

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ Е. И. Шишацкая

« 3 » июля 2020 г.

## **БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология

ОЦЕНКА БИОСОВМЕСТИМОСТИ МЕДИЦИНСКИХ МАТЕРИАЛОВ В  
КУЛЬТУРАХ ЭУКАРИОТ

Научный руководитель \_\_\_\_\_  
подпись, дата

профессор, д.б.н. Е.И. Шишацкая

Выпускник \_\_\_\_\_  
подпись, дата

В.И. Григорьева

Красноярск 2020

## **РЕФЕРАТ**

Бакалаврская работа на тему «Оценка биосовместимости медицинских материалов в культурах эукариот» содержит 39 страниц текста, 8 иллюстраций, 4 таблицы и 57 источников литературы, использованной в работе.

Ключевые слова: биосовместимость, биоинженерия, высокотоксичные соединения, фибробласты, биоразрушаемые полимеры.

Целью работы являлась разработка депо-формы, обеспечивающей контролируемый выход высокотоксичных соединений (органические пероксиды ряда 1,2,4-триоксолан) в матрикс на основе биоразрушаемых полимерных материалов и оценка ее цитотоксических свойств.

Были поставлены задачи:

- 1) Отработать технологию получения пленочных образцов методом отлива плотных растворов ПГА на обезжиренную поверхность;
- 2) Определить условия для соединения ПГА и 1,2,4-триоксоланов;
- 3) Изучить характеристики полученных пленок, в том числе по отношению к жидкостям;
- 4) Изучить характер высвобождения 1,2,4-триоксолана из ПГА-пленок *in vitro*;
- 5) Провести сравнительную оценку цитотоксичности депо-форм 1,2,4-триоксоланов в ПГА по сравнению со свободным веществом.

Биоинженерия является одной из наиболее актуальных тем в медицине, так как в этой области есть возможность создавать искусственные элементы с целью замены ткани или органа. В ходе работы было получено несколько типов полимерных пленочных матриков с различным содержанием высокотоксичного соединения в них с целью разработки депо-формы цитостатического препарата. Были изучены реакции адгезионных клеточных культур эукариот, а именно фибробластов NIH 3T3. Результаты исследования показали, что полученные полимерные образцы с депонированным в них

высокотоксичным соединением проявляют высокий эффект цитотоксичности по отношению к клеткам эукариот.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Полимерные материалы для медицины и биоинженерии.....	10
1.1.1 Биоразлагаемые полимеры.....	12
1.1.2 Гидрогели.....	14
1.1.3 Хитозан.....	16
1.1.4 Полигидроксиалканоаты .....	17
1.1.5 Альгинаты .....	19
1.2 Использование клеточных культур в медицинском биоматериаловедении .....	20
1.3 Оценка материалов при контакте с культурой эукариот .....	23
1.4 Антибактериальные и противогрибковые препараты.....	24
1.5 Органические пероксидные соединения .....	25
1.6 Способы депонирования препаратов в биополимерные носители .....	27
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	31
2.1 Объекты исследования .....	31
2.2 Изготовление пленочных образцов.....	32
2.3 Стерилизация пленочных образцов .....	33
2.4 Исследование высвобождения пероксида из полимерных пленок.....	33
2.5 Ведение клеточной культуры .....	34
2.5.1 Подсчет абсолютного количества адгезированных клеток .....	34
2.5.2 MTT-тест .....	36

2.6 Статистическая обработка результатов .....	36
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>38</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>39</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>40</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....</b>	<b>41</b>

## **ВВЕДЕНИЕ**

Все представления о биосовместимости материалов и предъявляемых к ним требованиям менялись в разные периоды разработки и применения медицинских материалов. В результате этого было сформулировано определение биосовместимости. Биосовместимость - это способность материала в любой специфической ситуации выполнять необходимую функцию в условиях соответствующих ответу организма хозяина. Определение было основано на трех принципах:

- 1) Материал должен выполнять какую-либо функцию, а не просто находиться в тканях;
- 2) Ответ, вызванный организмом, должен подходить для применения материала;
- 3) Характер ответа на определенный материал может изменяться в разных ситуациях.

Исходя из этих принципов, мы понимаем, что основное здесь – это взаимодействие двух компонентов: реципиента и самого материала. Но при этом необходимо учитывать и такие характеристики пациента, как пол, возраст, сопутствующие заболевания, прием лекарственных препаратов и т.д. Учитывая все эти факторы, характеристики и свойства материала нужно будет модифицировать и совершенствовать [1].

В настоящее время все исследования, которые проводятся с участием биомедицинских материалов, особо актуальны. В частности, основной проблемой является трансплантология органов и тканей, т.к. осуществление эффективной деятельности в сфере трансплантации является одной из составляющих концепции развития здравоохранения Российской Федерации. Реальная потребность в трансплантации в России составляет более 11000 трансплантаций почки в год, 2000 – печени; 1100 – сердца; 800 – легких; 300 – поджелудочной железы. Так же известна статистика о выполняемых с

помощью доноров трансплантациях ежегодно: около 1000 трансплантаций почки; 200-240 – печени; 100-130 – сердца. Это в разы, в десятки раз меньше, чем требуется. Выполняемые 1300-1350 трансплантаций в год, обеспечивают всего 9-10% от всех требующихся операций. Основные ограничивающие факторы – это экономический фактор и ограниченное количество донорских органов. Существует высокая потребность в биоискусственных трансплантатах [2].

Достаточно часто к материалам для медицинской биоинженерии предъявляются повышенные требования. Существует потребность в биоактивных свойствах таких материалов и изделий из них. Например, для разработки биоискусственных тканей в условиях инфекции матриксный материал конструкции должен обладать антибактериальными свойствами. Этого эффекта можно добиться путем специфической модификации материала: добавлением антибактериальных/противовоспалительных препаратов либо изменением химической структуры соединения, либо добавлением групп  $-NO$ ,  $-NH_2$ ,  $-H$ , а также включением в структуру материала наноформ тяжелых металлов, таких как серебро, золото, платина.

Для создания медицинских изделий используют такие материалы искусственного происхождения, как синтетические полимеры, биополимеры, гидроксиапатиты, металлы, керамику, углерод, биоткани. Эти материалы могут называться медицинскими материалами при условии, что они биосовместимы.

Были выделены основные свойства, которыми должны обладать чужеродные материалы, взаимодействующие с биологическими структурами человека и животных:

- не вызывать местных воспалительных реакций;
- не оказывать токсического действия;
- не быть канцерогенными и генотоксичными;
- не вызывать развития инфекций;

- сохранять свойства в течение предусмотренного срока эксплуатации.

Такие свойства являются основными для любого изделия, но в зависимости от места назначения им могут предъявляться дополнительные требования. Как, например, материалы для клапанов сердца должны не только выдерживать многократные механические нагрузки, но также и не подвергаться кальцификации.

Эффективность разработки и внедрения искусственных органов и тканей связана с возможностью клинического использования импортозамещающей высокотехнологичной отечественной продукции, которая не уступает по характеристикам самым лучшим зарубежным трансплантатам, но имеет стоимость намного ниже аналогичных зарубежных технологий.

Отдельно стоящей проблемой является разработка высокоэффективных форм противогрибковых препаратов. В современной клинической имплантологии грибковые инфекции являются особо серьезной и сложной проблемой, сопровождая иммунодефицитные состояния при длительном приеме препаратов, подавляющих отторжение трансплантата. Следует ожидать, что подавлений супер-инфекций также будет не менее актуально при использовании биоинженерных конструкций вместо донорских тканей и органов в недалеком будущем, с учетом высоких рисков поражения культивируемых клеток грибковыми инфекциями в современной клеточной биологии. Высокий риск контаминации грибками обуславливает использование больших количеств антибиотиков-антибиотиков в питательных средах. При этом постоянная изменчивость грибковых культур делает актуальной разработку всех новых антимикотических препаратов. Из всего разнообразия органических пероксидов триоксоланы являются наиболее перспективным классом для создания депо-формы, которая позволит контролировать выход вещества из матриксов, так как у них обнаружена высокая антипаразитарная и противоопухолевая активность [51].

Цель работы – разработка депо-формы, обеспечивающей контролируемый выход высокотоксичного соединения (органический пероксид ряда 1,2,4-триоксоланов) в матрикс на основе биоразрушаемых полимерных материалов.

Задачи:

1. Отработать технологию получения пленочных образцов методом отлива плотных растворов ПГА на обезжиренную поверхность;
2. Определить условия для соединения ПГА и 1,2,4-триоксоланов.
3. Изучить характеристики полученных пленок, в том числе по отношению к жидкостям;
4. Изучить характер высвобождения 1,2,4-триоксоланов из ПГА-пленок *in vitro*;
5. Провести сравнительную оценку цитотоксичности депо-форм 1,2,4-триоксоланов в ПГА по сравнению со свободным веществом.

# 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Полимерные материалы для медицины и биоинженерии

Развитие современных медицинских технологий требует использования новых, в том числе наноструктурных, полимерных, металлических и композиционных материалов и изделий. Такие материалы должны отвечать многим требованиям, важнейшим из которых является биосовместимость.

Основным элементом биоинженерии является способность имитировать естественные носители, которые используют для организации клеток в ткани. Ключевой фактор успеха ТИ заключается в правильном выборе полимера. Полимерные матрицы разрабатываются для контроля и направления регенерации тканей, а также для создания специфических клеточных взаимодействий и реакций. В свою очередь, они служат еще и носителями, поддерживающими клетки при трансплантации [3].

Требования к материалу для ТИ зависят от реконструируемой ткани и дефекта, который нужно восстановить. Но все же выделяют общие свойства таких материалов:

- биосовместимая и биоразлагаемая матрица полимера для гарантии отсутствия иммунной или аллергической реакции;
- контролируемая кинетика разрушения для регулирования скорости распада различных тканей, восстанавливющихся с разной скоростью;
- матрица с системой межсвязных пор соответствующего размера и строения;
- соответствие механических свойств месту имплантации;
- возможность стерилизации при высокой температуре либо в этиленоксиде;
- придание нужной формы, сохраняющейся после имплантации [4, 5].

По применению биоразлагаемые полимеры делятся на три группы: медицинского, экологического и двойного применения, по происхождению – на две: природные и синтетические полимеры.

Типы полимеров, используемых в биоинженерии:

1) Природные полимеры:

- A) полисахариды и их производные (альгинаты, хитозан, целлюлоза, гиалуроновая кислота и др.);
- B) белки (коллаген, фибрин, шелк и др.);
- B) полигидроксиаканоаты (производные гидроксикислот, синтезируемые организмами в качестве запасного вещества).

2) Синтетические полимеры: полиэтилен, полиамиды, силиконы, полиуретаны и др.

На основе всех этих биополимеров создают тканеинженерные конструкции практически всех систем организма [6].

Чтобы оценить материалы, которые, предположительно, будут использоваться в ТИ, пользуются общепринятой системой тестирования медицинских материалов, в которой учитываются сроки пребывания в организме. Оцениваются физико-механические, санитарно-химические и токсикологические свойства материала. Также, чтобы оценить функциональность изделия, проводят тестирования с испытательными приборами и клеточными культурами по стандарту ISO 10993-5 [7].

Основное применение полимеров в медицине приходится на хирургию – наложение швов при операциях. Коллагеновые волокна используют в качестве рассасывающихся нитей. Различные полимерные гели применяют для остановки кровотечения, заполнения повреждений, «склеивания» повреждений. Также полимеры применяются для фиксации сломанных костей, во избежание повторной операции для таких целей стараются применять биоразлагаемые полимеры.

В фармацевтике полимеры используют в качестве систем доставки лекарственных средств (СДЛ) для доставки препаратов к пораженным участкам организма. СЛД замедленно высвобождает лекарственные препараты для большей продолжительности и поддержки оптимальной дозы. С помощью такой системы препарат доставляется в определенное место на поврежденный участок, не затрагивая здоровые участки. Основные достоинства СЛД в контролируемой доставке препарата и простая их доставка через кожу и слизистые оболочки. Полимеры в этой области применения стали очень подходящим материалом. Для таких целей используют микро- и наночастицы, гранулы, цилиндры и диски [8].

В биоинженерии полимеры используют для изготовления скваффолов, которые регенерируют или воссоздают ткань. Также полимеры применяют для замедленного высвобождения факторов роста в месте регенерации тканей [9].

### **1.1.1 Биоразлагаемые полимеры**

Биоразлагаемые полимеры – это те полимеры, которые разлагаются в биологических средах не термическим окислением, фотолизом или радиолизом, а в процессе ферментативного или неферментативного гидролиза. Другими словами, это полимеры, требующие для гидролитической или окислительной деструкции ферменты микроорганизмов. Но термин «биоразлагаемый» принято использовать ко всем полимерам, которые в результате исчезают, не зависимо от механизма деградации [10].

Среди биосовместимых биоразлагаемых алифатических полиэфиров широко используются полимеры и сополимеры на основе  $\alpha$ -гидроксикислот: полилактид, полигликолид, и др [11]. Процесс гидролиза сложноэфирных связей этих полимеров в биологических тканях протекает при участии воды,

ферментов и ионов, содержащихся в биологических жидкостях. Продукты гидролиза при выведении включаются в метаболизм.

Полилактид – это термопластичный полимер, который после формования изделия способен повторно проходить переработку, так как он обратимо переходит в вязкотекучее состояние при нагревании. У полилактида высокий предел прочности разрыва (до 60 МПа) и большой модуль упругости (до 3,5 ГПа). Полилактид синтезируют двумя способами: поликонденсацией молочной кислоты и полимеризацией с раскрытием цикла димера молочной кислоты. В промышленности в основном используют второй способ [12].

Полигликолид – алифатический сложный полиэфир. От полилактида полигликолид отличается не растворимостью в большинстве органических растворителей, например, ацетоне, метиленхлориде, хлороформе и др. Его широко используют в производстве биоразлагаемых хирургических нитей, благодаря высоким механическим свойствам, таким как напряжение при разрыве 218 МПа, упругости до 7 Гпа [13]. Но в чистом виде полигликолид применять достаточно трудно из-за жесткости и сложностей в переработке. Чтобы уменьшить жесткость в полимерную цепь добавляют 10% звеньев лактида.

Биодеградация полимеров в основном происходит за счет разрыва основной или боковых цепей молекул полимера, вызванная их термической активацией, окислением, фотолизом или гидролизом. Некоторые биополимеры также могут разлагаться в биологических средах с участием живых клеток или микроорганизмов [14].

Полимеры лактида и гликолида широко применяются в изготовлении нитей для хирургии, материалов в травматологии, матриксов для регенеративной медицины. Для изготовления резорбируемых изделий в медицине и прототипировании органов и тканей также используются биоразлагаемые материалы. Кроме того, такие полимеры начали

использовать в фармакологии для изготовления лекарственных препаратов нового поколения [15]. Но у биоразлагаемых полимеров есть и такой недостаток, как токсичность побочных продуктов биодеградации, поэтому появляются затруднения для полного введения их в медицинскую практику. Причины проявления токсичности биополимеров в основном из-за вымывания соединения из материала в организм. Вымываемые вещества могут включать в себя незаполимеризованные мономеры, неудаленный этиленоксид, антиоксиданты и другие различные добавки.

### **1.1.2 Гидрогели**

Особое внимание в медицине в настоящее время уделяется полимерным материалам, которые могут обеспечить комплексное действие – противовоспалительное, противоотечное, обезболивающее, гемостатический эффект, заживление ран и т.д. Пример такого материала – полимерные пористые гидрогели. Они представляют собой сополимеры N-замещенного метакриламида или акриламида, сшивающего агента и соединения сахара или его производного, пептида, соединяющего ткань, или сопряженного полимера с антителами. При этом полимер является гетерогенным, упругодеформирующимся и имеющим равновесное содержание воды, по крайней мере, около 80% (средний размер пор 35-40 мкм) [16].

Гидрогель можно использовать для восстановления органа и ткани. Он обладает лучшей способностью к заживлению ткани, которое достигается за счет контроля над разрастанием клетки, инфильтрацией клетки и организацией ткани в стабильной полимерной матрице.

Полимерные гидрогели считаются уникальными материалами. Они имеют необычные свойства, например, такие как: поглощение воды в 400 раз больше собственного веса. Связанная в геле вода не замерзает до -780 °С. Также гели могут менять свои свойства под воздействием внешних факторов.

Большинство стойко переносят действие кислот, щелочей и кипящей воды. Эти материалы выдерживают температуру от 10 до 130°С и pH от 1 до 10. У них хорошие оптические свойства и коэффициент их преломления (1,33) практически совпадает с коэффициентом преломления воды (1,35). Также они могут выдерживать давление от 0,6 до 3 МПа, что отражает хорошие механические свойства [17].

Основные методы получения полимерных гидрогелей – радикальная полимеризация гидрофильных мономеров в присутствии сшивающих агентов, сшивание гидрофильных олигомеров или полимеров обычными методами синтеза сетчатых полимеров; прививка перечисленных мономеров к природным полимерам, обеспечивающим образование сетки, химические реакции полимеров, например, гидролиз сшитого или привитого полиакрилонитрила.

Создание новых биоматериалов на основе полимерных гидрогелей идет уже более 50 лет. В настоящее время одним из немногих технологичным методом является метод криоструктурирования. Основывается он на формировании трехмерной пористой структуры в присутствии гетерофазы замороженного растворителя - как правило, воды. Получают данным методом один из более доступных гидрогелей – криогель поливинилового спирта. Этот полимер обладает высокой биосовместимостью и уже несколько десятилетий применяется в медицине, в основном как кровезаменитель [18].

Основным достоинством макропористых гидрогелей являются свойства, обусловленные содержанием в них системы пор, которая занимает основной объем (90-95%):

- они способны сорбировать и удерживать большие объемы жидкости (при этом скорость сорбции в десятки раз выше, чем в обычных гелях);
- на них, практически, не влияют внешние условия (а именно, они резко не изменяют свой объем под влиянием внешних условий);

- улучшенная эластичность и механическая прочность в сравнении с другими гелями [19].

Внедрение полимерных гидрогелей в производство фармакологических препаратов позволило создать новые лекарственные формы и терапевтические системы на основе природных и синтетических полимеров.

Сегодня полимерные гидрогели – наиболее универсальные и перспективные материалы для использования в ряде различных областей медицинской науки и новый пласт в инновационной и фундаментальной медицине. Это нововведение позволит лечить пациентов, страдающих заболеваниями, с которыми современная медицина не справляется [20].

### 1.1.3 Хитозан

Наиболее распространенным полисахаридом с улучшенными физико-химическими свойствами является хитозан, который получают из хитина, содержащегося в скелетах насекомых и раковинах ракообразных. Хитин и некоторые его производные достаточно широко используются, а иногда и в комплексе с другими различными природными материалами. Хитозан – аминополисахарид 2-амино-2-дезокси- $\beta$ -D-глюкана, образующийся при деацетилировании хитина. Хитозан выделяется своими свойствами, такими как, биосовместимость, биоадгезивность, нетоксичность, биоразлагаемость и биоактивность. Но есть одно более перспективное свойство хитозана – способность образовывать пористые структуры, которые используют при трансплантации клеток и регенерации тканей. Такие структуры получают посредством замораживания и лиофильной сушки. Размер пор можно регулировать за счет скорости высушивания, а направление пор – за счет температурных градиентов. При медленном замораживании получаются поры большего размера [21, 22].

Хитозан является хорошим носителем для реконструкции тканей. Он, будучи поликатионом, прикрепляется к тканям, имеющим отрицательный заряд на поверхности, естественным образом. Это объясняет то, как хитозан задерживался в месте повреждения сустава, несмотря на подвижность последнего. Ко всему, биологическое разрушение хитозана можно контролировать количеством остаточных ацетильных групп [23].

Среди недостатков хитозана выделяют их хрупкость и способность изменять структуру при стерилизации разными методами. Поэтому изделия добавляют как дополнительные компоненты в матрицы, а хрупкость снижают за счет пластификаторов [24].

Лекарственные препараты на основе хитозана проявляют защитное действие на бактериальные инфекции. Также полимеры на основе хитозана способны ингибировать вирусные инфекции в клетках эукариот и предотвращать развитие инфекции в культуре. Выявлена такая способность для повышения резистентности животных, как иммуномодуляторная, обнаружено адаптогенное действие на организм человека при нагрузках [25].

Помимо хитозана интерес к себе привлекают его аналоги. Например, полученный триметилхитозанхлорид усиливает транспорт лекарственных препаратов через эпителий. Из алкилированного хитозана получают мембранные селективной проницаемостью для лекарственных препаратов. А для получения лекарственных агентов пролонгированного действия синтезируют конъюгаты антибиотиков с хитозаном [26].

#### **1.1.4 Полигидроксиалcanoаты**

К биоразлагаемым полимерам природного происхождения относятся полигидроксиалcanoаты (ПГА), среди которых выделяют поли-3-оксимасляную (поли-3-оксибутират), поли-4-оксимасляную, поли-3-

оксивалериановую кислоты, поли-3-оксигексаноат, их сополимеры и некоторые другие [27].

Наиболее распространенными считаются гомогенный поли-3-гидроксибутират (ПЗГБ) и поли-3-гидроксибутират-ко-3-гидроксивалерат. В природе эти биополимеры появились в процессе эволюции, как запасные полимеры. Первым был обнаружен ПЗГБ в 1920-х годах, но активно изучаться и использоваться стал он только в конце 1950-х. В биомедицине впервые использовали его в 1962 году, когда была предложена идея биоразлагаемых хирургических нитей и пленок. После этого ПЗГБ снова стали использовать только через 20 лет, когда начали получать из него таблетки для длительного высвобождения препаратов. На данный момент зарегистрировано большое количество изделий из ПЗГБ, включая имплантаты для костей, анастомозные трубочки и разделительные пленки [28].

Основными свойствами ПЗГБ считаются биосовместимость и биоразложение без образования токсинов. Продуктами его разложения являются углекислый газ и вода, отсюда и нетоксичность. Главным отличием от природных полимеров (хитозан, коллаген, альгинат и др.) и химически созданных полимеров является то, что ПЗГБ синтезируют биотехнологическим способом, и благодаря этому можно задавать и контролировать физико-химические свойства этих полимеров [29].

ПЗГБ и его сополимеры имеют собственную биологическую активность, благодаря которой они могут активировать клетки иммунной системы при имплантации, вызывая выделение противовоспалительных цитокинов. ПЗГБ один из широкораспространенных компонентов клеточных мембран животных, поэтому в крови человека присутствует достаточное количество низкомолекулярного ПЗГБ. Учитывая предыдущий факт и то, что продукт деградации ПЗГБ – это 3-оксимасляная кислота, являющаяся

метаболитом всех высших организмов, можно смело говорить о нетоксичности ПЗГБ.

Многообещающими материалами для инженерии являются полимерные микроструктурированные пленки, в которых размер пор соответствует размеру клеток. Поэтому, стало возможным, меняя размер пор, контролировать и регулировать рост клеток на таких структурах. Также перспективным ПЗГБ является для систем доставки лекарств (СДЛ). Он обладает высокой биосовместимостью и физико-химическими характеристиками, подходящими для этих целей [30].

### 1.1.5 Альгинаты

Альгинат является природным линейным полисахаридом, который получают либо из морских водорослей, либо в процессе биотехнологической ферментации [31]. Относится он к семейству неразветвленных двойных сополимеров и состоит из остатков  $\beta$ -D-маннуревой кислоты и  $\alpha$ -L-гулуроновой кислоты, которые соединены между собой 1 $\rightarrow$ 4 глюкозидными связями. Добавляя к альгинатам двухвалентные катионы, они образуют нерастворимый гидрогель. Гелеобразование регулируется ионными взаимодействиями, поэтому оно полностью обратимо при хелатировании двухвалентного катиона, используемого для получения геля [32].

Альгинатные гидрогели нетоксичны, вызывают минимальный воспалительный ответ организма и просты в обращении, а также относятся к биосовместимым и биодеградируемым материалам и относительно недороги в стоимости. Как и у других гидрогелей, механической жесткости альгинатов достаточно для выполнения поставленной перед ними задачи. Благодаря своим свойствам альгинаты стали широко применять в качестве загустителей и стабилизаторов в медицине и фармации [33].

Разнообразные органические и неорганические вещества, содержащиеся в водорослях, используют в медицине. Например, полифенолы, аскорбиновая кислота, терпены и др. являются соединениями, проявляющими высокую антиоксидантную активность [34].

В клеточной и тканевой инженерии альгинат используют в качестве матриков для культивирования и депонирования клеток. Из них делают также капсулы для пересадки клеток поджелудочной железы.

В медицине данный материал находит применение при имплантации, при обработке различных ран, при регенерации тканей, а также как гемостатический агент и стимулятор иммунной системы против инфекций вирусной и бактериальной природы [35].

## **1.2 Использование клеточных культур в медицинском биоматериаловедении**

Клеточные культуры в настоящее время востребованы практически во всех областях. Их используют для выяснения механизмов дифференцировки и пролиферации, взаимодействия клеток со средой, адаптации, старения, биологической активности и т.д. Уже с 80-х годов начали минимизировать количество подопытных животных для изучения токсичности различных препаратов и изделий, заменяя их альтернативными биологическими моделями. Одной из таких моделей стали культуры клеток. Основным превосходством культивируемых клеток считают возможность прижизненного наблюдения за ними в течение всего исследования [36].

Первый этап изучения любого вещества, независимо от дальнейшей цели использования, представляет собой оценку его токсичности. Методы оценки токсичности с использованием культур клеток в альтернативу тестам на животных нашли широкое применение в химико-токсикологических исследованиях. Эти методы решили не только этическую проблему

использования животных для эксперимента, но и удешевили и ускорили сроки исследования новых материалов на стадии их доклинического испытания.

Под цитотоксичностью подразумеваю появление патологических изменений в клетках при действии химических, физических и биологических агентов. От силы и мишени можно ожидать с одной стороны цитостатический эффект, который нарушает прохождение клетки по клеточному циклу, с другой - цитоцидный эффект, ведущий к гибели клетки. Рассматривая гибель клетки как конечный этап цитотоксического действия агентов, под цитотоксичностью стоит понимать разнообразные нарушения, имеющие на одной стороне запуск апоптоза, а на противоположной – включение процессов некроза [37].

В результате деградации биоразрушающий полимер всегда высвобождает низкомолекулярные соединения во внешнюю среду. И если эти соединения смогут провзаимодействовать с клеткой или войти в нее, то нормальное состояние клетки будет нарушено из-за чужеродного вмешательства. В таком случае, если нарушение будет достаточным для вызова необратимых повреждений клетки, то можно говорить о том, что материал обладает цитотоксичностью.

Самое большое отличие биоразрушающего и небиоразрушающего полимера с точки зрения цитотоксичности является высвобождение биоразрушающим полимером низкомолекулярных соединений. В то время как в небиоразрушающем материале загрязняющие вещества возможно уменьшить до минимальных количеств, соответствующих нормам, при правильной очистке.

Крупный вклад в цитотоксикулогию внес шведский ученый, цитолог Bjorn Ekwall, сформулировав в 1983 году концепцию «базовой цитотоксичности». Для подтверждения своей теории он создал проект Multicentre Evaluation of In Vitro Cytotoxicity Programm [38].

В ходе этого проекта Bjorn выделил 3 типа токсичности:

- 1) Базовая цитотоксичность – характеризуется неблагоприятным воздействием веществ на структуру и функции клеток, которые необходимы для выживания клеток, деления, репликации ДНК и т.д. Эта цитотоксичность характеризуется одинаковой чувствительностью на действие вещества любым типом клеток.
- 2) Органоспецифическая цитотоксичность – влияние на структуры и функции, специфические для определенных клеток.
- 3) Внеклеточная токсичность – может проявляться, если вещества не влияют на саму клетку, но их действие критично организму.

Токсикологический процесс состоит из этапов, начинающихся с воздействия на организм агента, после следуют клеточные и молекулярные воздействия и в итоге проявляется ответная реакция организма.

Для исследования цитотоксичности используют тесты [39]:

- анализ на цитотоксичность с использованием теста МТТ. В основе метода МТТ лежит способность живых клеток восстанавливать желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (МТТ) в пурпурносиние внутриклеточные кристаллы МТТ-формазана, растворимые в ДМСО. МТТ – это краситель, который приобретает синюю окраску под воздействием ферментов митохондрий. Такую реакцию могут осуществлять только клетки с живыми митохондриями, поэтому интенсивность окраски связана со степенью поврежденности митохондрий. Тест используют для обнаружения цитотоксических соединений и для агентов, для которых митохондрии специфические мишени.

- основа опытов на цитотоксичность – определение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Фермент локализуется в цитоплазме живых клеток и выделяется в среду через мембранные мертвых или умирающих клеток, нарушенные воздействием токсинов. Измеряя ЛДГ, необходимо извлечь небольшое количество среды в разные промежутки времени.

- также проводят тесты: определение количества жизнеспособных клеток при помощи окрашивания их цитоплазмы трипановым синим (живые клетки не прокрашиваются); определение количества общего белка в качестве показателя прироста клеточной массы; оценка активности лизосом и интенсивности процессов мембранныго переноса по поглощению красителя нейтрального красного; определение нарушения регуляции pH среды; оценка нарушения процессов метаболизма; определение содержания АТФ в клетках и среде; оценка морфологических изменений клеток.

### **1.3 Оценка материалов при контакте с культурой эукариот**

При контакте клеток с материалом их судьба зависит от суммарного воздействия, состоящего из прямого взаимодействия клеток с искусственной поверхностью и секреторную активность многоклеточной системы. Реакция клетки на материал определяется топографией поверхности, химическим составом, скоростью деградации и механическими свойствами имплантата.

Методы исследования с использованием клеточных культур определяют точное количество клеток, которые выживают при прямом контакте с тестируемым материалом, в сравнении с контрольным. Они определяют лизис клеток, замедление роста, и другие виды воздействия материала на клетки. Обычно в тестах с биоматериалами используют линейные культуры фибробластов или клетки крови человека.

Клеточные линии фибробластов обычно используют для оценки совместимости биоматериалов *in vitro*, так как они устойчивы к небольшим изменениям при культивировании. Например, одной из часто используемых культур являются мышиные фибробlastы NIH3T3.

Пригодность полимерных пленок из полигидроксибутирата для культивирования эукариотических клеток была показана в 90-х годах Korsatko-Wabnegg на примере фибробластов мыши. При длительном

культивировании негативного воздействия обнаружено не было. Позже исследование проводили в Институте биофизики СО РАН и НИИ трансплантологии и искусственных органов. Культивировали фибробласты мыши линии NIH 3T3 на полимерные пленки. Фибробласты сохранили свою морфологию, характерную для нормальных клеток. Оценка жизнеспособности показала сохранение высокой жизнеспособности клеток.

#### **1.4 Антибактериальные и противогрибковые препараты**

Противогрибковые препараты, также называемые антимикотиками или фунгицидами, обладающие специфической активностью в отношении патогенных грибов, бывают как природного, так и химического происхождения.

Существует классификация таких препаратов в зависимости от их химической структуры [41]:

- 1) Полиены – природные антимикотики, оказывают как фунгистатическое действие (остановка роста грибковой клетки), так и фунгицидное (разрушение мембранны и гибель грибковой клетки). Полиены относятся к препаратам, обладающим самым широким спектром активности *in vitro*. Также они могут проявлять активность в отношении некоторых простейших – трихомонад, амеб. Но есть и организмы, которые проявляют устойчивость к полиенам – грибы-дерматомицеты и псевдоаллешерия. Примеры полиеновых препаратов: леворин, натамицин, нистатин, амфотерицин В.
- 2) Азолы – синтетические антимикотики, с преобладающим фунгистатическим эффектом. Связано это с ингибированием цитохрома Р450-зависимой  $14\alpha$  диметилазы, которая катализирует превращение ланостерола в эргостерол. Эгростерол, в свою очередь, является основным компонентом грибковой мембранны, отсюда и преимущество

фунгицидного действия. Примеры азоловых препаратов: бифоназол, вориконазол, кетоконазол.

- 3) Аллиламины – также группа синтетических антимикотиков с широким спектром противогрибковой активности. Оказывают преимущественно фунгицидное действие, которое связано с нарушением синтеза эргостерола. От азолов они отличаются тем, что блокируют более ранние стадии синтеза, путем ингибирования фермента скваленэпоксидазы, не относящегося к системе цитохрома P450. Примеры аллиламиновых препаратов: тербинафин, нафтифин.
- 4) Препараты разных групп – включают в себя препараты системного и местного применения. Примеры: аморолфин, калия йодид, леворин.

## 1.5 Органические пероксидные соединения

Химию органических пероксидов изучают уже более ста лет. Основными реагентами за этот период стали кетоны и альдегиды, так как реакция, протекающая между углеродным атомом карбонильной группы и атомом кислорода гидропероксидной группы, является простой и доступной реакцией.

Открытие органических пероксидов в медицинской химии началось с природного пероксида – аскаридола, обладающего антипаразитарным эффектом. Еще в 40-х годах осуществили первый промышленный синтез этого соединения, но оно получилось неустойчивым, и к тому же был выявлен ряд побочных эффектов, поэтому в медицине применять его отказались [42].

Наиболее известное и применяемое в медицине соединение, которое имеет в составе пероксидную группу – это артемизинин. Это вещество экстрагируют из растения *Artemisia annua* (полынь однолетняя). Его давно применяют в китайской медицине, как противомалярийное средство.

Активность артемизинина определяется присутствием в составе молекулы пероксидной группы.

В настоящее время все больше внимания направлено к органическим пероксидам. Обусловлено это их высокой биологической активностью, а именно: антимикробной и противоопухолевой. Их биологическая активность связана с окислительно-восстановительными свойствами, поэтому электрохимические методы становятся востребованными для их изучения.

Наиболее востребованными и перспективными считаются циклические соединения: тетраоксаны, озониды, триоксаны. Их можно сопоставить с природным пероксидом – артемизинином [43].

Для синтеза пероксидов при поиске новых лекарственных препаратов используются такие реагенты, как кетоны и  $H_2O_2$ . В качестве лекарственных препаратов также используют полусинтетические аналоги артемизинина, такие как дигидроартемизинин, артеметр, артесунат, и синтетический циклический органический пероксид артеролан. Но стоимость артемизинина и его аналогов высока, поэтому требуется проводить разработки по созданию противомалярийных средств, состоящих полностью из синтетического пероксида. Одним из таких исследований стала разработка лекарственных средств, которые содержат полностью синтетический пероксид артефеномел. Также существует уже разработанный препарат, в составе которого синтетический пероксид артеролан.

Синтезировать пероксиды довольно сложно из-за лабильности О-О связи и склонности пероксидных соединений к перегруппировкам. Первый селективный синтез осуществил А. Рихи в 1964 году. Он синтезировал циклический пероксид из триацетилметана и пероксида водорода с участием серной кислоты как катализатора. Но выход пероксидов в данной работе был очень низким.

Значительный прогресс в развитии фармакологических и агрохимических средств, созданных на основе органических пероксидов,

связан с соединениями, содержащими озонидную группу или, другими словами, 1,2,4-триоксолановую. Получают триоксоланы путем озонирования алkenов или озонолизом О-метилоксимов с участием кетонов (ациклических или циклических). Способы синтеза, основанные на использовании озона, имеют ряд недостатков: озон – сильный окислитель и высококоррозионное соединение, поэтому для его использования требуется специальное оборудование, также все реакции с озоном требуют проведения работ при низкой температуре. Поэтому исследователи в настоящее время пытаются синтезировать озониды без использования озона. Одной из таких успешных разработок является работа по синтезу озонидов на основе реакции между  $H_2O_2$  и 1,5-дикетонами, проводимая институтом органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН под руководством Терентьева А.О. Эта разработка является редким примером селективного синтеза озонидов без использования озона [44].

В числе новых направлений разработки пероксидов присутствует поиск веществ с противоопухолевой активностью. Связано это с открытием у некоторых природных пероксидов цитотоксического действия, направленного на раковые клетки [45].

Также пероксиды широко применяют в промышленности в качестве инициаторов радикальной полимеризации непредельных мономеров, для сшивки каучуков, фторкаучуков, полиэтилена и т.д.

## **1.6 Способы депонирования препаратов в биополимерные носители**

В наше время используется много токсичных материалов и это негативно отражается на ноосфере. Для минимизации негативного воздействия разрабатываются такие формы, которые могут доставить эти соединения в нужное место в нужной дозе. Одна из таких используемых форм – депо-форма.

Особо популярны в последние десятилетия во всем мире системы для депонирования и направленной доставки фармацевтических агентов. Целью создания таких систем является увеличение срока высвобождения препарата, то есть удлинение периода их активности, снижение общего количества используемого препарата, а также направленная их доставка, что увеличивает эффективность.

Материалы, которые используются в качестве депо агентов, также должны быть нетоксичны и биосовместимы, с хорошими физико-механическими и диффузионными свойствами. Лучше всего для таких целей подходят разрушаемые биополимерные материалы, так как по мере бiorазрушения такого матриксного материала происходит высвобождение из него активного агента.

Конструкция таких систем может быть разная: на основе микро- и наночастиц, гранул, полимерных пленок, содержащих препараты и т.д.

Криогели поливинилового спирта (КГПВС), получаемые путем замораживания, выдерживания в замороженном виде и затем оттаивания концентрированных растворов полимера, применяют в качестве депо для высвобождения агента [46]. Благодаря их пористому строению они способны и поглощать вещества в свою матрицу, и высвобождать низкомолекулярные компоненты. Криогель удобен в применении тем, что его физико-химические свойства можно регулировать либо варьированием концентраций и свойств полимера, либо за счет введения в гель разных модификаторов, а именно – наполнителей [47]. В медицинских целях используют наполнители наноразмера, чтобы КГПВС приобрел сверхделикатные свойства для дальнейшего контакта с биологическими тканями. Высвобождение агента из криогелевой массы происходит достаточно быстро и практически полностью. Исходя из этого, КГПВС являются перспективным материалом для использования в качестве депо-форм [48].

Такие системы используются как в фармакологии, разработке препаратов для людей, так и в ветеринарии и сельском хозяйстве.

В сельском хозяйстве они являются основой для депонирования ядохимикатов и удобрений с целью их адресности, а также используются в качестве носителя для создания безопасных и долговременных форм пестицидов и других агропрепаратов с целью применения в грунте.

В фармакологии особый интерес проявляют к пролонгированным лекарственным формам в виде микро- и наночастиц. Они могут вводиться в кровь как внутривенно, так и внутримышечно, возможно оральное применение или ингаляции. В основном такие системы используют в лечении затяжных заболеваний. Уже существуют пролонгированные лекарственные препараты на основе полигидроксиалканоатов (ПГА). Существуют они в виде микрочастиц с анальгетиками и противовоспалительными препаратами. В исследованиях Института биофизики Сибирского отделения РАН было показана высокая биосовместимость ПГА и их пригодность для депонирования препаратов. Также была показана возможность депонирования препаратов в носители из ПГА в таком виде как: таблетированная форма, микрочастицы и пленки.

Такая лекарственная форма как пленка с основой из биополимера выполняет в медицине несколько функций, а именно: играет роль связующего и тут же пролонгатора действия препарата. Полимерными носителями могут быть синтетические биодеградируемые полимеры (полигидроксибутират) и пленкообразующие природные полисахариды (альгинат, хитозан, крахмал). Институт биохимии им. А.Н. Баха совместно с кафедрой биоинженерии МГУ проводят исследования свойств полимеров и возможность применения поли-3-гидроксибутират (П(ЗГБ)) для депонирования препаратов. В Институте биофизики СО РАН разработали носители в виде полимерных пленок [49].

Преимуществом использования пленок в качестве носителей является продолжительность высвобождения препарата из них. Это свойство позволяет равномерно доставлять препарат, так как полимерная мембрана препятствует полному выходу препарата. Такой механизм освобождает от необходимости вводить препарат повторно, повышает эффективность его действия, снижает токсичность и побочные эффекты препаратов, дает возможность препарату локализованно воздействовать и в конечном итоге снижается стоимость лечения. Системы доставки лекарств подходят для лечения самых разных заболеваний: хронических, воспалительных, инфекционных и онкологических, а также при гормональных сбоях.

Разрабатывая и вводя в производство новые формы доставки лекарственных препаратов, можно будет снизить импорт дорогостоящих лекарств и получить дополнительные выгоды с замены импортных лекарств на отечественные. Поэтому разработка и создание таких систем доставки лекарственных препаратов является весьма перспективным направление для отечественной терапии.

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Объекты исследования

В работе использовали хлорсодержащий органический пероксид DF-70 – это 1,2,4-триоксолан с брутто-формулой  $C_{17}H_{21}O_5Cl$ , предоставленный лабораторией исследования гомолитических реакций ИОХ СО РАН под руководством Терентьева Александра Олеговича. Структурная формула пероксида представлена на рисунке 1. DF-70 представляет собой бесцветный порошок, не растворяющийся в воде, но хорошо растворяющийся в органических растворителях, таких как ДМСО, ацетонитрил и дихлорметан. Максимумы поглощения пероксида – 268 и 276,5 нм представлены на рисунке 2 (УФ область).

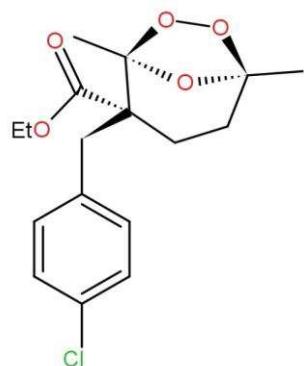


Рисунок 1 - Структурная формула 1,2,4-триоксолана DF-70

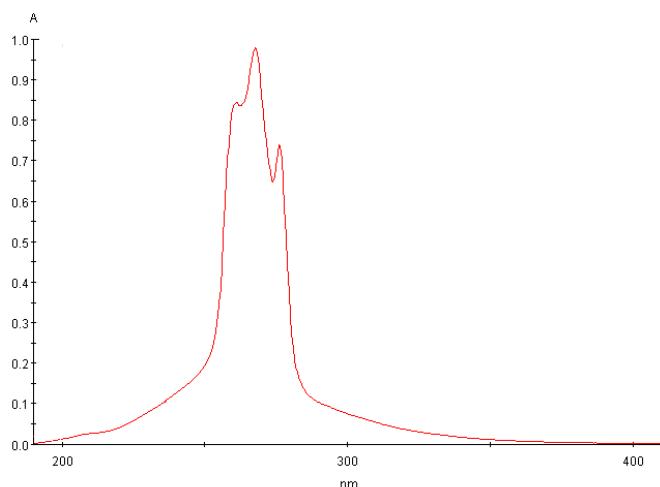


Рисунок 2 - Спектр поглощения DF-70

Также в работе использовали образцы полигидроксиалканоатов, а именно, сополимер 3-гидроксибутират с 3-гидроксивалератом: поли-3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерат ( $\text{П(ЗГБ/ЗГВ)90/10}$  мол.%). Получали образцы в стерильных условиях на фруктозе в качестве углеродного субстрата. Экстрагировали из биомассы хлороформом. Осаждение проводили гексаном, в соответствии с [50]. В таблице 1 представлена характеристика используемого вещества для изготовления пленок. Структурная формула полимера представлена на рисунке 3.

Таблица 1 – Характеристики полимера, используемого в работе

Название	Мол. масса, кДа	$T_{\text{пл}}$ , °C	Кристалличность, %
Сополимер поли-3-гидроксибутира с поли-3-гидроксивалератом П(ЗГБ/ЗГВ)90/10 мол.% $(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2/\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2)_n$	260	150	50-60

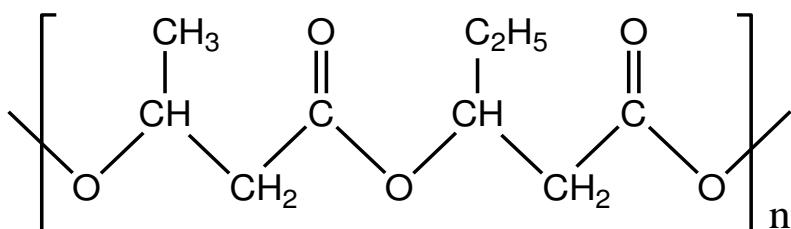


Рисунок 3 – Структурная формула полимера поли-3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерата

## 2.2 Изготовление пленочных образцов

Приготовлен раствор П(ЗГБ/ЗГВ)/90/10 2,3 мол.% в дихлорметане, в который в дальнейшем добавляли пероксид DF-70 в разных концентрациях. Соотношения компонентов в полученных образцах представлены в таблице

2. Были получены 3 раствора DF-70 с различными концентрациями и контроль, для гомогенизирования растворы нагревали в течение 15 минут на магнитной мешалке MR Hei-Standart (Heidolph, Германия) при температуре 50°C до полного растворения. После чего растворы разлили на поверхность обезжиренного стекла (чашки Петри) с высыпыванием в беспылевой камере в течение 48 часов.

Таблица 2 – Типы образцов П(ЗГБ/ЗГВ)90/10 мол.%/DF-70

Образец	П(ЗГБ-ЗГВ), мг	1,2,4-триоксолан, мкг	1,2,4-триоксолан, %
1	250	0	0
2	250	20	0,008
3	250	40	0,016
4	250	60	0,024

### 2.3 Стерилизация пленочных образцов

После полного высыхания пленочных образцов из них вырезали диски диаметром 4,8 мм для дальнейшей выкладки на культуральный 96-луночный планшет. Перед стерилизацией проверили растворимость используемого пероксида в 70% этиловом спирте, добавив 5 мкг DF-70 в 1 мл спирта. Пероксид полностью растворился за 2 минуты. Поэтому пленки стерилизовали под ультрафиолетовым излучением в ламинарном шкафу в течение 2 часов, без промывания спиртом, с учетом заранее известной высокой токсичности препарата. Затем краткосрочно промывали образцы автоклавированной дистиллированной водой.

### 2.4 Исследование высвобождения пероксида из полимерных пленок

Образцы полимерных пленок с депонированным пероксидом нарезали на диски массой 5 мг и диаметром 4,8 мм. Образцы разместили в пробирки эпендорф и залили в каждую 2 мл DMSO. Наблюдение вели в течение 168 часов (7 сут) с определением оптической плотности через 1 ч, 3 ч, 6 ч, 8 ч, 24 ч, 30 ч, 48 ч, 54 ч, 72 ч, 96 ч, 120 ч, 144 ч. Каждая точка наблюдения для отдельного образца была выполнена в 3 повторностях. Экспериментальным путем определен максимум поглощения для DF-70 – 268 нм и построен калибровочный график. Измеряли оптическую плотность и рассчитывали концентрацию вещества в DMSO .

## **2.5 Ведение клеточной культуры**

Для исследования на цитотоксичность использовали клеточную линию фибробластов мыши NIH 3T3.

В работе клетки культивировали во флаконах в гумидной атмосфере в СО<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°С. Для наращивания клеток использовали среду DMEM (Dubecco Modified Eagle Medium, Invitrogen, США), эмбриональную сыворотку теленка 10% и раствор антибиотиков 5%. После культивирования среду из флакона отобрали пипеткой в ламинарном шкафу, добавили 1 мл DMEM, слили DMEM и добавили 2 мл трипсина для снятия клеток со стенок флакона, убрали флакон на 5 минут в инкубатор. Добавили 2 мл DMEM, чтобы инактивировать трипсин. Собрали пипеткой содержимое флакона в центрифужную пробирку, центрифугировали 3 минуты при 3500 об/мин. Пробирку поместили в ламинарный шкаф. 10 мкл клеточной суспензии переместили в чашку Петри, добавили 10 мкл красителя Туран blue и перемешали. Определили с помощью камеры Горяева количество клеток.

### **2.5.1 Подсчет абсолютного количества адгезированных клеток**

Изначальное прикрепление клеток к поверхности материала и последующая пролиферация клеток на нем показывает количественные данные о его свойствах, которые в дальнейшем можно использовать для оценки цитотоксичности.

6 образцов каждой полимерной пленки помещали в 96-луночный планшет матовой поверхностью вверх. На каждый образец полимерной пленки посеяли  $5 \times 10^4$  клеток. Культивировали при 37°C в среде DMEM, добавив пенициллин-стрептомицин 5% и эмбриональную сыворотку теленка 10%. Контролем выбраны лунки с чистым полимером без добавок пероксида. На него сеяли такое количество клеток, как и на исследуемые образцы. Через 3 суток клетки с поверхности пленок снимали раствором трипсина 0,25%, отбрав изначально культуральную среду из лунки. Трипсин инактивировали средой DMEM, поместив перед этим планшет на 5 минут в инкубатор. Клетки снимали с пленок средой и центрифугировали 5 минут при 3000 об/мин, отбирали супернатант, клеточный осадок ресуспендировали. Брали 10 мкл клеточной суспензии и добавляли равный объем красителя Trypan blue. После в камере Горяева считали количество клеток в пяти больших квадратах по диагонали (рисунок 4). Количество клеток определяли по формуле:

$$X = Nx0,05x10^6x2,$$

где X – концентрация клеток (млн/мл),

N – количество клеток в пяти больших квадратах.

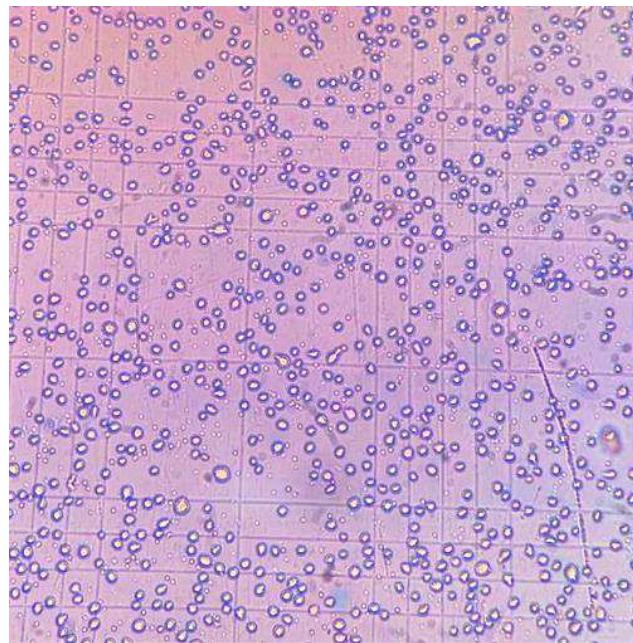


Рисунок 4 – Фибробласты мыши NIH 3T3 при подсчете в камере Горяева

### 2.5.2 МТТ-тест

Для проведения МТТ-теста на 1 и 3 сутки из лунок удалили культуральную среду и промывали клетки свежей порцией среды DMEM с 10% эмбриональной сывороткой теленка. В лунки вносили 200 мкл раствора МТТ (BioChemica, AppliChem) в среде DMEM с 10% эмбриональной сывороткой теленка (конечная концентрация МТТ 0,25 мг/мл). Клетки инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе 4 часа. После завершения инкубации среду удаляли, в лунки вносили 150 мкл DMSO (Sigma-Aldrich (Merck), США). Аликовты по 100 мкл переносили в чистые планшеты и определяли оптическую плотность при  $\lambda=550$  нм на многоканальном ридере 680 (Bio-Rad, США). В качестве холостой пробы использовали полимерные подложки, которые без внесения клеток инкубировали в полной среде DMEM с 10% эмбриональной сывороткой теленка.

### 2.6 Статистическая обработка результатов

Статистический анализ результатов проводился обычными методами с использованием программного пакета Microsoft Excel. Статистическую значимость результатов определяли с использованием критерия Стьюдента (уровень значимости:  $P \leq 0,05$ ).

### **3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

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

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Отработана технология получения пленочных образцов методом отлива плотных растворов ПГА на обезжиренную поверхность. Получены ПГА-пленки, содержащие 0,008%; 0,016%; 0,024% DF-70.
2. Образцы депо-форм получаются при соединении раствора П(3ГБ/3ГВ) в дихлорметане с DF-70 в сухом виде, с концентрациями: П(3ГБ/3ГВ) – 2,3% и DF-70<sub>(1)</sub> –  $1,8 \times 10^{-4}\%$ , DF-70<sub>(2)</sub> –  $3,7 \times 10^{-4}\%$ , DF-70<sub>(3)</sub> –  $5,5 \times 10^{-4}\%$ ; для получения гомогенных растворов обоих компонентов была использована магнитная мешалка MR Hei-Standart (Heidolph, Германия) с подогревом реакционного сосуда в течение 15 минут.
3. При исследовании характеристик поверхности П(3ГБ/3ГВ)/DF-70 установлено, что включение в состав пленки из ПГА DF-70 изменяет гидрофобность/гидрофильность пленки: контактный угол смачивания П(3ГБ/3ГВ)90/10 мол.% составляет  $62,3 \pm 1,56^\circ$ , а П(3ГБ/3ГВ)/DF-70 от  $78,0 \pm 1,54^\circ$  до  $92,5 \pm 1,49^\circ$ .
4. Толщина пленочных образцов составила: П(3ГБ/3ГВ)/90/10 мол.% –  $22 \pm 2$ ; П(3ГБ/3ГВ)/DF-70 0,008% –  $33 \pm 2$ ; П(3ГБ/3ГВ)/DF-70 0,016% –  $29 \pm 2$ ; П(3ГБ/3ГВ)/DF-70 0,024% –  $26 \pm 2$ .
5. Установлено, что DF-70 полностью выходит из пленок ПГА с концентрацией DF-70 0,008%; 0,016%; 0,024% в течение 4 суток при постепенном высвобождении, начиная с первого часа.
6. Проведенная *in vitro* оценка цитотоксичности на примере фибробластов мыши линии NIH 3T3 показала высокий уровень цитотоксичности у депо-пленок П(3ГБ/3ГВ)/DF-70 с различными концентрациями DF-70. Полученные данные позволяют планировать эксперименты по оценке фунгицидного эффекта DF-70 *in vitro*.

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- ДХМ – дихлоретан,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$
- КГПВС – криогель поливинилового спирта
- П(ЗГБ) – поли-3-гидроксибутират
- П(ЗГБ/ЗГВ) – поли-3-гидроксибутират-ко-3-гидроксивалерат
- ПГА - полигидроксиалканоаты
- СДЛ – система доставки лекарств
- $\text{CO}_2$  – двуокись углерода (углекислый газ)
- DF-70 – новое соединение из класса 1,2,4-триоксоланов
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMSO – Dimethyl sulfoxide (диметилсульфоксид)
- MTT - бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия
- NIH 3T3 – линия фибробластов мыши, адгезионная культура

## **СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ**

1. Викнянщук, А.Н. Подходы к тестированию биоматериалов с позиции современной парадигмы биосовместимости / А.Н. Викнянщук, А.И. Мишанин, С.И. Твердохлебов, А.С. Головкин // Трансляционная медицина. – 2017. – №4 (1). – С. 29–40.
2. Готье, С.В., Органное донорство и трансплантация в Российской Федерации в 2015 г. IV сообщение регистра Российского трансплантологического сообщества / С.В. Готье, Я.Г. Мойсяк, С.М. Хомяков, О.С. Ибрагимова // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2016. – №14 (3). – С. 6–18.
3. Pittenger, M. F. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells/ M.F. Pittenger // Science. — 1999. — vol. 284. — P. 143–147.
4. 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.
5. 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.
6. Николаева, Е.Д. Биополимеры для клеточной и тканевой инженерии / Е.Д. Николаева // Журнал Сибирского федерального университета. – 2014. – Т.7, №2. – С. 222–223.
7. Немец, Е.А. Биостабильность и цитотоксичность медицинских изделий на основе сшитых биополимеров / Е.А. Немец, А.П. Панкина, В.А. Сургученко, В.И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2018. – Т.20, №1. – С. 79–85.

8. Мустафин, Р.И. Роль межмакромолекулярных взаимодействий полимеров фармацевтического назначения в функционировании пероральных систем доставки лекарств / Р.И. Мустафин // Российский химический журнал. – 2012. – Т.56, №3. – С. 97–101.
9. Маланин, Д. А. Восстановление повреждений хряща в коленном суставе: монография / Д. А. Маланин, В. Б. Писарев, В. В. Новочадов. – Волгоград: Волгоградское научное издательство, 2010. – 454 с.
10. Роговина, С.З. Биоразлагаемые полимерные композиции на основе синтетических и природных полимеров различных классов / С.З. Роговина // Высокомолекулярные соединения. Серия С. – 2016. – Т.58, №1. – С. 68–80.
11. Агапова, О.И. Биоинженерные конструкции на основе фибропина шелка и спидроина для регенеративной медицины и тканевой инженерии / О.И. Агапова // Современные технологии в медицине. – 2017. – Т.9, №2. – С. 190–206.
12. Гомзяк, В.И. Биоразлагаемые полимерные материалы для медицины: от импланта к органу / В.И. Гомзяк, В.А. Демина, Е.В. Разуваева, Н.Г. Седущ, С.Н. Чвалун // Тонкие химические технологии. – 2017. – Т.12, №5. – С. 5–20.
13. Хапчаев, Ш.Ю. Цитотоксическая активность вискумина, инкапсулированного в полилактидную матрицу с помощью сверхкритического диоксида углерода / Ш.Ю. Хапчаев, И.И. Агапов, М.М. Мойсенович, А.А. Рамонова, С.Э. Богородский, И.С. Мусаэлян, В.К. Попов // Биотехнология. – 2008. – №5. – С. 43–49.
14. Штильман, М.И. Биодеградация полимеров / М.И. Штильман // Журнал Сибирского федерального университета. – 2015. – Т.8, №2. – С. 113–130.

15. Алексеенко, К.В. Разработка методов исследования характеристик полупродуктов и конечных веществ при синтезе лактидов и гликолидов / К.В. Алексеенко, О.В. Бабкина, В.А. Светличный, Т.И. Изак, Д.В. Новиков, В.Т. Новиков // Вестник Томского государственного университета. – 2013. – №368. – С. 200–203.
16. Зозулина, В.А. Новые материалы для медицины и биотехнологии на основе пористых полимерных гидрогелей / В.А. Зозулина, А.Н. Корнеева // Химия, физика и механика материалов. – 2018. – №3 (18). – С. 46–55.
17. Голунова, А.С. Пористые полимерные гидрогели на основе поливинилового спирта и его производных, содержащих заряженные группы / А.С. Голунова, А.А. Артюхов, А.П. Фомина, М.И. Штильман // Успехи в химии и химической технологии. – 2010. – Т.24, №4 (109). – С. 23–32.
18. Фомина, А.П. Биодеградируемые полимерные гидрогели на основе производных крахмала и поливинилового спирта / А.П. Фомина, Д.Е. Лесовой, А.А. Артюхов, М.И. Штильмов // Успехи в химии и химической технологии. – 2011. – Т.25, №3 (119). – С. 83–87.
19. Мавлянов, М.В. Получение гидрогелей на основе сшитых полимеров акрил- и метакриламида и их свойства / М.В. Мавлянов, У.К. Абдурахманова, Ф.М. Туракулов, В.М. Ибрагимов // Велес. – 2016. – №6-1 (36). – С. 38–40.
20. Легонькова, О.А. Полимеры в лечении ран: реалии и горизонты / О.А. Легонькова, М.С. Белова, Л.Ю. Асанова, А.Д. Алиев, А.Е. Чалых // Раны и раневые инфекции. – 2016. – Т.3, №1. – С. 12–18.
21. Глазачева, Е.Н. Получение и исследование пленочных материалов на основе полигидроксибутирата и хитозана для биомедицинских применений / Е.Н. Глазачева, Е.М. Дорофеева, М.В.

Успенская // Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института. – 2019. – №50 (76). – С. 52–57.

22. Севостьянов, М.А. Кинетика высвобождения антибиотиков из биодеградируемых биополимерных мембран на основе хитозана / М.А. Севостьянов, А.Ю. Федотов, Е.О. Насакина, А.Ю. Тетерина, А.С. Баикин, К.В. Сергиенко, А.Г. Колмаков, В.С. Комлев, В.Е. Иванов, О.Э. Карп, С.В. Гудков, С.М. Баринов // Доклады Академии наук. – 2015. – Т.465, №2. – 194 с.

23. Волоскова, Е.В. Свойства композитных материалов на основе хитозана и гидроксиапатита / Е.В. Волоскова, В.А. Полубояров, Ф.К. Горбунов, Е.И. Акопова // Химия в интересах научного развития. – 2015. – Т.23, №5. – С. 607–611.

24. Волова, Т.Г. Современные биоматериалы: мировые тренды, место и роль микробных полигидроксиалканоатов / Т.Г. Волова // Журнал Сибирского федерального университета. – 2014. – Т.7, №2. – С. 103–133

25. Мезина, Е.А. Хитозан-волокнистые матрицы для пролонгированного выделения лекарственного препарата лидокаина / Е.А. Мезина, Л.И. Макарова, И.М. Липатова // Известия высших учебных заведений. Серия: химия и химическая технология. – 2013. – Т.56, №12. – С. 110–114.

26. Сливкин, Д.А. Хитозан для фармации и медицины / Д.А. Сливкин, В.Л. Лапенко, О.А. Сафонова, С.Н. Суслина, А.С. Беленова // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: химия. Биология. – 2011. – №2. – С. 214–232.

27. Бонарцев, А.П. Применение полиоксиалканоатов в медицине и биологическая активность природного поли-3-оксибутират / А.П. Бонарцев, Г.А. Бонарцева, И.В. Решетов, К.В.

Шайтан, М.П. Кирпичников // Acta naturae. – 2019. – Т.11, №2 (41). – С. 4–16.

28. Севастьянов, В.И. Биодеградируемый биополимерный материал эластопоб для клеточной трансплантации / В.И. Севастьянов, В.А. Егорова, Е.А. Немец, Н.В. Перова, Н.А. Онищенко // Перспективные материалы. – 2004. – №3. – С. 35–41.

29. Жаркова, И.И. Биосовместимость матриков для тканевой инженерии из поли-3-оксибутират и его композитов, полученных методом электроформования / И.И. Жаркова, О.В. Староверова, В.В. Воинова, Н.В. Андреева, А.М. Шушкевич, Е.Д. Склянчук, Г.М. Кузьмичева, А.Е. Беспалова, Е.А. Акулина, К.В. Шайтан, А.А. Ольхов // Биомедицинская химия. – 2014. – Т.60, №5. – С. 553–560.

30. Воинова, В.В. Рост мезенхимальных стволовых клеток на структурированных пленках биосинтетического поли-3-оксибутирата / В.В. Воинова, Е.А. Акулина, А.А. Дудун, И.И. Жаркова, К.А. Меньших, А.П. Бонарцев, Д.В. Чеснокова, Т.К. Махина, Г.А. Бонарцева, И.Г. Чишанков, Т.М. Жданко, В.И. Куликовская, В.Е. Агабеков // Биологический журнал. – 2019. – №8 (8). – С. 4–9.

31. Семенова, Е.В. К вопросу об использовании альгинатов из бурых водорослей в медицине и фармации / Е.В. Семенова, В.В. Чеботок, И.В. Борисовская // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – №6. – 186 с.

32. Липатова, И.М. Функционализация синтетических волокнистых материалов с использованием наноразмерных полимерных носителей / И.М. Липатова, А.П. Морыганов // Российский химический журнал. – 2015. – Т.59, №3. – С. 60–67.

33. Соколан, Н.И. Исследование возможности получения альгината натрия из продукта переработки фукусовых водорослей / Н.И. Соколан, Л.К. Куранова, Н.Г. Воронько, В.А. Гроховский //

Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2018. – Т.80, №1 (75). – С. 161–167.

34. Макарова, Е.Л. Использование альгинатов в медицине для создания иммобилизованных ферментных препаратов / Е.Л. Макарова, И.В. Петракова // Заметки ученого. – 2017. – №9 (25). – С. 64–66.

35. Баранов, О.В. Композиционные гидрогели на основе альгината натрия и фосфата кальция, содержащие лекарственные средства / О.В. Баранов // Физико-химия и технология неорганических материалов. – 2017. – С. 265–266.

36. Горбунова, Е.М. Метод проверки на цитотоксичность полимерных материалов медицинского назначения *in vitro* / Е.М. Горбунова, Е.Н. Шульгина, Л.Р. Люсова, К.И. Колмычкова, Г.Ю. Косовский, Е.В. Косовская // Инновации в науке. – 2013. – №25. – С. 22–29.

37. Романова, М.А. Изучение цитотоксичности биологически активных соединений на культуре клеток / М.А. Романова, А.Ш. Додонова // Молодой ученый. – 2016. – №18 (122). – С. 110–113.

38. Ekwall B. Correlation between cytotoxicity *in vitro* and LD50 values / B. Ekwall // Acta Pharmacologica Toxicologica. — 1983. — V. 52, S. II. — P. 80–99.

39. Дмитруха, Н.М. Применение метода культуры клеток в токсикологическом эксперименте / Н.М. Дмитруха, Т.К. Короленко, М.Л. Марченко // Современные проблемы биоэтики. – 2009. – С. 165–171.

40. Хлусов, И.А. Молекулярные механизмы реакции стромальных стволовых клеток и мононуклеарных лейкоцитов крови на кратковременный контакт с искусственными материалами / И.А. Хлусов, К.А. Нечаев, М.В. Дворниченко // Вестник науки Сибири. – 2012. – №1 (2). – С. 321–326.

41. Яковлев, В.П. Рациональная антимикробная фармакотерапия: учебное пособие / В.П. Яковлев, С.В. Яковлев, И.А. Александрова, О.Р. Асцатурова, В.Б. Белобородов, Б.С. Белов, Л.А. Блатун, А.О. Буеверов. – Москва : Литтерра, 2003. С. 188–193.
42. Виликотский, А.Е. Синтез стабильных циклических пероксидов из трикетонов и пероксида водорода / А.Е. Виликотский, Ю.Ю. Белякова, П.С. Радулов, И.А. Яременко, А.О. Терентьев // Успехи в химии и химической технологии. – 2018. – Т.32, №5. – С. 23–25.
43. Веденяпина, М.Д. Электрохимическое поведение мостикового 1,2,4,5-тетраоксана / М.Д. Веденяпина, А.П. Симакова, Д.А. Борисов, А.О. Терентьев, А.М. Скундин, А.А. Веденяпин // Конденсированные среды и межфазные границы. – 2012. – Т.14, №3. – С. 297–305.
44. Яременко, И.А. Противораковые, противомалярийные соединения и средства защиты растений на основе циклических пероксидов / И.А. Яременко, П.С. Радулов, Ю.Ю. Белякова, А.А. Демина, F. Fleury, А.О. Терентьев // Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии. – 2019. – 118 с.
45. Яременко, И.А. Синтез и биологическая активность мостиковых 1,2,4,5-тетраоксанов / И.А. Яременко, Д.А. Борисов, А.О. Терентьев // Успехи в химии и химической технологии. – 2009. – Т.23, №6 (99). – С. 75–78.
46. Колесникова, Е.С. Криогели поливинилового спирта, содержащие добавки биологически активных веществ / Е.С. Колесникова, О.Ю. Колосова, В.И. Лозинский // Успехи в химии и химической технологии. – 2017. – Т.31, №12. – С. 21–23.
47. Ражева, Т.В. Свойства композитных криогелей поливинилового спирта, наполненных нановолокнами бактериальной

целлюлозы / Т.В. Ражева, Н.А. Степанов, Е.А. Подорожко, Е.Н. Ефременко, В.И. Лозинский // Успехи в химии и химической технологии. – 2018. – Т.32, №6. – С. 147–149.

48. Карелина, П.А. Влияние добавок глицина на физико-химические свойства криогелей поливинилового спирта / П.А. Карелина, О.Ю. Колосова, В.И. Лозинский // Успехи в химии и химической технологии. – 2018. – Т.32, №5. – С. 38–40.

49. Бровко, О.С. Перспективы получения новых пленочных материалов биомедицинского назначения на основе интерполимерного комплекса альгинат-хитозан / О.С. Бровко, И.А. Паламарчук, Н.А. Вальчук, Т.А. Бойцова, К.Г. Боголицын // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2018. - №3 (2). – С. 45–49.

50. Volova T. Synthesis of Polyhydroxyalkanoates by Hydrogen-Oxidizing Bacteria in a Pilot Production Process / T. Volova, E. Kiselev, N. Zhila, E. Shishatskaya // Biomacromolecules. – 2019. – P. 3261–3270.

51. Белякова, Ю.Ю. Синтез озонидов из 1,5-дикетонов и пероксида водорода / Ю.Ю. Белякова, А.Е. Виликотский, П.С. Радулов, И.А. Яременко, А.О. Терентьев // Успехи в химии и химической технологии. – 2017. – Т.31, №12. – С. 6–8.

52. Дядищев, Н.Р., Рыбалкин С.П., Марченко А.И. Биологические модели *in vitro* в токсикологии // Тез. докл. I съезда токсикологов России. – 1998. – 328 с.

53. Севастьянов, В.И. Биосовместимые материалы: учебное пособие / В.И. Севастьянов. – Москва : Медицинское информационное агентство, 2011. – 544 с.

54. Волова, Т.Г. Полиоксиалканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины: науч. изд. / Т.Г. Волова, В.И. Севастьянов, Е.И. Шишацкая. – Новосибирск : СО РАН, 2003. – 332 с.

55. Дудун, А.А. Высокомолекулярный бактериальный альгинат: биосинтез и физико-химические свойства / А.А. Дудун, Л.А. Акулина, А.П. Бонарцев, Г.А. Бонарцева. – Москва : ИБХ РАН, 2019. – 113 с.

56. Бонарцев, А.П. Поли-3-оксибутират и биополимерные системы на его основе / А.П. Бонарцев, Г.А. Бонарцева, К.В.Шайтан, М.П. Кирпичников // Биомедицинская химия. – 2011. – Т.57, №4. – С. 374–391.

57. Горева, А.В. Характеристика полимерных микрочастиц на основе резорбируемых полиэфиров оксиалкановых кислот в качестве платформы для депонирования и доставки препаратов / А.В. Горева, Е.И. Шишацкая, Т.Г. Волова, Э.Дж. Сински // Высокомолекулярные соединения. – 2012. - №54 (2). – 224 с.

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

Елена Е. И. Шишацкая

« 3 » июля 2020 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология

**ОЦЕНКА БИОСОВМЕСТИМОСТИ МЕДИЦИНСКИХ МАТЕРИАЛОВ В  
КУЛЬТУРАХ ЭУКАРИОТ**

Научный руководитель

Елена

профессор, д.б.н. Е.И. Шишацкая

подпись, дата

Выпускник

В.П.Григорьева

В.И. Григорьева

Красноярск 2020