

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ Т. Г. Волова

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2019 г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Оценка биополимеров различного происхождения для восстановления  
дефектов кожи

06.04.01 – Биология

06.04.01.09 – Фундаментальная и прикладная биология

Научный руководитель \_\_\_\_\_ профессор, д.б.н.Е.И. Шишацкая

Выпускник \_\_\_\_\_ А.Е. Дудаев

Рецензент \_\_\_\_\_ профессор, д.м.н. Н.М.Маркелова

Красноярск 2019

## РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация на тему «Оценка биополимеров различного происхождения для восстановления дефектов кожи» содержит 81 страницу текстового документа, 17 иллюстраций, 3 таблицы, 8 формул и 83 использованных источника.

БИОПОЛИМЕРЫ, ПОЛИГИДРОКИАЛКАНОАТЫ, БАКТЕРИАЛЬНАЯ ЦЕЛЛЮЛОЗА, ХИТОЗАН, ТКАНЕВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ, СКАФФОЛД, КЛЕТОЧНЫЙ НОСИТЕЛЬ, РЕГЕНЕРАЦИЯ КОЖИ, БИОСОВМЕСТИМОСТЬ.

Цель работы – изготовить клеточные носители для ТИ кожи на основе ПГА, БЦ и хитозана, и изучить их физико-механические и биологические характеристики.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- изготовить образцы носителей из ПГА, БЦ и хитозана в разных процентных соотношениях;
- исследовать физико-механические свойства полученных образцов: смачиваемость, упругость, прочность;
- оценить биосовместимость полученных образцов в культуре линейных фибробластов мыши

Фундаментальная проблема, на решение которой направлена работа – формирование научных основ создания и применения биосовместимых резорбируемых материалов и гибридных тканеинженерных систем нового поколения для репаративного тканегенеза.

Актуальность тематики обусловлена тем, что освоение новых материалов, необходимых для современных реконструктивных медико-биологических технологий, является одной из ключевых проблем современности; без этого

невозможны развитие и прогресс клеточной и тканевой инженерии, имплантологии и реконструктивной хирургии в целом. Повышение эффективности лечения и качества жизни невозможно без внедрения в практику революционных технологий с применением новых материалов высокой функциональности и специфичности, включая конструирование систем, способных воспроизводить функции биологических тканей.

В работе были исследованы физико-химические, а также биологические свойства 13 сконструированных матриц на основе ПГА.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Тканевая инженерия .....	10
1.1.1 Тканевая инженерия кожи.....	12
1.2 Носители, используемые в тканевой инженерии кожи.....	16
1.2.1 Синтетические материалы.....	19
1.2.2 Природные биополимеры .....	24
1.2.2.1 Полигидроксиалканоаты (ПГА) .....	27
1.2.2.2 Бактериальная целлюлоза (БЦ) .....	30
1.2.2.3 Хитозан .....	35
1.3 Клеточный компонент.....	37
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	40
2.1 Объекты исследования.....	40
2.2 Методики исследования .....	41
2.2.1 Синтез ПГА .....	41
2.2.2 Получение экспериментальных плёночных образцов из ПГА .....	45
2.2.3 Получение бактериальной целлюлозы .....	47
2.2.4 Изготовление плёнок из хитозана .....	48
2.2.5 Получение композитных материалов на основе ПГА, БЦ и хитозана . .....	49
2.2.6 Исследование свойств поверхности .....	49
2.2.7 Исследование физико-механических свойств.....	50
2.2.8 Ведение клеточной культуры эмбриональных фибробластов мыши линии NIH 3T3 .....	51

2. 2. 9	Анализ биосовместимости опытных образцов .....	51
2. 2. 9. 1	Подсчёт абсолютного количества адгезированных клеток.....	51
2. 2. 9. 2	Проведение МТТ-теста.....	52
2. 2. 9. 3	Окраска клеток флуоресцентным красителем DAPI .....	53
2. 2. 10	Статистическая обработка.....	53
3	РЕЗУЛЬТАТЫ.....	54
3. 1	Получение экспериментальных образцов <b>Ошибка! Закладка не определена.</b>	
3. 2	Синтез ПГА .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3. 3	Синтез БЦ .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3. 4	Поверхностные характеристики .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3. 5	Физико-механические свойства .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3. 6	Биосовместимость .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	54
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	71
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	72

## ВВЕДЕНИЕ

Согласно отчётам Министерства здравоохранения РФ заболевания и обширные травмы кожи и подкожной клетчатки в стране, включая Сибирский федеральный округ и Красноярский край, стабильно занимают 3-4-е место по смертности, уступая только заболеваниям органов дыхания и кровообращения, болезням костно-мышечной системы и представляют большую социально-экономическую проблему[1].

Оптимизация процесса заживления дефектов и заболеваний кожи и подкожной клетчатки с помощью новых технологий и материалов является актуальной проблемой; восстановление таких дефектов остается в центре внимания фундаментальной науки и клинической практики.

Совершенствование существующих и разработка новых, научно обоснованных подходов и технологий лечения обширных и глубоких ожогов и других повреждений эпидермиса и дермы является одной из важнейших задач фундаментальной медицины и практического здравоохранения[2].

Биотехнология сегодня – одно из приоритетных направлений развития науки. Большие надежды возлагаются на биотехнологию в области персонализированной медицины. Разработка новых лекарственных средств, эффективных методов диагностики, адресная доставка препаратов в лечении онкологических и других заболеваний, реконструктивная биоинженерия, генная терапия, разработка рекомбинантных вакцин, создание моноклональных антител – актуальные направления медицинской биотехнологии, будущие открытия в которых спасут жизнь и улучшат её качество триллионам людей во всём мире.

Особое место в медицинской биотехнологии занимает тканевая биоинженерия. Интенсивно развиваясь, благодаря усилиям специалистов биологии, медицины, материаловедения, инженерии, она открывает перспективы принципиально нового подхода к восстановлению повреждённых и утраченных органов и тканей. Подход заключается в создании тканевых эквивалентов и биоискусственных органов. Для этого необходимы клеточные

элементы и матрикс – каркас, имитирующий межклеточное вещество нативных структур, который обеспечивает трёхмерную организацию и рост новой ткани.

Клеточные технологии шагнули далеко вперёд с тех пор, как впервые была показана возможность поддержания живых тканей *ex vivo* в 1885 году. Благодаря развитию техники культивирования, сегодня клетки большинства тканей организма введены в культуру, и, более того, возможно получение их в значительных количествах при сохранении исходного фенотипа. Также изучены многие метаболические пути, расшифрованы механизмы внутриклеточного контроля дифференцировки и межклеточного взаимодействия, осуществлена генетическая реконструкция культивированных клеток, получены иммортализованные линии [3], что в сумме обеспечивает успешность современных реконструктивных клеточных технологий.

Лечение дефектов кожи с использованием культивированных *invitro* клеток получило широкое признание во всем мире, как безопасный и эффективный метод. Среди множества типов клеток, способных оказывать клинический эффект, особый интерес вызывают дермальные фибробласты, которые представляют собой гетерогенную популяцию клеток мезенхимного ряда и играют ключевую роль в процессах регуляции клеточных взаимодействий и поддержании гомеостаза кожи [4]. Фибробласты не только формируют оптимальные условия для функционирования и пролиферации других типов клеток (эпителиальных, эндотелиальных, клеток волосяных фолликулов), но и отвечают за координацию их функций в соответствии с расположением на теле. Способность фибробластов формировать межклеточный матрикс, синтезировать цитокины, вызывать миграцию и пролиферацию разных типов клеток при повреждениях кожи делает их перспективными для широкого клинического применения.

В области создания матриксов также достигнут прогресс, однако идеальный клеточный носитель до сегодняшнего дня не найден. Освоение новых материалов, необходимых для современных реконструктивных медико-биологических технологий, является одной из ключевых проблем

современности; без этого невозможны развитие и прогресс клеточной и тканевой инженерии, имплантологии и реконструктивной хирургии в целом.

Разработка биосовместимых и биоразрушающихся материалов для имплантируемых изделий временного действия представляет собой наиболее остро стоящую и сложную задачу, так как такие материалы должны выполнять предопределённую функцию в теле, с последующей биodeградацией в строго заданные сроки. Искусственный внеклеточный матрикс должен поддерживать пролиферацию и дифференцировку определенных клеточных элементов и замещаться натуральным, с учетом индивидуальных особенностей заданной ткани.

Перспективным материалом для создания таких матриксов являются полигидроксиалканоаты – семейство полимеров алкановых кислот микробиологического происхождения. Удовлетворяя требованиям биосовместимости и биорезорбируемости, предъявляемым к материалам для создания клеточных матриксов, ПГА имеют многие дополнительные преимущества. В отличие от других материалов, свойства ПГА можно изменять в широких пределах при помощи варьирования их мономерного состава и композиции с другими биосовместимыми материалами. Неоспоримым преимуществом этого класса является возможность модификации свойств поверхности изделий из него, их механических характеристик, а также возможность управления скоростью деградации изделий. В матриксы из ПГА могут быть депонированы биологически активные вещества, что позволяет реализовать комплексный подход в тканевой инженерии, включающий три компонента: клетки, каркасы, сигналы [5].

Исследования бактериальной целлюлозы (БЦ) для целей ТИ, выполненные в последние годы, также свидетельствуют о несомненных перспективах этого природного полимера для восстановительной хирургии, реконструкций дефектов кожных покровов, для клеточной и тканевой инженерии в качестве опорных носителей с возможностью депонирования и доставки различных лекарственных препаратов [6]. БЦ обладает уникальными



физико-механическими, химическими и биологическими свойствами, включая прочность, эластичность, газопроницаемость, высокую влагоудерживающую способность, пористость, и пр. Гель-пленки БЦ представляют собой трехмерную сетчатую конструкцию, состоящую из лентообразных микрофибрилл. Показано, что в сочетании с хитозаном БЦ обладает антибактериальной активностью, вызывая торможение роста *E.coli*, *Candidaalbicans*, *Staphylococcus aureus* [7]. Это позволяет рассматривать композитные пленки на основе БЦ для лечения инфицированных кожных ран.

Особый интерес представляют материалы на основе хитозана – ещё одного природного биоматериала, продукта деацетилирования хитина [8]. Пористые хитозановые матриксы используют как биосовместимые, биорезорбируемые и биоадгезивные изделия в медицинских и фармацевтических целях, в том числе в разных имплантационных системах [9]. Их применяют также при обработке ран для регенерации мягких тканей [10], как гемостатические изделия с антитромбогенными свойствами [11] и как стимуляторы иммунной системы – против вирусной и бактериальной инфекций [12].

Цель работы – изготовить клеточные носители для ТИ кожи на основе ПГА, БЦ и хитозана, и изучить их физико-механические и биологические характеристики.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- изготовить образцы носителей из ПГА, БЦ и хитозана в разных процентных соотношениях;
- исследовать физико-механические свойства полученных образцов: смачиваемость, упругость, прочность;
- оценить биосовместимость полученных образцов в культуре линейных фибробластов мышцы.

Работа выполнена в лабораториях биоматериалов Сибирского Федерального Университета.

# 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Тканевая инженерия

Новые возможности для восстановления поврежденных органов и тканей предоставляет быстро развивающееся междисциплинарное направление — тканевая инженерия (ТИ). Основные принципы этого подхода заключаются в разработке биоинженерных конструкций на основе комплекса клеток, факторов роста и материалов различной природы с целью их последующей трансплантации в организм пациента для замены поврежденных тканей [13,14].

Совершенно очевидно, что использование тканеинженерных конструкций (ТИК) должно быть четко аргументировано в зависимости от характера, типа и локализации повреждения. В связи с этим, накопленный в настоящее время достаточно обширный материал нуждается в дальнейших экспериментальных и клинических подтверждениях эффективности конструкций и выработке четких показаний к их использованию. Одним из требований к материалу конструкций является тканеспецифичность, отсутствие токсичности, высокий регенераторный потенциал и формирование органоспецифической ткани в зоне трансплантации [15], а также биоразрушаемость.

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

В свою очередь, ТИК делятся на два принципиально разных вида медицинских продуктов:

- имплантаты из девитализированных биологических тканей, к которым, например, относятся биоклапаны сердца, биопротезы кровеносных сосудов – медицинские изделия;
- системы, состоящие из биостабильного или биodeградируемого матрикса, жизнеспособных стволовых или тканеспецифических аутологичных или аллогенных клеток, и (или) биоактивных молекул (цитокины, факторы роста и др.) – клеточные продукты.

Сущность тканевой инженерии состоит в разработке и изготовлении биоинженерных каркасов (матрикс, скаффолдов) и последующей их имплантацией пациенту (в бесклеточном варианте или предварительно заселенных необходимым пулом клеток) с целью восполнения дефекта и стимуляции регенерации поврежденной структуры ткани. Ключевая проблема заключается в обеспечении последовательного и полного ремоделирования ТИК в собственную ткань. Это требует предсказуемых управляющих воздействий на процессы заселения, пролиферации, дифференцировки и адекватной фенотипической экспрессии клеток в веществе скаффолда и будущего матрикса собственной ткани. Одним из ключевых подходов к такому управлению является планирование и изготовление скаффолда с заранее заданным комплексом этих свойств [16, 17, 18]. На сегодняшний день имеется некоторый спектр материалов, пригодных для изготовления скаффолдов. Основными требованиями, которые предъявляются к этим материалам, являются: отсутствие цитотоксичности, воспалительного и иммунного ответа на материал; поддержание адгезии, фиксации, пролиферации и дифференцировки клеток; биорезорбируемость обычными метаболическими путями без образования токсических интермедиантов; наличие способностей к самовосстановлению, изменению строения и свойств в ответ на факторы окружающей среды(организма), включая механические нагрузки [19, 20, 21].

В качестве клеточного компонента биоинженерных конструкций тканей наиболее перспективными являются мезенхимальные стволовые клетки (МСК), способные к направленной мультилинейной дифференцировке в клетки кости, хряща, жира и др. [22]. Клеточная компонента отвечает за генерацию новой ткани, синтезируя ВКМ, являющийся залогом синтеза здоровой функциональной ткани. Для создания ТИК используются как недифференцированные, так и зрелые дифференцированные клетки – хондроциты, фибробласты, кератиноциты и др.

### 1. 1. 1 Тканевая инженерия кожи

Кожа стала первым искусственно полученным органом, получившим разрешение на клинические испытания. Кожа состоит из двух слоев. Первый, эпидермис, сформирован, в основном, кератиноцитами различной степени ороговевания. Пролиферация и созревание кератиноцитов – непрерывный «снизу вверх» процесс, от базальной мембраны к роговому слою эпидермиса. Здесь также присутствуют меланоциты, синтезирующие и распределяющие по всему эпидермису пигмент меланин, защищающий кожу и подлежащие ткани от ультрафиолетового излучения. Второй, расположенный глубже слой кожи, дерма, богат соединительной тканью и обеспечивает сопротивление растяжению, гибкость и эластичность. Там же расположена сосудистая сеть, лимфатическая система, нервные пучки и другие дополнительные структуры кожи. В дерме относительно мало клеток, основной объем занят ВКМ, состоящим из переплетенных коллагеновых фибрилл, протеогликанов и гликопротеинов. Основной тип клеток дермы – фибробласты, отвечающие за наработку и поддержание большей части ВКМ [23].

При повреждении кожи, если рана затрагивает только эпидермис и дерму, дерма способна заставить клетки заняться собственной реконструкцией. Более того, на помощь дерме приходят глубинные придатки кожи, такие как волосяные фолликулы и потовые железы, которые также могут стать источниками эпидермальных клеток. Однако, если рана затрагивает всю дерму, как это бывает при сквозных ожогах или кожных язвах, источников клеток для регенерации нет. Известно, что любые дефекты кожи диаметром больше 4 см<sup>2</sup> не способны к закрытию без формирования рубцов, без использования дополнительных средств. Этот лимит регенеративной способности послужил толчком к разработкам искусственных эквивалентов кожи. В настоящее время есть данные о возможности применения разных типов биополимерных покрытий и кожных заместителей на их основе для лечения широкого ряда дефектов и заболеваний кожи.

Лечение обширных повреждений кожи осуществляется с использованием нескольких подходов [24]:

- «золотой стандарт» – использование аутологичных кожных имплантатов, полученных от самого пациента, однако этот способ лечения затруднителен при повреждениях кожи больше 70% и для пожилых пациентов;
- использование «биологических повязок» в виде аллогенных трансплантатов (взятых у трупов), ксеногенных трансплантатов (взятых чаще всего у свиней, т.к. строение их кожи максимально сходно со строением кожи человека), амниотической оболочки – девитализированная ткань;
- использование культур кератиноцитов – метод, имеющий ряд недостатков, в частности длительные сроки получения трансплантатов (около 3 недель), высокая стоимость изготовления, высокая частота лизиса клеток после введения. Для сокращения сроков приготовления трансплантатов возможно использование клеточных носителей, изготовленных из биоматериалов: коллаген, фибрин, хитозан и др.;
- биополимерные раневые покрытия:
  - искусственная кожа (artificialskin, Бурк, 1981 г) – двухслойный материал: верхний слой – тонкая силиконовая пленка, нижний – состоит из биodeградирующей пористой мембраны из перекрестно связанного коллагена и хондроитин-6-сульфата. Искусственная кожа накладывается на раны и на протяжении двух-трех недель в поры нижнего слоя проникают собственные фибробласты и эндотелиальные клетки больного, прорастают сосуды, одновременно с этим происходит биodeградация самого нижнего слоя. Вследствие этого образуется ткань, более похожая на дерму, чем на рубец. После образования «неодермы» верхний силиконовый слой удаляется и выполняется обычная аутодермопластика (АДП) тонким трансплантатом. Использование такого тонкого трансплантата обуславливает скорую эпителизацию донорских ран, что позволяет повторно брать трансплантаты с того же места с небольшими интервалами времени (INTEGRA® DermalRegenerationTemplate).

– «живой эквивалент кожи» (livingskinequivalent) – трехслойная конструкция: первый слой – коллагеновый гель, второй слой – слой фибробластов, третий слой – культура кератиноцитов. Недостатком покрытий, содержащих коллаген, являются: снижение пролиферативной активности фибробластов, которые находятся в контакте с коллагеном; повышение уровня синтеза коллагеназ в ране; неустойчивость искусственных покрытий такого рода к влиянию ферментов и инфекций.

– клеточно-биополимерное покрытие (culturedskinsubstitute, 1988 г.), верхний слой которого состоит из 2-8 слоев кератиноцитов, культивированных на фидерной подложке из фибробластов, при трансплантации они выполняющих функцию соединительной ткани. В качестве подложки возможно использование нескольких типов биополимеров.

Полимерные матрицы дают некоторые улучшения морфологи рубца, но еще ни одна матрица, не содержащая клеток, не дала истинного восстановления дермы. Для успешной репликации кожи требуется двухслойная композитная кожная конструкция, которая могла бы воспроизвести синэргическое поведение эпидермиса и дермы.

В настоящее время разработаны 3 типа материалов, предназначенных для лечения кожных дефектов:

- заместители эпидермиса (осуществляют доставку кератиноцитов, включенных в покрытие – Epicel, в виде слоя кератиноцитов на покрытии – Myskin, в виде суспензии кератиноцитов в спрее – CellSpray);
- заместители дермы (кожа доноров и коммерческие продукты Integra, Alloderm – леофильно высушенная дерма доноров, Dermagraft – культура фибробластов на сетке из полиглактина, Transcyte – культура фибробластов на силиконовом носителе, Permacol – свиная кожа);
- материалы, выполняющие обе функции (Apligraf, Orcel, Permaderm). Все представленные материалы содержат культуры фибробластов и кератиноцитов на коллагеновом носителе.

Одним из первых полноценных заменителей кожи, получившим разрешение на клинические испытания, стала «искусственная кожа», выпущенная корпорацией IntegraLifeSciences, Plainsboro, NJ, разработанная в MIT в 80 годы прошлого века, сейчас она доступна для использования в случаях тяжелых ожогов. Внутренний слой этого продукта представляет собой 2х-мм слой смеси волокон коллагена, выделенных из тканей быка, и хондроитин-6-сульфата с размером пор 70-200 мкм, структура которого позволяет прорасти сосудистой сети, после чего слой разлагается. Для получения такой структуры волокна коллагена и глюкозаминогликана преципитируют, после чего их подвергают лиофильной сушке и сшивают глутаровым альдегидом. Верхний слой состоит из 0.25 мм полисилоксана, паропроницаемость которого соответствует эпителию. Материал предназначен для нанесения на очищенную рану. Через 2-3 недели, после того как прошла васкуляризация внутреннего слоя, наружную силиконовую мембрану заменяют ультратонким слоем собственного выращенного *invitro* эпителия.

В Институте хирургии им. А.В.Вишневского РАМН разработан [25] и внедрен в клиническую практику метод лечения обширных ран, основанный на использовании культуры аллогенных фибробластов. Патогенетический механизм действия предложенного метода заключается в синтезе аллогенными фибробластами экстрацеллюлярного матрикса, факторов роста, стимуляции пролиферации собственного эпителия, направленных на восстановление как эпидермального, так и дермального компонентов кожи. При ожогах II степени трансплантацию 3-х дневной культуры аллофибробластов осуществляют непосредственно на подготовленные в результате комплексного лечения ран участки. При глубоких ожогах III-IV степени трансплантацию аллофибробластов комбинируют с АДП. В последнем случае аллофибробласты стимулируют эпителизацию ячеек перфорированного аутодермотрансплантата АДТ. На подготовленную ожоговую поверхность (свежеиссеченная ожоговая рана или рана, покрытая зрелыми мелкозернистыми чистыми грануляциями с микробной загрязненностью не более 100 колониеобразующих единиц в 1

грамме ткани), делают трансплантацию выращенных *invitro* и помещенных на специальную подложку или матрицу аллофибробластов. Матрицу для более плотного прилегания к раневой поверхности фиксируют парафинизированной марлей и закрывают стерильной повязкой. Через 2ое суток в операционной снимают матрицу и выполняют второй этап операции – АДП. При этом ожоговая рана представляет собой гладкую матовую поверхность с характерным незначительным блеском. На эту поверхность выполняют трансплантацию расщепленных лоскутов аутокожи. Полная эпителизация в случае использования этого подхода в 93% наблюдений наступает в среднем на 12-18 сутки.

## **1.2 Носители, используемые в тканевой инженерии кожи**

К материалам ТИ кожи предъявляются высокие требования по сумме прочности, гибкости и эластичности. С учётом крайне желательной биodeградируемости, спектр материалов невелик. Сочетание этих двух компонент, а также корреляция между скоростью биоразрушения матрикса и новообразованием кожи на нём, является принципиально важной для успешной реконструкции [26].

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

Поэтому один из ключевых элементов ТИ кожи – разработка биомиметических носителей– скаффолдов, которые служат для организации и обеспечения выживаемости клеток в ТИК. Выбор полимера является жизненно важным фактором для успеха всей ТИК. ВКМ выполняет функцию каркаса,



поддерживающего изначальную архитектуру ткани, и обеспечивает регенерацию при повреждениях небольшого масштаба.

ВКМ – это композитная субстанция, состоящая из различных макромолекул, которые можно разделить на 4 основных класса, каждый из которых отвечает за специфические характеристики ВКМ. Это коллагены, протеогликаны, гликопротеины межклеточного взаимодействия и эластические волокна [27, 28]. Хотя все ВКМ обладают этими общими компонентами, организация, форма и механические свойства ВКМ в различных тканях сильно различаются в зависимости от химического состава и трехмерной организации присутствующих специфических компонент. Было показано [29], что упорядоченное обновление ткани, возникающее после повреждения или старения, достигается в присутствии нерастворимых каркасов ВКМ. Следовательно, для успешной реконструкции органа или ткани необходимо выбрать подходящий носитель, который помогал бы реплицировать ВКМ, а также поддерживал бы и направлял процесс регенерации ткани.

Полимерные матрицы, имитирующие ВКМ, разрабатывают для того, чтобы контролировать и направлять пролиферацию клеток, вызывать специфические межклеточные взаимодействия и реакции.

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

- выбранный полимер должен быть биосовместимым и биоразлагаемым, что гарантировало бы переносимость (отсутствие иммунной или аллергической реакции) организмом как изделия, так и продуктов его распада;

- контролируемая кинетика разрушения, так как различные ткани восстанавливаются с разной скоростью, скорость распада должна регулироваться;
- химия поверхности, подходящая для прикрепления, пролиферации и дифференцировки клеток, так как жизнедеятельность большинства клеток зависит от прикреплённости к субстрату;
- матрица должна иметь систему взаимосвязанных пор соответствующего размера и формы, что способствовало бы диффузии клеток и питательных веществ и оттока отходов. Поры малого диаметра дают наилучшее отношение поверхности к объёму, однако они должны быть больше, чем размер клеток ( $\approx 10$  мкм). Не существует единого мнения в ТИ относительно размера пор, оптимального для прорастания клеток, считается, что это зависит от типа ткани;
- механические свойства должны соответствовать месту имплантации, так на начальном этапе носитель должен обеспечивать механическую стабильность и служить образцом, направляющим рост клеток в трех измерениях;
- возможность придания необходимой формы и способность её сохранения после имплантации, которая поддерживалась бы и после имплантации;
- простота стерилизации либо при высоких температурах, – либо в этиленоксиде, либо гамма-излучением [30].

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

Таким образом, специфические взаимодействия клетка-поверхность и клетка-клетка происходят посредством молекул рецепторов, имеющих внеклеточный домен на поверхности клетки, с которыми связываются адсорбированные на материале или водорастворимые белки, или полипептидные лиганды.

### 1. 2. 1 Синтетические материалы

К синтетическим полимерам, чаще всего используемым для создания носителей для реконструкции тканей, относят алифатические полиэфиры, полученные путем полимеризации лактонов, например, полимолочную кислоту, полигликолевую кислоту, поликапролактон и их сополимеры. Биоразлагаемые имплантаты разлагаются путем гидролиза и/или под действием ферментов, образуя метаболиты, совместимые с тканями, которые потом поступают в циклы утилизации углеводов или белков. В конце концов продукты распада, такие как вода и двуокись углерода (CO<sub>2</sub>) будут выведены с мочой или фекалиями, или выдохнуты [31].

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

Первые синтетические полимеры получали путем модификации бытовых пластиков, таких как полиэтилен, полиуретан и силиконовые резины. Хотя такие синтетические полимеры были с успехом использованы при реконструкции тканей, они, само собой, не разрушаются биологическим путем, не резорбируются и навсегда остаются в ткани, вызывая дискомфорт и даже боли. Хотя такой подход и не является неприемлемым, тем не менее, свойство биоразрушаемости является очень желательным.

Первыми синтетическими биоразлагаемыми полимерными носителями, предназначенными для высевания клеток и регенерации тканей, стали представители семейства поли( $\alpha$ -гидроксикислот), таких как уже знакомые нам поли(молочная кислота) (ПМК), или полилактат, поли(гликолиевая кислота)

(ПГК), или полигликолид, и сополимер поли(молочная-со-гликолевая кислота) (ПМГК). Полимеризацию проводят по методу открытого кольца в присутствии органометаллических катализаторов, например октоата олова. ПГК – это линейный алифатических полиэфир, имеющий высокую степень кристалличности и высокую температуру плавления, а также низкую растворимость в органических растворителях. Однако, благодаря своей гидрофильности, он быстро разлагается в воде. Лактид, используемый для получения ПМК – циклический димер, существующий в виде двух оптических изомеров, d и l. В природе встречается l-lactide, а dl-lactide это синтетическая смесь d-lactide и l-lactide [32]. Гомополиер l-lactide (LPLA) имеет полукристаллическое строение. Такие материалы имеют высокую прочность на растяжение и небольшое относительное удлинение, у них высокий модуль упругости, что делает их более подходящими для случаев, требующих сопротивления приложенной нагрузки – хирургических нитей и фиксаторов. Поли(dl-lactide) (DLPLA) – аморфный полимер со случайным распределением изомеров, и, следовательно, не может образовывать кристаллические области. Этот материал имеет меньшую прочность, более высокое удлинение, и гораздо более короткое время деградации. Poly(l-lactide) имеет степень кристалличности 37%, температуру плавления 175-178°C и температуру стеклования 60-65°C. Скорость распада LPLA гораздо ниже, чем у DLPLA, имеются данные, что полная резорбция происходит более чем за 2 года. Сополимеры l-lactide и dl-lactide делают для того, чтобы нарушить кристаллическую упаковку l-lactide и ускорить разложение. Обычно эфирные связи в поли(гидрокси кислотах) расщепляются путем гидролиза, что приводит к уменьшению молекулярного веса полимера. Такое начальное разложение продолжается до тех пор, пока молекулярный вес не снизится до 5000, после чего начинается разрушение клеткой. Окончательное разложение и резорбция имплантов из поли(гидрокси кислот) осуществляется клетками иммунной системы, макрофагами и лимфоцитами. Скорость распада определяется доступом воды к эфирной связи, а не внутренней скоростью распада эфира.

Доступ воды к эфирной связи зависит от совместного влияния ряда характеристик полимера: температуры стеклования, степени кристалличности, молекулярного веса, гидрофобности мономерного звена и размера образца.

ПГК оказывается привлекательной биоразлагаемой подложкой, благодаря относительно высокой скорости биологического разрушения, в результате которого освобождается место для ВКМ, а воспалительная реакция сводится к минимуму. Однако, ПГК обладает довольно низкой прочностью, что часто делает непрактичным его применение для трансплантации. ПМК – более прочный материал, но из-за дополнительной метильной группы в основной цепи, он разлагается медленнее. В результате, имплантат дольше задерживается в ране, и полость заполняется матриксом гораздо медленнее, что может привести к возникновению более сильной иммунной реакции.

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

Поликапролактон (ПКЛ) – еще один полимер, используемый в качестве биоразлагаемого матрикса носителя для тканей. ПКЛ – алифатический полиэфир, разлагаемый путем гидролиза при физиологических условиях. Он также может быть разрушен путем ферментативной поверхностной эрозии. Фрагменты ПКЛ с низким молекулярным весом поглощаются макрофагами и разлагаются внутри клеток. Из-за длинного метиленового скелета ПКЛ

разлагается гораздо медленнее, чем ПМК и ПГК. ПКЛ обладает низкой температурой плавления и низкой температурой стеклования, что делает его резиноподобным при комнатной температуре.

В тканевой инженерии часто используют и полимерные гидрогели, так как они легче могут быть введены в тело, чем твердые полимерные конструкции. Полиэтиленоксид (ПЭО) – это синтетический полимер, часто используемый при реконструкции хряща. Форма ПЭО с низкой молекулярной массой известна, как полиэтиленгликоль (ПЭГ). Путем его модификации, например акрилатом (ПЭГ-диакрилат), можно получить фотосшивающийся полимер, образующий твердый гидрогель под действием света. В такой фотополимер можно помещать клетки и факторы роста. Фотополимеризирующиеся полимеры представляют существенный интерес для тканевой инженерии, так как они подходят для задач, где требуется минимальное вмешательство, и открывают возможности точного контроля процесса образования реконструируемых тканей. Увеличивая молекулярный вес центрального сегмента ПЭГ, можно управлять набуханием гидрогеля, получая материалы от твердых до очень гибких. Состав биоадсорбируемого сегмента также определяет время биологической абсорбции. ПЭГ практически не взаимодействует с белками. Скорость деградации можно варьировать в интервале от дней до недель и месяцев, соответственно путем введения гликолата, лактата или триметилен-карбоната [33].

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

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

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

Поливиниловый спирт (ПВС) также образует гидрогели за счет ковалентных сшивок в присутствии глутарового альдегида в кислой среде. Однажды полимеризовавшись, он оказывается принципиально неразрушаемым *in vivo*, хотя фотополимеризуемый гель на основе ПВС, который можно разрушить, был описан. Основное преимущество ПВС в том, что он образует относительно прочный, упругий и гибкий гидрогель, имеющий множество функциональных групп для связывания пептидов, факторов роста и молекул, отвечающих за адгезию. Так, синтезировали гель из ПВС, ковалентно модифицированный фибронектином, и изучали прикрепление и пролиферацию фибробластов на этой матрице. На модифицированном гидрогеле прикрепление фибробластов существенно улучшилось по сравнению с немодифицированным ПВС, а пролиферация была активнее, чем в культуре, выращенной на полистироле. Однако для полимеризации ПВС в гели требуются условия и реагенты, не позволяющие использовать его *insitu* [34].

Синтетические самоорганизующиеся пептиды нового типа самопроизвольно образуют гидрогели в ответ на изменения pH и/или ионной силы. Для структуры пептидов такого типа характерна самокомплиментарная структура, состоящая из регулярно повторяющихся единиц, образованных положительно и отрицательно заряженными остатками, между которыми находятся гидрофобные остатки. Такие пептиды самоорганизуются при

специфических значениях pH и ионной силы, образуя  $\beta$ -складки, которые затем агрегируют с образованием гидрогеля, состоящего из переплетенных нанофибрил. Уникальным свойством этих гидрогелей является их фибриллярная микроструктура, масштаб которой примерно на три порядка мельче, чем у полимерных гидрогелей.

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

Часто используют и инъектируемые(инъекционные) полимеры, так как они могут заполнять дефекты нерегулярной формы и минимизировать хирургическое вмешательство. В идеале инъектируемые полимеры должны полимеризоваться *insitu* без побочных эффектов для окружающих тканей, таких как повышение температуры.

### **1. 2. 2 Природные биополимеры**

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

Коллагены – самые широко распространенные белки в организме, и в основном играют структурную роль. Коллаген может быть приготовлен в виде раствора или сформирован в нити, губки или гидрогели. Несмотря на то, что его получают из чужеродных источников, использование методов очистки позволяет практически полностью избежать иммунного ответа. Прикрепление клеток к коллагену происходит за счет белков интегринов, узнающих определенный мотив Arg-Gly-Asp (RGD) последовательность. Прикрепление к этому естественному субстрату и связанные с ним сигналы внутри клетки приводят к улучшению метаболизма клетки, пролиферации, сохранению жизнеспособности и дифференцированного состояния. Бесклеточные матрицы



получают путем комбинированной ферментативной и детергентной обработки тканей, богатых коллагеном, таких как сердечные клапаны свиньи или подслизистой тонкого кишечника. Обработка убирает все клетки и потенциально антигенные белки, остается только коллаген и эластин с небольшим количеством ассоциированных полисахаридов ВКМ. У гелей на основе коллагена недостаточность механической прочности и короткие сроки биodeградации можно компенсировать за счет сшивок, например, при помощи глутарового альдегида [35].

Гликопротеины межклеточного взаимодействия – белки, содержащие специфические последовательности аминокислот, узнаваемые рецепторами на поверхности клеток. Эти полипептидные последовательности часто выступают в роли сигналов узнавания сайтов адгезии и могут обеспечивать специфичность для данного типа клеток [36].

Фибрин – белок, образующий кровяные сгустки, обычно используют в виде клея или гидрогеля, который может осуществлять контролируемую доставку факторов роста, и имеет сродство к гепарину. К образованию фибрина приводит ферментативное расщепление растворимого фибриногена, белка плазмы крови, спонтанно полимеризующегося при физиологических условиях. В результате получается мягкий гель, пригодный для роста и функционирования клеток. Преимущества фибрина в том, что он коммерчески доступен и уже был использован многими хирургами в клинических условиях. Однако на начальном этапе организации он имеет низкую механическую жесткость, и вряд ли подойдет там, где требуется большая механическая нагрузка[37].

Протеогликаны – сложные макромолекулы, каждая из которых состоит из сердцевинного белка с одним или несколькими ковалентно присоединенными линейными полисахаридными цепями, называемыми глюкозаминогликанами (ГАГ) [38]. Протеогликаны, например, гиалуроновая кислота (ГК), встречаются, как в клетке, так и на ее поверхности. Эти молекулы способны ассоциировать между собой, образуя запутанные сетки, удерживающие большое количество

воды, обладающие упругостью и в то же время легко деформируемые. Благодаря своим упругим свойствам, протеогликаны организуют пространство, в котором клетки могут двигаться, проходить дифференцировку, а также создавать новый матрикс.

ГК – также один из основных компонентов ВКМ, специфично связывает белки ВКМ и белки на поверхности клеток. Гиалуронан оказывает стимулирующий эффект на секрецию матрикса клетками. Недавно описали синтез гиалуронана, модифицированного метакрилатом, способного при смешивании с фотоинициатором *insitu* образовывать стабильный гидрогель под действием света. По своим механическим свойствам и способности поддерживать рост клеток и секрецию матрикса *invitro* такой гидрогель был сходен с другими биополимерами. Свойства гиалуронановых гидрогелей можно легко модифицировать, меняя количество гиалуронана, степень модификации (метакрилатирования), плотность сшивки, химическую природу модификатора, а также путем добавления специальных функциональных компонент, например, пептидов клеточной адгезии, содержащих RGD и факторы роста [39].

Альгинаты – это полисахариды, получаемые из морских водорослей и принадлежащие к семейству линейных сополимеров маннуроновой и гулууроновой кислот. При добавлении к ним двухвалентных катионов, например, кальция, альгинаты образуют нерастворимый гидрогель. За гелеобразование в альгинатах отвечают ионные взаимодействия, поэтому оно полностью обратимо при хелатировании двухвалентного катиона, используемого для получения геля. Альгинаты также используют в качестве материала для пересадки клеток различных типов. К плюсам альгинатных гидрогелей относятся нетоксичность, простота в обращении и минимальная воспалительная реакция со стороны организма. Альгинаты дают минимальный иммунный ответ, хотя в случае присутствия загрязнений и примесей возможно развитие иммунных реакций и разрастание фиброзной ткани. Как и у большинства гидрогелей, их механическая жесткость достаточна для задач, в

которых не требуется приложение большой нагрузки, или для имплантации после культивирования *invitro* и *invivo* в течение нескольких недель, но в средах с большими напряжениями, например, в несущих нагрузку суставах их физико-механические характеристики являются недостаточными.

Имеются работы, где изучали модификации альгината, которые позволили бы более точно контролировать его механические свойства и скорость разрушения. Были испробованы [40] такие стратегии, как подбор молекулярной массы полимерных цепей, образующих гидрогель, частичное окисление для образования в полисахаридной цепи точек, где возможен гидролиз, и функционализация остатков в полисахаридной цепи для получения ковалентных сшивок и придания материалу более предсказуемых механических характеристик и кинетики разложения.

#### **1. 2. 2. 1 Полигидроксиалканоаты (ПГА)**

Существует мнение, что наилучший биоразлагаемый полимер для биомедицинских целей можно будет получить путем создания новых биоматериалов, сочетающих в себе полезные свойства синтетических и природных полимеров. Такие полимеры можно разрабатывать в определенном виде и менять их свойства, подбирая синтетическую компоненту, метод обработки, встраивания дополнительных и усиливающих компонент[41].

Один из перспективных классов полимеров – ПГА – биосовместимые и биodeградируемые полиэфиры микробиологического происхождения, физико-химические свойства которых в зависимости от состава могут существенно варьироваться [42, 43]. Благодаря своим ценным свойствам, ПГА перспективны для применения в различных сферах – в том числе медицине и фармакологии.

Исследования ПГА активно ведутся в США, Скандинавии и Европе, России, Японии, Китае, Германии и Голландии. В настоящее время известно свыше 100 различных ПГА.

ПГА по физико-химическим свойствам сходны с широко применяемыми синтетическими полимерами, такими как полиэтилен. Однако ПГА обладают

оптической активностью, антиоксидантными свойствами, пьезоэлектрическим эффектом, биоразрушаемостью и биосовместимостью [44]. ПГА широко варьируют по структуре и свойствам в зависимости от физиолого-биохимических свойств микроорганизмов-продуцентов, условий культивирования и типа углеродного субстрата, что позволяет иметь целый спектр материалов одной группы с различными физико-механическими свойствами, пригодными для различных задач.

Благодаря линейной структуре молекул ПГА термопластичны, что позволяет получать из них разнообразные изделия с использованием различных термических методов без использования пластификаторов, в то время как переработка большинства широко используемых в настоящее время синтетических пластиков требует применения различных добавок.

Свойства ПГА определяются их строением и, прежде всего, зависят от строения боковых групп в полимерной цепи, а также от расстояния между эфирными связями в молекуле. Как правило, ПГА с короткими боковыми группами более кристалличны, в то время как ПГА с длинными боковыми группами являются эластомерами [45].

Первым среди выделенных и наиболее полно изученным ПГА является ПЗГБ. Это гомополимер D(-)-3-β-оксимасляной кислоты, изотактический полиэфир с регулярными, повторяющимися единицами. В отличие от сложных синтетических полиэфиров, ПЗГБ – это оптически активный полимер, который образует спирали в растворе. Он представляет собой бесцветное полукристаллическое гидрофобное вещество. Плотность аморфной фазы ПЗГБ составляет 1.177 г/см<sup>3</sup>, кристаллической – 1.23–1.26 г/см<sup>3</sup>, при этом кристаллическая фаза доминирует над аморфной.

В зависимости от типа используемого продуцента, условий биосинтеза, а также метода экстракции полимера из биомассы и применяемых при этом растворителей молекулярная масса ПЗГБ может составлять от нескольких сотен до миллионов дальтон с полидисперсией от 2.3 до 3.2. Молекулярная масса полимера определяет технологические свойства материала и возможности его

переработки. Установлено, что механическая прочность П(ЗГБ) существенно уменьшается, если его молекулярная масса составляет менее 400 000 Da, так, при низких значениях параметра ( $M_w$ ) – 200 000 Da, полимер очень хрупкий.

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

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

Одно из наиболее ценных свойств ПГА – их способность разрушаться до конечных продуктов в различных биологических средах. ПГА могут разрушаться не только под воздействием температуры, но в результате кислотного и щелочного гидролиза, а также биологическим путем, под воздействием ферментов – деполимераз. При термальном разложении происходит случайное разделение полимера. При гидролизе ПГА разлагаются, как обычные эфиры. Биологическая деградация ПГА происходит гидролитически под воздействием деполимераз микроорганизмов, а также ферментов крови и тканей высших животных [46].

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

Процесс биодеструкции ПГА *in vivo* длителен. Процесс протекает с достаточно низкими скоростями, поверхностно, без образования грубых дефектов и резкой потери механических качеств изделия, что является ценным

свойством. Показано, что деградация исследованных изделий из ПГА в биологических средах происходит по гуморальному и клеточному пути с активным участием макрофагов и гигантских клеток инородных тел. Скорость биодеградации сополимерных ПГА выше по сравнению с гомополимером.

В работе [47] была исследована деградация образцов ПГА при подкожной имплантации. Через 40 недель масса имплантатов была измерена и сопоставлена с контрольными интактными образцами. Средняя молярная масса двух имплантатов составила 68000 и 6500 в сравнении с контролем – 137000, средняя молекулярная – 31000 в сравнении с контролем – 58000. Дополнительно была исследована поверхностная и глубинная деградации, на основании результатов был сделан вывод: деградация носит гомогенный гидролитический характер.

Первостепенным требованием для материалов медицинского назначения является биосовместимость. Гомополимер  $\beta$ -оксимасляной кислоты обладает идеальной биосовместимостью, так как сам полимер и продукты его распада являются естественными метаболитами клеток и присутствуют в крови и тканях [48].

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

#### **1. 2. 2. 2    Бактериальная целлюлоза (БЦ)**

Целлюлоза является наиболее распространенным биополимером на Земле [49], являясь основным структурным компонентом клеточной стенки растений. Растительная целлюлоза широко используется в бумажных, текстильных и целлюлозных производствах. Также целлюлоза синтезируется некоторыми океаническими животными (туникаты), вследствие чего называется туницином. Другим источником целлюлозы являются микробиологический синтез с использованием водорослей, грибов и бактерий различных таксонов *Agrobacterium*, *Sarcina*, *Rhizobium* и *Glucoacetobacter* (ранее *Acetobacter*). Впервые о БЦ как о продукте микробиологического синтеза в 1886 году сообщил Браун, описав бактерии *Bacterium xylinum*. Позднее организм был переименован в *Acetobacter xylinum*, *Gluconacetobacter xylinus*; в настоящее время отнесен к *Komagataeibacter medellinensis*. Этот микроорганизм является наиболее активно изучаемым продуцентом БЦ из-за наиболее высоких продукционных характеристик и способности использовать разнообразные соединения в качестве источника углерода.

БЦ синтезируется в виде ленты, которая отходит от полюса бактериальной клетки. Лента удлиняется со скоростью 2 ~ м/мин. Одна клетка *G. xylinus* синтезирует ленту, состоящую из 10-100 микрофибрилл. Сборка микрофибрилл БЦ представляет собой двухстадийный процесс, включающий полимеризацию остатка глюкозы с образованием ~ -1, 4-глюкановой цепи (в плазматической мембране) и кристаллизацию глюкановой цепи до целлюлозы во внеклеточной среде. Кроме того, кристаллизация и полимеризация являются связанными процессами, управляемыми бактериальной клеткой, и скорость кристаллизации определяет скорость полимеризации. Полагают, что сборка кристаллита целлюлозы происходит также в два этапа: образование листов глюкановой цепи силами Ван-дер-Ваальса с последующей укладкой листов для получения кристаллической структуры [50].

К настоящему времени накоплен большой массив данных о различных штаммах, способных синтезировать БЦ, обладающую различными физико-химическими свойствами, делающими БЦ перспективной для биологических

применений. Для увеличения продукции БЦ получены и исследованы [51] генетически модифицированные микроорганизмы с измененными биохимическими путями синтеза БЦ. Установлено, что тип продуцента и условия ферментации могут оказывать значительное влияние на свойства БЦ, включая упаковку фибрилл, плотность, пористость пленок БЦ, а также механическую прочность. Показано, например, что генетически модифицированные штаммы *G. xylinus* с генами из *Candidaalbicans* способны продуцировать БЦ с улучшенной биоразлагаемостью *in vivo*. Целлюлозосинтаза в *G. xylinus* может потреблять как UDP-глюкозу, так и UDP-N-ацетилглюкозамин (UDP-NAcG) в качестве субстратов. Наличие NAcG делает БЦ уязвимой к действию лизоцима, а также нарушает высокоупорядоченную кристаллическую структуру БЦ, делая целлюлозу менее жесткой и кристаллической.

Свойства БЦ весьма отличаются от таковых растительной целлюлозы в лучшую сторону, что позволяет применять БЦ в различных областях, начиная от физики и химии, до медицины и машиностроения. БЦ имеет высокопористую структуру с высокой проницаемостью к газам, жидкостям, благоприятную для клеточной адгезии и пролиферации, а также высокую способность поглощать воду (содержание воды > 95%). Эти свойства БЦ обусловлены ее ультратонкой сетчатой структурой из ленточных микро- и нанофибрилл, в 100 раз тоньше волокон растительной целлюлозы. БЦ обладает исключительными механическими характеристиками с деформируемостью, напоминающей мягкие ткани. Напряжение при разрыве пленок из БЦ может составлять порядка  $2 \times 10^6$  Па, несмотря на содержание 99 % воды. БЦ также обладает исключительными механическими свойствами в высушенном виде, также благодаря своей кристаллической нанофибриллярной сети. Прочность на растяжение одного волокна БЦ почти сравнима с Kevlar<sup>®</sup> – пара-арамидным волокном (полипарафенилен-терефталамид) и сталью, что делает ее подходящим кандидатом для применения, где требуются высокие механические характеристики.



Структура и механические свойства БЦ делают этот биоматериал идеальным кандидатом для каркасов тканевой инженерии, включая искусственные хрящи, кости, протезы сердечных клапанов, искусственные кровеносные сосуды, роговая оболочка глаза, лечение зубных корневых каналов, и восстановление кожи. БЦ – не аллергенный биополимер и, таким образом, используется в косметике в качестве естественного лицевого скраба, лицевых масок для сухой кожи и в качестве структурирующего агента в очищающих композициях [52].

Продукт деградации БЦ – глюкоза, это объясняет высокую биосовместимость БЦ и делает ее перспективным материалом для многих областей, прежде всего, для тканевой инженерии и восстановительной хирургии. БЦ одобрена FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов — агентство Министерства здравоохранения и социальных служб США) для использования в качестве хирургического материала, сосудов, пористой хирургической сетки, матрицы армирования тканей.

Описаны положительные результаты исследования [53] БЦ и композитов на основе БЦ в качестве биосовместимых матриксов (скэффолдов) для выращивания различных клеток: клеток гладких мышц, хондроцитов, фибробластов, остеобластов, эндотелиальных клеток и др. Показано, что при подкожной имплантации БЦ не обнаружено реакции на инородное тело в виде образования гигантских клеток или грубой фиброзной капсулы. БЦ представляет собой идеальный матрикс для адгезии и пролиферации клеток, поэтому имеет и огромный потенциал для лечения кожных ран; раны, обработанные композитами БЦ, показали достаточное содержание влаги в течение длительного времени и более быструю эпителизацию и регенерацию по сравнению с применением даже хорошо себя зарекомендовавшего Tegaderm® (прозрачные плёночные наклейки для закрытия ран и фиксации катетеров). Аналогичным образом, диабетические раны ног, обработанные БЦ, показали более короткое время эпителизации по сравнению с

коммерческой сеткой из петролатума Xeroform™Petrolatum. Нанокompозиты БЦ обладают контролируемыми компрессионными механическими свойствами, близкими к природным тканям, таким как суставной хрящ, сердечные клапаны.

Однако БЦ как имплантат почти не подвержена биологическому разложению *invivo* из-за отсутствия в организме человека ферментов деструкции, то есть целлюлаз. Имеющаяся медленная деградация БЦ в организме человека может быть связана со спонтанным, неферментативным гидролизом целлюлозных цепей, хотя это все еще спорный вопрос. Имеются попытки сделать БЦ биоразрушаемой путем модификации целлюлозы окислением. В недавних публикациях подтверждены данные о формировании сетчатой структуры пленок БЦ из нановолокон БЦ и их свойствах. Изучены диэлектрические свойства и микроструктура водных суспензий дезинтегрированных наногель-пленок бактериальной целлюлозы .

Для придания БЦ дополнительных свойств, таких как антибактериальная активность, улучшение клеточной адгезии и пролиферации, усиление механических свойств, конструируют композиты на основе БЦ с различными материалами. Известные биомедицинские и фармацевтические применения композитов на основе БЦ включают антибактериальные и противовирусные пленки и системы заживления ран, сердечно-сосудистой системы, скелетной мускулатуры, хрящей, а также системы доставки лекарственных средств и биоинженерию[54].

Для улучшения физико-механических свойств БЦ получают композиты с использованием хитозана. Собственно БЦ не обладает антибактериальной активностью, но в сочетании с хитозаном вызывает торможение роста патогенных микроорганизмов *E.coli.*, *Candidaalbicans*, *Staphylococcus aureus*. Это позволяет рассматривать такие композитные пленки БЦ для лечения инфицированных ран.

БЦ, будучи высокопористой и с высокой абсорбирующей способностью, самостоятельно или в виде композита идеально подходит в качестве раневых повязок для удаления экссудата из раны [55]. Также она хороша для доставки в

рану антибиотиков или других препаратов, в то же время, обеспечивая физический барьер против внешних инфекций. Дополнительное преимущество в том, что БЦ и композиты с ней биосовместимы и способствуют адгезии и пролиферации клеток, таким образом, не только действуют как раневое покрытие, но и способствуют регенерации кожи. Компания XylosCo. (США) создала продукт на основе БЦ XCell<sup>®</sup>, который одновременно осуществляет абсорбцию и гидратацию, обеспечивая идеальную влажную среду для эффективного процесса заживления. Это раневое покрытие создает влажную среду и особенно полезно для хронических сухих ран с сухой некротической тканью на поверхности, в то же время абсорбирует жидкость гнойной раны с экссудатом. Кроме того, XCell<sup>®</sup> не деградирует и не оставляет какие-либо вредные вещества на месте раны. XCell<sup>®</sup> не прилипает к поверхности раны и, таким образом, легко снимается. Другие коммерческие продукты на основе БЦ – Biofill<sup>®</sup> и Bioprocesss<sup>®</sup>, ProdutosBioetecnologicos, Brazil. Biofill<sup>®</sup> – используются как временная искусственная кожа для лечения ожогов и язв. Таким образом, БЦ может использоваться как искусственная или временная кожа для глубокого заживления ран с барьерными противомикробными свойствами.

### **1. 2. 2. 3 Хитозан**

Хитозан – хорошо изученный природный биоразрушаемый полимер. Этот биологический материал представляет интерес в связи с его биологической совместимостью, биоразрушаемостью и биологической активностью [56]. Хитин и хитозан – кристаллические полимеры, нерастворимые в воде при pH выше 7, их степень кристалличности зависит от степени деацетилирования. Полностью кристаллическую структуру имеют хитин и хитозан со степенью деацетилирования 100%. Наименьшую степень кристалличности – при промежуточных значениях деацетилирования. Благодаря положительному заряду поверхности и хорошей биосовместимости считается, что хитозан может эффективно поддерживать адгезию, деление и дифференцировку клеток без

использования добавок, даже *invitro*. Хитин и хитозан разрушаются лизоцимом, который медленно деполимеризует полисахариды [57]. Одно из наиболее многообещающих свойств хитозана – его великолепная способность образовывать пористые структуры для использования при трансплантации клеток и регенерации тканей. Размер пор можно контролировать за счет скорости высушивания. Направление пор можно регулировать за счет температурных градиентов. При растворении хитозана в уксусной кислоте получают соли ацетата хитозана. Перед следующим смачиванием кислотную составляющую удаляют, например, путем нейтрализации и регидратации в щелочном растворе аммония или NaOH. Механические свойства таких носителей в основном зависят от размера и ориентации пор. Более медленное замораживание приводит к образованию бóльших пор и более кристаллической (и жесткой) фазы [58].

Скорость биологического разрушения хитозана определяется легко контролируемым параметром – количеством остаточных ацетильных групп. Зашелачивание водного раствора хитозана до значения pH более 6.2 приводит к преципитации гидрогеля под действием ионных сил. Путем смешивания хитозана с фосфоглицерином получили термочувствительный гидрогель, жидкий при комнатной температуре и физиологических значениях pH, и образующий гель при температуре тела [59].

Хитозан представляет собой многообещающий носитель для реконструкции тканей. На его свойства *invivo* непосредственно влияет химический состав. При повышении степени деацетилирования хитозана, время его пребывания *invivo* увеличивается, а вызываемая им воспалительная реакция ослабевает. Будучи поликатионом, хитозан естественным образом адгезирует к биологическим тканям, имеющим, как правило, отрицательный заряд на поверхности. Это может служить объяснением того, что хитозан задерживался в месте суставного повреждения, несмотря на подвижность незафиксированного сустава и недостаточную начальную жесткость хитозана. [60]. Кроме того, препараты хитозана не содержат потенциально токсичных

сшивающих агентов или остатков органических растворителей, что определяет отсутствие цитотоксичности для несомых клеток или организма хозяина.

### **1.3 Клеточный компонент**

На сегодня известно множество различных клеточных источников для ТИ. Возможно использование клеток разной степени стволовости, а также уже дифференцированных клеток.

Использование фибробластов в биомедицине обусловлено их способностью сохранять в культуре диплоидный кариотип, низкой экспрессией антигенов гистосовместимости и отсутствие онкогенных потенций. В России это направление получило развитие в ряде научных и практических учреждений: Институт цитологии РАН, Военно-медицинская академия МО РФ, Институт хирургии им. А.В. Вишневского РАМН, Институт кардиологии МЗ РФ, НИИ трансплантологии и искусственных органов, Институт Клеточных Технологий и др.

Фибробласты – основные клетки соединительной ткани. Эти клетки имеют мезенхимальное происхождение и являются главным продуцентом белков внеклеточного матрикса. Фибробласты синтезируют тропоколлаген, предшественник коллагена, коллагены I и II типов [61] и др. компоненты внеклеточного матрикса: ламинин, нидоген, тинасцин, хондроитин-4-сульфат, протеогликан [62], фибронектин [63], некоторые факторы роста и некоторые другие вещества. Участвуют в заживлении ран. В результате дифференцирования фибробласты превращаются в менее активные зрелые клетки – фиброциты. Активные фибробласты морфологически характеризуются отсутствием или наличием единичных вакуолей, вытянутой формой, длинными псевдоподиями. Менее благоприятными признаками фибробластов являются округлая форма и короткие псевдоподии [64].

В настоящее время имеется значительное число работ, свидетельствующих о большой роли факторов роста в эпителизации кожи. Факторы роста – это регуляторные белки (тканевые гормоны), вырабатываемые

клетками различных типов, которые в значительной степени ускоряют регенераторный процесс. Многие факторы роста критические в ТИ кожи продуцируются фибробластами:

- основной фактор роста фибробластов (bFGF) положительно влияет на рост всех типов клеток кожи, стимулирует продукцию компонентов внеклеточного матрикса фибробластами (фибронектина и коллагена), стимулирует хемотаксис фибробластов и выработку ими новых волокон коллагена, эластина и фибронектина;

- трансформирующий ростовой фактор (TGF-бета) стимулирует хемотаксис фибробластов и продукцию ими коллагена и фибронектина (Капе С. et al., 1991).

- трансформирующий ростовой фактор (TGF-альфа) влияет на ангиогенез (Chen J., et al., 1993). Продуцируемые фибробластами факторы роста могут ускорять восстановление пораженной дермы, что во многом объясняет стимулирующее воздействие аллогенных клеток на заживление ран.

- эпидермальный фактор роста (EGF)-усиливает пролиферацию и миграцию кератиноцитов;

- фактор роста кератиноцитов (KGF)-усиливает заживление и эпителизацию ран;

- трансформирующий фактор роста (a-NGF) активно влияет на ангиогенез.

Использование фибробластов для лечения дефектов кожи можно осуществлять 2 способами: с использованием аутологичных фибробластов (биопсийных или выделенных из жировой ткани пациентов) и аллогичных, в том числе фетальных фибробластов (банки клеток).

На данный момент имеются данные о высокой эффективности использования культур фибробластов для лечения дефектов кожи при ожогах, глубоких ранах, хронических язвах, в косметологии – для лечения угревой болезни, возрастных изменений кожи, алопеции и гнездной плешивости, в стоматологии – для лечения пародонтита. Доказано, что процесс выделения и

культивирования клеточного материала для тканеинженерных конструкций не вызывает повреждения ДНК в фибробластах, является безопасной и эффективной процедурой. Фибробласты, в т.ч. полученные от взрослых людей, длительно сохраняют высокую пролиферативную активность[65].

Основной проблемой культивирования клеток *invitro* является утрата организации и естественной связи с внеклеточным матриксом клеток в 2D культурах. В ряде работ показано, что культивирование клеток на неадгезируемых поверхностях приводит к образованию клеточных агрегатов – сфероидов. Установлено, что клетки в сфероидах находятся в метаболически неактивном состоянии, с минимальным расходом АТФ и кислорода, с минимальным синтезом белков цитоскелета. Культивирование клеток на 3D матриксах с хорошо развитой сетью пор позволяет преодолеть снижение клеточного метаболизма в культуре. Через взаимодействие «клетка-матрикс» происходит восстановление организации и функций клеток (которое в случае образования сфероидов происходит за счет межклеточных взаимодействий).

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Объекты исследования

Для исследований были выбраны 3 типа биополимеров:

- полигидроксиалканоаты (ПГА) – гомогенный полимер 3-гидроксимасляной кислоты (ПЗГБ) и двухкомпонентный сополимер 3-гидроксibuтирата и 3-гидроксивалерата (ПЗГБ/ЗГВ) с включением 3-гидроксивалерата 18 мол.%, полученные в лаборатории новых биоматериалов Сибирского федерального университета;

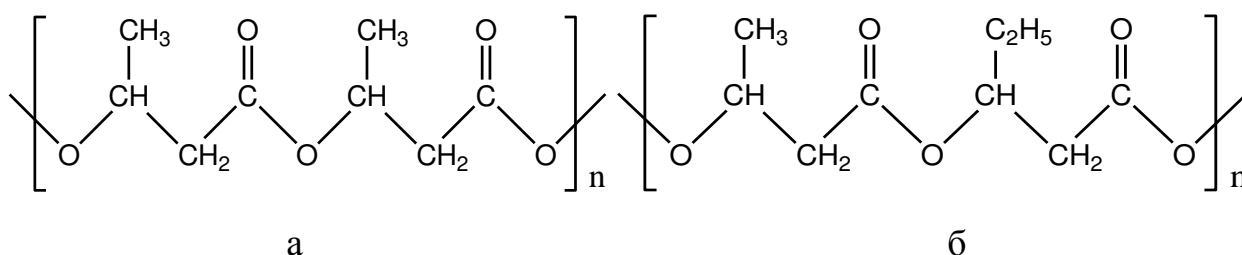


Рисунок 1 – Химическая структура ПГА различного состава, *а* – поли-3-гидроксibuтират, *б* – поли-3-гидроксibuтират-со-3-гидроксивалерат

- бактериальная целлюлоза (БЦ), синтезированная на 2 различных субстратах: глюкозе и глицерине, полученная на Базовой кафедре биотехнологии Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета;

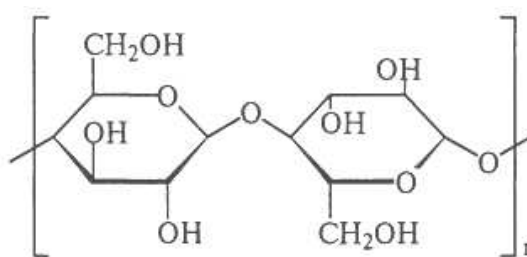


Рисунок 2 – Химическая структура бактериальной целлюлозы

- хитозан высокой степени чистоты, степень деацетилирования 99%, приобретён Sigma-Aldrich®.



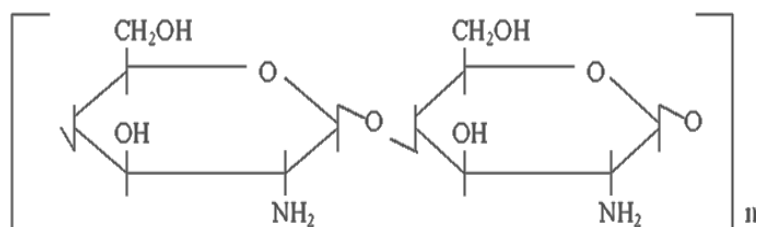


Рисунок 3 – Химическая структура хитозана

## 2.2 Методики исследования

### 2.2.1 Синтез ПГА

В качестве продуцентов ПГА были взяты природные штаммы бактерий *Cupriaviduseutrophus* B10646, характеризующиеся способностью к синтезу ПГА. *C. eutrophus* B10646 зарегистрирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов.

Бактерии выращивали в периодическом двустадийном режиме, разработанном ранее [66]. Посевной материал получали путем ресуспендирования музейной культуры, хранящейся на агаризованной среде. Музейную культуру выращивали в жидкой солевой среде Шлегеля при стартовой концентрации глюкозы 10 г/л. Для выращивания бактерий за основу принята среда следующего солевого состава:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 9,1 г/л;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,5 г/л;  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 0,2 г/л;  $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,025 г/л и сбалансированная кислотнo-солевая среда [67]. Источником железа служил раствор железалимоннокислого (5 г/л), который вводили из расчета 5 мл/л. Микроэлементы вводили по прописи Хоагланда из расчёта 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Стандартный раствор содержит:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0,288 г/л;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,030 г/л;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,08 г/л;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 0,008 г/л;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,176 г/л;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,050 г/л;  $\text{NiCl}_2$  – 0,008 г/л. В качестве источника азота использовали мочеви́ну.

Инокулят получали в строго стерильных условиях в периодическом режиме с использованием шейкера-инкубатора «IncubatorShakerInnova<sup>®</sup>» серии 44 («NewBrunswickScientific», США) в стеклянных колбах объемом от 0,5 до 2,0 л с коэффициентом заполнения 0,5 при 30°C и 200 об/мин.



Рисунок 4 – Получение инокулята в колбах в шейкер-инкубаторах «IncubatorShakerInnova»<sup>®</sup>

Культивирование бактерий проводили в стерильном режиме на опытном производстве Сибирского федерального университета, с использованием ферментёров фирмы Bioengineering (Швейцария) – NLF 22, объём аппарата 30 л (рабочий объём от 5 до 20 л) и P 150, объёмом 150 л (рабочий объём от 10 до 110 л).



а

б

Рисунок 5 – Ферментёры фирмы Bioengineering (Швейцария) а – «Bioengineering<sup>®</sup> NLF 22», объём 30 л, б – «Bioengineering<sup>®</sup> P 150», объём 150 л

Валерьяновую кислоту добавляли в виде натриевой соли совместно с основным глюкозным субстратом в концентрации 0,02 г/л для получения сополимера.

В ходе экспериментов периодически отбирали пробы культуры (каждые 5 ч). Контроль оптической плотности и азота, определение содержания и состава полимера, определение сухой биомассы клеток производили стандартными методами, описанными ранее.

Изменение биомассы клеток в процессе культивирования регистрировали по оптической плотности культуры. Для измерения оптической плотности периодически отбирали пробы культуры, использовали фотоколориметр КФК-2МП, при разведении пробы дистиллированной водой 1:5 и  $\lambda=440$  нм (длина оптического пути 1 мм).

Концентрацию клеток  $X$ , г/л, регистрировали весовым способом. Для этого брали аликвоты бактериальной суспензии, объемом 10-25 мл, центрифугировали 10 мин при 6000 об/мин; дважды отмывали клетки от солей дистиллированной водой и снова центрифугировали. Отмытые клетки переносили в бюксы, предварительно доведенные до постоянного веса. Пробы сушили при температуре 105°C в течение суток, охлаждали в эксикаторе и взвешивали. Биомассу бактерий в культуре определяли как разницу между весом бюкса с клетками и весом чистого бюкса.

Для измерения азота 1 мл фугата заливали 10 мл дистиллированной воды, добавляли 1-2 капли 33% КОН и 0,5 мл реактива Неслера. Результаты наблюдали по цветовой реакции.

Внутриклеточную концентрацию и состав полимера определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза образца на хромато-масс-спектрометрической системе Agilent 7890A с масс детектором Agilent Technologies 5975C («Agilent», США). К навеске сухой биомассы (4,0–4,5 мг) добавляли 1 мл внутреннего стандарта (0,5 мг бензойной кислоты на 1 мл хлороформа), 0,85 мл метанола и 0,15 мл концентрированной серной кислоты. Полученную смесь кипятили с обратными холодильником в течение

2 ч 40 мин. По окончании метанолиза в пробу добавляли 1-3 мл дистиллированной воды и хорошо перемешивали полученный раствор для разделения жидкостей. Нижний хлороформенный слой, полученный путем промывки проб дистиллированной водой, с помощью делительных воронок и пропускания через слой сернокислого натрия, использовали для анализа [55; 56 Воронина].

Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение исследовали с использованием хроматографа для гельпроникающей хроматографии AgilentTechnologies 1260 Infinity (Германия) с использованием калибровочных стандартов AgilentPS-HEasiVial. Находили средневесовую ( $M_B$ ) и среднечисловую ( $M_C$ ) молекулярную массу, а также полидисперсность (ПД), растворяя образцы сополимерных ПГА навеской 10–12 мг в 2 мл хлороформа с дальнейшей их фильтрацией. Значение средней молекулярной массы сополимеров ( $M_C$ , Да) определялось по формуле:

$$M_C = \Sigma (N_i \times M_i / N) \quad (1)$$

где  $N_i$  – количество молекул массы  $i$ ;  $N$  – общее количество молекул;  $M_i$  – масса молекул длины  $i$ , Да.

Вес средней молярной массы сополимера ( $M_B$ , Да) определялся по формуле:

$$M_B = \Sigma (w_i \times M_i) \quad (2)$$

где  $w_i$  – доля массы.

Доля массы определяется по следующей формуле:

$$w_i = N_i \times M_i / \Sigma (N_i \times M_i) \quad (3)$$

Полидисперсность, позволяющую оценить соотношение в полимере фрагментов с различной степенью полимеризуемости, вычисляли из формулы:

$$\text{ПД} = M_v / M_n \quad (4)$$

Термические свойства биополимеров исследованы методом дифференциальной сканирующей калориметрии с помощью прибора DSC-1 («MettlerToledo», Швейцария). Образцы в виде порошка массой  $4,0 \pm 0,2$  мг помещали в алюминиевые тигли, нагревали со скоростью  $5^\circ\text{C}/\text{мин}$  до  $200^\circ\text{C}$ . После образцы охлаждали до  $-20^\circ\text{C}$ , выдерживали в течение 20 минут и повторно нагревали до  $320^\circ\text{C}$ . Температуры плавления и термической деградации регистрировали по пикам на термограммах с использованием программного обеспечения «STAReSW 11.00»

### **2. 2. 2      Получение экспериментальных плёночных образцов из ПГА**

Навеску полимера ПГА, предварительно выделенного из биомассы микроорганизмов *Cupriaviduseutrophus* B10646, растворяли в десяти объёмах дихлорметана по отношению к массе полимера. После полного растворения полимера раствор переливали в ёмкость, содержащую удвоенный (к раствору ПГА) объём осадителя, в роли которого выступал гексан. Все работы проводили в вытяжном шкафу и в защитных перчатках. Полученную смесь отстаивали в течение 30-40 минут, после чего полимер отфильтровывали на обеззоленном фильтре красная лента и высушивали в вытяжном шкафу в течение суток. При необходимости – по результатам контроля чистоты полученного полимерного материала при помощи газовой хроматографии – масс-спектрометрии AgilentTechnologies 5975C («Agilent», США) – процедуру очистки при помощи перерастворения-осаждения проводили повторно.

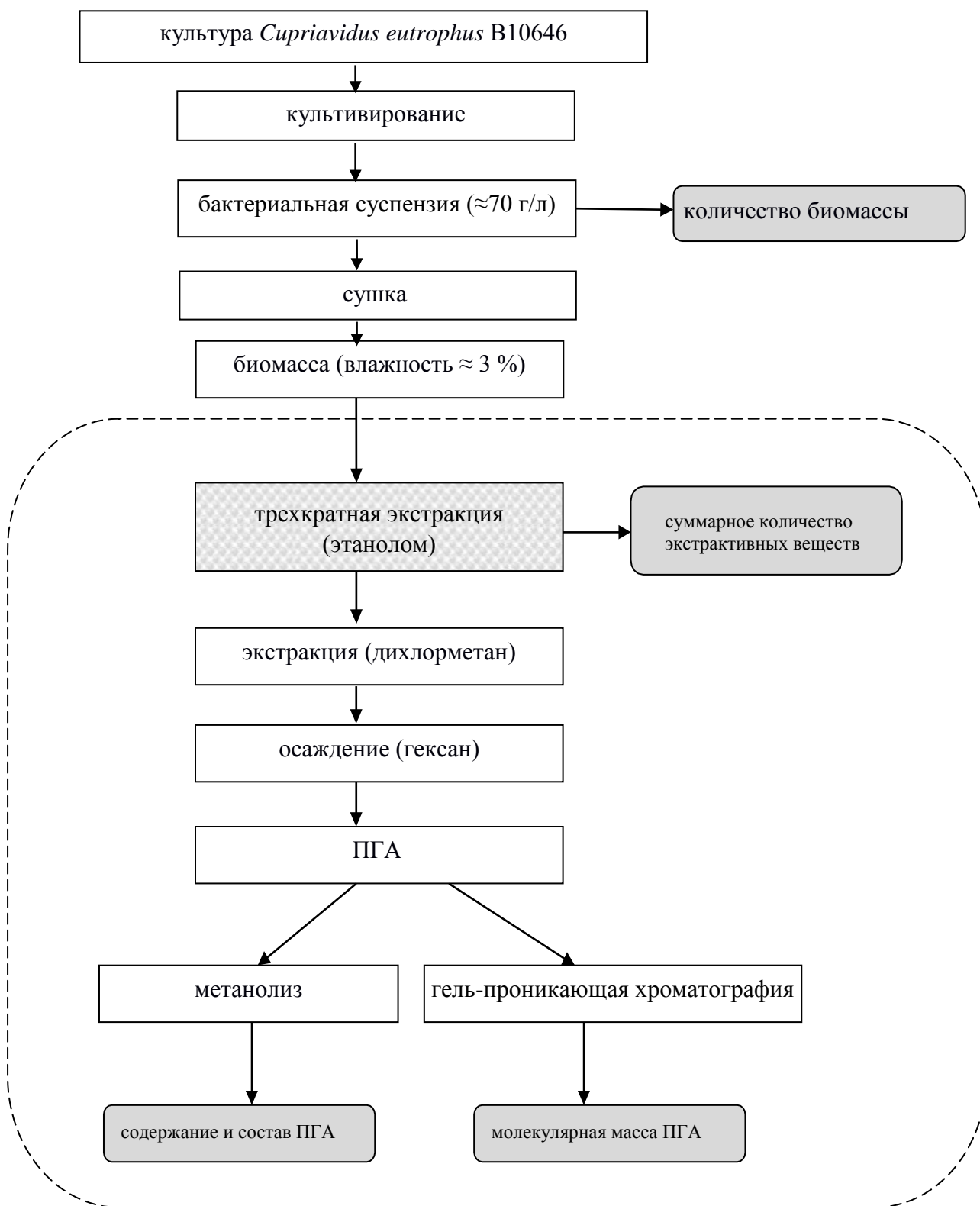


Рисунок 6 – Схема получения и анализа ПГА

Полимерные плёнки получали методом полива разогретого до 40°C на магнитной мешалке MRHei-Standart (Heidolph, Германия) при 300 об/мин. 2% раствора полимера в дихлорметане на обезжиренную поверхность чашек

Петри. Плёнки высушивали в вакуумном эксикаторе (Labconco, США) с целью испарения растворителя. Толщину плёнок измеряли механическим электронно-цифровым микрометром LegionerEDM-25-0.001 (Зубр, Россия). С помощью специальной формы высекали диски диаметром 15 мм, которые использовали в экспериментах.

### 2. 2. 3 Получение бактериальной целлюлозы

Штамм *Komagataeibacter xylinus*B-12068 был выделен из природной ассоциации чайного гриба (комбуча) *Medusomyces gisevii*J. Lindau. Выделение штамма проводили на агаризованной среде Hestrin-Schramm (HS), содержащей (г/л): глюкозу – 20.0, пептон – 5.0, дрожжевой экстракт – 5.0, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 2.7 и лимонную кислоту – 1.15 (Hestrin, Schramm, 1954). Морфологию клеток изучали на препаратах, окрашенных по Граму, фенотипические признаки исследовали общепринятыми в микробиологии методами (Boone et al., 2005; Dworkin et al., 2006). Способность к росту на различных источниках углерода определяли на базовой среде HS с добавлением 2 % соответствующего углевода (глюкоза, глицерин). Для дифференциации штамма от близкородственных видов рода *Komagataeibacter* определяли потребность в уксусной кислоте для роста; способность к росту в присутствии 30% глюкозы; рост на среде АЕ в присутствии 3% этанола и до 8% ацетата (г/л): пептон – 4.0; дрожжевой экстракт – 3.0; глюкоза – 7.5; агар – 8.0; уксусная кислота – 60 мл; этанол – 30 мл (Boone et al., 2005; Dellaglio et al., 2005). Этанол и уксусную кислоту добавляли после стерилизации основной среды.

Для изучения способности штамма *K. xylinus*B-12068 продуцировать БЦ штамм выращивали на стандартной среде HS. Посевной материал получали, выращивая бактерии *K. xylinus*B-12068 на агаризованной среде HS, затем переносили колонию бактерий в 250 мл колбу Эрленмейера со 100 мл жидкой питательной среды и культивировали в течение 7 суток при температуре 30°C в статических условиях. Полученную БЦ отделяли от культуральной жидкости,

очищали в 0,5 % растворе NaOH 24 часа при температуре 25-27°C, затем помещали в 0,5% раствор соляной кислоты на 24 ч для нейтрализации, после чего промывали дистиллированной водой до pH 7.

Пленки БЦ стерилизовали автоклавированием в фосфатно-буферном растворе при 121°C в течение 15 минут и хранили в стерильном растворе, или высушивали на воздухе при комнатной температуре до постоянной массы. Массу сырой и сухой пленки определяли на лабораторных весах AdventurerOH-AR2140 (Ohaus, Швейцария).

Для исследования влияния условий выращивания на биосинтез БЦ варьировали первоначальные значения pH (3,2-4,8) и добавляли в среду этанол в различных концентрациях (0,5-3,0 %).

#### **2. 2. 4 Изготовление плёнок из хитозана**

Плётки получали методом полива разогретого до 40°C на магнитной мешалке MRHei-Standart (Heidolph, Германия) при 300 об/мин. 2% раствора хитозана в гексафторизопропиловом спирте на обезжиренную поверхность чашек Петри. Плёнки высушивали в вакуумном эксикаторе (Labconco, США) с целью испарения растворителя. Толщину плёнок измеряли механическим электронно-цифровым микрометром LegioneREDM-25-0.001 (Зубр, Россия). С помощью специальной формы высекали диски диаметром 15 мм, аналогично образцам из других полимеров.

В случае использования неочищенного высокомолекулярного хитозана (700 кДа, степень деацетилирования менее 90%) его растворяли в 1% уксусной кислоте в концентрации по хитозану около 1 % (для более низкомолекулярных образцов используются более концентрированные растворы). Полученный раствор фильтровали через мелкопористый фильтр (мельничный газ, диаметр пор – 5 мкм) для удаления механических примесей (если визуально примесей не видно – фильтрацию не производят). Отфильтрованный раствор титровали 12% NH<sub>4</sub>OH до pH=7,5. Наблюдали выпадение белого хлопьевидного осадка



хитозана, который трижды центрифугировали (6 000 об в течение 10 минут) и декантировали супернатант. Полученный частично отмытый осадок ресуспендировали в воде и диализовали в течение четырех суток с многократной сменой воды. По окончании диализа полученную суспензию лиофильно высушивали. Средний выход хитозана после переосаждения 50-80%, в зависимости от наличия в образце большого количества солей и низкомолекулярных примесей. Сукцинированный хитозан переосаждали аналогичным образом растворением в 2% растворе NaOHc последующим закислением до pH=6,6 30% раствором уксусной кислоты.

### **2. 2. 5      Получение композитных материалов на основе ПГА, БЦ и хитозана**

Композитные плёнки изготавливали путем добавления измельчённых на ультразвуковой мельнице ZM 200 (Retsch, Германия) высушенных плёнок бактериальной целлюлозы хитозана в раствор разогретого до 40°C на магнитной мешалке MRHei-Standart (Heidolph, Германия) при 300 об/мин ПГА в дихлорметане. Получали плёнки с соотношением БЦ и хитозана к ПГА как 1:1 и 1:3, трёхкомпонентных плёнок не изготавливали. Для улучшения диспергирования порошкового хитозана раствор обрабатывали ультразвуковым гомогенизатором Sonikator 3000 (Misonix, США) в течение 10 минут до полного разбивания агломератов частиц хитозана. Плёнки высушивали в вакуумном эксикаторе (Labconco, США) с целью испарения растворителя. Толщину плёнок измеряли механическим электронно-цифровым микрометром Legione EDM-25-0.001 (Зубр, Россия). Также высекали диски диаметром 15 мм.

### **2. 2. 6      Исследование свойств поверхности**

Поверхностные характеристики полимерных изделий оценивали с помощью прибора для измерения краевых углов DSA-25E (Krüss, Германия) с использованием программного обеспечения DSA-4 для Windows. На

поверхность образцов с помощью микрошприца наносили капли воды объемом 1,5 мкл с видеофиксацией моментов взаимодействия жидкости с поверхностью образца. Для нахождения краевых углов смачивания кадр видеозаписи капли после ее стабилизации обрабатывался в полуавтоматическом режиме встроенным в программный пакет методом «Circle». Из полученных значений краевых углов смачивания ( $\theta$ , град) вычисляли свободную поверхностную энергию ( $\gamma_s$ ), свободную энергию межфазовой поверхности ( $\gamma_{SL}$ ) и величину сил сцепления ( $W_{SL}$ ) (эрг/см<sup>2</sup>), используя известные уравнения.

Свободную поверхностную энергию (эрг/см<sup>2</sup>) находили из уравнения

$$\gamma_s = \gamma_L (1 + \cos\theta)^2 / 4 \quad (5)$$

где  $\gamma_L$  – свободное поверхностное натяжение воды, равное 72.8 эрг/см<sup>2</sup>. Свободную энергию межфазовой поверхности «полимер-вода» ( $\gamma_{SL}$ , эрг/см<sup>2</sup>) – по уравнению

$$\gamma_{SL} = \gamma_s + \gamma_L - W_{SL}, \quad (6)$$

где  $\gamma_{SL}$  – критерий остаточной межфазовой энергии;  $\gamma_s$  и  $\gamma_L$  – соответственно, свободная энергия поверхности плёнки и воды.

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

$$W_{SL} \approx 2\sqrt{\gamma_s\gamma_L} \quad (7)$$

Для каждого матрикса проводили десять измерений; рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение.

### 2. 2. 7 Исследование физико-механических свойств

Механические характеристики плёнок определяли на универсальной электромеханической испытательной машине 5565-5KN (Instron,

Великобритания) стандартным методом испытаний на растяжение для тонких пластмассовых покрытий ASTM D882/883. Исследовали модуль Юнга (модуль упругости) (МПа) напряжение (МПа) и удлинение при разрыве (%). Процедуру определения модуля упругости при растяжении осуществляли при скорости деформации 3 мм/мин.

### **2. 2. 8 Введение клеточной культуры эмбриональных фибробластов мыши линии NIH 3T3**

Для эксперимента брали криоконсервированные клетки, которые после разморозки культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе MCO-5AC (Sanyo, Япония) в гумидной атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Для приготовления питательной среды использовали многокомпонентную среду DMEM, 10% эмбриональную телячью сыворотку и 5% раствор антибиотиков (пенициллин, стрептомицин). Для снятия клеток с поверхности культуральных флаконов использовали трипсин, титр суспензии определяли с помощью камеры Горяева (соотношение жизнеспособных и мёртвых клеток оценивали после окрашивания трипановым синим). Все манипуляции с клетками осуществляли в ламинарном шкафу NB602-WSL (N-biotek, Корея).

### **2. 2. 9 Анализ биосовместимости опытных образцов**

Оценку биосовместимости образцов *in vitro* проводили согласно стандартам ГОСТ Р ИСО 10993-2009. Потенциальную цитотоксичность полученных матриц оценивали в постоянной клеточной линии эмбриональных фибробластов мыши линии NIH 3T3. В качестве контроля приняли полистироловую поверхность культуральных планшетов.

#### **2. 2. 9. 1 Подсчёт абсолютного количества адгезированных клеток**

Клетки культивировали в 24-луночных пластиковых планшетах. Перед посевом клеток, в планшет помещали по 3 опытных образца каждого состава и

подвергали стерилизации экспозицией в 70% этаноле в течение 15 минут, после образцы промывали трижды в полной ростовой среде DMEM с сывороткой и антибиотиками. На каждый матрикс высевали  $10^5$  клеток на миллилитр, культивировали в гумидной атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в 1 мл полной среды DMEM с добавлением 5% пенициллина-стрептомицина и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) в течение 3 суток. Через 3 суток культивации клетки с поверхности образцов снимали 0,125% раствором трипсина, добавляя его по 0,5 мл в каждую лунку, предварительно отобрав культуральную среду. Планшет на 5 минут помещали обратно в CO<sub>2</sub>-инкубатор, после чего трипсин инактивировали добавлением среды DMEM с 10% ЭТС и 5% раствором антибиотиков, клетки с плёнок смывали и перемещали в центрифужные пробирки errendorf, центрифугировали со скоростью 3000 об/мин в течение 5 минут, супернатант отбирали, клеточный осадок ресуспендировали, к 10 мкл клеточной суспензии добавляли равный объем трипанового синего, после чего заполняли камеру Горяева и считали количество живых (неокрашенных) и мертвых (окрашенных) клеток в пяти больших квадратах по диагонали, количество клеток определяли по формуле

$$X = N \cdot 0,05 \cdot 10^6 \cdot m \quad (8)$$

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

### **2. 2. 9. 2    Проведение МТТ-теста**

Жизнеспособность культивируемых клеток оценивали в МТТ-тесте. В основе МТТ-теста лежит реакция внутриклеточного восстановления водорастворимого тетразолиевого красителя МТТ в нерастворимый формазан с участием NAD(P)H-зависимых оксидоредуктаз. Образование формазана зависит от доступности NAD(P)H и может служить интегральной оценкой активности продукции NAD(P)H и активности NAD(P)H-зависимых метаболических циклов, что позволяет оценить способности

митохондриальных дегидрогеназ восстанавливать 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол бромид до формазана и говорит об активности митохондрий клеток. Предварительно стерилизованные плёнки помещали в лунки 24-луночного планшета, высевали  $10^5$  клеток на лунку, довели питательной средой содержимое каждой лунки до 1 мл. Инкубировали в течение 3 суток. Отбирали культуральную жидкость, затем вносили в каждую лунку 50 мкл рабочего раствора МТТ (конечная концентрация МТТ 0,25 мг/мл) и 950 мкл полной среды DMEM с сывороткой и антибиотиками. Через четыре часа инкубирования заменяли среду на DMSO. После полного растворения кристаллов формазана аликвоты переносили в 96-луночный планшет и проводили измерение оптической плотности при  $\lambda=550$  нм на микропланшетном фотометре Bio-Rad 680 (Bio-Rad LABORATORIES Inc, США). Количество клеток оценивали по калибровочному графику.

### **2. 2. 9. 3    Окраска клеток флуоресцентным красителем DAPI**

Характер распределение клеток, прикрепившихся к поверхности плёнок, определяли с помощью окраски флуоресцентным красителем DAPI (маркер на ДНК). Для флуоресцентной микроскопии клетки на матриксах фиксировали 2,5 %-м раствором формалина, затем обрабатывали раствором Tween-20 с последующим контрастированием ядер клеток с помощью DAPI.

### **2. 2. 10    Статистическая обработка**

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

### 3 РЕЗУЛЬТАТЫ

Изъято 16 страниц.

### 4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изготовлены образцы носителей для тканевой инженерии кожи из ПГА, БЦ и хитозана в разных процентных соотношениях.

2. Исследование физико-механические свойства полученных образцов показало различия в зависимости от состава. Установлено, что экспериментальные плёнки состава: **ПЗГБ/ЗГВ**, **ПЗГБ/ЗГВ / Х (1:1)**, **БЦ (с: глицерин)**, **ПЗГБ/ЗГВ / БЦ (с:глиц.) (1:1)** обладали оптимальными свойствами для адгезии и пролиферации фибробластов. По совокупности измеренных физико-механических параметров отмечено, что плёнки состава **ПЗГБ/ЗГВ**, **ПЗГБ / Х (1:1)**, **БЦ (с: глюк., высушенная)**, **БЦ (с: глиц., высушенная)**, **ПЗГБ/ЗГВ / БЦ (с:глиц.) (3:1)**, **ПЗГБ/ЗГВ / БЦ (с:глиц.) (1:1)** обладали наиболее приближенными характеристиками к нативной коже (были прочными и эластичными).

3. Оценка биосовместимости полученных образцов, проведённая *in vitro*, в культуре NIH 3T3 показала отсутствие цитотоксического эффекта у матриксов всех типов, что позволяет сделать вывод о принципиальной возможности их использования в качестве носителей в тканевой инженерии. Среди экспериментальных плёнок можно выделить плёнки состава: **ПЗГБ**, **ПЗГБ/ЗГВ**, **ПЗГБ/ЗГВ / Х (3:1)**, **ПЗГБ/ЗГВ / Х (1:1)**, **ПЗГБ/ЗГВ / БЦ (с:глюк.) (3:1)**, **ПЗГБ/ЗГВ / БЦ (с:глиц.) (3:1)**, **ПЗГБ/ЗГВ / БЦ (с:глюк.) (1:1)**, **ПЗГБ/ЗГВ / БЦ (с:глиц.) (1:1)** как наиболее благоприятные для культивирования клеток. Подсчет прикрепленных клеток выявил достоверно меньшее ( $p=0,05$ ) количество клеток на контроле по сравнению с исследуемыми плёнками состава: **ПЗГБ/ЗГВ / Х (1:1)**, **ПЗГБ/ЗГВ / БЦ (с:глюк.) (3:1)**, **ПЗГБ/ЗГВ / БЦ (с:глиц.) (3:1)**, **ПЗГБ/ЗГВ / БЦ (с:глиц.) (1:1)**.

4. По результатам исследования, матриксы, сочетающие в себе наилучшие характеристики исследованных свойств – **ПЗГБ/ЗГВ / Х (1:1)** и **ПЗГБ/ЗГВ / БЦ (с:глиц.) (1:1)**.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- DLPLA – поли(dl-lactide)
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMSO – dimethyl sulfoxide (диметилсульфоксид)
- LPLA – гомополимер l-lactide
- PLGA – сополимерL-лактид-гликолид
- RGD –Arg-Gly-Asp последовательность
- АДП – аутодермопластика
- ВКМ – внеклеточный матрикс
- ГАГ – глюкозаминогликаны
- ГК – гиалуроновая кислота (гиалуронан)
- МСК – мезенхимальные стволовые клетки
- ПЭО – полиэтиленоксид
- ПЗГБ – поли-3-гидроксибутират
- ПЗГБ/ЗГВ – поли-3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерат
- ПВС – поливиниловый спирт
- ПГА – полигидроксиалканоаты
- ПГК – поли(гликолиевая кислота)
- ПКЛ – поликапролактон
- ПЛГК – сополимер ПМК и ПГК
- ПМГК – поли(молочная-со-гликолевая кислота)
- ПМК – поли(молочная кислота) (полилактат)
- ПЭГ – полиэтиленгликоль
- ТИ – тканевая инженерия
- ТИК – тканеинженерная конструкция
- ТИК – тканеинженерные конструкции



## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Алексеев, А.А. Местное применение стимуляторов регенерации для лечения ожоговых ран / А.А. Алексеев, А.Э. Бобровников // Комбустиология. – 2010. – № 41. – С. 20–22.
2. Basil, A. Operative wound management /D. Manuel, C.J. Jimenez, J. G. James, R.L. Sheridan, D. N. Herndon //The fourth Edition of Total Burn Care. – 2012. – P. 24–28.
3. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии [Электронный ресурс] :электрон. учеб. пособие / Т.Г. Волова, Е.И. Шишацкая, П.В. Миронов. – Электрон. дан. (6 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2009.
4. Зорин, В.Л. Дermalные фибробласты для лечения дефектов кожи / В.Л. Зорин, А.И. Зорина, О.С. Петракова и др //Клеточная трансплантология и тканевая инженерия – 2009. –№ 4(4). – С. 26–40.
5. Хенч Л. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / под ред. А.А. Лушниковой.М.: Техносфера, 2007. 304 с.
6. Saska, S. Characterization and in vitro evaluation of bacterial cellulose membranes functionalized with osteogenic growth peptide for bone tissue engineering . Saska S, Scarel-Caminaga RM, Teixeira LN, Franchi LP, Dos Santos RA, Gaspar AM, de Oliveira PT, Rosa AL, Takahashi CS, Messaddeq Y, Ribeiro SJ, Marchetto R. // J Mater Sci Mater Med – 2012. – № 23.–P. 2253-2266
7. Lin W.C., Lien C.C., Yeh H.J., YuC.M., Hsu S.H. Bacterial cellulose and bacterial cellulose chitosan membranes for wound dressing applications // Carbohydrate Polymers. 2013. V. 94(1). P. 603-611.
8. Pena, J. Destruction of chitosan matrix for tissue engineering / J. Pena, I. Izquierdo Barba, A. Martinez, M. ValletRegi // Solid State Science. – 2006. – vol. 8. – P. 513 – 519.
9. Петрович, Ю.А. Композитные материалы на основе хитозана для тканевой инженерии / Ю.А. Петрович, А.Н. Гурин, Н.А. Гурин, С.М. Киченко // Российский стоматологический журнал. – 2008. - № 2. – С. 67–73.

10. Федотов А.Ю. Покрытия на основе хитозана для инжиниринга имплантов / Ю.А. Федотов [и др.] // Доклады Академии Наук. – 2011. – Т.437, № 1. – С. 65–67.
11. Li, X.Y. Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY) / X.Y. Li et al // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2007. - vol. 55. – P. 2911 – 2917.
12. Байтукалов Т.А. Ранозаживляющие свойства низкомолекулярного хитозана / Т.А. Байтукалов [и др.] // Известия РАН. Серия биологическая. - 2005. – № 6. – С. 659 – 663.
13. Langer, R. Tissue engineering / R. Langer, J.P. Vacanti // Science. — 1993. — vol. 260. — P. 920 – 926.
14. Hin, T. S. Engineering materials for biomedical application / T.S. Hin. – London : World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, 2004. – 350 p.
15. Кирилова, И.А. Новые виды материалов для костной пластики в свете современных представлений о костных трансплантатах / И.А. Кирилова, Н.Г. Фомичев, В.Т. Подорожная, В.И. Трубников // Хирургия позвоночника. – 2007. – №2. – С. 66 - 70.
16. Маланин, Д. А. Восстановление повреждений хряща в коленном суставе: монография / Д. А. Маланин, В. Б. Писарев, В. В. Новочадов. – Волгоград: Волгоградское научное издательство, 2010. – 518 с.
17. Isla, N. Introduction to tissue engineering and application for cartilage engineering / N. de Isla et al // Biomedical Materials and Engeneering. – 2010. – vol. 20, № 3. – P. 127–133.
18. O'Brien, F. J. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering / F. J. O'Brien // Matererials Today. – 2011. – Vol. 14. – P. 88 – 95.
19. Kerker, J. T. Cartilage repair: synthetics and scaffolds – basic science, surgical techniques, and clinical outcomes / J.T. Kerker, A.J. Leo, N.A. Sgaglione // Sports Med. Arthrosc. – 2008. – Vol. 16, № 4, – P. 208–216.

20. Lu, T. Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering / T. Lu, Y. Li, T. Chen // *International Journal of Nanomedicine* – 2013. – Vol. 8. – P. 337–350.
21. Zhang, L. The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration / L. Zhang, J. Hu, K. A. Athanasiou // *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*. – 2009. – vol. 37, № 1–2. – P. 1–57.
22. Pittenger, M. F. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells/ M.F. Pittenger // *Science*. — 1999. — vol. 284. — P. 143–147.
23. Руднева, А.А. Реакция тканей кожи на синтетический материал «Тиопрост», разработанный для использования в тканевой инженерии / А.А. Руднева [и др.] // *Гены и Клетки*. – Москва, 2010. – Т.5, №1. – С. 53 – 57.
24. Гилевич, И.В. Достижения клеточной терапии в комбустиологии / И.В. Гилевич, Т.В. Федоренко, Е.А. Коломийцева, С.Б. Богданов, А.А. Семенченко, Ю.В. Иващук // *Инновационная медицина Кубани – 2017/* – №2(6). – С. 6 – 14.
25. Саркисов, Д.С. Теоретические и практические аспекты использования культивированных фибробластов при восстановлении целостности кожных покровов / Саркисов Д.С., Алексеев А.А., Глущенко Е.В. и др. // *Вестник РАМН* – 1994. – №6. – С. 6—11.
26. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии [Электронный ресурс] :электрон.учеб.пособие /Т. Г. Волова,Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов. – Электронные данные (6 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2009. –1 электрон.опт. диск (DVD).
27. Bastioli, C. Handbook of Biodegradable Polymers / C. Bastioli. - United Kingdom : Rapra Technology Limited, 2005. – 552 p.
28. Chen, Q. Progress and challenges in biomaterials used for bone tissue engineering: bioactive glasses and elastomeric composites / Q. Chen, Z. Chenghao, T. George // *Progress in Biomaterials*. – 2012. – vol. 1 (2). – P. 1 – 22.
29. Полимеры в биологии и медицине / под ред. М. Дженкинс. – Москва: Научный мир, 2011. – 256 с.

30. He, L. Fabrication and characterization of poly (l-lactic acid) 3D nanofibrous scaffolds with controlled architecture by liquid–liquid phase separation from a ternary polymer–solvent system / L. He et al // *Polymer*. – 2009. – vol. 50(16). – P. 4128 – 4138.
31. Дорожкин, С.В. Биоматериалы: Обзор рынка / С.В. Дорожкин, С. Агатопоулус // *Химия и жизнь*. – 2002. – № 2. – С. 8 – 10.
32. Вольф, Л.А. Производство поликапроамида / Л.А. Вольф, Б.Ш. Хайтин. – Москва : Химия, 1977. – 208 с.
33. Narayan, R. *Biomedical Materials* / Roger Narayan. — Springer, 2009. — 550 p.
34. Nirmala, R. Hydroxyapatite mineralization on the calcium chloride blended polyurethane nanofiber via biomimetic method / R. Nirmala, K.T. Nam // *Nanoscale Research Letters*. – 2011. – vol. 6 (2). – P. 134 – 147.
35. Kang, S.W. Surface modification with fibrin/hyaluronic acid hydrogel on solid-free form-based scaffolds followed by BMP-2 loading to enhance bone regeneration / S.W. Kang, J.S. Kim // *Bone*. – 2011. – vol. 48 (2). – P. 298 – 306.
36. Glowacki, J. *Collagen Scaffolds for Tissue Engineering* / J. Glowacki, S. Mizuno // *Biopolymers*. – 2007. – vol. 89 (5). – P. 338 – 344.
37. Kim, H. Sustained release of ascorbate-2-phosphate and dexamethasone from porous PLGA scaffolds for bone tissue engineering using mesenchymal stem cells / H. Kim, H. Kim, H. Suh // *Biomaterials*. – 2003. – vol. 24 (25) – P. 4671 – 4679.
38. Duan, B. Customized Ca-P/PHBV nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering: design, fabrication, surface modification and sustained release of growth factor / B. Duan, M. Wang // *Journal of the Royal Society*. – 2010. – vol. 7. – P. 615 – 629.
39. Liu, X. Biomimetic nanofibrous gelatin/apatite composite scaffolds for bone tissue engineering / X. Liu et al // *Biomaterials*. – 2009. – vol. 30 (12). – P. 2252 – 2258.

40. Севастьянов, В. И. Биосовместимые материалы: учебное пособие / В.И. Севастьянов. – Москва : Медицинское информационное агентство, 2011. – 544 с.
41. Волова, Т.Г. Полиоксиданканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины: науч. изд. / Т.Г. Волова, В.И. Севастьянов, Е.И. Шишацкая. – Новосибирск : Издательство СО РАН, 2003. – 330 с.
42. Николаева, Е.Д. Влияние обработки H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>O-плазмой на свойства клеточных носителей из резорбируемых полиэфигов «биоластотан» / Е.Д. Николаева, Д.Б. Гончаров, Е.И. Шишацкая // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.– 2011. – Т.VI, № 2. – С. 65 – 70.
43. Williams, S.F. Applications of Polyhydroxyalkanoates (PHA) in Medicine and Pharmacy / S. F. Williams, D.P. Martin // Biopolymers Online. – 2005. – P. 91 – 103.
44. Шишацкая, Е.И. Клеточные матрицы из резорбируемых полигидроксиалканоатов / Е.И. Шишацкая // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т.II, №2. – С. 68 – 76.
45. Murueva A.V. Microparticles prepared from biodegradable polyhydroxyalkanoates as matrix for encapsulation of cytostatic drug / A.V. Murueva et al // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2013. – vol. 24. – P. 1905 – 1915.
46. Murueva, A.V. The use of polymeric microcarriers loaded with anti-inflammatory substances in the therapy of experimental skin wounds / A.V. Murueva, A.M. Shershneva, E.I. Shishatskaya, T.G. Volova // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2014. – vol. 157. – P. 597 – 601.
47. Карпюк, В.Б. Клеточные технологии в восстановительной хирургии опорных и мягких тканей челюстно-лицевой области / В.Б. Карпюк, П.М. Лаврешин, М.Д. Перова // Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии. – 2015. - №3. – С. 87 – 96.

48. Руднева, А.А. Реакция тканей кожи на синтетический материал «Тиопрост», разработанный для использования в тканевой инженерии / А.А. Руднева [и др.] // Гены и Клетки. – Москва, 2010. – Т.5, №1. – С. 53 – 57.
49. Finkenstadt V.L. Natural polysaccharides as electroactive polymers // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005. V. 67. P. 735-745.
50. Cousins,S.K.. X-ray diffraction and ultrastructural analyses of dye-altered celluloses support van der Waals forces as the initial step in cellulose crystallization/ Cousins S.K. Brown R.M. // *Polymer.* 1997. V. 38. P. 897-902.
51. De Wulf, P. Improved cellulose formation by an *Acetobacterxylinum* mutant limited in (keto) gluconate synthesis / De Wulf P., Joris K., Vandamme E.J. // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1996. V. 67. P. 376-380.
52. Nimeskern, L. Mechanical evaluation of bacterial nanocellulose as an implant material for ear cartilage replacement / Nimeskern L., Avila H.M., Sundberg J., Gatenholm P., Müller R., Stok K.S. // *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials.* 2013. V. 22. P. 12-21.
53. Petersen, N. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives / Petersen N., Gatenholm P.// *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2011. V. 91(5). P. 1277-1286.
54. Shah, N. Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material / Shah N., Ul-Islam M., Khattak W.A., Park, J.K.// *Carbohydrate Polymers.* 2013. V. 98(2). P.1585-1598.
55. Gayathrya, G. Production and characterisation of microbial cellulosic fibre from *Acetobacterxylinum*/ Gayathrya G., Gopaldaswamy G. // *Ind. J. Fibre Text. Res.* 2014. V. 39. P. 93-96.
56. Muzzarelli, R.A.A. New derivatives of chitin and chitosan: properties and applications / R.A.A. Muzzarelli // *New Dev. Ind. Polysaccharides Proc.Conf.* – New York, 1985. – P. 207 – 231.
57. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / под ред. К.Г. Скрыбина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. – Москва : Наука, 2002. – 368 с.

58. Бондаренко, В.М. Воздействие хитозана на ультраструктуру клеток патогенных и условно патогенных микроорганизмов / В.М. Бондаренко, О.В. Рыбальченко, Н.Б. Вербицкая, С.Ф. Антонов // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана : материалы восьмой международной конференции / ВНИ-РО. – Москва, 2006. – С. 175-179
59. Дарашкевич, О.Н. Бицидные свойства хитозана различной степени деполимеризации / О.Н. Дарашкевич, О.В. Добролеж, Н.Б. Вербицкая Н. Б., С.Ф. Антонов, Н.Н. Золина, О.В. Рыбальченко // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана : материалы седьмой международной конференции / ВНИ-РО. – Москва, 2003. – С. 239-240.
60. Биотехнология: принципы и применение / подред. И. Хиггинс. – Москва : Мир, 1988. – 480 с.
61. Sclafani AP, et al. Evaluation of acellular dermal graft in sheet (AlloDerm) and injectable (micronizedAlloDerm) forms for soft tissue augmentation. Clinical observations and histological analysis. Arch Facial Plast Surg 2000; 2; 2: 130-136
62. Келлер, Г. Сохранность инъецируемых аутологичных человеческих фибробластов / Келлер Г., Себастиан Дж., Лакомбе Ю., Тофт К., Ласк Г., Ревазова Е. // «Бюл. эксп. биол. мед.», 2000, т.130, №8, 203-206.
63. Friedenstien, AJ. Heterotopic of bonemarrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissue / Friedenstien AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. // "Transplantation" 1968 , 6, 230-247;
64. Hayes, O. Cell confluency is as efficient as serum starvation for inducing arrest in the G0/G1 phase of the cell cycle in granulosa and fibroblast cells of cattle / Hayes O., Ramos B., Rodriguez L. L., Aguilar A., Badia T., Castro F. O. // Anim. Reprod. Sci. 87 : 181—192.
65. Л.Г. Степанова. Получение и характеристика нового штамма диплоидных клеток из фетальной ткани легкого человека / Л.Г. Степанова, С.Б. Алексеев, А.А. Згурский, Г.А. Ломанова, Н.В. Шалунова // «Цитология», 1986, т. 28, № 12, с.1373-1376.

66. Волова Т.Г. Получение и исследование микробных гетерополимерных полиоксиалканоатов / Т.Г. Волова, О.Г. Беляева, Г.С. Калачева [и др.] // ДАН. – 1996. – Т. 347. – С. 256-258

67. Курек, Ф. Механические и фрикционные свойства биоэластомеров. Часть 2: различия деформационных характеристик кожи в пределах эпи- и гипогастральной анатомических областей / Ф. Курек, С.В. Шилько, В.В. Аничкин, С.Б. Анфиногенов // Российский журнал биомеханики. – 2009. – том 13, № 4 (46). – С. 65–77.

68. Волова Т.Г. Полиоксиалканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины / Т.Г. Волова, В.И. Севастьянов, Е.И. Шишацкая. – Новосибирск: СО РАН, 2003. – 330 с.

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

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

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

72. Болотова, К. Морфологические особенности фибриллярной структуры растительной и бактериальной целлюлозы / Болотова К., Чухчин Д., Майер Л., Гурьянова А. // Лесной журнал. 2016. Т.6. № 354. С. 153-165.

73. Киселев Е. Г. Техничко-технологические основы биосинтеза резервных полигидроксиалканоатов водородными бактериями : автореф. дис. канд. биол. наук : 03.01.06 / Киселев Евгений Геннадьевич. - Красноярск, 2012. - 20 с.



74. Mohammadkazemi, F. Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media / Mohammadkazemi F., Azin M., Ashori A. // Carbohydrate Polymers. 2015. V. 117. P. 518-523
75. Pokalwar, S.U. Production of cellulose by Gluconacetobacter sp. / Pokalwar S.U., Mishra M.K., Manwar A.V. // Recent Research in Science and Technology. 2010. V. 2(7). P. 14-19.
76. Superb, K. Boccaccini. Poly(3-hydroxybutyrate) multifunctional composite scaffolds for tissue engineering applications / Superb K., Misra, Tahera Ansari, Sabeel P., Valappil, Dirk Mohn, Sheryl E. Philip, Wendelin J. Stark, Ipsita Roy, Jonathan C. Knowles, Vehid Salih, Aldo R. // Biomaterials 31. - 2010. - P. 2806-2815.
77. Qu, X.H. Effect of 3-hydroxyhexanoate content in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) on in vitro growth and differentiation of smooth muscle cells. / Qu X.H., Wu Q., Liang J., Zou B., Chen G.Q. // Biomaterials 2006;27:2944-2950.
78. Wiesmann, H. P. Scaffold Structure and Fabrication / Wiesmann H. P., Lammers L., Meyer I. et al. // Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. 2009. P. 539-551.
79. Marler, J.J. Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration / Marler J.J., Upton J., Langer R. et al. // Adv Drug Deliv Rev. 1998. 33. P. 165-182.
80. Фрешни Р. Я. Культура животных клеток : практическое руководство / пер. 5-го англ. изд. М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. 691 с. : ил., [24] с. цв. вкл.
81. Современные аппаратура и методы исследования биологических систем: учеб. пособие / под ред. Э. Дж. Сински, Т. Г. Воловой. Красноярск: Сибирский федеральный ун-т, Институт биофизики СО РАН, 2011. 480 с.
82. Гаврилюк, Б. К. Культура клеток и реконструкция ткани (например кожи) / Гаврилюк Б. К., Рочев Ю. А., Николаева Т. И. // Пушино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1988. 123 с.

83. Биотехнология: принципы и применение / подред. И. Хиггинс.М.: Мир, 1988.480 с.

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

УТВЕРЖДАЮ

/ Заведующий кафедрой

 Т. Г. Волова

« 5 » июне 2019 г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Оценка биополимеров различного происхождения для восстановления  
дефектов кожи

06.04.01 – Биология

06.04.01.09 – Фундаментальная и прикладная биология

Научный руководитель



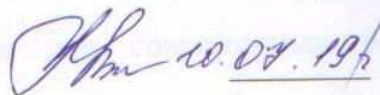
профессор, д.б.н. Е.И. Шишацкая

Выпускник



А.Е. Дудаев

Рецензент

  
10.07.19

профессор, д.м.н. Н.М. Тюхтева

Красноярск 2019