

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

Е. И. Шишацкая

подпись

« _____ » _____ 20__ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Материал для реконструктивных технологий на основе биоразрушаемых
полигидроксиалканоатов

06.04.01 Биология

06.04.01.05 Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель

профессор, д.б.н. Е. И. Шишацкая

подпись, дата

Выпускник

Е. А. Коляда

подпись, дата

Рецензент

профессор, д.м.н. Ю. Ю. Винник

подпись, дата

Красноярск 2018

АННОТАЦИЯ

Современное развитие науки приводит к широкому внедрению в медицине высокомолекулярных соединений, включая полиэфиры, синтезируемые живыми системами. В последнее десятилетие особое место среди природных биопластиков занимают биосовместимые и биодеградируемые полигидроксиалканоаты (ПГА) [1].

Одним из актуальных направлений в биомедицине является разработка фармацевтических препаратов с контролируемым и направленным действием на основе полимерных микро- и наночастиц. Для эффективного применения микрочастиц на основе ПГА в качестве материала для тканевой инженерии, необходимо усовершенствовать поверхностные характеристики микрочастиц.

Учитывая гидрофильно-липофильный баланс клеток, наиболее перспективным веществом для модификации микрочастиц на основе ПГА является белок.

Цель исследования - получить и изучить свойства материала, потенциально пригодного для реконструктивных инъекционных технологий мягких тканей на основе биоразрушаемых полигидроксиалканоатов.

Получение микрочастиц из П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ) осуществляли с помощью метода испарения растворителя из двухкомпонентной эмульсии. Модификацию поверхности микрочастиц белковыми молекулами (БСА, коллаген 1-го типа) осуществляли с применением реакции карбоксилирования и карбодиимидной реакции. Свойства материала изучали с применением системы Zetasizer Nano ZS, световой и РЭМ-микроскопии, биуретового метода и метода Лоури, методов клеточной биологии.

Полученные частицы из обоих типов ПГА, содержащие 30-45% белка, имеющие хорошие морфологические характеристики (выход, размер, ζ -потенциал), высокие показатели стабильности в суспензии, и обладающие более высокой адгезионной способностью по отношению к фибробластам кожи человека – являются пригодными для инъекционных форм введения, в особенности местного.

Ключевые слова: ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЫ, ПОЛИМЕРНЫЕ МИКРОЧАСТИЦЫ, ПОЛИ (3-ГИДРОКСИБУТИРАТ), СОПОЛИМЕР ПОЛИ (3-ГИДРОКСИБУТИРАТА) С ПОЛИ (3-ГИДРОКСИВАЛЕРАТОМ), БЫЧИЙ СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН, КОЛЛАГЕН 1-ГО ТИПА, АМИДНАЯ СВЯЗЬ.

АВТОРЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Материал для реконструктивных технологий на основе биоразрушаемых полигидроксиалканоатов» содержит 58 страниц текстового документа, 10 иллюстраций, 8 таблиц, 4 формулы и 124 использованных источника.

ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЫ, ПОЛИМЕРНЫЕ МИКРОЧАСТИЦЫ, ПОЛИ (3-ГИДРОКСИБУТИРАТ), СОПОЛИМЕР ПОЛИ (3-ГИДРОКСИБУТИРАТА) С ПОЛИ (3-ГИДРОКСИВАЛЕРАТОМ), БЫЧИЙ СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН, КОЛЛАГЕН 1-ГО ТИПА, АМИДНАЯ СВЯЗЬ.

Цель работы: получить и изучить свойства материала, потенциально пригодного для реконструктивных инъекционных технологий мягких тканей на основе биоразрушаемых полигидроксиалканоатов.

На основании поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Получить ПГА-микрочастиц различного химического состава: из П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ).
2. Присоединить молекулы белка к функциональным группам на поверхности ПГА-микрочастиц с применением карбодимидной реакции.
3. Изучить характеристики полученных микрочастиц (среднего диаметра, электрокинетического потенциала, химического состава полимера, молекулярной массы полимера).
4. Определить концентрацию белка, ковалентно-связанного с ПГА-микрочастиц.
5. Оценить стабильность амидной связи между NH_2 -группами белка и COOH -группами полимера на поверхности ПГА-микрочастиц.
6. Исследовать цитотоксичность модифицированных белком П(ЗГБ)-микрочастиц в первичной культуре фибробластов *in vitro*.

Актуальность диссертационной работы заключается в том, что впервые была проведена модификация поверхности микрочастиц на основе ПГА, в ходе которой получены частицы, содержащие 30-45% белка, имеющие хорошие морфологические характеристики (выход, размер, ζ -потенциал), высокие показатели стабильности в суспензии, и обладающие высокой адгезионной способностью по отношению к фибробластам кожи человека. Полученный материал на основе микрочастиц из ПГА является пригодным для инъекционных форм введения, в особенности местного.

ABSTRACT

Master's thesis on the topic: "Material for reconstructive technologies based on biodegradable polyhydroxyalkanoates" contains 58 pages of a text document, 10 illustrations, 8 tables, 4 formulas and 124 sources used.

POLYHYDROXYALCANOATES, POLYMERIC MICROPARTICLES, POLYMER (3-HYDROXYBOUTYRATE), COPOLYMER (3-HYDROXIBUTYRATE) WITH POLY (3-HYDROXYVALERATE), BOVINE SERUM ALBUMINE, COLLAGEN TYPE 1, AMIDE BOND.

Objective: to obtain and study the properties of a material potentially suitable for reconstructive injection soft tissue technologies based on biodegradable polyhydroxyalkanoates.

On the basis of the goal, the following tasks were identified:

1. Obtain PHA microparticles of different chemical composition: from P (3GB) and P (3GB / 3GV).
2. Attach protein molecules to functional groups on the surface of PHA-microparticles.
3. To study the characteristics of the resulting microparticles (mean diameter, electrokinetic potential, chemical composition of the polymer, molecular weight of the polymer).
4. Determine the concentration of protein covalently bound to PGA microparticles.
5. To assess the stability of the amide bond between the NH₂ groups of the protein and the COOH groups of the polymer on the surface of PHA-microparticles.
6. Investigate the cytotoxicity of protein-modified P (3 GB) -microparticles in a primary culture of fibroblasts *in vitro*.

The relevance of the thesis lies in the fact that for the first time carried out a modification of the surface of the microparticles based on PHA, during which particles were obtained with a protein content of 30-45%, having good morphological characteristics (yield, size, ζ -potential), high stability in suspension, and having a high adhesion to human skin fibroblasts. The obtained material based on microparticles of PHA is suitable for injection forms of subcutaneous administration, especially local.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1.1 Биоразрушаемые материалы применяемые в биомедицине.....	9
1.1.1 Синтетические полимеры.....	9
1.1.2 Природные полимеры.....	10
1.1.3 Природные полигидроксиалканоаты.....	11
1.2 Требования, предъявляемые к материалам для клеточной и тканевой инженерии.....	12
1.2.1 Дизайн инъекционных скафолдов на основе микро- и наносителей.....	14
1.3 Тканевая инженерия мягких тканей: реконструкция кожи.....	18
1.3.1 Применение коллагена для реконструкции мягких тканей.....	19
1.3.2 Применение факторов роста для реконструкции мягких тканей.....	22
1.4 Разнообразие материалов на основе микро- и наночастиц.....	22
1.4.1 Микро- и наночастицы в качестве носителей для контролируемой доставки препаратов.....	22
1.4.2 Микро- и наночастицы в качестве каркасов для клеточной и тканевой инженерии.....	25
1.4.3 Микро- и наночастицы в составе гидрогелей.....	27
1.4.4 Поверхностные модификации микро- и наночастиц.....	28
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	32
2.1 Материалы.....	32
2.2 Получение микрочастиц из ПГА.....	32
2.3 Модификации поверхности полимерных микрочастиц.....	33
2.3.1 Реакция карбоксилирования.....	33
2.3.2 Карбодимидная реакция.....	33
2.4 Количественное определение белка.....	34
2.4.1 Биуретовый метод.....	34
2.4.2 Метод Лоури.....	35
2.5 Определение морфологических свойств полимерных микрочастиц.....	36
2.6 Оценка стабильности амидной связи в микрочастицах из П(ЗГБ)/БСА и П(ЗГБ/ЗГВ)/БСА.....	37
2.7 Анализ жизнеспособности клеток.....	38
2.7.1 Тест alamarBlue®.....	38
2.8 Статистическая обработка данных.....	39
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	40
3.1 Характеристики микрочастиц из П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ).....	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Характеристики карбоксилированных микрочастиц.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.3 Поверхностная модификация микрочастиц бычьим сывороточным альбумином.....	Ошибка! Закладка не определена.

- 3.4 Оценка стабильности микрочастиц модифицированных БСА.... **Ошибка!**
Закладка не определена.
- 3.5 Поверхностная модификация микрочастиц коллагеном I типа .. **Ошибка!**
Закладка не определена.
- 3.6 Цитотоксичность модифицированных коллагеном I микрочастиц
Ошибка! Закладка не определена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	Ошибка! Закладка не определена.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	41
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	42

ВВЕДЕНИЕ

Современное развитие науки приводит к широкому внедрению в медицине высокомолекулярных соединений, включая полиэферы, синтезируемые живыми системами. Наиболее приоритетными полимерами в последнее десятилетие наряду с полилактидами и полигликолидами считаются полигидроксиалканоаты (ПГА) – полиэферы алкановых кислот микробиологического происхождения [1].

Анализ литературы показывает, что полигидроксиалканоаты (ПГА) обладают физико-химическими свойствами, подходящими для различных применений в биомедицине, в том числе для конструирования микро- и наноносителей [1, 2].

Микрочастицы из биосовместимых и биodeградируемых полимеров – это современные лекарственные формы, способные элиминировать побочные эффекты и преодолевать неудовлетворительную фармакокинетику уже существующих лекарственных препаратов [3, 4], при этом микрочастицы могут быть использованы в тканевой инженерии и клеточных технологиях в качестве матриц - носителей для клеток. Выступая в роли имплантатов, микрочастицы используются в качестве материала для клеточной и тканевой инженерии [5].

Коррекция дефектов в мягких тканях является важной проблемой в эстетической пластической хирургии, и является одним из перспективных направлений по использованию материалов на основе ПГА, так как этот класс биополимеров имеет широкий спектр свойств, влияющих на сроки биорезорбции частиц [6]. Для совершенствования свойств биосовместимости материала актуальна модификация поверхности полимерных микрочастиц различными соединениями, к примеру - молекулами белка. За счет белковых молекул происходит уменьшение количества отрицательно заряженных COOH-групп в составе ПГА и улучшаются адгезионные свойства поверхности микрочастиц по отношению к клеткам.

В связи с этим, целью данного исследования явилось получение и изучение свойств материала, потенциально пригодного для реконструктивных инъекционных технологий мягких тканей на основе биоразрушаемых полигидроксиалканоатов.

Исходя из поставленной цели, были сформулированы следующие задачи:

1. Получить ПГА-микрочастицы различного химического состава: из П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ).
2. Присоединить молекулы белка к функциональным группам на поверхности ПГА-микрочастиц с применением карбодиимидной реакции.
3. Изучить характеристики полученных микрочастиц (среднего диаметра, электрокинетического потенциала, химического состава полимера, молекулярной массы полимера).
4. Определить концентрацию белка, ковалентно-связанного с ПГА-микрочастиц.

5. Оценить стабильность амидной связи между NH_2 -группами белка и COOH -группами полимера на поверхности ПГА-микрочастиц.

6. Исследовать цитотоксичность модифицированных белком П(ЗГБ)-микрочастиц в первичной культуре фибробластов *in vitro*.

Работа проводилась на базе лаборатории биотехнологии новых биоматериалов Сибирского федерального университета.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биоразрушаемые материалы применяемые в биомедицине

В настоящее время известно большое количество материалов, которые могут быть применены в сфере биомедицины. К таким материалам, в том числе относят биоразрушаемые синтетические полимеры, природные полимеры и, среди них, природные полигидроксиалканоаты.

1.1.1 Синтетические полимеры

Наиболее известные виды синтетических полимеров это: полиэтилен, полиметилметакрилат, полиамиды, полиуретаны (ПУ), поливиниловый спирт (ПВС), силиконы, полигликолиды (ПГК), полилактиды (ПМК) [5, 7].

Смеси полилактида с полигликолидом или сополимеры молочной и гликолевой кислот (ПМГК) – это наиболее широко используемые синтетические полимеры для медицинских применений, в том числе для контролируемой доставки субстанций в системах направленного и пролонгированного действия. ПМГК имеют хорошие характеристики по термостойкости, срокам биоразрушения и механической прочности. Также они обладают низкой токсичностью, превосходной биологической совместимостью и характеризуются практически полным отсутствием воспалительных реакций при прямом контакте с внутренней средой живых организмов [8].

Свойства и области применения ПМГК могут варьировать в широких пределах за счет изменения молекулярной массы полимера и за счет изменения соотношения мономерных звеньев в полимере [9].

Высокомолекулярные сополимеры молочной и гликолевой кислот представляют собой бесцветные стеклоподобные полимеры, растворимые в большом количестве органических растворителей, в том числе хлорированных углеводородах, тетрагидрофуране, ацетоне и этилацетате. ПМГК может находиться в частично кристаллическом либо аморфном состояниях [10].

Материалам из ПМГК свойственно объемное разрушение. Вследствие этого гидролиз полимера протекает и на его поверхности, и в объеме, а активное вещество высвобождается и за счет одновременного пропитывания и диффузии имплантата, и растворения. Кроме того, полимерная матрица может разрушиться на части еще до полного выхода активного вещества, что является одной из причин «взрывного эффекта» при высвобождении. Такие особенности поведения материала *in vivo* негативно отражаются на прочностных характеристиках изделий [8, 11].

В организме сополимеры молочной и гликолевой кислот деградируют в основном путем неферментативного гидролиза, при этом, на течение процесса биodeградации влияет значение pH окружающих тканей. Процесс биodeградации полимеров подавляется в кислотной и ускоряется в щелочной среде. Гидролитическая деградация изделий из этих полимеров контролируется диффузией воды, проникающей в поры изделия, и выходом водорастворимых кислотных олигомерных продуктов разрушения полимеров. Роль ферментов в

биодеструкции ПМГК до конца не ясна. Одни исследователи докладывают, что деструкция ПМГК происходит только за счет гидролиза, а другие – что ферменты все-таки способствуют биодеструкции ПМГК, что проявляется в различии скоростей деструкции *in vitro* и *in vivo* [12].

Полимеры на основе молочной и гликолевой кислот разрешены для использования в медицине и фармакологии Департаментом по контролю качества продуктов и лекарств США (United States Food and Drug Administration – F.D.A.) с 1970г. [7], а также в странах Евросоюза, Азии и РФ.

Подавляющее большинство синтетических биополимеров, имеющих хорошо воспроизводимые свойства и обладающие широким спектром физико-механических характеристик – от гидрогелей до жестких материалов, имеют недостатки, такие, как неидеальную биосовместимость и слишком большую скорость резорбции, что не позволяет отнести их к универсальным материалам [5] и стимулирует поиск и разработку новых.

1.1.2 Природные полимеры

В настоящее время растет интерес к биоразрушаемым природным полимерам. К ним относятся три класса полимеров: полисахариды и их производные (альгинаты, целлюлоза, хитозан, декстран, гепарин, гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат); белки (коллаген, эластин, фибрин, фибронектин, шелк); полигидроксиалканоаты (производные гидроксикислот, синтезируемые прокариотическими организмами в качестве запасного энергетического вещества) [13].

Достаточно широкое применение в медицине нашли природные полисахариды хитозан и альгинат. Хитозан чаще всего получают гидролизом хитина, который выделяют из панцирей ракообразных. Альгинат – природный линейный полисахарид, получаемый из морских водорослей или биотехнологической ферментацией. В медицинской практике эти полисахариды в виде пленок, губок и гидрогелей используют как раневые, ожоговые и заживляющие покрытия, в системах доставки клеток, лекарственных веществ и различных факторов роста [14].

Гиалуроновая кислота (ГК) – гликозаминогликан, естественный компонент межклеточного вещества тканей позвоночных, - перспективный материал для восстановительной хирургии и тканевой инженерии. Гликозаминогликаны используются при болезнях суставов в ортопедии, в качестве барьерных мембран в полостной хирургии, ожоговых покрытий, а также в косметологии [7].

Белки коллаген и фибрин также являются распространенными природными полимерными материалами и широко применяются в медицине. Области применения коллагена – эндопротезы мягких тканей, компоненты материалов для лечения поражений кожных покровов и слизистых оболочек и др. Фибрин может быть использован в виде фибрин-полимерного сгустка для покрытия пораженных участков кожи, в виде порошка в качестве

гемостатического агента для обработки ран, в виде фибриновой пены в качестве также гемостатического и пломбирующего средства и др. [7].

Желатин – это денатурированная форма коллагена. Этот природный полимер применяется в качестве матриксов для выращивания клеток *in vitro* в ТИ мягких тканей.

Биоразрушаемые природные полимеры также нельзя отнести к универсальным материалам, так как они имеют недостаточную механическую прочность. К тому же природные биополимеры имеют высокую стоимость получения и достаточно трудоемкую обработку [7].

1.1.3 Природные полигидроксиалканоаты

Особое место среди натуральных биополимеров занимают полигидроксиалканоаты (ПГА) – биodeградируемые и биосовместимые линейные полиэфиры алкановых кислот микробиологического происхождения – они являются перспективным материалом для изготовления изделий, пригодных для применения в различных сферах [15]. ПГА могут использоваться в сельском и коммунальном хозяйстве, радиоэлектронике, фармакологии. Особо перспективны эти полимеры для разработки изделий и устройств медико-биологического назначения, включая возможность получения нетканого полотна и одноразовых изделий, шовных и перевязочных материалов, систем контролируемой доставки лекарственных средств, матриксов для клеточной и тканевой инженерии, элементов для восстановительной хирургии и трансплантологии [16].

Полигидроксиалканоаты находятся на втором месте по значимости среди разрабатываемых сегодня биопластиков. Эти полимеры изучают относительно недолгое время, с конца 80-х – начала 90-х гг. XIX в. ПГА синтезируются в одну стадию биотехнологическим способом на различных типах сырья. В отличие от полилактидов, ПГА более термопластичны, имеют более высокие прочностные характеристики, не растворяются в водных средах, поэтому сроки их биодеструкции в среднем более длительны. Продукт распада – мономеры масляной кислоты – не вызывает такого резкого закисления тканей, как молочная кислота. ПГА имеют следующие особенности и преимущества: [7]

1. Технология биосинтеза ПГА позволяет получать образцы полимеров разной химической структуры, различающихся степенью кристалличности, гибкости, механической прочности, скоростями биodeградации;

2. Базовые свойства ПГА дают возможность применять различные способы переработки (прессование из расплавов и порошков, экструзию из расплавов, переработку из растворов и эмульсий) для получения широкого спектра изделий – пленок, мембран, шовных волокон, объемных плотных и пористых матриксов, полимерных покрытий, полимерных эндопротезов различных типов;

3. Основной компонент ПГА – 3-гидроксимасляная кислота – это промежуточный продукт цикла трикарбоновых кислот, является естественным

продуктом обмена клеток и тканей, а конечный продукт биodeградации ПГА – диоксид углерода и вода. Это позволяет получать изделия для биомедицины высокой биосовместимости, имплантация которых не сопровождается образованием продуктов, влияющих на рН тканей, вызывающих воспалительные или иные негативные реакции;

Известно около 150 различных мономеров, которые могут входить в состав ПГА, синтезируемых разными группами микроорганизмов, в том числе и генетически модифицированных. На состав ПГА влияют особенности микроорганизма-продуцента, пути его метаболизма, источники углерода. В зависимости от мономерного состава кристалличность, пластичность, термические свойства ПГА сильно варьируют [17].

В исследовании в качестве материала для создания микрочастиц использовали гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты и сополимеры 3-гидроксibuтирата с 3-гидроксивалератом.

Гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты (поли-3-гидроксibuтират, ПЗГБ) – является наиболее изученным представителем среди ПГА. Очищенные образцы ПЗГБ обладают высокой степенью биосовместимости. Также ПЗГБ обладает рядом негативных свойств: жесткость и хрупкость, связанные с большой кристалличностью (70%) полимера, медленная скорость деградации *in vivo* [18, 19].

Наиболее перспективными для переработки в изделия различного рода являются сополимеры 3-гидроксibuтирата с 3-гидроксивалератом (ПЗГБ/ЗГВ). В зависимости от содержания ЗГВ кристалличность сополимеров варьирует в пределах 39-69%. Механические свойства сополимеров, содержащих ЗГВ, в зависимости от соотношения мономеров могут существенно меняться: с увеличением доли ЗГВ полимер степень кристалличности уменьшается и полимер становится более эластичным. Температура плавления сополимера ниже по сравнению с ПЗГБ, и чем выше доля 3-гидроксивалерата, тем больше это снижение. Физико-механические свойства также существенно меняются от соотношения мономерных фракций. ПЗГБ/ЗГВ является вторым по изученности представителем ПГА после ПЗГБ. В ходе исследования свойств сополимера ПЗГБ/ЗГВ было обнаружено, что высокоочищенный сополимер вызывал минимальную тканевую реакцию при имплантации животным, то есть ПЗГБ/ЗГВ имеет высокую биосовместимость [18, 20].

Таким образом, можно отметить, что сополимерные ПГА являются более перспективным материалом, так как их свойства варьируют в широких пределах в зависимости от состава и распределения мономеров.

1.2 Требования, предъявляемые к материалам для клеточной и тканевой инженерии

Основные требования, предъявляемые к материалам для создания матриц, – это биосовместимость и биоразрушаемость [21].

Биосовместимость – это способность материала находиться внутри организма без воспалительных и аллергических реакций [21]. На

биосовместимость материала влияет состав и форма имплантата, структура поверхности и наличие активных функциональных групп на ней. Матрицы для клеток могут быть произведены в форме гелей, микро - и наночастиц, волокон, пленок, различных трехмерных конструкций [21].

Микро - и наночастицы, изготовленные из синтетических или натуральных биополимеров, чаще всего нужны в качестве систем доставки препаратов и биологически активных веществ, но также могут быть использованы и в качестве матриц для доставки клеток в требуемое место [5].

Постоянное нахождение неразрушаемого имплантата в организме связано с нежелательными побочными действиями: окисление поверхности, воспалительные реакции, экранирование механической нагрузки, необходимой для нормального развития тканей, и необходимость повторной операции для удаления имплантата. Поэтому большое внимание уделяется разработке биоразрушаемых материалов, то есть способных постепенно разлагаться в организме, желательно со скоростью, сопоставимой со скоростью роста новых тканей и образованием нетоксических продуктов, которые вовлекаются в метаболизм или легко выводятся из организма. Деградация материалов в организме осуществляется гидролитически или ферментативно, поверхностно или во всем объеме матрикса [5].

Важным параметром при выборе материала для матрикса являются свойства поверхности: гидрофильно-гидрофобный баланс поверхности, шероховатость, заряд [5].

Было установлено, что для адгезии и пролиферации клеток более благоприятна поверхность со средней гидрофобностью. Более гидрофильная поверхность лучше подходит для адгезии белков, таких как фибронектин или коллаген, связывающих клетки с субстратом. Для повышения гидрофильности поверхности используются различные приемы – обработка плазмой кислорода, водорода, азота, обработка щелочью, липазой, белками, покрытие материала стерином, акриламидом и другими веществами в зависимости от требуемого результата [22].

Шероховатость поверхности – следующий важный параметр, влияющий на гидрофильность поверхности, адсорбцию белков, прикрепляемость клеток и особенности их роста в дальнейшем, а также на протекание воспалительной реакции. Для разных типов клеток подходят поверхности с различными коэффициентами шероховатости. Например, для остеобластов лучше подходит, упрощенно, более шероховатая поверхность, а для эпителиальных клеток – более гладкая [23].

Заряд поверхности материалов влияет на адгезию клеток, взаимодействуя с зарядом клеточных мембран и, таким образом усиливая взаимодействие между клеткой и субстратом. При использовании материалов для контакта с кровью необходимо, чтобы молекулы материала были отрицательно заряжены, как и клетки крови, для предотвращения тромбообразования. Заряд

поверхности материала также определяет интенсивность воспалительной реакции [23].

1.2.1 Дизайн инъекционных скафолдов на основе микро- и наносителей

Биодеградируемые полимерные микросферы появились как носители клеток для регенерации и восстановления дефектов тканей неправильной формы из-за их инъекционной способности, контролируемой биоразлагаемости и способности к введению и высвобождению лекарственного средства. Примечательно, что последние достижения в области нанотехнологий позволили манипулировать физическими и химическими свойствами микросфер в наномасштабе, создавая наноструктурные микросферы, имитирующие состав и/или структуру естественного внеклеточного матрикса. Эти наноструктурированные микросферы использовались в качестве носителей клеток для регенерации тканей. Они усиливают клеточное связывание и пролиферацию, способствуют позитивным взаимодействиям с клетками и дифференцировке стволовых клеток для регенерации ткани мишени [24].

Инъекционные скафолды также могут привести к сокращению времени восстановления благодаря минимальной инвазивности инъекции и возможности легкой имплантации сборного скафолда. Клеточные носители, уже используемые для выращивания большого количества клеток в фармацевтической промышленности, все чаще стали играть роль в дизайне каркаса тканевой инженерии. Разработаны различные новые инъекционные носители для доставки клеток и регенерации дефектов тканей неправильной формы [25]. Как и другие скафолды, используемые в тканевой инженерии, клеточные микроносители были разработаны для доставки факторов роста и клеток [26] и были построены из широкого спектра материалов, каждый из которых имеет особые преимущества и недостатки (рисунок 1).

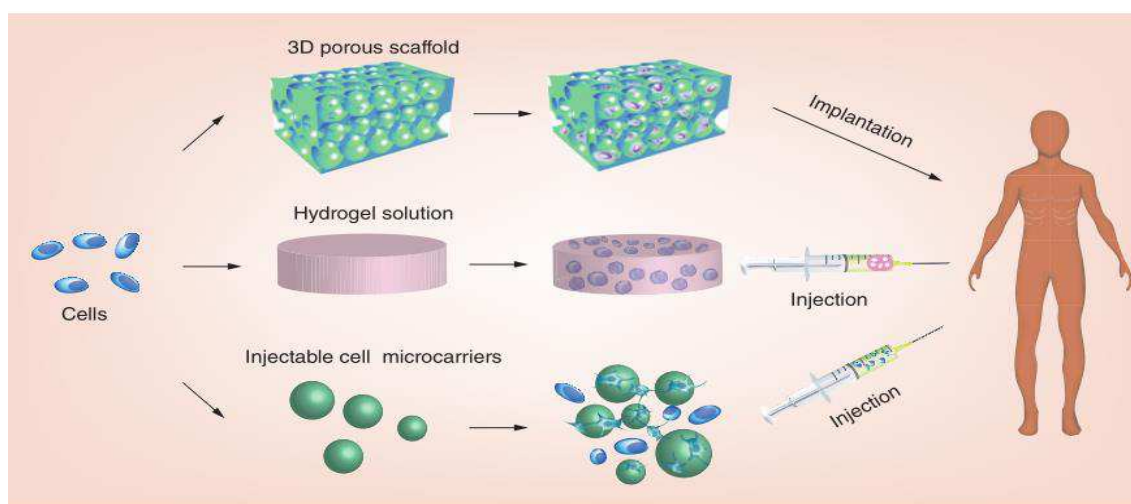


Figure 1. A schematic showing the three typical strategies for cell delivery and tissue regeneration. (A) Cell-seeded 3D porous scaffolds for implantation. **(B)** Cell-mixed hydrogel prepolymer solution for injection to the targeted site for *in situ* gelation. **(C)** Cell-laden microspheres, with or without *in vitro* culture, for injection to the targeted site.

Рисунок 1 – Схема трех основных стратегий клеточной доставки и тканевой регенерации [24]

Было обнаружено, что, помимо включения факторов роста или других малых молекул на поведение клеток и регенерацию тканей значительно влияет наноструктура инъекционных частиц [24].

Чтобы оптимизировать микросферы для тканевой инженерии и регенерации, необходимо выполнить несколько требований к дизайну. Во-первых, микросферы должны быть биodeградируемыми и биосовместимыми. Во-вторых, скорость деградации должна точно соответствовать скорости образования новой ткани и демонстрировать соответствующую долговечность. В-третьих, размер и морфология микроносителей должны быть пригодны для переноса клеток. В-четвертых, химический состав и поверхностная архитектура микросферы должны способствовать клеточной адгезии, пролиферации и дифференцировке. Кроме того, могут потребоваться биологически активные и стимулирующие клетки, которые могут направлять дифференциацию стволовых клеток, поддержание фенотипа и облегчение регенерации ткани мишени. Эти «клеточно-поучительные» элементы могут быть встроены в микросферу через ее архитектуру или механические свойства или могут быть включены посредством прикрепления факторов роста или цитокинов [27]. Производство *de novo* внеклеточного матрикса клетками, высеваемыми на микроносителях в виде частиц, напоминало многие особенности происхождения ткани [28], что побудило исследователей изучить потенциал использования микросфер в качестве средств доставки клеток для тканевой инженерии. Однако эти традиционные твердые микросферы часто биологически не разлагаются и не имеют биомиметической поверхностной структуры для взаимодействия с клетками.

Оптимизация прикрепления клеток и адгезии является еще одним важным фактором в разработке микросфер. Как правило, клетки непосредственно смешивают с микросферами в суспензионной культуре и вводят в участок дефекта с предварительной культурой или без нее в средах дифференцировки [29]. Для усиления прикрепления клеток микросферы могут быть предварительно покрыты различными белками, адгезионными факторами или даже компонентами сыворотки [30].

Пористость частиц - еще один фактор в дизайне, позволяющий эффективно переносить питательные вещества/отходы и, следовательно, положительную микросреду для функционирования клеток [31]. Клеточно-микросферные взаимодействия (как физические, так и химические) имеют решающее значение для полученного клеточного фенотипа и эффективности конструкции микросферы. Таким образом, для улучшения взаимодействия клеток и частиц исследователи в настоящее время разрабатывают технологии для модификации физической и химической структуры носителей клеток с особым акцентом на имитацию естественной среды для клеток [26]. С одной стороны, скафолды с наноархитектурой, напоминающие естественную наноструктуру внеклеточного матрикса, могут усилить клеточно-матричные взаимодействия и регенерацию тканей [31, 32]. Например, имитируя архитектуру натуральных коллагеновых фибрилл, в каркасах нанофибрилл

усиливались множественные типы формирования ткани, включая кости [32], дентин [33], межпозвонковые диски [34], хрящ [31] и кровеносные сосуды [35]. С другой стороны, инженерные скафолды для связывания и представления соответствующих биохимических сигналов (например, факторов роста/цитокинов и т. д.) являются важной стратегией регулирования стволовых клеток при регенерации тканей. Например, факторы роста, связанные с межклеточным матриксом, являются важными регуляторными сигналами, которые широко внедряются в биоматериалы для морфогенеза в тканевой инженерии с помощью различных стратегий доставки/представления [26, 32, 36]. Поэтому, критически важно принимать во внимание, как физическую архитектуру, так и включение конкретных сигнальных фрагментов в конструкцию инъеклируемых микросфер, для их функции и оптимизации.

Sha Huang было продемонстрировано использование микрочастиц с различными поверхностными характеристиками за счет модифицированного процесса сушки. Микрочастицы с различной морфологией поверхности (гладкие, бугристые и многоугольные) были созданы из химически сшитых желатиновых частиц. Три типа микрочастиц были охарактеризованы и оценены с точки зрения клеточного поведения кератиноцитов и фибробластов человека, высеваемых на них. Все типы микрочастиц обладают хорошей биосовместимостью, способностью к биологическому разложению и надлежащим механическими свойствами, что совместимо с их использованием в клеточной терапии. Клетки могут присоединяться, распространяться и размножаться на всех типах микрочастиц. Тем не менее, клетки прилипают и размножаются быстрее на микрочастицах с модифицированной поверхностью, чем на микрочастицах с гладкой поверхностью. Кроме того, микрочастицы с многоугольной поверхностью представлялись оптимальными для клеточной фиксации и пролиферации, равномерного распределения клеток и, следовательно, образования агрегации, вызванной клетками [37].

Подобно 3D монолитным скафолдам, как натуральные, так и синтетические полимеры используются для изготовления биоразлагаемых микросфер. Одним из таких примеров является Cellagen®, сшитый коллагеновый микроноситель I типа, который может поддерживать пролиферацию хондроцитов и экспрессию фенотипа [38]. Было обнаружено, что эти коллагеновые микросферы поддерживают пролиферацию остеобластов и продуцирование белков костной матрицы [39]. К сожалению, коллаген имеет относительно слабые механические свойства [40]. Альтернативно, желатин имеет химическую структуру, подобную коллагену (денатурирован из коллагена), в то время как его механические свойства и скорость деградации можно контролировать, регулируя плотности поперечного сшивания. Существует также более низкий уровень провоцирования иммунного ответа желатином по сравнению с коллагеном [41]. Функциональность и реакционная способность полисахаридов и, в частности, гиалуроновой кислоты в сочетании с белками, такими как желатин, коллаген и многие другие, дают интересные возможности для новых тенденций в регенеративной медицине [42].

В процессе разработки нового типа наполнителя для коррекции мелких дефектов в мягких тканях были изучены макропористые желатиновые сферы как культуральный субстрат, трансплантационный носитель и биоразлагаемый каркас для направленной регенерации мягких тканей *in vivo*. Fredrik R.M. Huss et al. инъецировали интрадермально желатиновые шарики под кожу голых мышей, микросферы были предварительно обработаны фибробластами человека, либо преадипоцитами, либо оставлены без использования клеток. При сравнении степени регенерированной ткани с таковой после инъекций физиологических или одноклеточных суспензий фибробластов или преадипоцитов человека - введенные физиологические растворы или суспензии содержащие клетки не влияли. Однако быстрая и тщательная регенерация тканей с развитием неоангиогенеза была вызвана желатиновыми сферами, а действие сфер, обработанных преадипоцитами, превзошло влияние сфер, обработанных фибробластами, что, в свою очередь, превзошло эффект действия голых желатиновых сфер. Предполагается, что незначительные дефекты мягких тканей, такие как морщины или складки, могут быть исправлены путем инъекции голых макропористых желатиновых сфер, тогда как более крупные дефекты лучше всего корректировать путем инъекции макропористых желатиновых сфер, обработанных фибробластами или преадипоцитами, или и то, и другое [43].

Хитозан, частично деацетилированное производное хитина, является другим широко используемым природным полимером для биомедицинских применений [44].

Хитозан является биodeградируемым и обладает хорошими механическими свойствами. В дополнение к тому, чтобы широко использоваться для создания монолитных скафолдов, хитозан также был изготовлен в микросферы для потенциальной доставки клеток и регенерации тканей [45, 46]. Преимущества хитозана включают биосовместимость, доступность в больших количествах и присущие ему антибактериальные свойства [47]. Из-за его структурного сходства с гликозаминогликанами, которые являются важными компонентами экстраклеточного матрикса печени, хрящей и других тканей, хитозан также был протестирован как материал для доставки гепатоцитов. Микроносители из хитозана облегчают образование агрегатов клеток и правильную экспрессию фенотипа печени [48]. Подобно желатину, хитозан может также образовывать полиионные комплексы с заряженными белками или лекарственными средствами, создавая систему доставки биологически активных агентов, способную к медленному высвобождению [49]. Композитные микросферы также могут быть изготовлены из натуральных полимеров, сочетая в себе сильные стороны отдельных материалов, чтобы преодолеть их недостатки.

За последние годы ПГА нашли широкое применение в реконструкции тканей, за счет контролируемой биоразлагаемости, биосовместимости, восприимчивости к гидролитической деградаци и возможности изменять механические свойства. ПГА способны производить скафолды с

превосходными механическими свойствами в сочетании с неорганическими агентами. Известно также, что широкий спектр составленных из ПГА материалов, от твердых и хрупких материалов до мягких и эластомерных, может быть спроектирован как для мягкой, так и для твердой тканевой инженерии [50]. Кроме того, основанные на ПГА скафолды могут поддерживать рост клеток за счет поддержания нужного уровня питательных веществ. Кроме того, имплантаты, изготовленные на основе ПГА, могут обладать различными физико-химическими свойствами и деградировать с контролируемой скоростью, сохраняя свою механическую прочность, как в течение короткого времени, так и длительных периодов времени после индукции формирования ткани [51].

Также, синтетические полимеры получают значительное внимание в качестве микросферных материалов. Разработаны самые разнообразные синтетические микросферы для тканевой инженерии, и многие из них демонстрируют потенциал для улучшения регенерации тканей [31, 52, 53, 54]. Как и природные полимеры, синтетические полимеры могут быть смешаны с другими материалами для создания композитов, которые устраняют недостатки, или улучшают свойства чистого полимера [24].

С новыми открытиями в области биологии и нанотехнологий ученые начинают разрабатывать новые наноструктурированные микросферы, включающие различные биомиметические характеристики. Лекарственные препараты и биомолекулы были собраны и включены в нанодомены микросфер и доставлены в клетки для регулирования пролиферации и дифференцировки клеток для целевой регенерации тканей.

1.3 Тканевая инженерия мягких тканей: реконструкция кожи

Полное закрытие раны и восстановление нормальных функций кожной ткани являются основными целями тканевой инженерии кожи. Нанобиополимеры должны имитировать кожу человека, выступая в качестве гемостатического барьера против бактерий, поглощая экссудаты и сохраняя влажную среду, легко снимаемую, безболезненную для пациента, легко трансплантируемую в больших количествах и без значительных рубцов [55, 56, 57]. На уровне кожи биосовместимые и биоразлагаемые полимерные нановолокнистые мембраны, такие как трехмерные заменители/каркасы дермо-эпидермального типа, изготовленные методом электроспиннинга, разделения фаз или самосборки, привлекают фибробласты, которые секретируют компоненты экстраклеточного матрикса (факторы роста коллагена, цитокинов, ангиогенные факторы) для восстановления поврежденных тканей [58, 59]. Природные полимеры для кожи включают различные нанобиоматериалы, проявляющие ранозаживляющие свойства. Например, коллагеновые нановолоконные и коллагеновые гибридные матрицы из полигликолевой кислоты являются основными полусинтетическими полимерами, применяемыми в качестве кожных заменителей для регенерации кожи: мембраны из нановолокон, покрытые коллагеном, демонстрируют хорошую

адгезию клеток, пролиферацию и миграцию фибробластов в нановолоконную матрицу [60].

1.3.1 Применение коллагена для реконструкции мягких тканей

Структура коллагена состоит из трех параллельных полипептидных цепей, каждая из которых имеет конформацию левозакрученной спирали (рисунок 2).

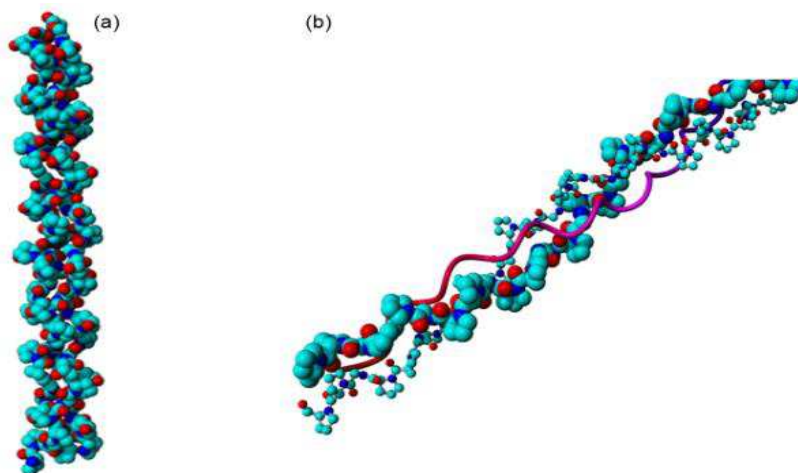


FIGURE 7.1

Overview of collagen triple helix. (a) Collagen structure (Protein Data Bank id: 1cag, YASARA image). (b) Collagen triple helix with the three chains illustrated in ball and sticks, balls and ribbon (Protein Data Bank id: 1k6f, YASARA image).

Рисунок 2 – Кристаллическая структура тройной спирали коллагена[61]

Эта тройная спираль представляет собой четвертичную структуру, стабилизированную водородными связями, внутримолекулярными ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями и ковалентными связями, связанными с микрофибриллами и фибриллами и состоящими из коллагеновых волокон. Правая спираль, образованная тремя цепями, имеет 18 аминокислот за ход. Каждая цепь состоит из примерно 1000 аминокислотных остатков и имеет длину около 300 нм и диаметр 1,4 нм [61]. Коллаген имеет особое строение, представленное регулярным расположением аминокислот в каждой субъединице. Каждая из α -цепей состоит из триад аминокислот. В триадах третья аминокислота всегда глицин, вторая пролин или лизин, первая любая другая аминокислота, кроме трёх перечисленных [61, 62]. Аминокислоты, занимающие первые две позиции, чаще представлены пролином (Pro, 28%) и гидроксипролином (Hyp, 38%). Эти две аминокислоты составляют примерно шестую часть от общей последовательности и могут участвовать в различных взаимодействиях, точнее, во внутримолекулярной стабилизации из-за их стерического отталкивания [61,62]. Триплет ProHypGly является наиболее распространенным в структуре коллагена. Телопептиды (короткие не спиральные домены из 9-26 аминокислот) способствуют образованию коллагеновых фибрилл и их естественному сшиванию, в сочетании с другими структурами окружающей матрицы [61]. Другими компонентами, которые

играют важную роль в формировании тройной спиральной структуры, являются С- и N-пропептиды. Таким образом, С-пропептиды способствуют началу образования тройной спирали, тогда как N-пропептиды участвуют в регулировании диаметров первичных фибрилл [61]. Скрученная структура коллагена стабилизируется связями, создаваемыми между Gly и Pro. Кроме того, содержание 4-гидроксипролина важно для образования водородных связей и, следовательно, стабильности тройной спиральной конформации.

Семейство фибриллярных коллагенов включает типы I, II, III, V, XI. Фибриллярный коллаген типа I представляет собой наиболее важный компонент внеклеточного матрикса и один из наиболее распространенных белков млекопитающих. Он обычно встречается в связочных и сухожильных тканях, где он обеспечивает прочность на разрыв. Фибриллы коллагена I формируются в иерархическом процессе самосборки и начинаются с тройных спиральных монотропических мономеров (длина 1,5 нм, длина 300 нм), через микрофибриллярные единицы диаметром 4×5 нм. Одна молекула содержит три цепи аминокислот, которые образуют тройную спираль (две цепи $\alpha 1$ и одна $\alpha 2$ -цепь), каждая цепь состоит всего из 1000 аминокислот. Молекула характеризуется тремя доменами: N-телопептидный домен, расположенный в N-конце, домен тройной спиральной области и С-телопептидный домен на С-конце, который помогает в образовании ферментативных ковалентных сшивок и, таким образом, обеспечивает структурную целостность, прочность и жесткость коллагеновых тканей [63].

Коллаген, один из основных компонентов внеклеточного матрикса, интенсивно изучается для использования в реконструкции мягких тканей. Будучи природным биоматериалом, коллаген характеризуется низкой механической прочностью и антигенностью, отличной биосовместимостью и биоразлагаемостью [64]. Его можно использовать как отдельно, так и в сочетании с губками, пленками и гелями. Кроме того, коллаген может быть сшит с другими материалами или веществами, чтобы стать более прочным или изменить профиль деградации [65]. В различных исследованиях сообщалось об использовании биоматериалов на основе коллагена при регенерации периферических нервов, заполнения дефектов после операций по поводу образованию спинного мозга, регенерации сухожилий, инженерии скелетных мышц и тканей роговицы [66]. Важной причиной эффективности коллагена в области биомедицины является то, что коллаген может образовывать прочные и стабильные волокна из-за его самоагрегации и процесса сшивания. Коллаген может использоваться как биоинжиниринговая ткань для сердечно-сосудистой системы, такая как кровеносные сосуды и клапаны сердца, из-за его гемостатических свойств. Было продемонстрировано, что трехмерные биодеградируемые коллагеновые скафолды обеспечивают большую площадь поверхности для прикрепления клеток и процесса васкуляризации. Учитывая преимущества коллагена, особенно его низкую антигенность и способность интегрироваться с окружающими тканями, исследователи использовали коллаген для восстановления целостности брюшной стенки. Новые поколения

коллагеновых тканей могут быть реконструированы благодаря простой конфигурации, однородности и доступности [61].

Кожа представляет собой естественный барьер между внутренним организмом и внешней средой. На целостность кожи могут влиять ожоговые травмы, хронические раны, хирургические процедуры и ограниченное кровообращение. Эпидермальные, поверхностные дефекты кожи могут восстанавливаться путем самовосстановления, но глубокие раны кожи нуждаются в кожной пересадке [61].

Основываясь на принципах ТИ, биомедицинские заменители кожи представляют собой важный терапевтический вариант [67]. Основными материалами, используемыми для восстановления кожной ткани, являются: коллаген, гиалуронат, амнион, полилактид, полигликолид и полибутилентерефталат [68]. Конструкции на основе коллагена характеризуются хорошей биосовместимостью, биоразлагаемостью и низкой иммуногенностью, но их применение ограничено их плохими механическими свойствами. Было показано, что искусственные полимеры, такие как поли (ϵ -капролактон), поли (молочная кислота), поли (гликолевая кислота) и их сополимер ПЛГА характеризуются превосходными механическими свойствами [69, 70].

Коллагеновые каркасы с хитозаном чаще всего используются для регенерации кожи. Такие каркасы могут поддерживать и ускорять инфильтрацию и пролиферацию фибробластов [71].

Скафолды, засеянные фибробластами на поверхности, могут быть перспективным кандидатом на разработку кожной ткани [72]. Коллагеновые гели и гидрогели считались перспективными кандидатами на замену кожи, но, к сожалению, их резкое сокращение после смешивания с клетками и их плохие механические свойства представляют собой основной недостаток их использования в качестве кожного трансплантата [73].

Коллаген представляет собой самый распространенный белок в организме (до 30%) и обладает фибриллярной структурой. Коллаген участвует в биомеханических функциях организма, особенно на уровне соединительных тканей. Кроме того, коллаген представляет собой основной элемент внеклеточного матрикса, и на этом уровне он проявляет важные функции, связанные с хранением и высвобождением факторов роста [74]. Благодаря своим свойствам, различные типы коллагена привлекли внимание исследователей для широкого использования в медицине, косметологии, фармацевтике и пищевой промышленности. Разработано много биоматериалов из коллагена, включая гели, гидрогели, губки, мембраны, сферы и порошковые губки. В настоящее время исследователи сосредоточены на разработке имплантатов на основе коллагена для кожного трансплантата, регенерации и восстановления сухожилий, сердечных и кровеносных сосудов, хрящей и костной ткани.

1.3.2 Применение факторов роста для реконструкции мягких тканей

Факторы роста представляют собой биологически активные полипептиды, которые регулируют рост клеток, пролиферацию и миграцию, а также экспрессию белка и производство ферментов. Кроме того, факторы роста обладают потенциальной способностью лечить раны путем стимуляции - ангиогенез, модулирующий воспалительный ответ и вмешательство в производство и деградацию внеклеточного матрикса [75].

Основные факторы роста, участвующие в процессе заживления и регенерации кожи - это фактор роста тромбоцитов (PDGF), эпидермальный фактор роста (EGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF) и семейство факторов роста эндотелия сосудов (VEGF) [76].

Скафолды, загруженные факторами роста, представляют собой конструкцию для длительного высвобождения и более точного распределения в ткани-мишени, поскольку высвобождение факторов роста замедляется за счет структуры скафолда, что обеспечивает более устойчивое высвобождение факторов роста [77].

1.4 Разнообразие материалов на основе микро- и наночастиц

На сегодняшний день существует большое количество исследований, в которых можно отметить использование разнообразных по составу микро- и наночастиц. В зависимости от того, в каком качестве используются микро- и наночастицы осуществляются химические модификации материала, воздействие средовых факторов и т.д.

1.4.1 Микро- и наночастицы в качестве носителей для контролируемой доставки препаратов

Одним из актуальных направлений в биомедицине является контролируемая доставка препаратов. Методы доставки лекарств могут влиять на эффективность, а также на природу самого препарата. Микрочастицы сделанные из биodeградируемых полимеров, таких как поли (D, L-лактид-со-гликолид) и полимолочная кислота (ПМК), широко изучаются для контролируемого высвобождения разнообразных лекарств. Yujie Xia et al. использовали эмульсионный метод, для изготовления однородных микрочастиц, управляя их геометрическими свойствами. Производя частицы однородного размера, который имеет решающее значение и влияет на поведение лекарственного средства, используя модельные препараты с малыми молекулами и макромолекулами, группа исследователей продемонстрировала, что физико-химические свойства полимеров и лекарств, и структурные свойства матрицы могут значительно влиять на распределение лекарственного средства в микрочастицах, эрозию частиц и скорость высвобождения лекарств [78]. В данном исследовании было показано, что скорость высвобождения родамина и профили высвобождения пироксикама увеличились с уменьшением

размера частиц. Начальное пространственное распределение лекарственного средства внутри частиц также контролируется размером частиц и играет значительную роль для скорости контролируемого высвобождения. Распределение лекарств было более однородным для микросфер крупных размеров. Оказалось, по мере уменьшения размера частиц при более быстром затвердевании, как правило, кинетически лекарства захватываются, прежде чем сформируется микросфера и распределение лекарств в данном случае менее однородно [78]. Также микросферы могут использоваться для изготовления частиц, предназначенных доставлять два или более терапевтических препарата одновременно [79].

Полимерные наночастицы и микрочастицы широко используются для доставки пептидов, биологических и растворимых терапевтических средств [80]. Макромолекулы, такие как белки, полисахариды и ДНК, выступают агентами для специфической терапии. Однако их соединение с матрицей и доставка сталкиваются со многими проблемами. Например, многие макромолекулярные терапевтические средства требуют строгого контроля над концентрацией и локализацией *in vivo*. Однородные микрочастицы для высвобождения макромолекул могут обеспечивать лучшую инкапсуляцию и контролируемую скорость высвобождения, а также предоставить возможность изучить механизмы профилей для контролируемого высвобождения макромолекул [80].

К примеру, С. Martín-Sabroso et al. с помощью эмульсионного метода получили микрочастицы из ПЛГК, инкапсулированные белком. В качестве белковой модели использовали альбумин. Концентрация NaCl во внешней водной фазе, концентрация поливинилового спирта и главным образом вязкость, как внутренней водной фазы, так и органической фазы являлись главными критериями для улучшения загрузки белка. Таким образом, при использовании 0,5% ПВС в качестве внутренней водной фазы была достигнута самая высокая загрузка альбумина. Оптимизированные микрочастицы демонстрировали устойчивый выход альбумина *in vitro* в течение 130 дней. Влияние процесса микроинкапсулирования на стабильность и биологическую активность альбумина оценивали путем проведения анализа пролиферации клеток РС12 с альбумином, высвобождаемым из микрочастиц. РС12 клетки получали из феохромоцитомы мозгового вещества надпочечников крысы. Такой анализ показал, что процедура микроинкапсулирования, оптимизированная в этом исследовании, не влияла на биологическую стабильность микрокапсулированного белка [81].

Roozbeh Qodratnama et al. представили подход для предварительного высвобождения лизоцима из ПЛГК - микрочастиц большого размера (100-300 мкм). В этой работе показано, что скорость высвобождения лизоцима и общее выделение связаны с массой триблок-сополимера, присутствующего в полимерной композиции. Было показано, что смешивание триблочного сополимера ПЛГК-ПЭГ-ПЛГК с ПЛГК 85:15 приводит к увеличению общего высвобождения лизоцима и сокращению периода высвобождения и такие

микрочастицы можно использовать в качестве матрицы для предварительного высвобождения белка из микрочастиц. Эти микрочастицы с модулированными свойствами высвобождения белка могут быть использованы для создания основанных на микрочастицах тканевых инженерных конструкций с заранее запрограммированными свойствами высвобождения [82].

Методика распылительной кристаллизации, то есть процесс инкапсулирования без растворителя, был успешно использован Marcello Di Sabatino et al. для получения БСА-загруженных липидных микрочастиц. В качестве модельного белка использовали бычий сывороточный альбумин (БСА), а в качестве носителей использовали три низкоплавких липида (глицерилпальмитостеарат, тримиристин и тристеарин). БСА-загруженные липидные микрочастицы были охарактеризованы с точки зрения размера частиц, морфологии и загрузки лекарств. Результаты показали, что микрочастицы имеют сферическую форму, средний диаметр в диапазоне 150-300 мкм и эффективность инкапсулирования выше 90%. Возможные изменения структуры белка в результате производственного процесса были исследованы с использованием УФ-спектрофотометрии. Результаты показали, что структурная целостность белка поддерживается внутри частиц [83].

Также для контролируемой доставки препаратов и пептидов актуально использование хитозановых матриц [84]. В исследовании Sarah Wassmer et al. изучается кинетика высвобождения белков из хитозановых микрочастиц *in vitro* и оценивается их биосовместимость и цитотоксичность на клетках сетчатки *in vitro* и *in vivo*. Для исследования инкапсуляции и высвобождения использовали два белка: БСА и tat-EGFP (зеленый флуоресцентный белок, слитый с трансактиватором транскрипционного пептида). В целом, это исследование показало, что микрочастицы из хитозана являются эффективными агентами для долгосрочной доставки в сетчатку, но концентрация хитозана может влиять на цитотоксичность [85].

Система доставки лекарств с пролонгированным высвобождением для повышения эффективности заживления ран была разработана S Yavasvini et al. путем загрузки инкапсулированных симвастатином микрочастиц из хитозана в гидрогели из поливинилового спирта [86].

Микро- и наночастицы, также используются для доставки лекарств, опосредованной клетками, которая должна усилить нацеливание синтетического нано- или микроносителя, нагруженного лекарственными средствами, и уменьшить доставку не по назначению. Поверхностно-модифицированные клетки успешно используются для облегчения доставки носителей на основе нано- и микрочастиц на целевой сайт. Этот механизм, зависит от микроокружения, в которое должен быть доставлен препарат, а затем от природы патологического состояния. Целевое выделение наночастиц на уровне ткани в контексте клеточно-опосредованной доставки может применяться и для доставки в микроокружение опухоли, и в участки воспаления или инфекции [87].

Существуют три основных эндогенных стимула, которые могут быть использованы для инициирования высвобождения нано- или микрочастиц с поверхности клетки: пониженный интерстициальный рН, разность окислительно-восстановительного потенциала или повышенный уровень внеклеточных ферментов, таких как протеаза, фосфолипаза или гликозидазы. Кроме того, в случае использования лекарственных средств, которые действуют на внутриклеточные мишени, нано- или микроноситель должен быть сконструирован таким образом, чтобы, повышать клеточную интернализацию, а также скорость доставки активного соединения в подходящую органеллу, используя различные внутриклеточные значения рН, окислительно-восстановительный потенциал и концентрацию ферментов[88].

Wayteck и др. [89] совместили опухолевые свойства цитотоксических Т-клеток с их способностью повышать доставку наночастиц, нагруженных лекарственными средствами, в опухолевую ткань. Этот пример представляет собой современную технологию сочетания клеточной терапии и доставки лекарств, опосредованных клетками.

1.4.2 Микро- и наночастицы в качестве каркасов для клеточной и тканевой инженерии

На сегодняшний день, одним из актуальных направлений экспериментальной биологии и медицины являются методы длительного культивирования клеток, в том числе клеток-предшественников специализированных тканей.

Данные методы ТИ направлены в первую очередь на создание новых композиционных материалов для восстановления утраченных функций отдельных тканей или органов в целом. Основные принципы данного подхода заключаются в разработке и применении при имплантации в поврежденный орган или ткань носителей из биodeградируемых материалов, которые используются в сочетании с донорскими клетками и/или с биоактивными веществами. Такими носителями могут быть: гибкие прозрачные пленки, мембраны, ультратонкие волокна, губки, а также микрочастицы [90, 91].

Активно разрабатываемые в последние годы методы микроинкапсулирования позволяют получать микрочастицы с микро- и наноразмерным диаметром, которые в силу высочайшей развитости поверхности и возможности имплантирования подкожно, внутримышечно и инфузионно имеют огромные перспективы не только для разработки систем контролируемой доставки лекарственных средств, но и в качестве матриц для выращивания клеток [90].

Среди биоматериалов, активно изучаемых для конструирования матриц функционирующих клеток – альгинаты, коллаген, полиамиды, силикон, полимеры гликолевой и молочной кислот и с недавних пор – класс природных полимеров, синтезируемых микроорганизмами. Это термопластичные линейные полиэфиры гидроксипроизводных алкановых кислот – полигидроксисилканоаты [92].

ПГА становятся одним из классов биоразлагаемых полимеров для применения в ТИ. В настоящее время многие виды ПГА используются в качестве заменителей кожной ткани, подкожной клетчатки, сердечно-сосудистой ткани, ткани сердечного клапана, ткани нервного канала, ткани пищевода, ткани хряща и костной ткани соответственно. Сферы применения этих полимеров в медицине потенциально широки и могут включать, в том числе реконструктивную хирургию и трансплантологию [92].

Успешные тканевые скафолды должны обладать соответствующими эластомерными свойствами, чтобы они могли выдерживать и восстанавливаться после многочисленных деформаций без неблагоприятного воздействия на окружающие ткани. Поэтому смеси ПГА с другими полимерами были получены для улучшения механических и гидрофильных свойств [93].

Пять сополимеров ПГА в настоящее время находятся под медицинским исследованием поли (3-гидроксibuтират), поли (4-гидроксibuтират), поли (3-гидроксibuтират-со-4-гидроксibuтират), поли (3-гидроксibuтират-со-3-гидроксивалерат) и поли (3-гидроксioктаноат-со-3-гидроксигексаноат), только материалы на основе П4ГБ были одобрены FDA для клинических применений в качестве хирургических материалов на основе TeraFLEX® (абсорбируемый моноволоконный шов и сетка) [94].

В отличие от полилактидов и полигликолидов, ПГА не подвержены гидролитической деградации в водных средах, поэтому они характеризуются медленной кинетикой биорезорбции, при этом их деструкция в биологических средах не сопровождается изменением активной реакции среды [95].

Общепринято, что материалы биомедицинского назначения, предназначенные для контакта со средой живого организма, должны обладать комплексом необходимых биологических свойств и физико-механических свойств. Таковыми являются – биологическая совместимость на уровне культивируемых клеток, а также тканей макроорганизма; отсутствие токсичности, включая образуемые продукты дегидратации; материал должен обладать поддерживающей для клеток функцией, способствовать пролиферации и дифференцировке клеток, обеспечивать свободный доступ субстратов и отток продуктов метаболизма [90, 96].

Известно также, что свойства поверхности матриксов играют большую роль для прикрепления и пролиферации клеток. Для повышения адгезионных свойств поверхности по отношению к клеткам, улучшения газодинамических свойств изделий и повышения их проницаемости для субстратов и продуктов обмена клеток, применяют различные подходы, включая обработку изделий физическими факторами или химическими реагентами [90].

Для повышения биосовместимости матриксов из ПГА в форме микрочастиц применяют методы, увеличивающие гидрофильность поверхности микрочастиц. Например, ковалентное присоединение белка к карбоксильным группам полимера. Такими белками могут быть: бычий сывороточный альбумин, эластин, фибронектин, трансферин, фибрин, коллаген и др.

Трехмерные (3D) пористые каркасы на основе коллагена являются перспективными кандидатами для применения в области ТИ [97].

Например, Evren H. Gokse et al. была разработана дермальная матрица, состоящая из белков кожи и липидов с антиоксидантом, которая улучшила заживление и сбалансировала окислительный стресс в области диабетической раны стопы из-за высокого уровня глюкозы. Таким образом, была разработана трехмерная коллаген-ламининовая пористая дермальная матрица. С помощью, которой, были объединены микрочастицы гиалуроновой кислоты и дипальмитоилфосфатилхолина, нагруженные ресвератролом. Коллаген-ламининовая дермальная матрица с микрочастицами была синергетически эффективной из-за присутствия компонентов кожи в препарате и контролируемого высвобождения [98].

Другим примером создания коллагеновых скафолдов является исследование Elaine Quinlan et al., которые использовали метод распылительной сушки и эмульсионный метод для инкапсуляции биоактивных факторов роста rhBMP-2 в альгинат и микрочастицы из ПМГК. При тестировании *in vitro* с остеобластами полученные материалы демонстрировали усиленный проостеогенный эффект. Из этих результатов была выбрана наиболее эффективная композиция коллагенно-гидроксиапатитовых скафолдов и имплантирована в кальциевые дефекты в модели крыс, где она продемонстрировала превосходную целебную способность *in vivo*. Эти каркасы обладают огромным потенциалом в области регенерации тканей; путем настройки конкретной терапевтической молекулы на интересующую ткань и путем использования различных матриц на основе коллагена, аналогичные системы могут быть разработаны для улучшения заживления разнообразных тканей и органов [99, 100].

1.4.3 Микро- и наночастицы в составе гидрогелей

Гидрогели состоят из трехмерных сшитых гидрофильных полимерных сетей, которые поглощают и удерживают большое количество воды или биологических жидкостей. Гидрогели имеют несколько уникальных характерных особенностей, которые включают сходство с клеточной матрицей тканей, поддерживают пролиферацию и миграцию клеток, контролируемое высвобождение факторов роста, минимальное механическое раздражение окружающих тканей и диффузию питательных веществ поддерживают жизнеспособность клеток. Эти свойства позволяют использовать их в тканевой инженерии и регенеративной медицине (ТЭРМ) в качестве носителей для факторов роста, клеток, препаратов и генов. ТЭРМ - междисциплинарная область, которая направлена на поддержку, омолаживание и / или замену частично функционирующих или поврежденных тканей, вызванных либо острой травмой, хирургическим удалением, врожденными заболеваниями, либо хроническими проблемами. Обычные способы регенерации тканей, такие как предварительно сформированные гидрогели или скафолды, сталкиваются с проблемой хирургической имплантации, повышением риска инфекций и

неправильной адаптацией к дефектному участку, что может привести к разрушению скафолдов. Преодолевая эти проблемы, инъекционные гидрогели приобретают все большее значение в области ТЭРМ, так как они могут достигать дефектов в очень глубоких тканях, с минимальной инвазивностью и лучшей адаптацией тканей. Это приведет к снижению риска заражения, меньшему количеству рубцов и уменьшению боли. В целом это отражает важность инъекционных гидрогелей в области ТИ [101, 102, 103].

Для создания гидрогеля высокого качества необходимо учитывать следующие параметры: жесткость и прочность гидрогеля, пористость и проницаемость, гидрофильность и заряд, биосовместимость, биоразлагаемость, васкуляризацию. В настоящее время применение инъекционных гидрогелей в ТИ распространено для хрящевой ткани, межпозвоночных дисков, костей, мышечной ткани, жировой ткани [101, 104, 105].

Kunal J. Rambhia et al. инкапсулировали инсулиноподобный фактор роста-1 и фактор роста гепатоцитов в микросферы ПЛГК и интегрировали эти микросферы вместе с человеческими живыми клетками в гидрогель, изготовленный из трехблочного сополимера полипропиленгликоля и полиэтиленгликоля. Данный гидрогель использовали для сердечной ТИ. Инкапсуляция факторов роста в микросферы давала возможность пролонгированного высвобождения в течение 21 дня [106].

Daniela P. Pacheco et al. создали гибридную систему для регенеративной медицины в виде двухфазного инъекционного материала, объединяющего микрочастицы поли (гидроксипропирирата-со-гидроксипалерата) и гидрогель геллановой смолы, для локализованной доставки и долгосрочного удерживания микрочастиц, несущих гидрофильные и гидрофобные модельные активные вещества. Для разработки таких микрочастиц был применен эмульсионный метод. В качестве моделей гидрофильных и гидрофобных активных агентов был использован бычий сывороточный альбумин и дексаметазон соответственно. Вариации состава органической фазы во время процесса позволили настроить топографию поверхности, распределение частиц по размерам и пористость ядра микрочастиц и, таким образом, профиль высвобождения *in vitro* дексаметазона. Кроме того, использование гидрогелей с более высокой концентрацией геллановой смолы привело к более медленному и более устойчивому высвобождению обоих активных агентов независимо от условий обработки системы микрочастиц [107].

1.4.4 Поверхностные модификации микро- и наночастиц

Микро- и наночастицы, чаще всего не соответствуют требованиям удовлетворяющим для их использования в тех или иных направлениях биомедицины. Соответственно, для улучшения свойств частицы подвергают модификациям, присоединяя различные агенты на их поверхность или обрабатывая растворами.

Одним из наиболее используемых агентов является бычий сывороточный альбумин. БСА - белок плазмы крови крупного рогатого скота с молекулярной

массой 69000 Да, одноцепочечный, состоящий из 607 аминокислотных остатков [108]. Это наиболее широко изученный и наиболее распространенный протеин крови (70% от общего протеинового состава). Его концентрация в плазме составляет 35-55 мг/мл. БСА обладает достаточно сложной пространственной структурой, образующей три домена. Вторичную структуру БСА на 50-68% составляют α -спирали, 16-18% β -складки. Третичная структура образована дисульфидными связями, которых в молекуле БСА насчитывается 17 штук. Он является удобной моделью для изучения свойств глобулярных белков. Благодаря доступности исходного материала, стабильным методикам выделения, и, как результат, относительно невысокой цене и хорошей изученности свойств, бычий сывороточный альбумин широко применяется в лабораторной практике [108, 109, 110, 111].

Imane Hadeef et al. было обнаружено, что сложные эфиры гидроксиалкил альгината легко реагируют с человеческим сывороточным альбумином и пригодны для получения микрочастиц с использованием метода трансацилирования. Напротив, алкилгидраты не приводят к образованию микрочастиц. Разница реакционной способности альгинатных эфиров объясняется гидрофобно / гидрофильным микроокружением, созданным самосборкой сложноэфирных цепей в водном растворе [112].

В.С. Бондарь с коллегами установил возможность создания композиционных материалов из биodeградируемых полигидроксиалканоатов и модифицированных наноалмазов (МНА). Было показано, что с помощью реакции нуклеофильного присоединения, проводимой в кислых условиях среды, на поверхность 1 мг микросфер из 3-ПГБ за 20 мин может быть ковалентно иммобилизовано от 70 до 150 мкг частиц МНА. Получение композитов подтверждалось данными элементного анализа и растровой электронной микроскопии экспериментальных образцов. Из данных растровой электронной микроскопии было выяснено, что частицы МНА располагаются на поверхности микросфер биополимера в виде скоплений (агрегатов) [113].

С.А. Cust et al. стремились продолжить разработку системы для выделения конкретных подмножеств клеток из гетерогенных популяций. Было показано, что модифицированные микрочастицы из хитозана, способны захватывать и способствовать развитию определенного типа клеток, которые можно рассматривать как инъекционный биоматериал. Моноклональные антитела против клеточных поверхностных антигенов, специфичных к эндотелиальным клеткам и стволовым клеткам, были иммобилизованы на поверхности микрочастиц. Экспериментальные результаты показали, что частицы, биоконъюгированные с конкретными антителами, обеспечивают подходящие поверхности для захвата клеток-мишеней и последующего развития захваченных клеток. В первую очередь для применения в ТИ три основные проблемы анализируются на примере с представленными микрочастицами: разделение, развитие определенного типа клеток и успешное использование в качестве инъекционной системы для образования небольших тканевых конструкций *in situ*.

Было показано, что биodeградируемые и биосовместимые частицы, функционализированные антителами, представляют собой избирательное средство к клеткам, что делает их потенциально пригодными для разделения субпопуляций клеток из сложных смесей. Кроме способности к разделению клеток, культивируемые частицы также оказались пригодными для развития клеток *in vitro*. Кроме того, было показано, что агрегация функционализированных микрочастиц успешно формирует трехмерные надежные структуры после инъекции в ткань [114].

Другим примером является использование микрочастиц из альбумина и супероксиддисмутазы, которые были обработаны на поверхности антителами для того чтобы нейтрализовать в клетке разрушающее действие активных форм кислорода [115, 116].

Также, Watchara Kanjanakawinkul et al. провели исследование по изучению адсорбции лизоцима на магний-силикате при различных значениях pH и охарактеризовали микрочастицы, полученные из молекулярного взаимодействия между лизоцимом и микрочастицами магний-силиката. Эти данные свидетельствуют о том, что лизоцим может взаимодействовать с магний-силикатом для образования микрочастиц, которые потенциально могут использоваться в качестве систем для устойчивой доставки белка [117].

Brenda R. Carrillo-Conde et al. охарактеризовали химико-зависимую адсорбцию сывороточных белков на полиангидридных микрочастицах и последствия их молекулярного взаимодействия с дендритными клетками. Химико-зависимая адсорбция дифференциально повлияла на поглощение и активацию дендритных клеток, и секрецию цитокинов данными клетками [118].

Большинство поверхностных модификаций основанных на обработке поверхности микро- и наночастиц белковыми молекулами осуществляется за счет использования карбодиимидного метода [119, 120, 121, 122].

Соответственно, EDC/NHS часто используется для биоконъюгации пептидов к разнообразным наночастицам. Карбоксильные группы, присутствующие на поверхности наночастиц, активируют с использованием гидрохлорида 1-этил-3-((3-диметиламинопропил) карбодиимида) и (N-гидроксисульфосукцинимид) – EDC/NHS с образованием реакционноспособного эфира сульфо-NHS. Этот сложный эфир реагирует с аминной функциональностью белков посредством образования амидной связи [123]. Схема карбодиимидной реакции представлена на рисунке 3.

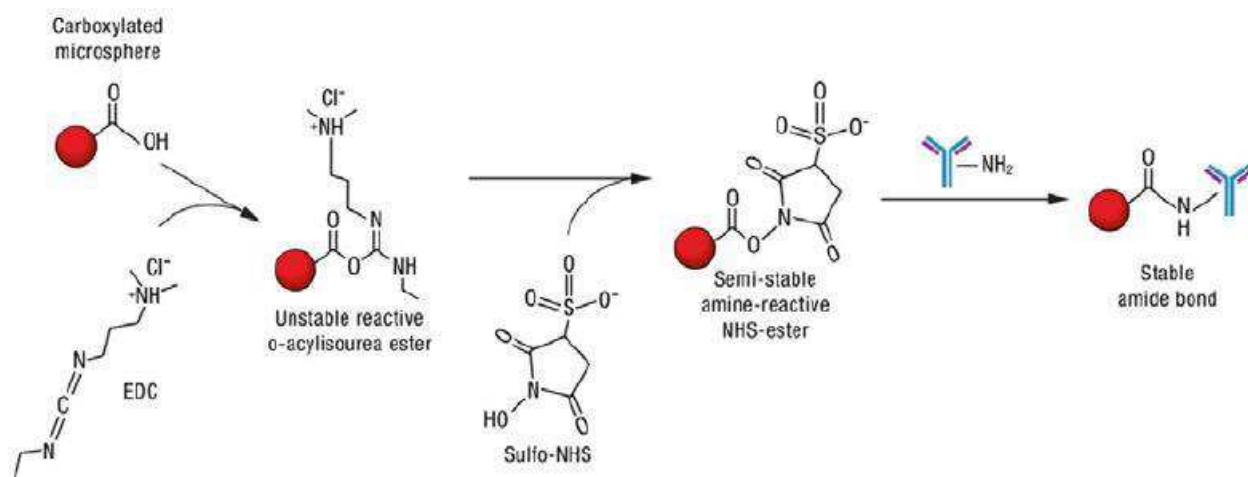


Рисунок 3 – Схема карбодимидной реакции [123]

Таким образом, проанализировав данные научной литературы, можно сказать, что одним из наиболее актуальных решений для улучшения поверхностных свойств материала на основе ПГА является присоединение белковых молекул. Следовательно, основой для данного исследования стало проведение модификации поверхности ПГА-микрочастиц, используя карбодимидный метод.

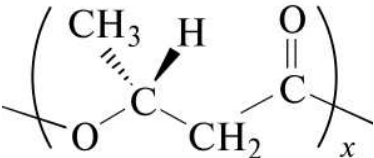
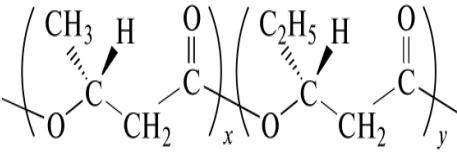
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

В работе были использованы в качестве полимеров – поли (3-гидроксибутират (420 кДа) и сополимер 3-гидроксибутирата с 3-гидроксивалератом (260 кДа) с содержанием ЗГВ 11%.

В таблице 1 представлена характеристики полимеров используемых в качестве материала для изготовления микрочастиц [96].

Таблица 1 – Характеристики полимеров используемых в работе

Название	Формула	Мол. масса (кДа)	T _{пл} (°C)	Кристалличность (%)
Поли (3-гидроксибутират) П(ЗГБ) (C ₄ H ₆ O ₂) _n		420	180	70-80
Сополимер поли (3-гидроксибутирата) с поли (3-гидроксивалератом) П(ЗГБ/ЗГВ) (C ₄ H ₆ O ₂ /C ₅ H ₈ O ₂) _n		260	150	50-60

Также, в данной работе в качестве веществ, модифицирующих поверхность полимерных микрочастиц, использовали щелочь NaOH; диметилсульфоксид, производитель Биолот; 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид гидрохлорид или 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC), производитель BIO-RAD; N-Гидроксисукцинимид или N-Hydroxysuccinimide (NHS), производитель SIGMA-ALDRICH; бычий сывороточный альбумин (БСА) – Albumin, Bovine (BSA), производитель – Amresco; раствор коллагена 1-го типа, из хвостов крыс, 15-кратный, 7.5 мг/мл, стерильный, получен кислотной экстракцией, производитель Биолот.

Для оценки цитотоксичности модифицированных белком П(ЗГБ)-микрочастиц *in vitro*, использовали первичную культуру фибробластов человека, 14 пассаж (Лаборатория биотехнологии новых биоматериалов Сибирского федерального университета).

2.2 Получение микрочастиц из ПГА

Микрочастицы из ПГА были получены с помощью эмульсионного метода, который заключается в приготовлении двухфазной эмульсии по типу «масло в воде».

В качестве масляной фазы выступает раствор полимера в органическом растворителе. В качестве водной фазы выступает раствор поливинилового спирта. Затем на магнитной мешалке при 750 об/мин добавляется раствор

полимера в раствор поливинилового спирта и в течение суток осуществляется перемешивание, таким образом, происходит образование полимерных микрочастиц. При получении микрочастиц в данной работе использовался 2%-ый раствор полимера и 1%-ый раствор поливинилового спирта (M_w 31-50 kDa, Sigma, USA).

Для получения 2%-го раствора 200 мг полимера растворяли в 10 мл дихлорметана CH_2Cl_2 («ЭКОС-1», Россия). Для получения 1%-ого раствора сурфактанта 1 г ПВС растворяли в 100 мл дистиллированной воды.

Затем ставили стакан с раствором ПВС на магнитную мешалку и добавляли по капле автоматической пипеткой раствор полимера при 550-750 об/мин. Стакан оставляли на сутки для формирования микрочастиц и полного испарения дихлорметана.

Микрочастицы осаждали центрифугированием в течение 5 минут при 5 тыс. об/мин. Затем 3 раза промывали дистиллированной водой путем центрифугирования 5 минут при 11 тыс. об/мин. Микрочастицы высушивали лиофильно.

2.3 Модификации поверхности полимерных микрочастиц

Для улучшения поверхностных свойств готовых полимерных микрочастиц, осуществляли увеличение количества $COOH$ -групп в составе цепей ПГА за счет карбоксилирования микрочастиц и присоединение к $COOH$ -группам белковых молекул с помощью карбодимидной реакции.

2.3.1 Реакция карбоксилирования

Реакция используется для увеличения количества $COOH$ -групп в составе полимерных цепей ПГА.

Для осуществления реакции карбоксилирования 250 мг микрочастиц диспергировали в смеси метанола и щелочи в соотношении 1:1 (2,5 мл метанола и 2,5 мл $NaOH$). Полученный раствор оставляли при перемешивании 100 об/мин. Спустя 1 ч, добавляли 2 капли 1%-го фенолфталеина в качестве индикатора окраски и нейтрализовали полученный раствор соляной кислотой.

Затем 5 раз промывали микрочастицы дистиллированной водой путем центрифугирования 5 минут при 11 тыс. об/мин. Далее микрочастицы высушивали лиофильно.

2.3.2 Карбодимидная реакция

ПГА-микрочастицы модифицированные белком были получены с помощью карбодимидной реакции.

Реакция заключается в активировании $COOH$ -групп полимера и ковалентном присоединении к ним молекул белка. Первой стадией реакции является активирование карбоксильного компонента путем образования реакционно-способного производного O -ацилизо мочевины.

Производное O -ацилизо мочевины превращается в пептид непосредственно или через соответствующий симметричный ангидрид.

Главным побочным процессом является $O \rightarrow N$ -ацильный сдвиг, приводящий к получению нереакционноспособных побочных продуктов – N-ацилизомочевин.

Для активации COOH-групп полимера использовали следующий раствор: 200 мг карбодиимида (EDAC) и 200 мг NHS-гидроксисукцинимид растворяли в 50 мл диметилсульфоксида.

Затем к 200 мг готовых карбоксилированных микрочастиц добавляли 50 мл MES-буфера (2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота) - $C_6H_{13}NO_4S$, производитель Helicon и обрабатывали ультразвуком «Sonicator-S3000» фирмы Misonix Incor. (США) в теч. 3-5 минут при 4.0 (1.0 соответствует 3 вольтам).

Раствор карбодиимида добавляли к раствору с микрочастицами и оставляли при перемешивании 650-700 об/мин. Спустя 4 часа раствор снимали с магнитной мешалки и центрифугировали при 8 тыс. об/мин в течение 5 минут.

Затем 0,01 М фосфатно-солевой буфер (рН 7,3-7,5) добавляли к полученным микрочастицам. К полученному раствору добавляли белок в соотношении 1:1 белок и микрочастицы соответственно. Готовый раствор ставили на магнитную мешалку при 450-500 об/мин. на 17 часов.

В завершении микрочастицы модифицированные белком, осаждали центрифугированием в течение 5 минут при 8 тыс. об/мин. Супернатант оставляли для определения концентрации белка. Затем 4 раза промывали микрочастицы дистиллированной водой путем центрифугирования 5 минут при 11 тыс. об/мин, и затем высушивали лиофильно.

2.4 Количественное определение белка

Количественное определение белка присоединенного к COOH-группам ПГА-микрочастиц, осуществляли при помощи биуретового метода и метода Лоури.

2.4.1 Биуретовый метод

Метод основан на образовании биуретового комплекса (имеет фиолетовый цвет) пептидных связей белков с двухвалентными ионами меди. В методе используют т. н. биуретовый реактив. В образовавшемся комплексе медь связана с 4 азотами координационными связями, а с 2 кислородами - электростатическими. Полноценный комплекс образуется лишь с пептидами, состоящими более чем из 4 остатков. Оптическую плотность раствора (прямо пропорциональную концентрации пептида) определяют при 540-560 нм.

К достоинствам метода стоит отнести его простоту, низкую чувствительность к посторонним веществам и невысокую погрешность. Чувствительность метода - 2-10 мг/мл.

Для определения концентрации белка добавляли 200 мкл белка и 800 мкл биуретового реактива, затем инкубировали 30 минут. После этого растворы переносили в 1мл кювету и проводили измерение оптической плотности на спектрофотометре Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis (США) при длине волны 540 нм.

Для построения калибровочной кривой белок предварительно растворяли в 0,9 %-ном растворе NaCl. Для калибровки брали концентрации белка: 20 мг/мл; 10 мг/мл; 5 мг/мл; 2,5 мг/мл; 1,25 мг/мл.

В состав биуретового реактива входят компоненты: 0,15 мг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,6 г $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, которые растворяли в 50 мл H_2O при энергичном перемешивании и приливали 30 мл 10%-го NaOH, затем добавляли 0,1 г KI и доводили раствор до 100 мл.

Изначально в ходе карбодиимидной реакции было добавлено 200 мг БСА в 100 мл раствора с микрочастицами. Для расчета концентрации белка в супернатанте был построен калибровочный график в программе Microsoft Office Excel, 2007. В результате с учетом коэффициента аппроксимации было получено следующее уравнение:

$$y=0,0323x+0,0224$$

$$R^2=0,9631$$

R^2 -коэффициент аппроксимации, следует учитывать, что чем ближе его значение к 1, тем точнее построен калибровочный график.

Для расчета концентрации, связанного с микрочастицами БСА использовали следующую формулу:

$$K_{\text{мч}} = K_{\text{исх}} - K_{\text{с}} \quad (1)$$

где $K_{\text{мч}}$ – концентрация, связанного с микрочастицами белка, мг;

$K_{\text{исх}}$ – концентрация белка, которая была добавлена для присоединения с помощью карбодиимидного метода, мг;

$K_{\text{с}}$ – концентрация белка, определяемая в супернатанте, мг/мл.

2.4.2 Метод Лоури

Для количественного определения белка методом Лоури, изначально необходимо выполнить осаждение белка в супернатанте, так как измерение концентрации белка осуществляется в щелочном растворе.

При осаждении белка первым этапом является центрифугирование образцов в течение 3 минут при 6 тыс. об/мин. После центрифугирования добавляем к супернатанту 10%-ный раствор ТХУ в соотношении 1:1 и оставляем образцы на 1 день в холодильнике.

После инкубации центрифугируем пробы при 3 тыс. об/мин в течение 10 минут. Супернатант сливаем и добавляем к осадку 1 мл 96%-го этанола. Повторно центрифугируем при 3 тыс. об/мин в течение 10 минут, сливаем супернатант и добавляем 500 мкл 96%-го этанола. Далее повторяем процедуру центрифугирования, и в течение 1 часа оставляем образцы в сушильном шкафу при температуре 60°C. В высушенные пробы добавляем 80 мкл 1 Н NaOH, и оставляем их в сушильном шкафу при температуре 60°C в закрытом виде на 20 минут.

Далее приступаем непосредственно к определению концентрации белка с помощью метода Лоури. Метод идет в щелочной среде, где ионы Cu^{+2} образуют

комплекс с пептидными связями, переходя в Cu^+ . Одновалентные ионы меди реагируют с реактивом Фолина (фосфомолибденовая кислота с фенолом), образуя нестабильный продукт, переходящий в молибденовую синь, с максимумом адсорбции при 655 нм. Увеличение адсорбции при 655 нм пропорционально концентрации белка. Метод очень чувствителен к наличию в растворе посторонних восстановителей, чувствительность к белку – 10 - 1000 мкг/мл.

Реактивы:

Реактив А: 2%-ый водный раствор Na_2CO_3 .

Реактив В: 1г цитрата натрия + 0,5г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 98,5мл воды.

Реактив С: готовится в день определения – 1 мл реактива В смешивают с 49 мл реактива А.

Реактив D: готовый реактив Фоллина.

Стандартный раствор: раствор 1 Н NaOH.

После приготовления всех реактивов добавляем в лунки микропланшета по 20 мкл каждого образца и по 100 мкл реактива С. Затем инкубация в термостатируемом шейкере в течение 15 минут; после этого добавляем 10 мкл реактива D и инкубируем в шейкере 90 минут. Далее проводим измерение оптической плотности на планшетном фотометре iMark производства компании Bio Rad при длине волны 655 нм.

Для расчета концентрации белка использовали формулу:

$$x = 102,04 \times E_{655} - 0,32 \quad (2)$$

где x – концентрация белка, мг;

E_{655} – оптическая плотность при длине волны 655 нм.

2.5 Определение морфологических свойств полимерных микрочастиц

Определение электрокинетического потенциала или ζ -потенциала микрочастиц проводили с помощью системы Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания).

Измерение размера осуществляли с применением световой микроскопии Leica DM6000B (Германия). РЭМ-изображения получены на сканирующем электронном микроскопе SU-3500 (Hitachi) и настольном электронном микроскопе ТМ-3000 (Hitachi) после напыления золотом (Институт физики им. Л.В. Киренского, Центр коллективного пользования КНЦ СО РАН).

Выход микрочастиц рассчитывали в процентах от массы использованного для их получения полимера:

$$V = \frac{D_m}{D_p} \cdot 100\% \quad (3)$$

где V – выход микрочастиц;

D_m – масса полученных микрочастиц, мг;

D_p – масса использованного полимера, мг.

Также, была определена молекулярная масса полимера для микрочастиц: из П(ЗГБ); П(ЗГБ/ЗГВ); карбоксилированных микрочастиц из П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ). Для определения молекулярной массы брали по 10-15 мг каждого образца и добавляли по 1,5 мл хлороформа, для получения однородного раствора. Раствор для каждого образца фильтровали и проводили измерение молекулярной массы с помощью мультidetекторной системы гель-проникающей хроматографии Agilent Technologies 1260 Infinity (США).

Определение химического состава полимера проводилось для карбоксилированных микрочастиц из П(ЗГБ/ЗГВ) в сравнении с исходным сополимером П(ЗГБ/ЗГВ). Для определения химического состава полимера делали навески по 4,5 мг каждого образца и добавляли 1 мл внутреннего стандарта, 850 мкл метанола, 150 мкл H_2SO_4 . Далее проводили метанолиз, то есть инкубацию полученных растворов на водяной бане с охлаждением в течение 2 часов 40 минут. В ходе метанолиза происходит присоединение метиловых групп к полимеру и образуется метиловый эфир. К полученному метиловому эфиру добавляли 1 мл дистиллированной воды и проводили измерение химического состава полимера с помощью газового хроматографа Agilent Technologies 5975C VL MSD (США).

Для подтверждения формирования связи между $COOH$ -группами ПГА и NH_2 -группами коллагена 1-го типа проводили ИК-Фурье спектроскопию на ИК-Фурье спектрометре Nicolet 6700, производитель - Thermo Scientific (USA) (Центр коллективного пользования СФУ).

2.6 Оценка стабильности амидной связи в микрочастицах из П(ЗГБ)/БСА и П(ЗГБ/ЗГВ)/БСА

Для оценки стабильности амидной связи в микрочастицах из П(ЗГБ)/БСА и П(ЗГБ/ЗГВ)/БСА был проведен эксперимент длительностью в 4 дня при 5 различных видах воздействия: в условиях, близких к внутренней среде организма – при $37^\circ C$ и pH 7,4; при хранении в комнатных условиях – при $21^\circ C$ и pH 7,4; при хранении в бытовом холодильнике – при $4^\circ C$ и pH 7,4; в условиях, близких к внутренней среде кожи и подкожной жировой клетчатки – при $24^\circ C$ и pH 5,0; и в условиях близких к кровотоку организма – при механическом перемешивании на магнитной мешалке при 150 об/мин, $37^\circ C$ и pH 7,4.

В состав исходных образцов входили следующие компоненты: 5 образцов содержали по 25 мг микрочастиц из П(ЗГБ)/БСА + 2 мл СФБ; следующие 5 образцов содержали по 23 мг микрочастиц из П(ЗГБ/ЗГВ)/БСА + 2 мл СФБ.

В ходе эксперимента все образцы подвергались пяти вышеперечисленным видам воздействия. Для оценки стабильности амидной связи 0,5 мл супернатанта каждого образца отбирались в 4-х временных повторностях: через 2 часа после воздействия; через 5 часов; через 1 сутки; через 4 суток.

Таким образом, было получено 20 проб супернатанта при воздействии на микрочастицы из П(ЗГБ)/БСА и 20 проб супернатанта при воздействии на

микрочастицы из П(ЗГБ/ЗГВ)/БСА. Далее было проведено количественное определение белка в полученном супернатанте, с помощью метода Лоури.

2.7 Анализ жизнеспособности клеток

Для оценки цитотоксичности модифицированных коллагеном ПГА-микрочастиц использовали первичную культуру фибробластов человека, 14-й пассаж.

Культивирование клеток проводили в среде DMEM (Invitrogen Corporation, USA) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone[®], Thermo scientific, USA) и раствора антибиотиков – содержание в растворе пенициллина 10000 ЕД/мл, стрептомицина 10000 мкг/мл и амфотерицина-В 25 мкг/мл (Gibco[®] Antibiotic-Antimycotic, Invitrogen Corporation, USA) в CO₂ – инкубаторе (Sanyo MCO-5AC Incusafe Compact CO₂ Incubator, Japan) при 5% атмосфере CO₂ при 37° С. Замену среды проводили раз в сутки. Клетки снимали с пластика при помощи трипсина (Trypsin/EDTA Solution, Gibco[®]). Для нейтрализации трипсина добавляли равное количество полной питательной среды. Клетки собирали центрифугированием в течение 5 минут при 3 тыс/об/мин. Полученные клетки суспендировали в питательной среде и подсчитывали их количество в камере Горяева, используя краситель трипановый синий. Клетки, окрашенные в синий цвет – мертвые, бесцветные – живые.

2.7.1 Тест alamarBlue[®]

Оценка цитотоксичности модифицированных коллагеном 1-го типа П(ЗГБ)-микрочастиц осуществлялась за счет анализа жизнеспособности первичной культуры фибробластов человека. Для эксперимента клетки рассеивали в 96-луночный планшет из расчета 5 тыс.клеток/100 мкл среды/лунку. В качестве контроля использовали культуральный пластик (TPP, Швейцария). Жизнеспособность фибробластов оценивали по истечении 24, 48 и 72 часов с помощью реагента alamarBlue[®] (Invitrogen Corporation, USA).

Реагент alamarBlue[®] используется для оценки жизнеспособности клеток путем простого добавления 10X готового к употреблению раствора для млекопитающих или бактериальных клеток в культуральных средах, в количестве 10% от объема образца (то есть 10 мкл реагента alamarBlue[®] в 100 мкл образца), а затем осуществляется инкубация образцов 4 часа при температуре 37° С в CO₂ – инкубаторе (Sanyo MCO-5AC Incusafe Compact CO₂ Incubator, Japan). Во время инкубации реагент alamarBlue[®] функционирует как индикатор жизнеспособности клеток. Когда клетки живы, они сохраняют восстановительную среду в цитозоле клетки. Резазурин, активный ингредиент реагента alamarBlue[®], представляет собой нетоксичное, проникаемое для клеток соединение, которое имеет синий цвет и практически не флуоресцирует. При введении клеток, резазурин восстанавливается до резорурфина, соединение, красное по цвету и высоко флуоресцентное. Жизнеспособные клетки

непрерывно конвергируют резазурин в резорурфин, увеличивая общую флуоресценцию и цвет среды, окружающей клетки.

Результаты оценивали путем построения флуоресцентного сигнала в зависимости от концентрации соединения. После инкубации проводили измерение оптической плотности на фотометре iMark (Bio Rad) при длине волны 550 нм. Для расчета концентрации жизнеспособных клеток строили калибровочный график и определяли по графику точную концентрацию жизнеспособных клеток.

2.8 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакетов прикладных программ Statistica for Windows 8.0 (StatSoft Inc., США, 2008) и Microsoft Excel, 2007 (Microsoft, США).

Оценивали средние значения в зависимости от величины выборки по U критерию Манна-Уитни и t-критерию Стьюдента. Результаты приведены в виде $X \pm m$. Где: X – среднее значение, m – стандартная ошибка среднего.

Стандартную ошибку среднего рассчитывали по формуле:

$$m = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (4)$$

где S – стандартное отклонение, подсчитанное по выборке;
n – число наблюдений в выборке.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ПГА – полигидроксиалканоаты
ПВС – поливиниловый спирт
ПУ – полиуретаны
ПГК – полигликолиды
ПЛК – полилактиды
ПМК – полимолочная кислота
ПМГК – сополимеры молочной и гликолевой кислот
ГК – гиалуроновая кислота
П(ЗГБ) – поли (3-гидроксибутират)
П(ЗГБ/ЗГВ) – сополимер поли (3-гидроксибутирата) с поли (3-гидроксивалератом)
БСА – бычий сывороточный альбумин
П(ЗГБ)/БСА – микрочастицы из поли (3-гидроксибутирата) модифицированные белком БСА
П(ЗГБ/ЗГВ)/БСА – микрочастицы из сополимера поли (3-гидроксибутирата) с поли (3-гидроксивалератом) модифицированные белком БСА
П(ЗГБ)/коллаген I – микрочастицы из поли (3-гидроксибутирата) модифицированные коллагеном 1-го типа
П(ЗГБ/ЗГВ)/коллаген I – микрочастицы из сополимера поли (3-гидроксибутирата) с поли (3-гидроксивалератом) модифицированные коллагеном 1-го типа
РЭМ – растровый электронный микроскоп
ТИ – тканевая инженерия

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шершнева, А.М. Конструирование микрочастиц на основе резорбируемых полимеров Биопластотан с применением метода распылительной сушки / А.М. Шершнева, Е.И. Шишацкая // Journal of Siberian Federal University. – 2014. – Т. 2, № 7. – С. 195-208.
2. Shrivastav, Anupama Advances in the Applications of Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles for Novel Drug Delivery System / Anupama Shrivastav et al. // BioMed Research International. – 2013. – V. 2013. – P. 1-12.
3. Шишацкая, Е.И. Биодegradация ПГА *in vivo* / Е.И. Шишацкая // Journal of Siberian Federal University. – 2016. – Т. 1, № 9. – С. 21-32.
4. Горева, А.В. Характеристика полимерных микрочастиц на основе резорбируемых полиэфиров окисалкановых кислот в качестве платформы для депонирования и доставки препаратов / А.В. Горева и др. // Высокомолекулярные соединения. – 2012. – Т. 54, № 2. – С. 224-236.
5. Николаева, Е.Д. Биополимеры для клеточной и тканевой инженерии / Е.Д. Николаева // Journal of Siberian Federal University. – 2014. – Т. 2, №7. – С. 222-233.
6. Алексеев, К.В. Технология повышения биологической и фармацевтической доступности лекарственных веществ / К.В. Алексеев и др. // Вестник новых медицинских технологий. – 2012. – Т. 19, № 4. – С. 43-47.
7. Волова, Т.Г. Современные биоматериалы: мировые тренды, место и роль микробных полигидроксиалканоатов / Т.Г. Волова // Journal of Siberian Federal University. – 2014. – Т. 2, № 7. – С. 103-133.
8. Кедик, С.А. Полимеры для систем доставки лекарственных веществ пролонгированного действия (обзор). Полимеры и сополимеры молочной и гликолевой кислот / С.А. Кедик и др. // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – Т. 3, № 2. – С. 18-32.
9. Bogdan, C. Simionescu Natural and Synthetic Polymers for Designing Composite Materials / C. Simionescu Bogdan, Ivanov Daniela // Handbook of Bioceramics and Biocomposites. – 2015. - № 9. – P. – 1-54.
10. Shi, Rui Recent Advances in Synthetic Bioelastomers / Rui Shi et al. // International Journal of Molecular Sciences. – 2009. - № 10. – P. 4223-4256.
11. Тимченко, Т.В. Поли-d,l-лактид-ко-гликолид: методы получения, свойства и использование для разработки лекарственных препаратов со средствами микро- и нанодоставки / Т.В. Тимченко, Л.И. Щербакова, В.А. Компанцев // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4. – С. 1-11.
12. Felicity, Y. Nan Bioerodable PLGA-Based Microparticles for Producing Sustained-Release Drug Formulations and Strategies for Improving Drug Loading / Y. Han Felicity et al. // Frontiers in Pharmacology. – 2016. – V. 7, № 185. – P. 1-11.
13. 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. – 2011. – V. 19, № 3. – P. 637-676.

14. Vert, Michel Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: beliefs and facts / Michel Vert // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2009. – V. 20, № 2. – P. 437-446.
15. Гончаров, Д.Б. Реология растворов полигидроксиалканоатов / Д.Б. Гончаров, А.Г. Суковатый // *Journal of Siberian Federal University*. – 2016. – Т. 2, № 9. – С. 190-197.
16. Imre, B. Compatibilization in bio-based and biodegradable polymer blends / B. Imre, B. Pukanszky // *European Polymer Journal*. – 2013. – V. 49, № 6. – P. 1215-1233.
17. Shishatskaya, E. I. Biocompatibility of polyhydroxybutyrate microspheres: in vitro and in vivo evaluation / E. I. Shishatskaya et al. // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2008. – V. 19, № 6. – P. 2493–2502.
18. Зернов, А.Л. Микрокапсулы из поли(3-гидроксибутирата) для пролонгированного высвобождения белка / А.Л. Зернов и др. // *Современные технологии в медицине*. – 2015. – Т. 7, № 4. – С. 50-57.
19. Feng, Tian The vitro and vivo study of Poly (3-hydroxybutyrate) microspheres / Tian Feng et al. // *IFMBE Proceedings*. – 2008. – V. 19, № 3. – P. 615–622.
20. Bonartsev, A.P Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(3-Hydroxybutyrate)-Based Biopolymer Systems / A.P Bonartsev et al. // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. – 2011. – V. 5, № 1. – P. 10-21.
21. Richter, Michael Novel materials through Nature's catalysts / Michael Richter et al. // *Materials Today*. – 2015. – V. 18, № 8. – P. 459-467.
22. Муруева, А.В. Получение резорбируемых микрочастиц, содержащих цитостатический препарат, методом распылительного высушивания и исследование их свойств / А.В. Муруева, А.М. Шершнева // *Journal of Siberian Federal University*. – 2016. – Т. 1, № 9. – С. 75-87.
23. Ke, Y. Reactive blends based on polyhydroxyalkanoates: Preparation and biomedical application / Y. Ke et al. // *Materials Science and Engineering C*. – 2017. – V. 70, № 2. – P. 1107-1119.
24. Zhang, Zhanpeng Nanostructured injectable cell microcarriers for tissue regeneration / Zhang Z., Eyster T. W., Ma P. X. // *Nanomedicine*. – 2016. – V. 11. – №. 12. – P. 1611-1628.
25. Martin, Yella Microcarriers and their potential in tissue regeneration / Martin Y. et al. // *Tissue Engineering Part B: Reviews*. – 2010. – V. 17. – №. 1. – P. 71-80.
26. Ma, Peter X. Biomimetic materials for tissue engineering / Ma P. X. // *Advanced drug delivery reviews*. – 2008. – V. 60. – №. 2. – P. 184-198.
27. Wang, Huanan The use of micro-and nanospheres as functional components for bone tissue regeneration / Wang H. et al. // *Tissue Engineering Part B: Reviews*. – 2011. – V. 18. – №. 1. – P. 24-39.
28. Malda, Jos Microcarriers in the engineering of cartilage and bone / Malda J., Frondoza C. G. // *Trends in biotechnology*. – 2006. – V. 24. – №. 7. – P. 299-304.

29. Palumbo, Fabio S. Spray dried hyaluronic acid microparticles for adhesion controlled aggregation and potential stimulation of stem cells / Palumbo F. S. et al. // *International journal of pharmaceutics*. – 2017. – V. 519. – №. 1-2. – P. 332-342.
30. Rinker, Torri E. Core-shell microparticles for protein sequestration and controlled release of a protein-laden core / Rinker T. E., Philbrick B. D., Temenoff J. S. // *Acta biomaterialia*. – 2017. – V. 56. – P. 91-101.
31. Liu, Xiaohua Nanofibrous hollow microspheres self-assembled from star-shaped polymers as injectable cell carriers for knee repair / Liu X., Jin X., Ma P. X. // *Nature materials*. – 2011. – V. 10. – №. 5. – P. 398-406.
32. Zhang, Zhanpeng Nanofiber-based delivery of bioactive agents and stem cells to bone sites / Zhang Z., Hu J., Ma P. X. // *Advanced drug delivery reviews*. – 2012. – V. 64. – №. 12. – P. 1129-1141.
- 33 Wang, Jing The effect of scaffold architecture on odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells / Wang J. et al. // *Biomaterials*. – 2011. – V. 32. – №. 31. – P. 7822-7830.
34. Feng, Ganjun Regenerating nucleus pulposus of the intervertebral disc using biodegradable nanofibrous polymer scaffolds / Feng G. et al. // *Tissue engineering Part A*. – 2012. – V. 18. – №. 21-22. – P. 2231-2238.
35. Hu, Jiang Porous nanofibrous PLLA scaffolds for vascular tissue engineering / Hu J. et al. // *Biomaterials*. – 2010. – V. 31. – №. 31. – P. 7971-7977.
36. Omorphos, Nicolas P. Design of extracellular protein based particles for intra and extra-cellular targeting / Omorphos N. P., Kahn L., Kalaskar D. M. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2015. – V. 136. – P. 440-448.
37. Huang, Sha Cell behavior on microparticles with different surface morphology / Huang S., Fu X. // *Journal of Alloys and Compounds*. – 2010. – V. 493. – №. 1-2. – P. 246-251.
38. Frondoza, C. Human chondrocytes proliferate and produce matrix components in microcarrier suspension culture / Frondoza C., Sohrabi A., Hungerford D. // *Biomaterials*. – 1996. – V. 17. – №. 9. – P. 879-888.
39. Overstreet, Michael Collagen microcarrier spinner culture promotes osteoblast proliferation and synthesis of matrix proteins / Overstreet M. et al. // *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. – 2003. – V. 39. – №. 5. – P. 228-234.
40. Loretta, L. Design and characterization of microcapsules-integrated collagen matrixes as multifunctional three-dimensional scaffolds for soft tissue engineering / Loretta L. et al. // *journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. – 2016. – V. 62. – P. 209-221.
41. Chan, Ka Man Carmen Functionalizable hydrogel microparticles of tunable size and stiffness for soft-tissue filler applications / Chan K. M. C. et al. // *Acta biomaterialia*. – 2014. – V. 10. – №. 6. – P. 2563-2573.
42. Mora-Boza, Ana Contribution of bioactive hyaluronic acid and gelatin to regenerative medicine. Methodologies of gels preparation and advanced applications / Mora-Boza A. et al. // *European Polymer Journal*. – 2017. – V. 95. – P. 11-26.

43. Huss, Fredrik RM Macroporous gelatine spheres as culture substrate, transplantation vehicle, and biodegradable scaffold for guided regeneration of soft tissues. In vivo study in nude mice / Huss F. R. M. et al. // *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery*. – 2007. – V. 60. – №. 5. – P. 543-555.
44. Raftery, Rosanne M. Development of a gene-activated scaffold platform for tissue engineering applications using chitosan-pDNA nanoparticles on collagen-based scaffolds / Raftery R. M. et al. // *Journal of Controlled Release*. – 2015. – V. 210. – P. 84-94.
45. Custódio, Catarina A. Cell selective chitosan microparticles as injectable cell carriers for tissue regeneration / Custódio C. A. et al. // *Biomaterials*. – 2015. – V. 43. – P. 23-31.
46. Ma, Zhengxin Comprehensive in vitro and in vivo risk assessments of chitosan microparticles using human epithelial cells and *Caenorhabditis elegans* / Ma Z. et al. // *Journal of hazardous materials*. – 2018. – V. 341. – P. 248-256.
47. Almalik, Abdulaziz Hyaluronic acid-coated chitosan nanoparticles: molecular weight-dependent effects on morphology and hyaluronic acid presentation / Almalik A. et al. // *Journal of controlled release*. – 2013. – V. 172. – №. 3. – P. 1142-1150.
48. Wu, Chen Fabrication and characterization of chitosan microcarrier for hepatocyte culture / Wu C. et al. // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2007. – V. 18. – №. 11. – P. 2211-2214.
49. Chang, Qiang An injectable aldehyded 1-amino-3, 3-diethoxy-propane hyaluronic acid–chitosan hydrogel as a carrier of adipose derived stem cells to enhance angiogenesis and promote skin regeneration / Chang Q. et al. // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2015. – V. 3. – №. 22. – P. 4503-4513.
50. Salerno, Aurelio Bio-based polymers, supercritical fluids and tissue engineering / Salerno A., Pascual C. D. // *Process Biochemistry*. – 2015. – V. 50. – №. 5. – P. 826-838.
51. Mokhtarzadeh, Ahad Bacterial-derived biopolymers: Advanced natural nanomaterials for drug delivery and tissue engineering / Mokhtarzadeh A. et al. // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2016. – V. 82. – P. 367-384.
52. Lee, Young Sook Development of porous PLGA/PEI1. 8k biodegradable microspheres for the delivery of mesenchymal stem cells (MSCs) / Lee Y. S. et al. // *Journal of Controlled Release*. – 2015. – V. 205. – P. 128-133.
53. Wen, Yanhong Design and characterization of core–shell mPEG–PLGA composite microparticles for development of cell–scaffold constructs / Wen Y. et al. // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2013. – V. 85. – №. 1. – P. 87-98.
54. Zhang, Qingchun Preparation of open porous polycaprolactone microspheres and their applications as effective cell carriers in hydrogel system / Zhang Q. et al. // *Materials Science and Engineering: C*. – 2012. – V. 32. – №. 8. – P. 2589-2595.
55. Böttcher-Haberzeth, Sophie Tissue engineering of skin / Böttcher-Haberzeth S., Biedermann T., Reichmann E. // *Burns*. – 2010. – V. 36. – №. 4. – P. 450-460.

56. Zhang, Zheng Tissue engineered human skin equivalents / Zhang Z., Michniak-Kohn B. B. // *Pharmaceutics*. – 2012. – V. 4. – №. 1. – P. 26-41.
57. Groeber, Florian Skin tissue engineering—in vivo and in vitro applications / Groeber F. et al. // *Advanced drug delivery reviews*. – 2011. – V. 63. – №. 4-5. – P. 352-366.
58. Zhong, S. P. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction / Zhong S. P., Zhang Y. Z., Lim C. T. // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. – 2010. – V. 2. – №. 5. – P. 510-525.
59. Hilmi, Abu Bakar Mohd Vital roles of stem cells and biomaterials in skin tissue engineering / Hilmi A. B. M., Halim A. S. // *World journal of stem cells*. – 2015. – V. 7. – №. 2. – P. 428.
60. Mogoşanu, George Dan Applications of nanobiopolymers for soft tissue engineering / Mogoşanu G. D. et al. // *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering*. – 2016. – P. 83-109.
61. Purcel, Gabriela Collagen-based nanobiomaterials: Challenges in soft tissue engineering / Purcel G. et al. // *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering*. – 2016. – P. 173-200.
62. Shoulders, Matthew D. Collagen structure and stability / Shoulders M. D., Raines R. T. // *Annual review of biochemistry*. – 2009. – V. 78. – P. 929-958.
63. Kwansa, Albert L. Mechanical recruitment of N-and C-crosslinks in collagen type I / Kwansa A. L., De Vita R., Freeman J. W. // *Matrix Biology*. – 2014. – V. 34. – P. 161-169.
64. Gokce, Evren H. Wound healing effects of collagen-laminin dermal matrix impregnated with resveratrol loaded hyaluronic acid-DPPC microparticles in diabetic rats / Gokce E. H. et al. // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2017. – V. 119. – P. 17-27.
65. Obarzanek-Fojt, Magdalena Tracking immune-related cell responses to drug delivery microparticles in 3D dense collagen matrix / Obarzanek-Fojt M. et al. // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2016. – V. 107. – P. 180-190.
66. Mohamed, Aezeden Nanomaterials and nanotechnology for skin tissue engineering / Mohamed A., Xing M. M. // *International journal of burns and trauma*. – 2012. – V. 2. – №. 1. – P. 29.
67. Yildirimer, Lara Skin regeneration scaffolds: a multimodal bottom-up approach / Yildirimer L., Thanh N. T. K., Seifalian A. M. // *Trends in biotechnology*. – 2012. – V. 30. – №. 12. – P. 638-648.
68. Shokrgozar, Mohammad Ali Healing potential of mesenchymal stem cells cultured on a collagen-based scaffold for skin regeneration / Shokrgozar M. A. et al. // *Iranian biomedical journal*. – 2012. – V. 16. – №. 2. – P. 68.
69. Wang, Xingang The roles of knitted mesh-reinforced collagen–chitosan hybrid scaffold in the one-step repair of full-thickness skin defects in rats / Wang X. et al. // *Acta biomaterialia*. – 2013. – V. 9. – №. 8. – P. 7822-7832.

70. Quinlan, Elaine Development of collagen–hydroxyapatite scaffolds incorporating PLGA and alginate microparticles for the controlled delivery of rhBMP-2 for bone tissue engineering / Quinlan E. et al. // *Journal of Controlled Release*. – 2015. – V. 198. – P. 71-79.
71. Han, Chun-mao Application of collagen-chitosan/fibrin glue asymmetric scaffolds in skin tissue engineering / Han C. et al. // *Journal of Zhejiang University Science B*. – 2010. – V. 11. – №. 7. – P. 524-530.
72. Gautam, Sneha Surface modification of nanofibrous polycaprolactone/gelatin composite scaffold by collagen type I grafting for skin tissue engineering / Gautam S. et al. // *Materials Science and Engineering: C*. – 2014. – V. 34. – P. 402-409.
73. Hu, Kuikui Compressed collagen gel as the scaffold for skin engineering / Hu K. et al. // *Biomedical microdevices*. – 2010. – V. 12. – №. 4. – P. 627-635.
74. Caramella, Carla Controlled delivery systems for tissue repair and regeneration / Caramella C. et al. // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2016. – V. 32. – P. 206-228.
75. Bodnar, Richard J. Epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor: the yin and yang in the treatment of cutaneous wounds and cancer / Bodnar R. J. // *Advances in wound care*. – 2013. – V. 2. – №. 1. – P. 24-29.
76. Garcia-Orue, Ixaso Nanotechnology approaches for skin wound regeneration using drug-delivery systems / Garcia-Orue I. et al. // *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering*. – 2016. – P. 31-55.
77. Losi, Paola Fibrin-based scaffold incorporating VEGF-and bFGF-loaded nanoparticles stimulates wound healing in diabetic mice / Losi P. et al. // *Acta biomaterialia*. – 2013. – V. 9. – №. 8. – P. 7814-7821.
78. Xia, Yujie Uniform biodegradable microparticle systems for controlled release / Yujie Xia, Daniel W. Pack // *Chemical Engineering Science*. – 2015. - № 125. – P. 129-143.
79. Q, Xu. Monodisperse double-walled microspheres loaded with chitosan-p53 nanoparticles and doxorubicin for combined gene therapy and chemotherapy / Xu, Q., Xia, Y. et al. // *Journal of Controlled Release*. – 2012. - № 163. – P. 130–135.
80. Pagels, Robert F. Polymeric nanoparticles and microparticles for the delivery of peptides, biologics, and soluble therapeutics / Robert F. Pagels, Robert K. Prud'homme // *Journal of Controlled Release*. – 2015. - № 219. – P. 519-535.
81. Martín-Sabroso, C. Critical attributes of formulation and of elaboration process of PLGA-protein microparticles / C. Martín-Sabroso et al. // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2015. - № 480. – P. 27-36.
82. Qodratnama, Roozbeh Formulations for modulation of protein release from large-size PLGA microparticles for tissue engineering / Roozbeh Qodratnama et al. // *Materials Science and Engineering C*. – 2015. - № 47. – P. 230-236.
83. Di Sabatino, Marcello Spray congealed lipid microparticles with high protein loading: preparation and solid state characterization / Marcello Di Sabatino et al // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2012. - № 46. – P. 346-356.

84. Matsuura, Tetsuya Calcium phosphate-polymer hybrid microparticles having functionalized surfaces prepared by a coaxially electrospray technique / Tetsuya Matsuura, Tatsuo Maruyama // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2017. - № 526. – P. 64-69.
85. Wassmer, Sarah Chitosan microparticles for delivery of proteins to the retina / Sarah Wassmer et al. // *Acta Biomaterialia*. – 2013. - № 9. – P. 7855-7864.
86. Yasasvini, S Topical hydrogel matrix loaded with Simvastatin microparticles for enhanced wound healing activity / S Yasasvini et al. // *Materials Science and Engineering C*. – 2017. - № 72. – P. 160-167.
87. Ayer, Maxime Cell-mediated delivery of synthetic nano- and microparticles / Maxime Ayer, Harm-Anton Klok // *Journal of Controlled Release*. – 2017. - № 259. – P. 92-104.
88. Mooney, R. Conjugation of pH-responsive nanoparticles to neural stem cells improves intratumoral therapy / R. Mooney et al. // *Journal of Controlled Release*. – 2014. - № 191. – P. 82-89.
89. Wayteck, L. Hitchhiking nanoparticles: reversible coupling of lipid-based nanoparticles to cytotoxic T lymphocytes / L. Wayteck et al. // *Biomaterials*. – 2016. - № 77. – P. 243-254.
90. Шишацкая, Е.И. Клеточные матриксы из резорбируемых полигидроксиалканоатов / Е.И. Шишацкая // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. – 2007. – Т. 2, № 2. – С. 68-75.
91. Yanhong, Wen. Biodegradable nanocomposite microparticles as drug delivering injectable cell scaffolds / Wen Yanhong et al. // *Journal of Controlled Release*. – 2011. – № 156. – P. 11-20.
92. Сташевская, К.С. Биодegradуемые микрочастицы с иммобилизованным пептидом для заживления ран / К.С. Сташевская и др. // *Биомедицинская химия*. – 2006. – Т. 52, № 1. – С. 83-94.
93. Ke, Y. Reactive blends based on polyhydroxyalkanoates: Preparation and biomedical application / Y. Ke et al. // *Materials Science and Engineering C*. – 2017. - № 70. – P. 1107-1119.
94. Barouti, Ghislaine Advances in drug delivery systems based on synthetic poly(hydroxybutyrate) (co)polymers / Ghislaine Barouti et al. // *Progress in Polymer Science*. – 2017. - № 73. – P. 1-31.
95. Yanhong, Wen. Design and characterization of core-shell mPEG-PLGA composite microparticles for development of cell-scaffold constructs / Wen Yanhong et al. // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2013. – № 85. – P. 87-98.
96. Волова, Т.Г. Физико-химические свойства полигидроксиалканоатов различного химического строения / Т.Г. Волова и др. // *Высокомолекулярные соединения*. – 2013. – Т. 55, № 7. – С. 775-786.
97. L. del Mercato, Loretta Design and characterization of microcapsules-integrated collagen matrixes as multifunctional three-dimensional scaffolds for soft tissue


- engineeringrs / Loretta L. del Mercato et al. // Journal of the mechanical behavior of biomedical materials. – 2016. - № 62. – P. 209-221.
98. Gokce, Evren H. Wound healing effects of collagen-laminin dermal matrix impregnated with resveratrol loaded hyaluronic acid-DPPC microparticles in diabetic rats / Evren H. Gokce et al. // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2017. - № 119. – P. 17-27.
99. Quinlan, Elaine Development of collagen–hydroxyapatite scaffolds incorporating PLGA and alginate microparticles for the controlled delivery of rhBMP-2 for bone tissue engineering / Elaine Quinlan et al. // Journal of Controlled Release. – 2015. - № 198. – P. 71-79.
100. Ke, Xiaoli Immunogenicity of the LrrG protein encapsulated in PLGA microparticles in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) vaccinated against *Streptococcus agalactiae*/ Xiaoli Ke et al. // Aquaculture. – 2017. - № 480. – P. 51-57.
101. Sivashanmugam, A. An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering / A. Sivashanmugam et al. // European Polymer Journal. – 2015. - № 72. – P. 543-565.
102. Rambhia, Kunal J. Controlled drug release for tissue engineering / Rambhia K. J., Ma P. X. // Journal of Controlled Release. – 2015. – V. 219. – P. 119-128.
103. Yue, Zhilian Preparation of three-dimensional interconnected macroporous cellulosic hydrogels for soft tissue engineering / Yue Z. et al. // Biomaterials. – 2010. – V. 31. – №. 32. – P. 8141-8152.
104. Jaikumar, D. Injectable alginate-O-carboxymethyl chitosan/nano fibrin composite hydrogels for adipose tissue engineering / D. Jaikumar et al. // Int. J. Biol. Macromol. – 2014. - № 74. – P. 318-326.
105. F. Pati, Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink / F. Pati et al. // Nat. Commun. – 2014. - № 5. – P. 3935.
106. Rambhia, Kunal J. Controlled drug release for tissue engineering / Kunal J. Rambhia, Peter X. Ma // Journal of Controlled Release. – 2015. - № 219. – P. 119-128.
107. Pacheco, Daniela P. Development of an injectable PHBV microparticles-GG hydrogel hybrid system for regenerative medicine / Daniela P. Pacheco et al. // International Journal of Pharmaceutics. – 2015. - № 478. – P. 398-408.
108. Поляничко, А.М. Межмолекулярные взаимодействия сывороточного альбумина в растворе / А.М. Поляничко и др. // Цитология. – 2016. – Т. 58, № 9. – С. 707-713.
109. Tao, Caihong Facile synthesis and performance studies of BSA and PDA@Ag hollow microcapsules using SiO₂ microspheres as the templates / Caihong Tao et al. // Journal of Alloys and Compounds. – 2017. - № 715. – P. 154-160.
110. Nattich-Rak, Małgorzata Formation mechanism of human serum albumin monolayers on positively charged polymer microparticles / Małgorzata Nattich-Rak et al. // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2017. - № 10. – P. 3-17.

111. Lin, Xiaojie Redox phospholipid polymer microparticles as doubly functional polymer support for immobilization of enzyme oxidase / Xiaojie Lin et al. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2013. - № 102. – P. 857-863.
112. Hadeif, Imane Influence of chemically modified alginate esters on the preparation of microparticles by transacylation with protein in W/O emulsions / Imane Hadeif et al. // *Carbohydrate Polymers*. – 2017. - № 157. – P. 275-281.
113. Бондарь, В.С. Конструирование композиционных материалов на основе наноалмазов и разрушаемых биополимеров / В.С. Бондарь и др. // *Journal of Siberian Federal University*. – 2013. - № 6. – С. 163-174.
114. Custodio, C.A. Cell selective chitosan microparticles as injectable cell carriers for tissue regeneration / C.A. Custodio et al. // *Biomaterials*. – 2015. - № 43. – P. 23-31.
115. Yamazoe, Hironori. Multifunctional protein microparticles for medical applications / Yamazoe H. // *Biomaterials*. – 2018. – V. 155. – P. 1-12.
116. Campos, Elisa Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications / Campos E. et al. // *European Polymer Journal*. – 2013. – V. 49. – №. 8. – P. 2005-2021.
117. Kanjanakawinkul, Watchara Lysozyme–magnesium aluminum silicate microparticles: Molecular interaction, bioactivity and release studies / Kanjanakawinkul W. et al. // *International journal of biological macromolecules*. – 2015. – V. 80. – P. 651-658.
118. Carrillo-Conde, Brenda R. Chemistry-dependent adsorption of serum proteins onto polyanhydride microparticles differentially influences dendritic cell uptake and activation / Carrillo-Conde B. R. et al. // *Acta biomaterialia*. – 2012. – V. 8. – №. 10. – P. 3618-3628.
119. Irache, J. M. Preparation and characterization of lectin-latex conjugates for specific bioadhesion / Irache J. M. et al. // *Biomaterials*. – 1994. – V. 15. – №. 11. – P. 899-904.
120. Kamra, Tripta Covalent immobilization of molecularly imprinted polymer nanoparticles on a gold surface using carbodiimide coupling for chemical sensing / Kamra T. et al. // *Journal of colloid and interface science*. – 2016. – V. 461. – P. 1-8.
121. Holubova, Lucie Magnetic microparticles post-synthetically coated by hyaluronic acid as an enhanced carrier for microfluidic bioanalysis / Holubova L. et al. // *Materials Science and Engineering: C*. – 2014. – V. 44. – P. 345-351.
122. Wang, Xue-Yan Lectin-coated PLGA microparticles: thermoresponsive release and in vitro evidence for enhanced cell interaction / Wang X. Y. et al. // *International journal of pharmaceutics*. – 2012. – V. 436. – №. 1-2. – P. 738-743.
123. Yadav, Subhash Chandra Development of peptide and protein nanotherapeutics by nanoencapsulation and nanobioconjugation / Yadav S. C., Kumari A., Yadav R. // *Peptides*. – 2011. – V. 32. – №. 1. – P. 173-187.

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Е. И. Шишацкая

подпись

« 18 » июня 20__ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Материал для реконструктивных технологий на основе биоразрушаемых
полигидроксиалканоатов

06.04.01 Биология

06.04.01.05 Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель



профессор, д.б.н. Е. И. Шишацкая

подпись, дата

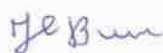
Выпускник



Е. А. Коляда

подпись, дата

Рецензент



профессор, д.м.н. Ю. Ю. Винник

подпись, дата

Красноярск 2018