения, являются наиболее перспективными. ПГА представляют большой интерес для создания тканеинженерных конструкций в связи с их высокой биосовместимостью, медленной биodeградацией и механической прочностью.

В матриксы из ПГА могут быть депонированы биологически активные вещества, что позволяет реализовать наиболее комплексный подход в тканевой инженерии, включающий три компонента: клетки, каркасы, сигналы [2]. Эти свойства позволяют ПГА найти применение в широком спектре областей тканевой инженерии, связанных с восстановлением сердечно-сосудистой системы, поджелудочной железы и пищеварительной системы, почек и

мочеполовой системы, опорно-двигательного аппарата, нервной системы, роговицы, зубов, кожи и т.д.

Особый интерес представляют материалы на основе хитозана – полисахарида, продукта деацетилирования хитина [3]. Пористые хитозановые матрицы используют как биосовместимые, биорезорбируемые и биоадгезивные изделия в медицинских и фармацевтических целях, в том числе в разных имплантационных системах [4]. Их применяют также при обработке ран, при регенерации мягких тканей [5], как гемостатические агенты с антитромбогенными свойствами [6] и как стимуляторы иммунной системы против вирусной и бактериальной инфекций [7].

Цель работы – разработка и изучение физико-химических и биологических свойств носителей на основе ПГА и хитозана в разных процентных соотношениях применительно к задачам тканевой инженерии.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- изготовить плёночные образцы методом полива раствора из ПГА и хитин-содержащего биологического соединения и методами распылительного высушивания и испарения эмульсии;
- исследовать физико-химические свойства полученных образцов;
- оценить биосовместимость полученных плёночных образцов в культурах клеток животных.

Работа выполнена в Инновационном биомедицинском центре на базе «Сибирского Федерального Университета».

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. 1 Тканевая инженерия

Новые возможности для восстановления поврежденных органов и тканей предоставляет быстро развивающееся междисциплинарное направление — тканевая инженерия. Основные принципы этого подхода заключаются в разработке биоинженерных конструкций на основе комплекса клеток, факторов роста и материалов различной природы с целью их последующей трансплантации в организм пациента для замены поврежденных тканей [8, 9].

Совершенно очевидно, что использование ТИК должно быть четко аргументировано в зависимости от характера, типа и локализации повреждения. В связи с этим, накопленный в настоящее время достаточно обширный материал нуждается в дальнейших экспериментальных и клинических подтверждениях эффективности конструкций и выработке четких показаний к их использованию. Одним из требований к пластическому материалу является тканеспецифичность, отсутствие токсичности, высокий регенераторный потенциал и формирование органоспецифической ткани в зоне трансплантации [10].

Основным преимуществом пересадки тканеинженерных органов или их частей перед любой другой трансплантацией является полное отсутствие необходимости иммуносупрессии в послеоперационном периоде и рисков отторжения трансплантата.

В свою очередь, ТИК делятся на два принципиально разных вида медицинских продуктов: — имплантаты из «нежизнеспособных» биологических тканей, к которым, например, относятся биоклапаны сердца, биопротезы кровеносных сосудов — медицинские изделия; — системы, состоящие из биостабильного или биodeградируемого матрикса, жизнедеятельных стволовых или тканеспецифических аутологичных или аллогенных клеток и (или) биоактивных молекул (цитокины, факторы роста и др.) — клеточные продукты.

В качестве клеточного компонента биоинженерных конструкций тканей наиболее перспективными являются мезенхимальные стволовые клетки (МСК), способные к направленной мультилинейной дифференцировке в клетки кости, хряща, жира и др. [11]. Свойствами МСК также являются адгезивность, высокий пролиферативный потенциал и определенный иммунофенотип. МСК могут быть изолированы из различных источников, таких как костный мозг, жировая и мышечная ткани, дерма, периферическая и кордовая кровь. Клеточная компонента отвечает за генерацию новой ткани, синтезируя внеклеточный матрикс (ВКМ), являющийся залогом синтеза здоровой функциональной ткани. Однако для создания ТИК используются как недифференцированные, так и зрелые дифференцированные клетки – хондроциты, фибробласты, кератиноциты.

Сущность тканевой инженерии состоит в разработке и изготовлении биоинженерных каркасов (скаффолдов) и последующей их имплантации пациенту (в бесклеточном варианте или предварительно заселенных необходимым пулом клеток) с целью возмещения дефекта и стимуляции регенерации поврежденной структуры ткани. Ключевая проблема заключается в обеспечении последовательного и полного ремоделирования ТИК в собственную ткань. Это требует предсказуемых управляющих воздействий на процессы заселения, пролиферации, дифференцировки и адекватной фенотипической экспрессии клеток в веществе скаффолда и будущего матрикса собственной ткани. Одним из ключевых подходов к такому управлению является планирование и изготовление скаффолда с заранее заданным комплексом этих свойств [12, 13, 14]. На сегодняшний день имеется достаточно широкий спектр материалов, пригодных для изготовления скаффолдов. Основными требованиями, которые предъявляются к этим материалам, являются: отсутствие цитотоксичности, воспалительного и иммунного ответа на материал; поддержание адгезии, фиксации, пролиферации и дифференцировки клеток; биорезорбируемость обычными метаболическими путями; наличие способностей к самовосстановлению, изменению строения и

свойств в ответ на факторы окружающей среды, включая механические нагрузки [15, 16, 17].

1. 2 Материалы, используемые в тканевой инженерии

Материал носителя изначально обеспечивает механическую стабильность и служит образцом для трехмерного роста клеток. Взаимодействие этих двух компонент, в частности координация между скоростью разрушения полимера и роста клеток, является принципиально важной для успешной реконструкции тканей. Одной из ключевых задач, которые необходимо решить для успешной реконструкции тканей, стала разработка подходящих структур (носителей), которые обеспечили бы клеткам необходимую поддержку, чтобы те могли делиться и поддерживать свой дифференцированный фенотип, а также позволили бы пересаживать их обратно пациентам [18].

Помимо клеток любая ткань содержит ВКМ. Основная роль ВКМ в развитии ткани – это роль физиологического субстрата для прикрепления клеток. Более того, некоторые клетки, особенно соединительных тканей, растут только тогда, когда прикреплены и распластаны по твердому субстрату. Клетки растут и распластаются *in vivo* либо за счет отложения нового ВКМ, либо прикрепляясь к экзогенному ВКМ. Аналогично, клетки, отделенные от ВКМ, быстро теряют жизнеспособность и подвергаются запрограммированной клеточной смерти, например, апоптозу.

Поэтому один из ключевых элементов тканевой инженерии – умение имитировать естественные носители, которые в норме служат для организации клеток в ткани. Выбор полимера является жизненно важным фактором для успеха ТИК. Внеклеточный матрикс выполняет функцию каркаса, поддерживающего изначальную архитектуру ткани, и обеспечивает регенерацию ранее существовавших структур. Было показано [19], что упорядоченное обновление ткани, возникающее после повреждения или старения, достигается в присутствии нерастворимых каркасов ВКМ.

Следовательно, для успешной реконструкции органа или ткани необходимо выбрать подходящий носитель, который помогал бы реплицировать ВКМ, а также поддерживал бы и направлял процесс регенерации ткани. ВКМ – это композитная субстанция, состоящая из разнообразных макромолекул, которые можно разделить на 4 основных класса, каждый из которых отвечает за специфические характеристики ВКМ. Это коллагены, протеогликаны, гликопротеины межклеточного взаимодействия и эластические волокна [20, 21]. Хотя все ВКМ обладают этими общими компонентами, организация, форма и механические свойства ВКМ в различных тканях могут сильно различаться в зависимости от химического состава и трехмерной организации присутствующих специфических компонент.

Коллагены – самые широко распространенные белки в организме, и в основном играют структурную роль. Протеогликаны – сложные макромолекулы, каждая из которых состоит из сердцевинного белка с одним или несколькими ковалентно присоединенными линейными полисахаридными цепями, называемыми глюкозаминогликанами (ГАГ) [22]. Протеогликаны, например, гиалуроновая кислота, встречаются, как в клетке, так и на ее поверхности. Эти молекулы способны ассоциировать между собой, образуя запутанные сетки, удерживающие большое количество воды, обладающие упругостью и в то же время легко деформируемые. Благодаря своим упругим свойствам, протеогликаны организуют пространство, в котором клетки могут двигаться, проходить дифференцировку, а также создавать новый матрикс.

Гликопротеины межклеточного взаимодействия – белки, содержащие специфические последовательности аминокислот, узнаваемые рецепторами на поверхности клеток. Эти полипептидные последовательности часто выступают в роли сигналов узнавания сайтов адгезии и могут обеспечивать специфичность для данного типа клеток. Адгезия клеток является ключевым фактором в организации клеток в ткани и поддержания целостности ткани. Чтобы создать нормальную ткань, клетки должны образовать трехмерную структуру, для этого они должны прикрепляться не только друг к другу, но и к структуре,

выполняющей функцию поддерживающего носителя. Последняя компонента ВКМ – эластическое волокно, придает системе гибкость [23].

Полимерные матрицы, имитирующие ВКМ, разрабатывают для того, чтобы контролировать и направлять регенерацию тканей, вызывать специфические клеточные взаимодействия и реакции. Кроме того, они служат в качестве носителей, поддерживающих клетки при трансплантации.

Каким должен быть идеальный носитель? Требования к материалу носителя, подходящего для тканевой инженерии, сложны и во многих случаях между исследователями нет согласия относительно специфических требований для конкретного приложения. Они зависят от реконструируемой ткани, расположения и размера восстанавливаемого дефекта. Тем не менее, можно выделить несколько общих свойств материала носителя:

а) выбранный полимер должен иметь биосовместимую и биоразлагаемую матрицу, что гарантировало бы переносимость (отсутствие иммунной или аллергической реакции) организмом как изделия, так и продуктов его распада;

б) контролируемая кинетика разрушения, так как различные ткани восстанавливаются с разной скоростью, скорость распада должна регулироваться;

в) химия поверхности, подходящая для прикрепления, пролиферации и дифференцировки клеток, так как деятельность большинства клеток зависима от прикрепления к субстрату;

г) матрица должна иметь систему межсвязных пор соответствующего размера и морфологии, что способствовало бы диффузии клеток и питательных веществ и оттока отходов. Поры малого диаметра дают наилучшее отношение поверхности к объему, однако они должны быть больше, чем размер клеток (≈ 10 мкм). Не существует единого мнения относительно размера пор, оптимального для прорастания клеток, но считается, что это зависит от типа ткани;

д) механические свойства должны соответствовать месту имплантации, так на начальном этапе носитель должен обеспечивать механическую

стабильность и служить образцом, направляющим рост клеток в трех измерениях;

е) возможность придания необходимой формы, которая поддерживалась бы и после имплантации;

ж) простота стерилизации либо при высоких температурах, либо в этиленоксиде, либо гамма-излучением [24].

Клеточная адгезия – это очень важный фактор, играющий роль в формировании тканей и органов, и генерации тяги для миграции клеток; она также важна при определении биосовместимости материала синтетического импланта. При адгезии животных клеток, клетки сначала прикрепляются к поверхности, выбрасывая псевдоподии. Затем клетки распластываются и образуют фокальные контакты. Обе стадии включают в себя обследование поверхности в поисках белковых лигандов.

Таким образом, специфические взаимодействия клетка-поверхность и клетка-клетка происходят посредством молекул рецепторов, имеющих внеклеточный домен на поверхности клетки, с которыми связываются адсорбированные или водорастворимые белки, или полипептидные лиганды. Адгезивные белки могут служить мостиками между клеткой и искусственной поверхностью.

1. 2. 1 Природные полимеры

Природные полимеры, такие как коллаген и гиалуроновая кислота, являются основными компонентами ВКМ и облегчают прикрепление и рост клеток. Поэтому первой идеей явилось получение искусственных матриц на их основе.

1. 2. 1. 1 Коллаген

Коллаген может быть приготовлен в виде раствора или сформирован в нити, губки или гидрогели. Несмотря на то, что его получают из чужеродных источников, использование методов очистки позволяет почти избежать иммунного ответа. Прикрепление клеток к коллагену происходит за счет белков интегринов, узнающих определенный мотив Arg-Gly-Asp (RGD) последовательность. Прикрепление к этому естественному субстрату и связанные с ним сигналы внутри клетки приводят к улучшению метаболизма клетки, пролиферации, долгожительству и сохранению дифференцированного состояния. Бесклеточные матрицы получают путем комбинированной ферментативной и детергентной обработки тканей, богатых коллагеном, таких как сердечные клапаны свиньи или подслизистой тонкого кишечника (SIS). Обработка убирает все клетки и потенциально антигенные белки, остается только коллаген и эластин с небольшим количеством ассоциированных полисахаридов ВКМ. Недостаточность механической прочности и сроки биодеградации коллагеновых гелей можно компенсировать за счет сшивок, например, при помощи глутарового альдегида [25]. В организме коллаген встречается в комплексе с полисахаридами ВКМ (ГАГ). Комплекс образован как электростатическими, так и ковалентными связями, наиболее важна их роль в базальной мембране и связках. Путем лиофильной сушки из них получают пористые структуры. Конструкции стабилизируют сшивками. Такие конструкции используют для регенерации кожи, и изучают на предмет восстановления связок.

1. 2. 1. 2 Фибрин

Фибрин – белок, образующий кровяные сгустки, обычно используют в виде клея или гидрогеля, который может осуществлять контролируемую

доставку факторов роста, и имеет сродство к гепарину. К образованию фибрина приводит ферментативное расщепление растворимого фибриногена, белка плазмы крови, спонтанно полимеризующегося при физиологических условиях. В результате получается мягкий гель, годный для роста и функционирования клеток.

Преимущества фибрина в том, что он коммерчески доступен и уже был использован многими хирургами в клинических условиях. Однако на начальном этапе он имеет низкую механическую жесткость, и вряд ли подойдет там, где требуется большая механическая нагрузка[26].

1. 2. 1. 3 Гиалуроновая кислота

Гиалуроновая кислота (ГК) – один из основных компонентов ВКМ, специфично связывает белки ВКМ и белки на поверхности клеток. Гиалуронан оказывает стимулирующий эффект на секрецию матрикса клетками. Недавно описали синтез гиалуронана, модифицированного метакрилатом, способного при смешивании с фотоинициатором *in situ* образовывать стабильный гидрогель под действием света. По своим механическим свойствам и способности поддерживать рост клеток и секрецию матрикса *in vitro* такой гидрогель был сходен с остальными.

Свойства гиалуронановых гидрогелей можно легко модифицировать, меняя количество гиалуронана, степень модификации (метакрилирования), плотность сшивки, химическую природу модификатора, а также путем добавления специальных функциональных компонент, например, пептидов клеточной адгезии, содержащих RGD и факторы роста [27].

1. 2. 1. 4 Альгинаты

Альгинаты – это полисахариды, получаемые из морских водорослей и принадлежащие к семейству линейных сополимеров маннуриновой и

гулурановой кислот. При добавлении к ним двухвалентных катионов, например, кальция, альгинаты образуют нерастворимый гидрогель. За гелеобразование в альгинатах отвечают ионные взаимодействия, поэтому оно полностью обратимо при хелатировании двухвалентного катиона, используемого для получения геля. Недавно альгинаты начали использовать в качестве материала для пересадки клеток различных типов. Из альгинатов делают и капсулы для пересадки клеток поджелудочной железы.

К плюсам альгинатных гидрогелей относятся нетоксичность, простота в обращении и минимальная воспалительная реакция со стороны организма. Альгинаты дают минимальный иммунный ответ, хотя возможно присутствие загрязнений, вызывающих иммунную реакцию и разрастание фиброзной ткани. Как и у большинства гидрогелей, их механическая жесткость достаточна для задач, в которых не требуется приложение большой нагрузки, или для имплантации после культивирования *in vitro* и *in vivo* в течение нескольких недель, но в средах с большими напряжениями, например, несущих нагрузку суставах их изначальная хрупкость представляет проблему.

Исследователи изучали модификации альгината, которые позволили бы более точно контролировать его механические свойства и скорость разрушения. Были испробованы [28] такие стратегии, как подбор молекулярной массы полимерных цепей, образующих гидрогель, частичное окисление для образования в полисахаридной цепи точек, где возможен гидролиз, и функционализация остатков в полисахаридной цепи для получения ковалентных сшивок и придания материалу более предсказуемых механических характеристик и кинетики разложения. Эффективным оказалось и высевание гепатоцитов на трехмерный альгинатный гель с размером пор 100-150 мкм. Гепатоциты не пролиферировали, но агрегировали (как и положено), т.к. альгинат имеет гидрофильную поверхность и адгезия слабая.

1. 2. 1. 5 Хитозан

Хитозан – наиболее хорошо изученный природный биоразрушаемый полимер. Это биологический материал представляет интерес в связи с его биологической совместимостью, биоразрушаемостью и биологической активностью [29]. Хитин и хитозан – кристаллические полимеры, нерастворимые в воде при pH выше 7, их степень кристалличности зависит от степени деацетилирования. Полностью кристаллическую структуру имеют хитин и хитозан со степенью деацетилирования 100%. Наименьшую степень кристалличности – при промежуточных значениях деацетилирования. Благодаря положительному заряду поверхности и биосовместимости считается, что хитозан может эффективно поддерживать работу, деление и дифференцировку клеток без использования добавок, даже *in vitro*. Хитин и хитозан разрушаются лизоцимом, который медленно деполимеризует полисахариды [30]. Одно из наиболее многообещающих свойств хитозана – его великолепная способность образовывать пористые структуры для использования при трансплантации клеток и регенерации тканей. Пористые структуры из хитозана получают путем замораживания и лиофильной сушки. Во время высушивания образуются кристаллы льда, растущие по направлению температурного градиента. Соли хитозана исключаются из объема льда, затем кристаллы испаряются при лиофильной сушке. Размер пор можно контролировать за счет скорости высушивания. Направление пор можно регулировать за счет температурных градиентов. При растворении хитозана в уксусной кислоте получают соли ацетат хитозана. Перед следующим смачиванием кислотную составляющую удаляют, например, путем нейтрализации и регидратации в щелочном растворе аммония или NaOH. Механические свойства таких носителей в основном зависят от размера и ориентации пор. Более медленное замораживание приводит к образованию бо́льших пор и более кристаллической (и жесткой) фазы [31].

Скорость биологического разрушения хитозана определяется легко контролируемым параметром – количеством остаточных ацетильных групп. Зашелачивание водного раствора хитозана до значения pH более 6.2 приводит к преципитации гидрогеля под действием ионных сил. Путем смешивания хитозана с фосфоглицерином получили термочувствительный гидрогель, жидкий при комнатной температуре и физиологических значениях pH, и образующий гель при температуре тела.

Хитозан представляет собой многообещающий носитель для реконструкции тканей. На его свойства *in vivo* непосредственно влияет химический состав. При повышении степени деацетилирования хитозана, время его пребывания *in vivo* увеличивается, а вызываемая им воспалительная реакция ослабевает. Будучи поликатионом, хитозан естественным образом прикрепляется к биологическим тканям, имеющим, как правило, отрицательный заряд на поверхности. Это может служить объяснением того, что хитозан задерживался в месте суставного повреждения, несмотря на подвижность незафиксированного сустава и недостаточную начальную жесткость хитозана. Кроме того, препараты хитозана не содержат потенциально токсичных сшивающих агентов или органических растворителей, что снижает токсическую опасность для заключенных клеток или организма хозяина [32, 33].

1. 2. 2 Синтетические полимеры

Хотя природные биоматериалы хорошо имитируют естественную для клеток среду, при выделении из тканей образцы существенно различаются по свойствам, а также обладают ограниченными возможностями при создании устройств с заданными биомеханическими свойствами. Также они имеют практически неконтролируемое время разложения. По этой причине чаще используют синтетические полимеры, так как они позволяют лучше контролировать физико-химические свойства носителя и кинетику доставки. К

синтетическим полимерам, чаще всего используемым для создания носителей для реконструкции тканей, относят алифатические полиэфиры, полученные путем полимеризации лактонов, например, полимолочную кислоту, полигликолевую кислоту, поликапролактон и их сополимеры. Биоразлагаемые импланты разлагаются путем гидролиза и/или под действием ферментов, образуя метаболиты, совместимые с тканями, которые потом поступают в циклы утилизации углеводов или белков. В конце концов продукты распада, такие как вода и двуокись углерода (CO_2) будут выведены с мочой или фекалиями, или выдохнуты [34].

Серьезным недостатком таких полимеров является то, что при разложении, потеря массы сопровождается высвобождением кислых побочных продуктов, приводящих к воспалительным реакциям *in vivo*.

Первые синтетические полимеры получали путем модификации бытовых пластиков, таких как полиэтилен, полиуретан и силиконовые резины. Хотя такие синтетические полимеры были с успехом использованы при реконструкции тканей, они не разрушаются биологическим путем, не резорбируются и навсегда остаются в ткани. Хотя такой подход и не является неприемлемым при имплантации реконструированного продукта, тем не менее, при разработке биоразлагаемых полимеров были оценены преимущества полимерных материалов, разрушаемых биологическим путем.

Первыми синтетическими биоразлагаемыми полимерными носителями, предназначенными для высевания клеток и регенерации тканей, стали представители семейства поли(α -гидроксикислот), таких как уже знакомые нам поли(молочная кислота) (ПМК), или полилактат, поли(гликолиевая кислота) (ПГК) и сополимер поли(молочная-со-гликолевая кислота) (ПМГК). Полимеризацию проводят по методу открытого кольца в присутствии органометаллических катализаторов, например октоата олова. ПГК – это линейный алифатических полиэфир, имеющий высокую степень кристалличности и высокую температуру плавления, а также низкую растворимость в органических растворителях. Однако, благодаря своей

гидрофильности, он быстро разлагается в воде. Лактид, используемый для получения ПМК – циклический димер, существующий в виде двух оптических изомеров, d и l. В природе встречается l-lactide, а dl-lactide это синтетическая смесь d-lactide и l-lactide [35]. Гомополиер l-lactide (LPLA) имеет полукристаллическое строение. Такие материалы имеют высокую прочность на растяжение и небольшое относительное удлинение, у них высокий модуль упругости, что делает их более подходящими для случаев, требующих приложения нагрузки – хирургических нитей и фиксаторов. Поли(dl-lactide) (DLPLA) аморфный полимер со случайным распределением изомеров, и, следовательно, не может образовывать кристаллические области. Этот материал имеет меньшую прочность, более высокое удлинение, и гораздо более короткое время деградации. Poly(l-lactide) имеет степень кристалличности 37%, температуру плавления 175-178°C и температуру стеклования 60-65°C. Скорость распада LPLA гораздо ниже, чем у DLPLA, полная резорбция происходит более чем за 2 года. Сополимеры l-lactide и dl-lactide готовят для того, чтобы нарушить кристаллическую упаковку l-lactide и ускорить разложение. Обычно эфирные связи в поли(гидрокси кислотах) расщепляются путем гидролиза, что приводит к уменьшению молекулярного веса полимера. Такое начальное разложение продолжается до тех пор, пока молекулярный вес не снизится до 5000, после чего начинается разрушение клеткой. Окончательное разложение и резорбция имплантов из поли(гидрокси кислот) осуществляется клетками иммунной системы, макрофагами и лимфоцитами. Скорость распада определяется доступом воды к эфирной связи, а не внутренней скоростью распада эфира. Доступ воды к эфирной связи зависит от совместного влияния ряда характеристик полимера: температуры стеклования, степени кристалличности, молекулярного веса, гидрофобности мономерного звена и размера образца.

ПГК оказывается привлекательной биоразлагаемой подложкой, благодаря относительно высокой скорости биологического разрушения, в результате которого освобождается место для ВКМ, а воспалительная реакция сводится к

минимуму. Однако ПГК обладает довольно низкой прочностью, что делает непрактичным его применение для трансплантации. ПМК – более прочный материал, но из-за дополнительной метильной группы в основной цепи, он разлагается медленнее. В результате имплант дольше задерживается в ране, и полость заполняется хрящевым матриксом гораздо медленнее, что может привести к возникновению более сильной иммунной реакции.

Сополимеризацию используют и в тех случаях, когда гомополимер сам по себе не обладает всеми физическими и химическими свойствами, необходимыми для данного приложения. Сополимеры ПМК и ПГК (ПЛГК) были получены при попытке синтезировать полимеры, которые имели бы более короткое время поглощения, чем ПМК, и в то же время аморфную структуру. Это удалось, и возможность подогнать зависимости поглощения от времени для ПМК и ПГК сделала эти полимеры желательными для создания носителей. Было обнаружено, что клетки размножаются и выделяют ГАГ в пористой сетке ПГК и пенах ПМК. Однако при нахождении в теле более 12 недель ПМК и ПГК вызывают воспалительную реакцию. Это происходит в результате высвобождения кислых продуктов распада, таких как молочная и гликолевая кислоты.

1. 2. 2. 1 Поликапролактон

Поликапролактон (ПКЛ) – еще один полимер, используемый в качестве биоразлагаемого носителя для тканей. ПКЛ – алифатический полиэфир, разлагаемый путем гидролиза при физиологических условиях. Он также может быть разрушен путем ферментативной поверхностной эрозии. Фрагменты ПКЛ с низким молекулярным весом поглощаются макрофагами и разлагаются внутри клеток. Из-за длинного метиленового скелета ПКЛ разлагается гораздо медленнее, чем ПМК и ПГК. ПКЛ обладает низкой температурой плавления и низкой температурой стеклования, что делает его резиноподобным при комнатной температуре.

1. 2. 2. 2 Полимерные гидрогели

Полимерные гидрогели часто используют в тканевой инженерии, так как они менее инвазивны, чем твердые полимерные конструкции. Полиэтиленоксид (ПЭО) – это синтетический полимер, часто используемый при реконструкции хряща. Форма ПЭО с низкой молекулярной массой известна, как полиэтиленгликоль (ПЭГ). Путем его модификации, например акрилатом (ПЭГ-диакрилат), можно получить фотосшивающийся полимер, образующий твердый гидрогель под действием света. В такой фотополимер можно помещать клетки и факторы роста. Фотополимеризирующиеся полимеры представляют существенный интерес для тканевой инженерии, так как они подходят для задач, где требуется минимальное вмешательство, и открывают возможности точного контроля процесса образования реконструируемых тканей. Увеличивая молекулярный вес центрального сегмента ПЭГ, можно управлять набуханием гидрогеля, получая материалы, от твердых до очень гибких. Состав биоадсорбируемого сегмента также определяет время биологической абсорбции. ПЭГ практически не взаимодействует с белками. Скорость деградации можно варьировать в интервале от дней до недель и месяцев, соответственно путем введения гликолата, лактата или триметиленкарбоната [36].

Плюс гидрогелей в том, что они держат воду и биоактивные молекулы (факторы роста и т.д., не инактивируя их). Набухание гидрогелей способствует равновесию с окружающей тканью и позволяет обмен водой и метаболитами с тканевой жидкостью. Вязкоупругие свойства, низкое поверхностное натяжение по отношению к биологическим жидкостям делают их подходящими для тканевой инженерии.

Недостаток гидрогелей, как класса, в том, что они обладают слабой механической жесткостью, особенно непосредственно после заключения в них клеток, и при помещении в среду, на которую приходится большая нагрузка.

Поскольку существует такое огромное количество гидрогелей, которые потенциально можно использовать в тканевой инженерии, а путем их структурных и функциональных модификаций можно получить еще больше вариантов, метод проб и ошибок при выборе материала и структуры геля вряд ли даст оптимальные результаты за разумное время и ценой приемлемых затрат. Потребуется рациональный подход к разработке материала с точки зрения, как механических свойств, так и его способности поддерживать рост и работу клеток. Важной частью этих усилий станет нахождение корреляции между микроструктурными, биохимическими, гистологическими и механическими свойствами гидрогелей и полученных из них тканей.

1. 2. 2. 3 Поливиниловый спирт

Поливиниловый спирт (ПВС) образует гидрогели за счет ковалентных сшивок в присутствии глутарового альдегида в кислой среде. Однажды полимеризовавшись, он оказывается принципиально неразрушаемым *in vivo*, хотя фотополимеризуемый гель на основе ПВС, который можно разрушить, и был описан. Основное преимущество ПВС в том, что он образует относительно прочный, упругий и гибкий гидрогель, имеющий множество функциональных групп для связывания пептидов, факторов роста и молекул, отвечающих за адгезию. Так синтезировали гель из ПВС, ковалентно модифицированный фибронектином, и изучали прикрепление и пролиферацию фибробластов на этой матрице. На модифицированном гидрогеле прикрепление фибробластов существенно улучшилось по сравнению с немодифицированным ПВС, а пролиферация была сильнее, чем в культуре, выращенной на полистироле. Однако для полимеризации ПВС в гели требуются условия и реагенты, не позволяющие использовать его *in situ* [37].

1. 2. 3 Синтетические самоорганизующиеся пептиды

Синтетические самоорганизующиеся пептиды нового типа самопроизвольно образуют гидрогели в ответ на изменения рН и/или ионной силы. Для структуры пептидов такого типа характерна самокомплиментарная структура, состоящая из регулярно повторяющихся единиц, образованных положительно и отрицательно заряженными остатками, между которыми находятся гидрофобные остатки. Такие пептиды самоорганизуются при специфических значениях рН и ионной силы, образуя β -складки, которые затем агрегируют с образованием гидрогеля, состоящего из переплетенных нанопибрил. Уникальным свойством этих гидрогелей является их фибриллярная микроструктура, масштаб которой примерно на три порядка мельче, чем у полимерных гидрогелей.

Разнообразие возможностей создания пептидных гидрогелей почти не ограничены, поскольку можно варьировать последовательность и состав входящих в него пептидов. В пептид можно легко встроить функциональный домен, например, последовательность клеточной адгезии RGD.

Часто используют и инъектируемые полимеры, так как они могут заполнять дефекты нерегулярной формы и минимизировать хирургическое вмешательство. В идеале инъектируемые полимеры должны полимеризоваться *in situ* без побочных эффектов для окружающих тканей, таких как повышение температуры. Один из таких полимеров это поли(пропиленфумарат), ненасыщенный линейный полиэфир, имеющий подходящие механические свойства и разлагающийся на нетоксичные побочные продукты. Путем фотополимеризации с использованием шаблонов из него и его смесей с диэтилфумаратом получают структуры, морфологически сходные с губчатой костью, перспективные на предмет реконструкции кости [38].

1. 2. 3 Полигидроксиалканоаты

Существует мнение, что наилучший биоразлагаемый полимер для биомедицинских приложений можно будет получить путем создания новых биоматериалов, сочетающих в себе полезные свойства синтетических и природных полимеров. Такие полимеры можно разрабатывать в определенном виде и менять их свойства, подбирая синтетическую компоненту, метод обработки, встраивания дополнительных и усиливающих компонент[39].

Один из перспективных классов полимеров – ПГА – биосовместимые и биodeградируемые полиэфиры микробиологического происхождения, физико-химические свойства которых в зависимости от состава могут существенно варьировать [40, 41]. Благодаря своим ценным свойствам, ПГА перспективны для применения в различных сферах – в том числе медицине и фармакологии.

Исследования ПГА активно ведутся в США, Скандинавии и Европе, России, Японии, Китае, Германии и Голландии. Первым всесторонне изученным ПГА был поли-3-гидроксибутират (П(3ГБ)). В настоящее время известно свыше 100 различных ПГА.

ПГА по физико-химическим свойствам сходны с широко применяемыми синтетическими полимерами, такими как полиэтилен. Однако ПГА обладают оптической активностью, антиоксидантными свойствами, пьезоэлектрическим эффектом, биоразрушаемостью и биосовместимостью [42]. ПГА широко варьируют по структуре и свойствам в зависимости от физиолого-биохимических свойств микроорганизмов-продуцентов, условий культивирования и типа углеродного субстрата, что позволяет иметь целый спектр материалов с различными физико-механическими свойствами, пригодными для различных задач.

Благодаря линейной структуре молекул ПГА термопластичны, что позволяет получать из них разнообразные изделия с использованием различных методов, в то время как переработка большинства широко используемых в

настоящее время синтетических пластиков требует применения различных добавок.

Свойства ПГА определяются их строением и, прежде всего, зависят от строения боковых групп в полимерной цепи, а также от расстояния между эфирными связями в молекуле. Как правило, ПГА с короткими боковыми группами более кристалличны, в то время как ПГА с длинными боковыми группами являются эластомерами [43].

Первым среди выделенных и наиболее полно изученным ПГА является П(ЗГБ). Это гомополимер D(-)-3-β-оксимасляной кислоты, изотактический полиэфир с регулярными, повторяющимися единицами.

В отличие от сложных синтетических полиэфиров, П(ЗГБ) – это оптически активный полимер, который образует спирали в растворе. Он представляет собой бесцветное полукристаллическое гидрофобное вещество. Плотность аморфной фазы П(ЗГБ) составляет 1.177 г/см³, кристаллической – 1.23–1.26 г/см³, при этом кристаллическая фаза доминирует над аморфной.

В зависимости зависит от типа используемого продуцента, условий биосинтеза, а также метода экстракции полимера из биомассы и применяемых при этом растворителей молекулярная масса П(ЗГБ) может составлять от нескольких сотен до миллионов дальтон с полидисперсией от 2.3 до 3.2. Молекулярная масса полимера определяет технологические свойства материала и возможности его переработки. Установлено, что механическая прочность П(ЗГБ) существенно уменьшается, если его молекулярная масса составляет менее 400 000 Da, так при низких значениях параметра (M_w 200 000 Da) полимер очень хрупкий.

Гомогенный П(ЗГБ) по механическим свойствам сходен с полипропиленом и полистерином, однако обладает лучшими газобарьерными свойствами (например, по отношению к кислороду) и большей устойчивостью к ультрафиолету, характеризуется также хорошей водостойкостью и теплоустойчивостью. По механическим свойствам П(ЗГБ) аналогичен пополиэтилентерефталату, однако, он менее гидрофобный.

Вторым по изученности ПГА является сополимер гидроксibuтирата с гидроксивалератом (П(ЗГБ/ЗГВ)). Механические свойства П(ЗГБ/ЗГВ) в зависимости от состава существенно изменяются. С увеличением доли оксивалерата материал становится менее кристаллическим и более эластичным, снижаются значения температуры плавления ($T_{пл}$) и деградации ($T_{дегр}$). Четкой связи между химическим составом ПГА и величиной M_w не установлено.

Одно из наиболее ценных свойств ПГА – их способность разрушаться до конечных продуктов в различных биологических средах. ПГА могут разрушаться не только под воздействием температуры, но в результате кислотного и щелочного гидролиза, а также под биологическим путем, под воздействием ферментов – деполимераз. При термальном разложении происходит случайное разделение полимера. При гидролизе ПГА разлагаются, как обычные эфиры. Биологическая деградация ПГА происходит гидролитически под воздействием специфических ферментов – деполимераз микроорганизмов или ферментов крови и тканей высших животных [44].

Среди продуктов ферментативного распада ПГА – мономеры (например, у *Comamonas sp.*, *Al. eutrophus*), димеры (*P. fluorescens*) или смесь олигомеров, разрушающихся до мономеров олигомерными гидролазами.

Процесс биодеструкции ПГА *in vivo* длителен. Процесс протекает с достаточно низкими скоростями, поверхностно, без образования грубых дефектов и резкой потери механических качеств, что является ценным качеством. Показано, что деградация исследованных изделий из ПГА в биологических средах происходит по гуморальному и клеточному пути с активным участием макрофагов и гигантских клеток инородных тел. Скорость биодеградации сополимерных ПГА выше по сравнению с гомополимером. Длительность биодеструкции ПГА в организме может достигать трёх лет. В целом имеющиеся данные говорят о пригодности ПГА для изготовления биодеградируемых имплантатов длительного функционирования.

В работе [45] была исследована деградация образцов ПГА при подкожной имплантации. Через 40 недель масса имплантатов была измерена и

сопоставлена с контрольным интактным образцом. Средняя молярная масса двух имплантатов составила 68000 и 6500 в сравнении с контролем 137000, средняя молекулярная – 31000 в сравнении с контролем 58000. Дополнительно была исследована поверхностная и глубинная деградации, на основании результатов был сделан вывод: деградация носит гомогенный гидролитический характер.

Первостепенным требованием для материалов медицинского назначения является биосовместимость. Гомополимер β -оксимасляной кислоты обладает идеальной биосовместимостью, так как сам полимер и продукты его распада являются естественными метаболитами клеток и присутствуют в крови и тканях. Однако высокая кристалличность данного типа полимера и соответствующая хрупкость и тенденция к старению материала ограничивает его применение [46].

Проводятся исследования с целью выяснения биосовместимости других компонентов ПГА. Уже полученные результаты токсикологических исследований сополимеров гидроксибутирата и гидроксивалерата, выполненные в культурах животных клеток *in vitro*, а также на лабораторных животных *in vivo*, свидетельствуют о возможности воспалительных реакций, связанных с содержанием гидроксивалерата в ПГА. Исходя из того, что реакция клеток и тканей на имплантат зависит не только от химического состава материала, но также и от способов получения изделий, характеристик поверхности и методов ее обработки, степени химической чистоты материала, необходимо проведение более полных исследований.

1. 3 Особенности тканевой инженерии мягких тканей

Реконструирование дефектов мягких тканей возможно несколькими путями. Можно использовать заранее сформированные требуемого размера и формы биостабильные имплантаты, которые помещают в место дефекта на длительные сроки функционирования. Второй подход связан с использованием

отверждаемых композиций, которые, будучи введенными в место дефекта в виде раствора (геля) мономера, подвергаются полимеризации и приобретают необходимую форму. Если при этом применяют биоразрушаемые материалы, постепенно (по мере их разрушения) дефект будет заполняться новообразованными тканями. И наконец, возможно применение заранее сформированных конструкций из биорезорбируемых материалов, предназначенных для постепенного заполнения новыми тканями. Такие конструкции можно дополнительно нагружать лекарственными препаратами и стимулирующими тканегенез факторами, включая пролиферирующие клетки[47].

Отличительной чертой мягких тканей является их мягкость и эластичность, в соответствии с этим материал носителя должен быть плоским и эластичным.

1. 3. 1 Кожа

Кожа стала первым искусственно полученным органом, получившим разрешение на клинические испытания. Кожа состоит из двух слоев. Первый, эпидермис, состоит в основном из кератиноцитов, которые постоянно делятся и заменяют друг друга. В эпидермисе также присутствуют меланоциты, распределяющие меланин, защищающий эпидермис от ультрафиолетового излучения. Второй, расположенный глубже слой, дерма, богат соединительной тканью и обеспечивает сопротивление растяжению и гибкость. Там же расположена сосудистая сеть, лимфатическая система, нервные пучки и другие дополнительные структуры кожи. В дерме относительно мало клеток, основной объем занят ВКМ, состоящим из переплетенных коллагеновых фибрилл, протеогликанов и гликопротеинов. Основной тип клеток дермы – фибробласты, отвечающие за выработку и поддержание большей части ВКМ[48].

При повреждении кожи, если рана пересекает только часть дермы, дерма способна заставить клетки заниматься собственной реконструкцией. Более того, на помощь дерме приходят глубинные придатки кожи, такие как волосяные фолликулы и потовые железы, которые могут стать источниками эпидермальных клеток. Однако если рана затрагивает всю дерму, как это бывает при сквозных ожогах или кожных язвах, источников клеток для регенерации нет. Это послужило толчком к созданию искусственных эквивалентов кожи.

Для разработки гибридного заменителя кожи, который бы хорошо поддерживал структуру, использовали вязаные сетки из сополимера L-лактид-гликолид (PLGA) с фиксированным размером петли, на которые затем наносили раствор смеси коллагенхитозана (CCS) и подвергали лиофильной сушке, конструкции назвали PLGA_m/CCS. Пересаживали крысам. Оказалось, что встраивание вязаной PLGA в хитозан-коллагеновые каркасы приводит к улучшению механических свойств, оказывая мало влияния на средний размер пор и пористость. После имплантации [49] PLGA_m/CCS и не сжимается и способствует инфильтрации клеток, образованию новой ткани, прорастанию сосудов. Механическая прочность каркасов, поддерживая 3D микроструктуру тканей.

Один из методов реконструкции подразумевает высевание аутогенных эпидермальных кератиноцитов на поверхность раны. Доктор Jorg Gerlach с коллегами изобрели устройство для пересадки кожи Skin Gun, которое распыляет на поврежденную кожу пострадавшего раствор с его же стволовыми клетками[50]. На данный момент новый метод лечения находится на экспериментальной стадии, но результаты уже впечатляют: тяжелые ожоги заживают буквально за пару дней. Также прибегают к использованию в качестве замены материалов на основе бычьего кератина и искусственной дермы на основе клеточно-полимерных конструкций.

Хотя было показано, что полимерные матрицы дают некоторые улучшения морфологи рубца, еще ни одна матрица, не содержащая клеток, не

дала истинного восстановления дермы. Для успешной репликации кожи требуется двухслойная композитная кожная конструкция, которая могла бы воспроизвести синэргическое поведение эпидермиса и дермы.

В 70-х годах был разработан метод культивирования эпителиальных клеток, полученных путем биопсии кожи [51]. Клетки эпителия выделяют из полной биопсии кожи с помощью трипсина. Полученные клетки эпителия высевают на чашки с сывороткой телят, инсулином, трансферрином, гидрокортизолом, эпидермальным фактором роста, холерным токсином. Под ними располагаются *murine* фибробласты, подвергнутые нелетальной дозе облучения, что не дает им делиться. Изолированные колонии эпителиальных клеток затем разрастаются в пласты недифференцированных эпителиальных клеток. Их обрабатывают трипсином, и пересевают. Полученные слои обрабатывают диспазой, удаляющей белки, прикрепляющие слои к чашкам. Пласты клеток прикрепляют к *petrolatum gauze* (марля с парафином) для манипуляций в операционной. Тканевоинженерные заменители эпителия коммерчески доступны, в основном Genzyme Tissue repair, MA.

Одним из первых полноценных заменителей кожи, получивших разрешение на клинические испытания, стала «искусственная кожа», выпущенная корпорацией Integra LifeSciences, Plainsboro, NJ, разработанная в MIT в 80 годы, сейчас она доступна для общего использования в случаях тяжелых ожогов. Внутренний слой этого материала представляет собой 2-мм слой смеси волокон коллагена, выделенных из тканей быка, и хондроитин-6-сульфата с размером пор 70-200 мкм, структура которого позволяет прорасти сосудистой сети, после чего разлагается. Для получения такой структуры волокна коллагена и глюкозаминогликана преципитируют, после чего их подвергают лиофильной сушке и сшивают глутаровым альдегидом. Верхний слой состоит из 0.009 дюйма (0.25 мм) полисилоксана, паропроницаемость которого соответствует эпителию. Этот материал наносят на очищенную рану. Через 2-3 недели, после того как прошла васкуляризация внутреннего слоя,

наружную силиконовую мембрану заменяют ультратонким слоем собственного выращенного эпителия.

Биоразлагаемая сетка из полиглактина, в которую засевают аллогенные фибробласты из подкожного слоя новорожденных. Материал носителя разлагается путем гидролиза, тогда как аллогенные фибробласты должны облегчать формирование неодермы. Планируется, что этот материал нужно использовать вместе с ультратонким слоем эпителия, как и Интегра.

Другая стратегия [52] заключается в хранении аллогенной дермы при криогенных температурах. Этот материал называется Alloderm (LifeCell Corp., TX). Аллогенную дерму получают из трупов, проверенных на болезни. Эпителиальную составляющую удаляют в гипертоническом буфере, оставшуюся дерму обрабатывают детергентом для инактивации вирусов, затем лиофилизируют. В результате получается неантигенный каркас, содержащий белки базальной мембраны, в т.ч. ламинин и коллаген типа IV, VII. Материал регидратируют и накладывают на раны, а сверху аутологичный искусственный эпителий. Соединить аналог дермы и искусственный эпителий можно как прямо на ране, так и в лаборатории до операции.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

Для исследований были взяты образцы полигидроксиалканоатов (ПГА), полученные в лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза Института биофизики Сибирского Отделения Российской академии Наук. Гомогенный полимер 3-гидроксимасляной кислоты (П(ЗГБ)) и двухкомпонентный сополимер: 3-гидроксibuтирата и 3-гидроксивалерата (П(ЗГБ/ЗГВ)) с включением 3-гидроксивалерата 22,8 мол.%. Полимеры синтезированы бактериями *Wautersia eutropha* B5786 в автотрофных стерильных условиях роста на минеральной солевой среде и газовом субстрате, содержащем смесь углекислоты, водорода и кислорода ($\text{CO}_2:\text{O}_2:\text{H}_2=1:2:7$ по объему). П(ЗГБ) получали в гетеротрофных стерильных условиях роста на фруктозе и масляной кислоте; для синтеза сополимеров в среду дополнительно вносили в качестве косубстратов калиевые соли пентановой кислоты. Полимер экстрагировали из биомассы хлороформом. Осаждение полимера из экстрактов проводили гексаном. Состав полимеров определяли после метанолиза проб по метиловым эфирам жирных кислот на хроматомасс-спектрометре GCD plus (Hewlett Packard, США). Молекулярный вес ПГА (M_w) определяли вискозиметрически.

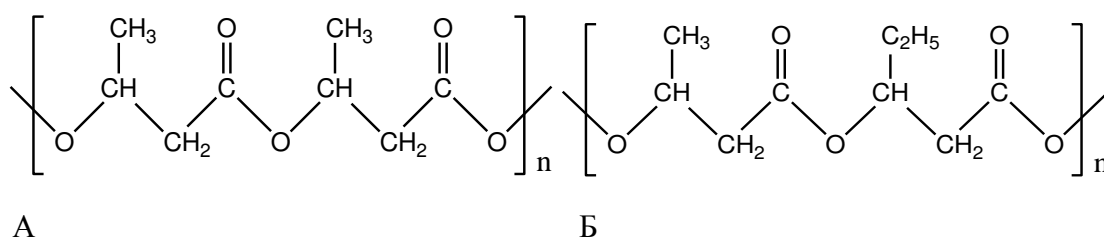


Рисунок 1 – Состав полимеров, А – поли-3-гидроксibuтират, Б – поли-3-гидроксibuтират-со-3-гидроксивалерат

Хитозан приобретен у компании-производителя Mageric в виде стерильного порошка, расфасованного в герметичные пластиковые колбы.

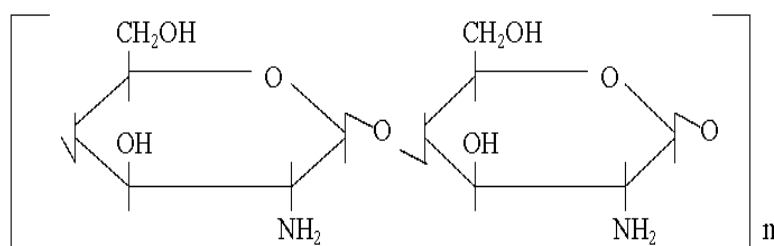


Рисунок 2 – Структура хитозана

Сконструирована серия изделий на основе ПГА и хитозана: матрицы различного химического состава.

2. 2 Изготовление и стерилизация плёночных образцов

Полимерные гомоплёнки получали методом полива разогретого до 40°C на магнитной мешалке MR Hei-Standart (Heidolph, Германия) при 300 об/мин. 2% раствора полимера в хлороформе, хитозана в гексафторизопропиловом спирте на обезжиренную поверхность чашек Петри. Композитные плёнки изготавливали двумя способами: путем добавления порошка хитозана в раствор полимера в хлороформе и путём смешения растворов полимера и хитозана. Для улучшения диспергирования порошкового хитозана раствор обрабатывали ультразвуковым гомогенизатором Sonikator 3000 (Misonix, США) в течение 10 минут до полного разбивания агломератов частиц хитозана. Для второго способа П(ЗГБ) и хитозан растворяли отдельно, полученные растворы тщательно смешивали. Соотношения компонентов в полученных образцах представлены в таблице 1. Плёнки высушивали в беспылевом боксе-ламинаре фирмы Labconco (США) с целью испарения растворителя. Толщину плёнок измеряли микрометром. С помощью специальной формы высекали диски диаметром 10 мм, которые использовали в экспериментах.

Таблица 1– Соотношение компонентов в полученных плёнках

Образец	Включение хитозана, %	П(ЗГБ), мг	Хитозан, мг	П(ЗГБ/ЗГВ), мг
1	0	500	-	-
2	0	-	-	500
3	10	450	50	-
4	25	375	125	-
5	50	250	250	-
6	10	450	50	-
7	50	250	250	-
8	100	-	500	-

Двумерные матрицы в виде плёнок стерилизовали выдержкой в 70% этиловом спирте при ультрафиолетовом излучении в ламинарном шкафу в течение 30 минут, затем промывали в полной среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 5% раствора антибиотиков.

2. 3 Исследование физико-химических свойств полученных образцов

Поверхностные характеристики полимерных изделий оценивали с помощью прибора для измерения краевых углов DSA-25E (Krüss, Германия) с использованием программного обеспечения DSA-4 для Windows. На поверхность образца с помощью микрошприца наносили капли воды объемом 1,5 мкл с видеофиксацией моментов взаимодействия жидкости с поверхностью образца. Для нахождения краевых углов смачивания кадр видеозаписи капли после ее стабилизации обрабатывался в полуавтоматическом режиме встроенным в программный пакет методом «Circle». Из полученных значений краевых углов смачивания (θ , град) вычисляли свободную поверхностную энергию (γ_s), свободную энергию межфазовой поверхности (γ_{SL}) и величину сил сцепления (W_{SL}) (эрг/см²), используя известные уравнения.

Свободную поверхностную энергию (эрг/см²) находили из уравнения

$$\gamma_s = \gamma_L (1 + \cos\theta)^2 / 4, \quad (1)$$

где γ_L – свободное поверхностное натяжение воды, равное 72.8 эрг/см². Свободную энергию межфазовой поверхности «полимер-вода» (γ_{SL} , эрг/см²) – по уравнению

$$\gamma_{SL} = \gamma_s + \gamma_L - W_{SL}, \quad (2)$$

где γ_{SL} – критерий остаточной межфазовой энергии; γ_s и γ_L –, соответственно, свободная энергия поверхности плёнки и воды.

Силу сцепления, характеризующую прочность адгезионного шва между фазами, вычисляли из зависимости

$$W_{SL} \approx 2 \sqrt{\gamma_s \gamma_L}. \quad (3)$$

Для каждого матрикса проводили не менее десяти измерений; рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение.

Механические характеристики матриксов определяли на универсальной электромеханической испытательной машине Инстрон 5565-5KN (Instron, Великобритания). Исследовали следующие параметры: модуль Юнга (модуль упругости) (МПа) напряжение при разрыве (МПа) и удлинение при разрыве (%).

2. 4 Выделение и ведение клеточных культур

2. 4. 1 Эмбриональные фибробласты мышцы линии NIH 3T3

Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе (Innova CO-48, New Brunswick Scientific, США) в гумидной атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Для приготовления питательной среды использовали многокомпонентную среду DMEM, 10% эмбриональную телячью сыворотку и 5% раствор антибиотиков (пенициллин, стрептомицин).

Для снятия клеток с поверхности культуральных флаконов использовали трипсин, титр суспензии определяли с помощью камеры Горяева (соотношение

жизнеспособных и мёртвых клеток оценивали после окрашивания трипановым синим) и высевали клетки из расчёта 50×10^3 клеток на матрикс.

2. 4. 2 Кератиноциты человека

Кератиноциты человека получали из кожных биоптатов, полученных при косметических операциях. Перед началом работы образцы кожи тщательно промывали в растворе Хенкса с антибиотиками (0,4 мг/мл гентамицина). Скальпелем срезали подкожную клетчатку, нарезали полученный лоскут на полоски шириной 3x10 мм, помещали в 0,2%-ный раствор диспазы («Sigma») и инкубировали при 4°C в течение 16-24 ч. После этого эпидермис пинцетом отделяли от дермы по линии базальной пластинки. Кусочки эпидермиса, отделенные от подлежащей дермы, помещали в раствор 0,125% трипсина. Инкубировали при 37°C в течение 10-15 мин., после чего трипсин инактивировали раствором эмбриональной телячьей сыворотки и пипетированием получали суспензию эпидермальных кератиноцитов, которую фильтровали через 70-микронное нейлоновое сито и осаждали центрифугированием при 2000 об/мин в течение 10 мин. Затем супернатант сливали и ресуспендировали осадок в среде для культивирования. Высевали суспензию кератиноцитов в пластиковые культуральные флаконы по 25 мл. Кератиноциты культивировали в среде EpiLife® Medium в CO₂ инкубаторе (Innova CO-48, New Brunswick Scientific, США) при 37°C. Смену среды проводили через каждые 2-3 дня.

2. 4. 3 Мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани крысы

МСК получали из жировой ткани крыс самок линии Вистар, выведенных передозировкой эфирным наркозом. Выделенную в стерильных условиях с области живота и бедер крыс жировую ткань измельчали до однородной массы, трехкратно промывали в физиологическом растворе, забуференном фосфатами

(ФСБ), содержащими антибиотики (100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина). К полученной суспензии добавляли раствор коллагеназы I типа и инкубировали 60 минут в CO₂ инкубаторе при 37°C, встряхивая каждые 15 минут. Жировую ткань тщательно перемешивали до получения однородной суспензии, затем клетки осаждали центрифугированием в течение 10 минут при 1500 g. Удаляли надосадочную жидкость, осадок ресуспендировали в полной среде DMEM. Суспензию клеток переносили в культуральный флакон и помещали в CO₂-инкубатор. Через 24 ч среду заменяли свежей, удаляя при этом неприкрепившиеся клетки. Клетки культивировали в полной среде DMEM в стандартной среде.

2. 5 Исследование абсолютного количества адгезированных клеток

Адгезионная способность матриксов исследована в культуре фибробластов мыши линии NIH 3T3. Клетки культивировали в 24-луночных пластиковых планшетах, в которые предварительно были помещены стерильные матриксы по три каждого состава. На каждый матрикс высевали 50×10^6 клеток, культивировали в гумидной атмосфере 5% CO₂ при 37°C в 1 мл полной среды DMEM с добавлением 5 % пенициллина-стрептомицина и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) в течение 3 суток. В качестве контроля выбран культуральный пластик – пустые лунки планшета. Через 3 суток культивации клетки с поверхности дисков снимали 0,125% раствором трипсина, добавляя его по 0,5 мл в каждую лунку, предварительно отобрав культуральную среду. Планшет на 5 минут помещали обратно в CO₂-инкубатор, после чего трипсин инактивировали добавлением среды DMEM с 10% ЭТС и 5% раствором антибиотиков, клетки с плёнок смывали средой, центрифугировали со скоростью 3000 об/мин в течение 5 минут, супернатант отбирали, клеточный осадок ресуспендировали, к 10 мкл. клеточной суспензии добавляли равный объем трипанового синего, после чего заполняли камеру

Горяева и считали количество живых (неокрашенных) и мертвых(окрашенных) клеток в пяти больших квадратах по диагонали, количество клеток определяли по формуле

$$X = N \times 0,05 \times 10^6 \times 2, \quad (4)$$

где X – концентрация клеток (млн/мл), N – количество клеток в 5 больших квадратах.

2. 6 Исследование биосовместимости полученных плёночных образцов *in vitro*

Оценку биосовместимости образцов *in vitro* проводили согласно стандартам ГОСТ Р ИСО 10993-2009. Потенциальную цитотоксичность полученных матриксов оценивали в постоянной клеточной линии эмбриональных фибробластов мыши NIH 3T3. В качестве контроля приняли полистироловую поверхность культуральных планшетов. Жизнеспособность культивируемых клеток оценивали в МТТ-тесте. Метод основан на способности митохондриальных дегидрогеназ восстанавливать 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол бромид до формазана и говорит об активности митохондрий клеток. Стерильные матриксы помещали в лунки 24-луночного планшета, высевали клетки, доводили питательной средой содержимое каждой лунки до 1 мл. Инкубировали в течение 1, 3, 7 дней. Затем вносили в каждую лунку 50 мкл рабочего раствора МТТ и 950 мкл полной среды DMEM. Через четыре часа заменяли среду на DMSO. После полного растворения кристаллов формазана переносили раствор в 96-луночный планшет и проводили измерение оптической плотности при длине волны 550 нм на микропланшетном фотометре Bio-Rad 680 (Bio-Rad LABORATORIES Inc, США). Количество клеток оценивали по калибровочному графику.

2. 7 Окраска клеток флуоресцентным красителем DAPI

Морфологию клеток, прикрепившихся к поверхности матриксов, определяли с помощью окраски флуоресцентным красителем DAPI (маркер на ДНК). Для флуоресцентной микроскопии клетки на матриксах фиксировали 2,5 %-м раствором глутарового альдегида, затем обрабатывали раствором Tween-20, раствором альбумина и красили FITC с последующим контрастированием ядер клеток с помощью DAPI.

2. 8 Исследование биополимерных сферических частиц из полигидроксиалканоатов в качестве носителя для дермального эквивалента

Для исследования были взяты экспериментальные биополимерные сферические микрочастицы (МЧ) разного химического состава, полученные стандартным методом испарения растворителя из трехкомпонентной эмульсии [45], а также при использовании распылительного высушивания [46] в Инновационном биомедицинском центре на базе Сибирского федерального университета.

Потенциальную цитотоксичность МЧ оценивали в постоянной клеточной линии эмбриональных фибробластов мыши NIH 3T3. В качестве контроля приняли полистироловую поверхность культуральных планшетов.

Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе (Innova CO-48, New Brunswick Scientific, США) в гумидной атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Для приготовления питательной среды использовали многокомпонентную среду DMEM, эмбриональную телячью сыворотку (10%) и раствор антибиотиков (пенициллин, стрептомицин) (5%).

Для снятия клеток с поверхности культуральных флаконов использовали трипсин, титр суспензии определяли с помощью камеры Горяева (соотношение

жизнеспособных и мёртвых клеток оценивали после окрашивания трипановым синим) и высевали клетки из расчёта 50×10^3 мл. клеток на лунку 24-луночного планшета.

Для оценки жизнеспособности клеток был выполнен колориметрический метод исследования с помощью МТТ- реактива. Для проведения МТТ-теста брали стерильные образцы микрочастиц различных типов из ПГА, помещали в 24-луночный планшет, высевали клетки, доводили питательной средой содержимое каждой лунки до 1000 мкл. Инкубировали в течение трёх суток. Затем, убрав среду, вносили в каждую лунку 50 мкл. рабочего раствора МТТ и 950 мкл. свежей питательной среды. Через четыре часа заменяли среду на DMSO. После полного растворения кристаллов формазана переносили раствор в 96-луночный планшет и проводили измерение оптической плотности при длине волны 550 нм на микропланшетном фотометре Bio-Rad 680 (Bio-Rad LABORATORIES Inc, США). Количество клеток оценивали по калибровочному графику.

2. 9 Статистическая обработка

Все эксперименты были выполнены в трёх повторностях. Статистический анализ выполняли с помощью программ Microsoft Exel 2016 и Statistica 6.0. Результаты представлены как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение. Достоверность отличия средних проверяли с помощью дисперсионного анализа и по t-критерию Стьюдента при уровне значимости $p = 0,05$.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из текста ВКР изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ВКМ – внеклеточный матрикс
- ГАГ – глюкозаминогликаны
- ГК – гиалуроновая кислота (гиалуронан)
- МСК – мезенхимальные стволовые клетки
- МЧ – микрочастицы
- П(ЗГБ) – поли-3-гидроксибутират
- П(ЗГБ/ЗГВ) – поли-3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерат
- ПВС – поливиниловый спирт
- ПГА – полигидроксиалканоаты
- ПГК – поли(гликолиевая кислота)
- ПКЛ – поликапролактон
- ПМГК – поли(молочная-со-гликолевая кислота)
- ПМК – поли(молочная кислота) (полилактат)
- ПЭГ – полиэтиленгликоль
- ПЭО – полиэтиленоксид
- ТИК – тканеинженерные конструкции
- ФСБ – фосфатный буфер
- ССС – коллагенхитозан
- СО₂ – двуокись углерода (углекислый газ)
- DLPLA – поли(dl-lactide)
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMSO – dimethyl sulfoxide (диметилсульфоксид)
- LPLA – гомополимер l-lactide
- PLGA – сополимер L-лактид-гликолид
- RGD – определенный мотив Arg-Gly-Asp

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Готье, С.В., Органное донорство и трансплантация в Российской Федерации в 2015 г. IV сообщение регистра Российского трансплантологического общества / С.В. Готье, Я.Г. Мойсюк, С.М. Хомяков, О.С. Ибрагимова // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2016. – №14 (3). – С. 6 – 18.
2. Хенч, Л. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / Л. Хенч; под ред. А.А. Лушниковой. – Москва : Техносфера, 2007. – 304 с.
3. Pena, J. Destruction of chitosan matrix for tissue engineering / J. Pena, I. Izquierdo Barba, A. Martinez, M. Vallet Regi // Solid State Science. – 2006. – vol. 8. – P. 513 – 519.
4. Петрович, Ю.А. Композитные материалы на основе хитозана для тканевой инженерии / Ю.А. Петрович, А.Н. Гурин, Н.А. Гурин, С.М. Киченко // Российский стоматологический журнал. – 2008. - № 2. – С. 67–73.
5. Федотов А.Ю. Покрытия на основе хитозана для инжиниринга имплантов / Ю.А. Федотов [и др.] // Доклады Академии Наук. – 2011. – Т.437, № 1. – С. 65–67.
6. Li, X.Y. Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY) / X.Y. Li et al // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2007. - vol. 55. – P. 2911 – 2917.
7. Байтукалов Т.А. Ранозаживляющие свойства низкомолекулярного хитозана / Т.А. Байтукалов [и др.] // Известия РАН. Серия биологическая. - 2005. – № 6. – С. 659 – 663.
8. Langer, R. Tissue engineering / R. Langer, J.P. Vacanti // Science. — 1993. — vol. 260. — P. 920 – 926.
9. Hin, T. S. Engineering materials for biomedical application / T.S. Hin. – London : World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, 2004. – 350 p.

10. Кирилова, И.А. Новые виды материалов для костной пластики в свете современных представлений о костных трансплантатах / И.А. Кирилова, Н.Г. Фомичев, В.Т. Подорожная, В.И. Трубников // Хирургия позвоночника. – 2007. – №2. – С. 66 - 70.
11. Pittenger, M. F. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells/ M.F. Pittenger // Science. — 1999. — vol. 284. — P. 143–147.
12. Маланин, Д. А. Восстановление повреждений хряща в коленном суставе: монография / Д. А. Маланин, В. Б. Писарев, В. В. Новочадов. – Волгоград: Волгоградское научное издательство, 2010. – 518 с.
13. Isla, N. Introduction to tissue engineering and application for cartilage engineering / N. de Isla et al // Biomedical Materials and Engineering. – 2010. – vol. 20, № 3. – P. 127–133.
14. O'Brien, F. J. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering / F. J. O'Brien // Materials Today. – 2011. – Vol. 14. – P. 88 – 95.
15. Kerker, J. T. Cartilage repair: synthetics and scaffolds – basic science, surgical techniques, and clinical outcomes / J.T. Kerker, A.J. Leo, N.A. Sgaglione // Sports Med. Arthrosc. – 2008. – Vol. 16, № 4, – P. 208–216.
16. Lu, T. Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering / T. Lu, Y. Li, T. Chen // International Journal of Nanomedicine – 2013. – Vol. 8. – P. 337–350.
17. Zhang, L. The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration / L. Zhang, J. Hu, K. A. Athanasiou // Critical Reviews™ in Biomedical Engineering. – 2009. – vol. 37, № 1–2. – P. 1–57.
18. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии [Электронный ресурс] : электрон. учеб. пособие / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов. – Электронные данные (6 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2009. – 1 электрон. опт. диск (DVD).
19. Полимеры в биологии и медицине / под ред. М. Дженкинс. – Москва: Научный мир, 2011. – 256 с.

20. Bastioli, C. Handbook of Biodegradable Polymers / C. Bastioli. - United Kingdom : Rapra Technology Limited, 2005. – 552 p.
21. Chen, Q. Progress and challenges in biomaterials used for bone tissue engineering: bioactive glasses and elastomeric composites / Q. Chen, Z. Chenghao, T. George // Progress in Biomaterials. – 2012. – vol. 1 (2). – P. 1 – 22.
22. Duan, B. Customized Ca-P/PHBV nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering: design, fabrication, surface modification and sustained release of growth factor / B. Duan, M. Wang // Journal of the Royal Society. – 2010. – vol. 7. – P. 615 – 629.
23. Glowacki, J. Collagen Scaffolds for Tissue Engineering / J. Glowacki, S. Mizuno // Biopolymers. – 2007. – vol. 89 (5). – P. 338 – 344.
24. He, L. Fabrication and characterization of poly (l-lactic acid) 3D nanofibrous scaffolds with controlled architecture by liquid–liquid phase separation from a ternary polymer–solvent system / L. He et al // Polymer. – 2009. – vol. 50(16). – P. 4128 – 4138.
25. Kang, S.W. Surface modification with fibrin/hyaluronic acid hydrogel on solid-free form-based scaffolds followed by BMP-2 loading to enhance bone regeneration / S.W. Kang, J.S. Kim // Bone. – 2011. – vol. 48 (2). – P. 298 – 306.
26. Kim, H. Sustained release of ascorbate-2-phosphate and dexamethasone from porous PLGA scaffolds for bone tissue engineering using mesenchymal stem cells / H. Kim, H. Kim, H. Suh // Biomaterials. – 2003. – vol. 24 (25) – P. 4671 – 4679.
27. Liu, X. Biomimetic nanofibrous gelatin/apatite composite scaffolds for bone tissue engineering / X. Liu et al // Biomaterials. – 2009. – vol. 30 (12). – P. 2252 – 2258.
28. Севастьянов, В. И. Биосовместимые материалы: учебное пособие / В.И. Севастьянов. – Москва : Медицинское информационное агентство, 2011. – 544 с.

29. Нудьга, Л.А. Получение хитозана, его производных и исследование их свойств: автореф. дис. ... канд. хим. наук : 02.00.06 / Нудьга Людмила Александровна. – Ленинград, 1979. – 20 с.
30. Muzzarelli, R.A.A. New derivatives of chitin and chitosan: properties and applications / R.A.A. Muzzarelli // *New Dev. Ind. Polysaccharides Proc.Conf.* – New York, 1985. – P. 207 – 231.
31. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / под ред. К.Г. Скрыбина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. – Москва : Наука, 2002. – 368 с.
32. Бондаренко, В.М. Воздействие хитозана на ультраструктуру клеток патогенных и условно патогенных микроорганизмов / В.М. Бондаренко, О.В. Рыбальченко, Н.Б. Вербицкая, С.Ф. Антонов // *Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана : материалы восьмой международной конференции / ВНИ-РО.* – Москва, 2006. – С. 175-179
33. Дарашкевич, О.Н. Биоцидные свойства хитозана различной степени деполимеризации / О.Н. Дарашкевич, О.В. Добролеж, Н.Б. Вербицкая Н. Б., С.Ф. Антонов, Н.Н. Золина, О.В. Рыбальченко // *Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана : материалы седьмой международной конференции / ВНИ-РО.* – Москва, 2003. – С. 239-240.
34. Дорожкин, С.В. Биоматериалы: Обзор рынка / С.В. Дорожкин, С. Агатопоулус // *Химия и жизнь.* – 2002. – № 2. – С. 8 – 10.
35. Вольф, Л.А. Производство поликапроамида / Л.А. Вольф, Б.Ш. Хайтин. – Москва : Химия, 1977. – 208 с.
36. Narayan, R. *Biomedical Materials* / Roger Narayan. — Springer, 2009. — 550 p.
37. Nirmala, R. Hydroxyapatite mineralization on the calcium chloride blended polyurethane nanofiber via biomimetic method / R. Nirmala, K.T. Nam // *Nanoscale Research Letters.* – 2011. – vol. 6 (2). – P. 134 – 147.
38. Schofer, M.D. Functionalisation of PLLA nanofiber scaffolds using a possible cooperative effect between collagen type I and BMP-2: impact on growth and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells / M.D. Schofer et al

// The Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2011. – vol. 22. – P. 1753 – 1762.

39. Wang, Y. Porous poly (lactic-co-glycolide) microsphere sintered scaffolds for tissue repair applications / Y. Wang, X. Shi // Materials Science and Engineering. – 2009. – vol. 29 (8). – P. 2502 – 2507.

40. Биотехнология: принципы и применение / под ред. И. Хиггинс. – Москва : Мир, 1988. – 480 с.

41. Волова, Т.Г. Полиоксиданканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины: науч. изд. / Т.Г. Волова, В.И. Севастьянов, Е.И. Шишацкая. – Новосибирск : Издательство СО РАН, 2003. – 330 с.

42. Николаева, Е.Д. Влияние обработки H₂O₂-плазмой на свойства клеточных носителей из резорбируемых полиэфигов «биоластотан» / Е.Д. Николаева, Д.Б. Гончаров, Е.И. Шишацкая // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. VI, № 2. – С. 65 – 70.

43. Williams, S.F. Applications of Polyhydroxyalkanoates (PHA) in Medicine and Pharmacy / S. F. Williams, D.P. Martin // Biopolymers Online. – 2005. – P. 91 – 103.

44. Шишацкая, Е.И. Клеточные матрицы из резорбируемых полигидроксиалканоатов / Е.И. Шишацкая // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т. II, №2. – С. 68 – 76.

45. Murueva A.V. Microparticles prepared from biodegradable polyhydroxyalkanoates as matrix for encapsulation of cytostatic drug / A.V. Murueva et al // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2013. – vol. 24. – P. 1905 – 1915.

46. Murueva, A.V. The use of polymeric microcarriers loaded with anti-inflammatory substances in the therapy of experimental skin wounds / A.V. Murueva, A.M. Shershneva, E.I. Shishatskaya, T.G. Volova // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2014. – vol. 157. – P. 597 – 601.

47. Карпюк, В.Б. Клеточные технологии в восстановительной хирургии опорных и мягких тканей челюстно-лицевой области / В.Б. Карпюк, П.М.

Лаврешин, М.Д. Перова // *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии.* – 2015. - №3. – С. 87 – 96.

48. Руднева, А.А. Реакция тканей кожи на синтетический материал «Тиопрост», разработанный для использования в тканевой инженерии / А.А. Руднева [и др.] // *Гены и Клетки.* – Москва, 2010. – Т.5, №1. – С. 53 – 57.

49. Гусева, А.С. Реакция тканей гиподермы на конструкционные материалы, применяемые в стоматологии в интересах тканевой инженерии / А.С. Гусева, Л.М. Рысева, А.С. Гук, В.П. Румакин // *Гены и Клетки.* – Москва, 2007. – Т.2, №1. – С. 60 – 64.

50. Гусев, С.А. Система отбора перспективных имплантируемых трехмерных полимерных материалов для тканевой инженерии / С.А. Гусев, П.А. Щеплев, Н.Н. Гарин, Г.Г. Борисенко // *Перспективные материалы.* – Москва, 2005. - №6. – С. 49 – 56.

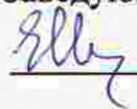
51. Craigie, J.E. Autogenous breast reconstruction with the deep inferior epigastric perforator flap / J.E. Craigie, R.J. Allen, F.J. DellaCroce, S.K. Sullivan // *Clinics in Plastic Surgery.* – 2003. – vol.3 – P. 30 – 39.

52. Disa, J.J. Dextran-related complications in head and neck microsurgery: do the benefits outweigh the risks? A prospective randomized analysis / J.J. Disa et al // *Plastic and Reconstructive Surgery.* – 2003. – vol. 12. – P. 1512 – 1534.

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Е. И. Шишацкая

« 23 » июня 2017 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

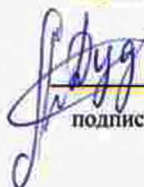
ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕРМАЛЬНОГО ЭКВИВАЛЕНТА НА БАЗЕ
БИОПОЛИМЕРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ

Научный руководитель

 28.06.17
подпись, дата

профессор, д.б.н. Е.И. Шишацкая

Выпускник

 28.06.17
подпись, дата

А.Е. Дудаев