

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
\_\_\_\_\_ Т. Г. Волова

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2020 г.

## БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Культивирование фибробластов на полимерных матрицах из ПГА разного  
химического состава

Руководитель

\_\_\_\_\_

подпись

доцент, к.б.н.

должность, учёная степень

А.А. Шумилова

инициалы, фамилия

Выпускник

\_\_\_\_\_

подпись

Н.А. Токмина

инициалы, фамилия

Красноярск 2020

## Содержание

Введение .....	4
1. Обзор литературы.....	6
1.1 Клеточные технологии в тканевой инженерии .....	6
1.2 Биополимеры в качестве носителя культивируемых клеток.....	8
1.3 ПГА в качестве клеточных носителей .....	12
2 Материалы и методы.....	18
2.1 Объекты исследования .....	18
2.2 Методы исследования.....	19
2.2.1 Изготовление клеточных матриксов.....	19
2.2.2 Исследование поверхностных характеристик .....	19
2.2.3 Исследование физико-механических свойств .....	21
2.2.4 Культивирование клеток на матрицах из ПГА .....	21
2.2.5 Оценка жизнеспособности фибробластов.....	22
2.2.6 Окрашивание флуоресцентным красителем DAPI.....	23
2.2.7 Статистический анализ данных.....	24
3. Результаты.....	25
3.1 Характеристика полученных клеточных матриксов из ПГА .....	25
3.2 Свойства поверхностей изделий из ПГА.....	26
3.3 Физико-механические свойства клеточных матриксов из ПГА .....	29
3.4 Исследование жизнеспособности фибробластов на клеточных матрицах .....	30

3.5 Окрашивание флуоресцентными красителями.....	32
Выводы .....	34
Список литературы: .....	35

## **Введение**

Тканевая инженерия, является одним из основных путей развития регенеративной медицины, целью которой является разработка биологических заменителей, путем объединения клеток с каркасным материалом, для восстановления, замены или регенерации дефектных тканей. Для создания клеточных каркасов используют биоматериалы. Такие материалы должны быть биоразлагаемыми и биосовместимыми, для того чтобы минимизировать реакции хозяина, включая воспаление. Одним из главных показателей биосовместимости является способность поверхности клеточных матриксов поддерживать адгезию и рост клеток, что в дальнейшем оказывает влияние на пролиферацию клеток [1]. Среди активно исследуемых биополимеров: полилактидов, полигликолидов, природных полимеров (хитозан, коллаген и др.), полигидроксиалканоаты (ПГА) занимают особое место. ПГА используют в качестве материалов медицинского назначения, в качестве систем доставки лекарств, имплантатов и сосудистых эндопротезов. В многочисленных публикациях доказано, что матриксы из ПГА облегчают пролиферацию клеток, таких как: остеобlastы, хондроциты, фибробlastы, нейроны и стволовые клетки [2]. Матриксы на основе ПГА благоприятно влияют на адгезию фибробластов и кератиноцитов в отличие от полилактидных подложек [3],[4].

В зависимости от размера алкильной группы ПГА разделяют на коротко-, средне- и длинноцепочечные. К наиболее распространенным и изученным короткоцепочечным полимерам относят: гомополимер поли(3-гидроксибутират) ПЗГБ и его сополимеры с различным включением 3-гидроксивалерата ПЗГБ/ЗГВ или 4-гидроксибутират ПЗГБ/4ГБ; к среднеподцепочечным – сополимеры с различным включением 3-гидроксигексаноата ПЗГБ/ЗГГ. Разнообразие состава данного класса полимеров позволяет оценить как их структура и свойства (кристалличность, механическая прочность, температурные характеристики, скорости биораспада) могут повлиять на рост и адгезию культивируемых клеток.

В связи с вышеописанным цель данной работы – исследовать способность клеточных матриксов на основе ПГА разного химического состава поддерживать рост и адгезию мышиных фибробластов линии NIH 3T3

При выполнении данной работы были поставлены следующие задачи:

1. Методом литья полимерного раствора с последующим испарением растворителя получить пленочные матриксы из ПГА разного химического состава
2. Исследовать свойства поверхности (краевой угол, топологию и морфологию) и физико-механические характеристики полученных пленок на основе ПГА
3. Исследовать способность клеточных матриксов на основе ПГА поддерживать рост и адгезию мышиных фибробластов линии NIH 3T3

## **1. Обзор литературы**

### **1.1 Клеточные технологии в тканевой инженерии**

Клеточные технологии являются наиболее перспективным направлением с высоким терапевтическим потенциалом. В связи с развитием технологий стало возможно проводить лечение различного спектра заболеваний. Восстановление кожи при ожогах, лечение очагов некроза при ишемии миокарда, восстановление хряща при травмах суставов [4]. Клеточные технологии представляют собой не только различные подходы и методы, но и создание сложных композиций – тканеинженерных конструкций (ТИК), которые включают в себя, помимо клеток, биополимеры, с целью восстановления целостности и функций тканей и/или органов. К методам относят – выделение клеток из различных тканей и органов, возможность роста и развития клеток, свободных от микробной контаминации. В свою очередь ТИК включают в себя три основных компонента: клетки, которые способны формировать внеклеточный матрикс (ВКМ); подходящий субстрат для трансплантации клеток из биоразрушаемого или биостабильного полимера; ростовые факторы, которые оказывают стимулирующее действие на клетки поврежденной ткани [5];

Тканеинженерные конструкции подразделяются на два вида:

- имплантаты из «незжизнеспособных» биологических тканей, к которым, например, относятся биоклапаны сердца, биопротезы кровеносных сосудов – медицинские изделия;
- системы, которые состоят из биостабильного или биоразлагаемого матрикса, жизнедеятельных стволовых или тканеспецифических аутологичных или аллогенных клеток и биоактивных молекул (цитокины, факторы роста и др.)

Список типов клеток, введенных в культуру, достаточно широк. Это элементы скелетной ткани, скелетные, гладкие и сердечные мышцы,

соединительной ткани человека (фибробласты), эпителиальные ткани (печень, легкие, почки и др.), меланоциты, эндокринные клетки (надпочечники, клетки островков Лангерганса) и опухолевые клетки (например, HeLa). В качестве клеточной компоненты используют клетки различных типов и разного происхождения, они могут быть менее дифференцированными, например, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) и более – фибробласты, кератиноциты и др [1].

Фибробласты являются клетками рыхлой соединительной ткани, которые обеспечивают механическую прочность тканей, продуцируя внеклеточный матрикс (ВКМ), который образует опорную структуру. Морфология клеток различна, все зависит от уровня их активности и нахождения в организме, по форме они бывают отросчатые, веретеновидные, размер которых колеблется в пределах 20-25 мкм у недифференцированных форм, и 40-45 мкм у зрелых. Фибробласты синтезируют коллаген, эластин, протеогликаны и гликопротеины. Высокомолекулярным гликопротеином является – фибронектин. В межклеточном пространстве он связывается с коллагеном. Имеется суждение, что фибронектин обуславливает подвижность клеток, а также рост и дифференцировку клеток [6]. В настоящее время для лечения различных заболеваний кожи, тяжелых и обширных ожогов применяются как аллогенные (клетки, имеющие происхождение из организма, отличного от организма самого пациента), так и аутологичные фибробласти (клетки непосредственно самого пациента). При применении аутофибробластов исключается проявление аллергических реакций и нет проблемы в поисках донора, а также наблюдается длительный клинический эффект [7]. Однако, применение аллогенных клеток так же эффективно, как и применение аутологичных.

Технология использования культивированных *in vitro* данных фибробластов имеет большие перспективы. В настоящий момент в научной литературе имеется большое количество информации по применению культур клеток фибробластов в различных сферах [7]. Чаще всего встречается

информация о применении в регенеративной медицине, а также в косметологических целях: для возрастных изменений кожи, нехирургической коррекции.

Также клетки фибробластов можно использовать в качестве простейшей адгезионной культуры для тестирования цитотоксичности. Например, используют мышиные фибробласти линии NIH 3T3. Особенностью этих клеток является то, что их легко разводить в лабораторных условиях, а также из-за способности к высокой пролиферативной активности.

В настоящее время клеточные технологии используются для лечения патологий сердечно-сосудистой системы, в реконструкции мышечной ткани и кожи, а также клеточные технологии исследуют для целей повышения эффективности терапии при ишемии нижних конечностей. Таким образом, можно сказать, что в настоящее время происходит активное внедрение клеточных технологий повсеместно [1].

## **1.2 Биополимеры в качестве носителя культивируемых клеток**

В тканевой инженерии основной целью является копирование характеристик внеклеточного матрикса (ВКМ) ткани-мишени. Это делают с помощью полимерных матриц, засеянных клетками. Каркасы не только обеспечивают временную трехмерную поддержку во время восстановления тканей, но также регулируют поведение клеток [8]. В настоящее время в качестве клеточных носителей используются биоматериалы, так как они являются подходящим субстратом для обеспечения клеточной адгезии, миграции, пролиферации и дифференцировки клеток. Такие характеристики, как биосовместимость, биодеградация и отсутствие токсичности делают эти материалы превосходными кандидатами в качестве матриков для культивирования клеток. В свою очередь они делятся на синтетические и природные биополимеры. В последнее время непрерывно растет интерес к

биоразрушаемым природным полимерам, к которым относятся: белки (коллаген, шел, фибрин), полигидроксиалканоаты, полисахариды (гиалуроновая кислота, хитозан, декстран, альгинат) [1],[9]. К недостаткам природных полимеров относят сложность обработки, недостаточную механическую прочность и высокую стоимость их получения [1].

Природный полисахарид – хитозан широко используется в медицине. Он является производным хитина – распространенного в природе биополимера. Хитин добывается преимущественно из панцирей промысловых ракообразных. Получение хитозана протекает путем полного или частичного деацетилирования с помощью концентрированных щелочей. В твердом состоянии представляет собой аморфно-кристаллический полимер, который существует в нескольких полиморфных модификациях [10],[11]. Обладая набором биологических свойств, о которых упоминалось выше, хитозан оказался привлекательным материалом для лечения ран, действует как ускоритель их заживления. Было разработано несколько полимерных мембран для перевязки ран с комбинацией различных полимеров, включая желатин и альгинат [12].

Проведено исследование, где изучали *in vitro* цитотоксичность гидрогелей хитозана. Для определения цитотоксичности использовали дермальные фибробласти, полученные из кожи крысы. Исходя из полученных результатов, было выявлено, что хитозан не оказывал острой токсичности. Так же было обнаружено, что хитозановые повязки вызывают минимальные побочные реакции и, как было показано, обеспечивают защиту от бактериальных инфекций [13]. Суммируя эти результаты, хитозан можно рассматривать как перспективного кандидата для изготовления тканеинженерных конструкций.

Альгинат является природным полисахаридом, который получают либо путем биотехнологической ферментации, либо из морских водорослей. Одобренный Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (F.

D. A.) в качестве материала для заживления ран, он используется в виде волокон и пленок для первичной обработки ран и ожогов. Альгинаты могут полимеризоваться и образовывать гели в присутствии двухвалентных металлов (магния, кальция), полученные гели используются в качестве матриц для культивирования клеток [1].

Коллаген – самый распространенный белок в организме, является одним из основных компонентов соединительной ткани. Он обладает хорошими свойствами, которые необходимы для материалов в тканевой инженерии, такими как проницаемость, гидрофильность, пористость и биосовместимость. Коллаген используют в разработке новых биогибридных перевязочных материалов, предназначенных для заживления ран и регенерации кожных тканей. Учеными были разработаны биогибридные повязки на основе коллагена и поливинилового спирта в качестве новой модели перевязки ран. Этот каркас при загрузке с противовоспалительным препаратом (например, индометацином) еще больше улучшал заживление ран [14]. Коллагеновые каркасы идеально подходят для посева клеток, таких как остеобlastы и фибробласты, обеспечивая нормальный рост после введения в ткань.

Синтетические биополимеры предлагают ряд преимуществ для применения в тканевой инженерии и регенеративной медицине. Биоматериалы могут быть легко синтезированы и изготовлены в различных формах, с желаемыми поверхностными характеристиками [15]. Среди данных биополимеров наиболее широко используются погликолиды (полигликолевая кислота, ПГК) и полилактиды (полимолочная кислота, ПМК). Полигликолид считается одним из первых биоразлагаемых синтетических полимеров, используемых в биомедицинских применениях. Представляет собой жесткий термопласт, впервые использованный в медицине в качестве шовного материала в 1962 году под торговой маркой Dexon [16]. Швы быстро реабсорбируются организмом. Благодаря своей простой структуре и стереохимии, полигликолид может быть как полностью аморфным, так и иметь

различную степень кристалличности вплоть до максимальной, из-за высокой кристалличности он нерастворим в органических растворителях и также обладает лучшими механическими свойствами среди биоразрушаемых полиэфиров [17]. Разложение полимера происходит до углекислого газа и воды, выводится в виде мономера. При биодеградации наблюдается незначительное повышение pH окружающих тканей. Было выявлено, что материал поддерживает пролиферацию клеток и их адгезию, не обнаружено цитотоксического действия от материала [18].

Полилактид по своим физическим, химическим и биологическим свойствам близок к полигликолиду, но при этом уступает ему в прочности и скорости деградации, которая у него ниже. Полилактид обладает очень хорошими свойствами биосовместимости. Однако он имеет некоторые недостатки, включая чрезмерную хрупкость и медленную кристаллизацию, эти два свойства ограничивают его использование во многих приложениях. Поэтому его часто сополимеризуют с гидроксиалкановыми кислотами или смешивают с другими полимерами, наполнителями или пластификаторами [19].

Многочисленные исследования доказывают, что наилучшими показателями обладают сополимеры полилактида и гликолида – поли(молочногликоловая кислота, ПМГК). Варьируя процентным соотношением молочной и гликоловой кислот, можно изменять такие свойства продукта, как, например, прочность, пластичность и скорость биодеградации, и др. Производилось тестирование этих сополимеров в течение длительного времени, с использованием различных тест-культур [18]. Полученные результаты доказывают, что материал из ПМГК обладает хорошими поверхностными характеристиками, наблюдается адгезия и пролиферация клеток, что делает его одним из подходящих биоматериалов для регенерации тканей [20].

Существуют преимущества и недостатки как природного, так и синтетического полимера, и, в частности, материалы могут быть пригодны для

одних применений по сравнению с другими. Во многих случаях природные полимеры имеют состав, аналогичный тканям, которые они заменяют.

Интерес к полигидроксиалканоатам (ПГА) растет с конца 1980-х годов. Это новый класс биосовместимых и биоразрушаемых полиэфиров [1]. ПГА имеют линейную структуру и при нагревании становятся пластичными, имеется возможность переработки ПГА разными способами в различные изделия, например, прессование, получение микрочастиц из эмульсий, электростатическое формование, экструзия. Поэтому данный вид полимеров является наилучшим кандидатом для использования во многих областях медицины, например, для изготовления эндопротезов, шовных и перевязочных материалов [9]. Они хорошо переносятся иммунной системой млекопитающих, были протестированы нити из ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ, имплантированные внутримышечно в течение длительного периода и исследование показало, что данные нити из ПГА не вызывают нежелательных реакций, таких как гнойное воспаление, некроз или образование злокачественной опухоли [21].

### **1.3 ПГА в качестве клеточных носителей**

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – класс природных сложных полиэфиров, которые производятся микроорганизмами в качестве внутриклеточного запасного материала в условиях несбалансированного роста. Для производства ПГА используют микробную ферментацию, начиная с 1980-х годов. В мире известно несколько десятков производителей ПГА, наиболее распространённые бактерии семейства *Pseudomonas*, *Ralstonia eutropha* (прежнее название *Alcaligenes eutrophus*, *Wautersia eutropha* или *Cupriavidus necator*) и рекомбинантная *E. Coli* [22].

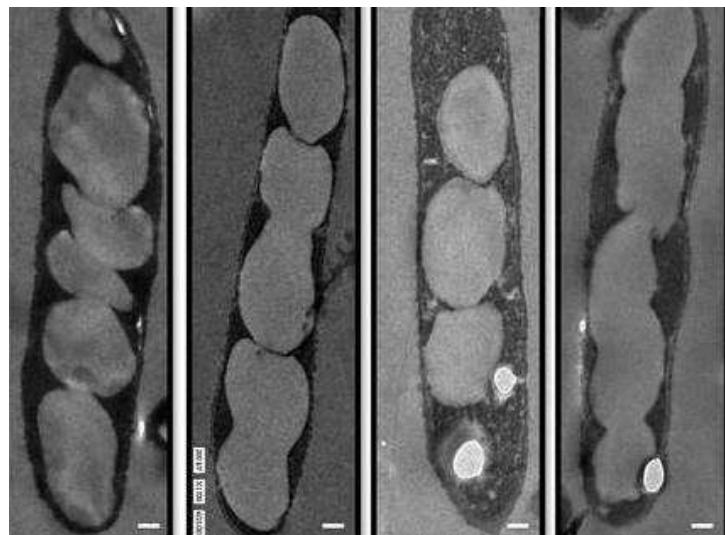


Рисунок 1 – Гранулы ПГА в цитозоле клетки бактерии [23]

Структуры ПГА можно представить следующим образом:

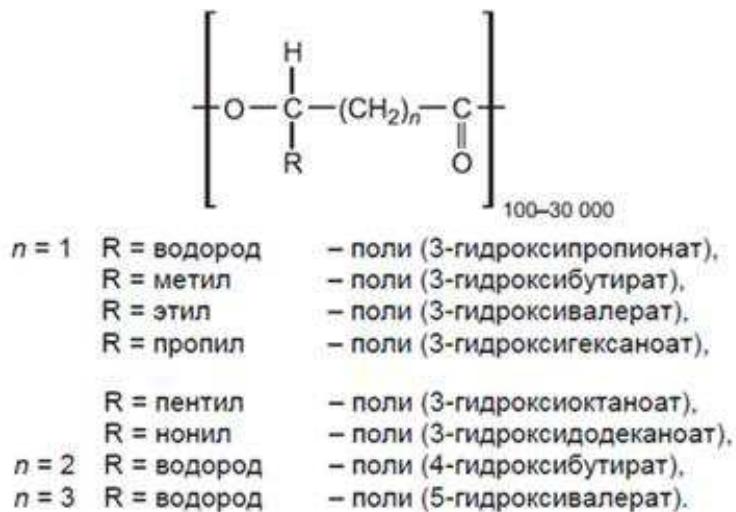


Рисунок 2 – Общая формула ПГА [24]

Исходя из размера углеродной цепи полигидроксиалканоаты подразделяют на три основные группы:

1. Короткоцепочечные, состоят из кислот с длиной углеродной цепи от 3-х до 5-ти углеродных атомов;
2. Среднекепочечные, в составе которых от 6 до 14 атомов углерода;

### 3. Длинноцепочечные, с содержанием кислот C<sub>17</sub> и C<sub>18</sub> [24].

Из-за структурных изменений мономеров, составляющих ПГА, они различаются по свойствам и химическому составу как гомо- или сополимеры. Гомополимеры – это такие полимеры, макромолекулы которых состоят из одинаковых по строению повторяющихся структурных единиц (мономеров). Например, мономером являются 3-гидроксибутират (ЗГБ), 3-гидроксивалерат (ЗГВ) и др. Сополимерами называются полимеры, молекулы которых содержат мономерные звенья разных типов. Полигидроксиалканоаты не растворимы в воде, обладают хорошей устойчивостью к гидролитическому воздействию, устойчивы к ультрафиолетовому излучению. Растворимы в хлороформе и других хлорированных растворителях. Их температура стеклования варьируется от -50 до 4 ° С, температура плавления от 40 до 180 ° С [24].

На сегодняшний день выявлено свыше 150 ПГА. Несмотря на это многообразие, внимание исследователей привлекает всего несколько типов ПГА: гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты, сополимеры поли-3-гидроксибутират-со-3-гидроксипропионат, поли-3-гидроксибутират-со-4-гидроксибутират, поли-3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерат, поли-3-гидроксибутират-со-3-гидроксигексаноат, поли-3-гидроксибутират-со-3-гидроксидеканоат [25].

Французский ученый Лемуань впервые открыл ПГА в *Bacillus megaterium* в форме поли(3-гидроксибутират) ПЗГБ в 1925 году – это гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты, который представляет собой изотактический полиэфир с повторяющими единицами (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) [26]. ПЗГБ является наиболее тщательно исследованным членом семейства ПГА. Мономер является обычным соединением, которое обнаруживается в крови человека в низких концентрациях и принадлежит к группе кетоновых тел. Благодаря высокой биосовместимости ПЗГБ является перспективным материалом для использования в клеточной инженерии. Различные клетки млекопитающих (фибробlastы человека и мыши, мезенхимальные стволовые клетки (МСК)

крысы, мыши и человека, и др.,) демонстрируют хороший уровень адгезии клеток, пролиферации и жизнеспособности при культивировании *in vitro* на пленках на основе ПЗГБ [27]. К недостаткам относят хрупкость полимера, его жесткость, которые связаны с большой кристалличностью (70 %), и медленную скорость деградации *in vivo* [9]. Для того, чтобы улучшить свойства матрикса из П(ЗГБ), его также можно использовать в сочетании с другими полимерами, например, с гидроксиапатитом, данные композиты используются для восстановления костной ткани [4].

Так же в исследовании проводили стандартный тест на реакцию ткани на подкожную имплантацию ПЗГБ и его сополимеров в форме пленки, результаты исследования показали, что данный тест выявляет мягкий или умеренный ответ на инородный материал. Тонкая фиброзная капсула (~ 100 мкм) образуется в течение месяца и резорбируется после биодеградации образцов. Исследование выявило низкий уровень лимфоцитов или практически отсутствие лимфоцитов (в частности, Т-лимфоцитов) в месте введения ПЗГБ, что указывает на то, что иммунная реакция на этот полимерный биоматериал либо значительно снижена, либо отсутствует [26].

Вторым по изученности является сополимер поли-3-гидроксибутират и 3-гидроксивалерата ПЗГБ/ЗГВ. В зависимости от включения мономера ЗГВ механические свойства полимера изменяются. С увеличением включения мономера материал становится эластичным и менее кристалличным, снижаются значения температуры плавления и деградации. Для изучения биосовместимости сополимера ПЗГБ/ЗГВ было проведено исследование на базе Института биофизики СО РАН, в котором получали клеточные матриксы в виде пленок. Было выявлено, что данный сополимер обладает биосовместимыми свойствами по отношению к культивируемым клеткам. В качестве тест-культуры использовали клеточную линию фибробластов мыши NIH 3T3 для оценки цитотоксичности матриксов [28].

Улучшенные свойства сополимера поли-3-гидроксибутират с поли-3-гидроксигексаноатом ПЗГБ/ЗГГ такие как механические свойства, сродство к различным типам клеток млекопитающих и способность к биологическому разложению *in vitro*, оказались лучше, чем у ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ [27]. Также было обнаружено, что пленки ПЗГБ/ЗГГ с высоким содержанием ЗГГ усиливают дифференцировку клеток. Было проведено исследование на совместимость в условиях *in vivo*. Материал был имплантирован под кожу и не оказывал токсичного воздействия на организм, не было никаких признаков макрофагов, и реакция тканей оставалась очень мягкой в течение всего периода тестирования [29].

Особенно привлекателен в качестве одного из компонентов ПГА мономер 4ГБ. Были получены результаты при исследовании биосовместимости сополимера ПЗГБ/4ГБ на тестируемой клеточной культуре фибробластов мыши L929. Жизнеспособность клеток, культивируемых на матриксах, увеличивалась с увеличением доли 4ГБ [30]. Так же в работе исследователей Сибирского Федерального университета и НИИ скорой помощи им. Н.В Склифосовского были предоставлены результаты о биосовместимости пленочного образца из ПЗГБ/4ГБ. В качестве оценки совместимости использовали мышные фибробласти линии NIH 3T3 и культуру диплоидных клеток эмбриона человека – фибробласти линии M-22. При прямом контакте с исследуемыми образцами в культурах клеток отсутствовала цитотоксичность, клетки имели характерную для культуры морфологию, сохраняли свою исходную структурную целостность, также пролиферативная активность не претерпевала изменений на протяжении всего культивирования [31].

Трехкомпонентный полимер ПЗГБ/ЗГВ/ЗГГ обладает более высокой термостабильностью, гибкостью и механической прочностью, чем ПЗГБ/ГВ и ПЗГБ/ГГ и может быть хорошим биоматериалом для тканевой инженерии. Так, в работе *Ya-Jun* были получены матриксы методом литья полимерного раствора их ПЗГБ/ЗГВ/ЗГГ. Цитотоксичность матриксов оценивали с помощью клеток –

МСК костного мозга. Данный вид матрикса показал отсутствие токсичности, хорошую адгезию клеток, поддерживал остеогенную дифференцировку МСК [32].

В сравнительном исследовании клеточных матриксов, которые были получены в Институте биофизики СО РАН, использовали гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты ПЗГБ, двухкомпонентные сополимеры: ПЗГБ/ЗГВ, ПЗГБ/ЗГГ, ПЗГБ/4ГБ и полилактид. Клеточные матриксы были получены методом литья полимерного раствора. В качестве тест культуры на исследование токсичности использовали фибробласты мыши NIH 3T3. Результаты исследования показали, что в течение 96 часов культивирования количество клеток на всех матрикса из ПГА и на контроле было сопоставимо; на полилактиде количество клеток было вдвое меньше. На 7 сутки количество клеток на матриксе из ПЗГБ, ПЗГБ/4ГБ и ПЗГБ/ЗГВ было сравнимо, чуть меньше клеточная активность наблюдалась на матриксе из ПЗГБ/ЗГГ. Можно сделать вывод, что данные клеточные матриксы из ПГА пригодны для культивирования клеток [25].

Исходя из выше представленных исследований, можно сделать вывод о том, что конструкции из полигидроксиалканоатов являются подходящими для культивирования клеток. Биосовместимость полимера зависит от целого комплекса свойств – от его физико-химических свойств, структуры, чистоты полимера, поверхностных характеристик, а главное от метода приготовления изделия для последующей имплантации. Вопрос о том, какой из всех видов ПГА является наиболее перспективным, безопасным и приемлемым для создания тканеинженерной конструкции, все еще остается открытым [12].

## **2 Материалы и методы**

### **2.1 Объекты исследования**

Для исследований были взяты образцы гомогенного полимера 3-гидроксимасляной кислоты ПЗГБ и двухкомпонентные сополимеры: ПЗГБ/ЗГВ с включением ЗГВ 13% и 23%; ПЗГБ/4ГБ с включением 4ГБ 10% и 23%; ПЗГБ/ЗГГ с включением ЗГГ 14%. Все полимерные образцы были любезно предоставлены сотрудниками Лаборатории новых биоматериалов Сибирского Федерального Университета.

Таблица 1 – Значения молекулярной массы образцов ПГА

Образец	Среднечисловая масса $M_n$ , кДа	Средневесовая масса $M_w$ , кДа	Полидисперсность, $M_w/M_n$
ПЗГБ	$723 \pm 14$	$1200 \pm 47$	$1,66 \pm 0,03$
ПЗГБ/ЗГВ 13%	$840 \pm 9$	$1500 \pm 22$	$1,79 \pm 0,01$
ПЗГБ/ЗГВ 23%	$660 \pm 19$	$1500 \pm 42$	$2,27 \pm 0,03$
ПЗГБ/ЗГГ 14%	$340 \pm 9$	$1000 \pm 16$	$2,94 \pm 0,04$
ПЗГБ/4ГБ 10%	$477 \pm 4$	$810 \pm 11$	$1,70 \pm 0,04$
ПЗГБ/4ГБ 23%	$290 \pm 5$	$550 \pm 10$	$1,90 \pm 0,01$

Для исследования адгезионных свойств на матрицах из ПГА, использовали клеточную линию мышиных фибробластов NIH 3T3. Культивирование клеток проводили по стандартным методикам в полной питательной среде: DMEM (Gibco), FBS (Gibco) – 10 %, раствор антибиотиков – 1% (Gibco). Далее флакон помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>.

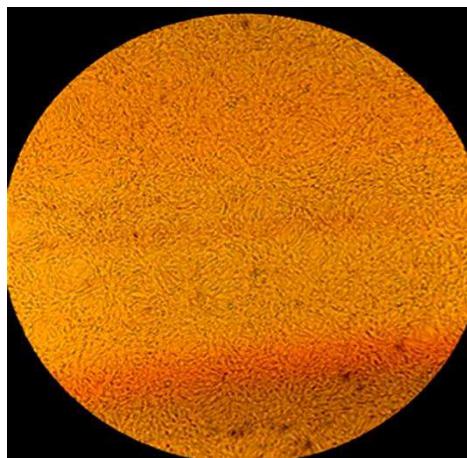


Рисунок 3 – клеточная линия NIH 3T3

## 2.2 Методы исследования

### 2.2.1 Изготовление клеточных матриксов

Клеточные матриксы, в виде пленок, получали путем полива разогретого до 45°C 2% раствора полимера на обезжиренную поверхность чашек Петри. В качестве растворителя использовали дихлорметан. Пленки высушивали в вакуумном эксикаторе для испарения растворителя. Далее с помощью специальной формы высекали диски диаметром 15 мм, толщину измеряли с использованием механического электронно-цифрового микрометра Legioner EDM-25-0.001, после чего матриксы были разложены в 24-х луночный планшет и подвергнуты ультрафиолетовой стерилизации в 70% этаноле в течение 15 минут. Далее матриксы трижды промывали в фосфатно-буферном растворе.

### 2.2.2 Исследование поверхностных характеристик

Измерение угла контакта с водой является стандартным методом, используемым для изучения гидрофильности поверхности биоматериала, и может помочь оценить возможное влияние биоматериала на адгезию и рост клеток. Гидрофильность поверхности определяли путем измерения угла

контакта с водой, для этого использовали прибор «KRUSS» с применением программного обеспечения DSA – 4 для Windows.

Последовательно наносили на поверхность полимерных образцов при помощи шприцов капли дийодометана и воды, осуществлялась видеозапись моментов взаимодействия каждой жидкости с поверхностью образца, затем она обрабатывалась в полуавтоматическом режиме «Circle», интегрированным в программный комплекс. Для каждого полимерного образца было произведено 10 измерений, по полученным значениям контактных углов смачивания рассчитывались среднее значение и стандартное отклонение, а также дисперсная и полярная составляющие.



Рисунок – 4 Прибор для исследования поверхностных характеристик

С применением сканирующей электронной микроскопии (микроскоп S 5500, Hitachi, Japan) исследовали микроструктуру поверхности полимерных изделий. Образцы  $5 \times 5$  мм помещали на предметный столик и покрывали напылением. Далее полученные снимки загружали в программу для анализа изображений «ImageJ».

С использованием атомно-силовой микроскопии («SmartSPM™», ООО «АИСТ-НТ», Россия) определяли шероховатость поверхности клеточных матриков. Для характеристики шероховатости образцов вычисляли среднеквадратичную шероховатость, максимальную высоту пика и максимальную глубину впадины.

### **2.2.3 Исследование физико-механических свойств**

Механические характеристики пленок определяли на электромеханической машине «Instron». Исследовали модуль Юнга (МПа), предел прочности (МПа) и удлинение при разрыве (%).



Рисунок 5 – Прибор для исследования физико-механических свойств

### **2.2.4 Культивирование клеток на матриках из ПГА**

На полученные матрицы, в асептических условиях, были рассеяны клетки с добавлением питательной среды. На каждую лунку высевали клетки

плотностью  $10^4$  кл/см<sup>2</sup> и добавляли 1 мл питательной среды, культивировали в течение 3 суток.

Перед тем, как произвести посев, клетки отделяли от культурального флакона с помощью раствора трипсина (3 мл), далее флакон был помещен в СО<sub>2</sub>-инкубатор на 5-7 минут. Затем добавляли питательную среду (3 мл), для того чтобы нейтрализовать трипсин (3 мл). Далее суспензию переносили в центрифужные пробирки, центрифугировали со скоростью 3000 об/мин в течение 5 минут, супернатант отбирали, клеточный осадок ресусцидировали, к 10 мкл клеточной суспензии добавляли такой же объем трипанового синего, после чего заполняли камеру Горяева и производили подсчет живых (неокрашенных) и мертвых (окрашенных) клеток по формуле:

$$X = N \cdot 0,05 \cdot 10^6 \cdot m$$

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

## 2.2.5 Оценка жизнеспособности фибробластов

Жизнеспособность клеток на полимерных матрикса изучали в реакции с МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол бромидом], которая основывается на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол бромид до формазана, это характеризует активность митохондрий живых клеток и косвенно отражает количество жизнеспособных клеток и способных к пролиферации. Оценивали 1 и 3 сутки. После 24-х часов культивирования меняли среду, добавляли новую 950 мкл и 50 мкл МТТ. Затем убирали планшет в инкубатор на 4 часа. По истечению времени доставали планшет, убирали среду досуха, затем добавляли 150 мкл ДМСО. После чего переносили содержимое по 100 мкл в девяностошестистилуночный планшет и измеряли оптическую плотность на фотометре при длине волны 550 нм. Такие же измерения производили на

трети сутки. Каждый образец имел три повторности. Количество клеток рассчитывали по калибровочному графику.



Рисунок 6 – прибор для измерения оптической плотности «Bio-RAD»

## 2.2.6 Флуоресцентное окрашивание красителем DAPI

Для флуоресцентного окрашивания клеток использовали краситель DAPI (окрашивает ядра живых клеток). Для начала досуха убирали питательную среду, после клетки промыли фосфатно-буферным раствором, затем фиксировали 4% раствором формалина в течение одного часа, далее снова промыли фосфатно-буферным раствором, обработали раствором Triton-X в течение 5 минут, потом опять промыли фосфатно-буферным раствором. После этого клетки окрасили DAPI (концентрация рабочего раствора 1 мкг/мл, по 50 мкл раствора на образец) в течение 15 минут. После окрашивания каждый образец тщательно промывали фосфатно-буферным раствором и результаты наблюдали в флуоресцентный микроскоп.

## **2.2.7 Статистический анализ данных**

Статистическая обработка результатов была проведена с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel. Результаты представлены как средние арифметические со стандартными отклонениями.

### **3. Результаты**

#### **3.1 Характеристика полученных клеточных матриксов из ПГА**

Получена серия образцов клеточных матриксов в виде пленок на основе гомополимера ПЗГБ и сополимеров: ПЗГБ/ЗГВ с включением 3-гидроксивалерата 13%, 23%, ПЗГБ/ЗГГ с включением 3-гидроксигексаноата 14%, ПЗГБ/4ГБ с включением 4-гидроксибутиратом 10% и 23%, диаметром 15 мм, толщиной от  $23,5 \pm 3$  до  $56,7 \pm 2,3$  мкм (Таблица 2 – Толщина полимерных пленок ПГА).

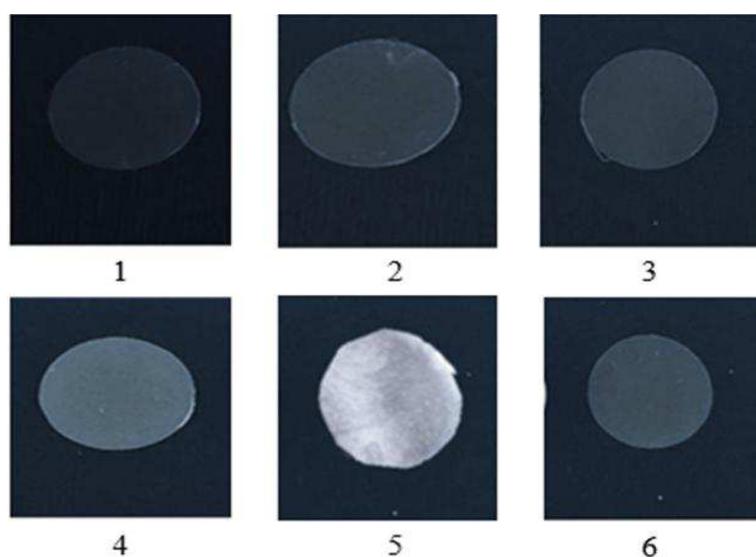


Рисунок 7 – Полимерные матриксы из ПГА. 1 - ПЗГБ; 2 - ПЗГБ/ЗГВ 13 %; 3 - ПЗГБ/ЗГВ 23 %; 4 - ПЗГБ/4ГБ 10 %; 5 - ПЗГБ/4ГБ 23 %; 6 - ПЗГБ/ЗГГ 14, %

Большинство полимерных пленок имели гладкую поверхность, были прозрачными без видимых дефектов. Пленка на основе ПЗГБ/4ГБ имела матово белый цвет, что связано с увеличением включения 4ГБ до 23 %.

Таблица 2 – Толщина полимерных пленок ПГА

Образец	ПЗГБ	ПЗГБ/ЗГВ 13%	ПЗГБ/ЗГ В 23%	ПЗГБ/ЗГ Г 14%	ПЗГБ/4ГБ 10%	ПЗГБ/4 ГБ 23%
Толщина, мкм	$56,7 \pm 2,3$	$29,4 \pm 3,05$	$54,3 \pm 2,8$	$30,1 \pm 2$	$33,2 \pm 2,9$	$23,5 \pm 3$

Изменение толщины полученных пленок связано с различной вязкостью растворов при определенном составе мономеров ПГА. Вязкость растворов отдельно в работе не изучали. По опубликованным данным в зависимости от используемого растворителя (хлороформ, дихлорметан) растворы ПГА по убыванию величины динамической вязкости можно расположить в следующем порядке: П(ЗГБ) – П(ЗГБ-ЗГВ) – П(ЗГБ-ЗГГ) – П(ЗГБ-4ГБ) [Диссертация Гончарова Дмитрия].

### 3.2 Свойства поверхностей изделий из ПГА

Среди параметров (химический состав полимера, краевой угол, пористость и т.д.) определяющих адгезию клеток к полимерным материалам морфология поверхности имеет важное значение, так как влияет на прикрепление, распластывание и двигательную активность клеток. Клеточные матриксы в виде пленок исследованы с помощью сканирующей электронной микроскопии, микрофотографии показаны на Рисунок 8.

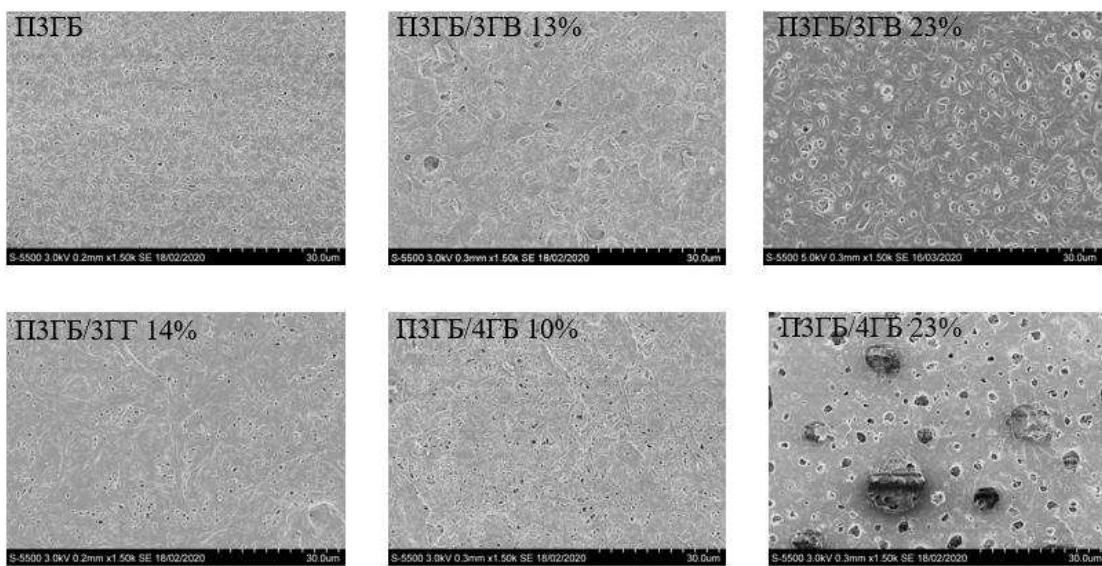


Рисунок 8 – микрофотография полимерных образцов из ПГА различного состава

По результатам СЭМ снимков полимерных образцов доказано, что все матрицы имеют поры, наибольшее количество которых размером от  $2 \pm 0,5$  мкм до  $8 \pm 2,4$  мкм зарегистрировано на пленках ПЗГБ/4ГБ 23% и ПЗГБ/3ГВ. Поверхность клеточных матриц из гомополимера и ПЗГБ/3ГГ 14% была более гладкой с минимальным количеством пор.

Рельеф поверхности оценивали с помощью атомно-силовой микроскопии. Результаты представлены в Таблица 3 и на Рисунок 9.

Таблица 3 – Показатели шероховатости поверхности клеточных матриц из ПГА

Образец	Среднеквадратичная шероховатость ( $Sq$ ), нм	Максимальная высота пика ( $Sp$ ), нм	Максимальная глубина впадины ( $Sv$ ), нм
ПЗГБ	$176,9 \pm 8,4$	$639 \pm 2,5$	$593,8 \pm 3,7$
ПЗГБ/3ГВ 13%	$360,6 \pm 3,3$	$1256 \pm 2,6$	$1055,6 \pm 2,8$
ПЗГБ/3ГВ 23%	$249,6 \pm 5,2$	$814,1 \pm 2$	$751,4 \pm 1,6$
ПЗГБ/3ГГ 14%	$297 \pm 3,1$	$850,6 \pm 1,4$	$1015,6 \pm 2,3$
ПЗГБ/4ГБ 10%	$363,8 \pm 2,1$	$1223,4 \pm 2,6$	$1055,5 \pm 2,4$
ПЗГБ/4ГБ 23%	$281,6 \pm 1,5$	$779,1 \pm 1,6$	$1400,1 \pm 2,9$

Топография поверхности всех исследуемых образцов имела отличия. Матрикс на основе ПЗГБ имел минимальную рельефность, о чем свидетельствуют данные самых низких значений шероховатости, а также высоты пика и глубины впадины. Максимальные показатели шероховатости были зарегистрированы для пленок ПЗГБ/3ГВ 13% и ПЗГБ/4ГБ 10%, также эти два сополимера имеют близкие значения по другим исследуемым параметрам. Стоит отметить, что при увеличении содержания мономеров 3ГВ и 4ГБ с 13% и 10%, соответственно, до 23% уменьшаются значения шероховатости с 360 и

363 нм до 249 и 281 нм соответственно и максимальная высота пика с 1256 и 1223 нм до 814 и 779 нм.

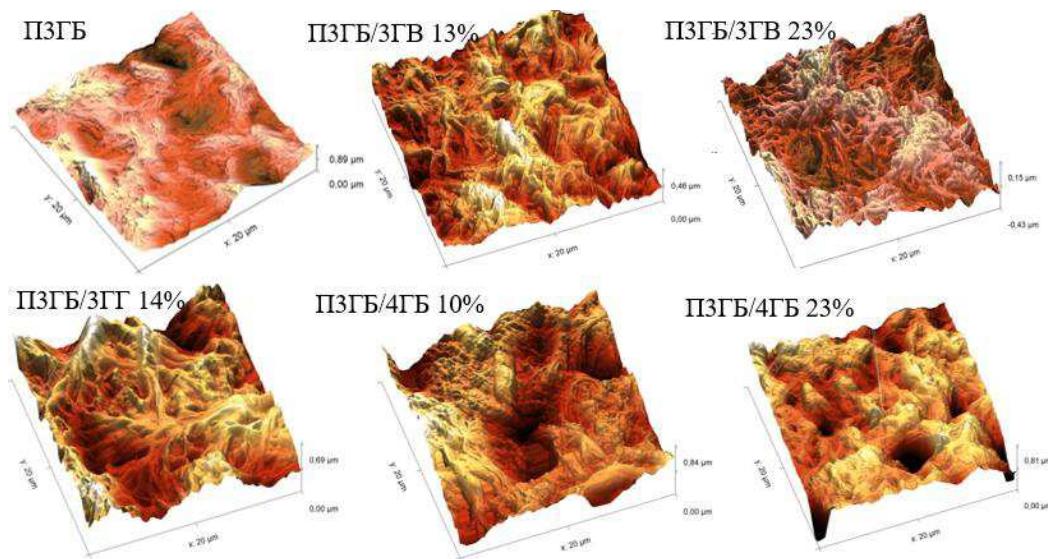


Рисунок 9 – микрофотографии рельефа полимерных образцов

Значимым показателем способным повлиять на биосовместимость клеточных носителей является краевой угол смачивания, характеризующий соотношения гидрофильной и гидрофобной составляющей поверхности.

Таблица 4 – Свойства поверхности клеточных матриксов из ПГА

Состав	Краевой угол (вода), град	Дисперсная составляющая, мН/м	Полярная составляющая, мН\м
ПЗГБ	$79,7 \pm 2,5$	$44,8 \pm 1,1$	$4,9 \pm 0,2$
ПЗГБ/ЗГВ 13%	$77,0 \pm 2,3$	$47,25 \pm 0,5$	$6,9 \pm 0,5$
ПЗГБ/ЗГВ 23%	$68,5 \pm 1,5$	$45,4 \pm 1,8$	$9,8 \pm 0,7$
ПЗГБ/ЗГГ 14%	$73,4 \pm 1,7$	$44,1 \pm 0,4$	$7,0 \pm 0,9$
ПЗГБ/4ГБ 10%	$67,4 \pm 2,9$	$44,0 \pm 0,8$	$11,5 \pm 1,9$
ПЗГБ/4ГБ 23%	$66,0 \pm 3,1$	$34,8 \pm 0,8$	$9,6 \pm 0,3$

Наибольший краевой угол имели пленки ПЗГБ –  $79,7 \pm 2,5^0$ ; ПЗГБ/ЗГВ с включением ЗГВ 13%  $77,0 \pm 2,3^0$ ; ПЗГБ/ЗГГ с включением ЗГГ 14%  $73,4 \pm 1,7^0$ , что указывает на их гидрофобные свойства. Наименьшее значение краевого угла зарегистрированы для образцов с включением 4ГБ 10% и 23%, их углы составили  $67,4 \pm 2,9^0$  и  $66,0 \pm 3,1^0$  соответственно, и клеточного матрикса из ПЗГБ/ЗГВ с включением ЗГВ 23%  $68,5 \pm 1,5^0$ , что свидетельствует о гидрофильных свойствах. Значения полярной составляющей обратно пропорциональны углу смачивания.

### **3.3 Физико-механические свойства клеточных матриков из ПГА**

Для исследования физико-механических свойств матриков из ПГА, пленки были нарезаны на полоски размером  $60 \times 10$  мм. Результаты исследования представлены в Таблица 5 – *Физико-механические свойства клеточных матриков из ПГА*.

Таблица 5 – Физико-механические свойства клеточных матриков из ПГА

Образец	Модуль Юнга, [МПа]	Предел прочности, [МПа]	Удлинение при разрыве, [%]
ПЗГБ	$2956,7 \pm 150,2$	$30,5 \pm 2,1$	$2,2 \pm 0,4$
ПЗГБ/ЗГВ 13%	$2808,1 \pm 161,4$	$37,4 \pm 1,7$	$1,9 \pm 0,2$
ПЗГБ/ЗГВ 23%	$2334,7 \pm 121,6$	$35,2 \pm 2,7$	$2,6 \pm 0,6$
ПЗГБ/ЗГГ 14%	$2310,6 \pm 98,7$	$32,8 \pm 2,2$	$2,1 \pm 1,1$
ПЗГБ/4ГБ 10%	$1183,4 \pm 62,1$	$27,3 \pm 1,3$	$10,8 \pm 1,4$
ПЗГБ/4ГБ 23%	$950 \pm 57,1$	$3,9 \pm 1,2$	$11,7 \pm 0,6$

Физико-механические испытания пленочных матриков показали высокие значения Модуля Юнга для пленок из ПЗГБ (2956,7 МПа), что характеризует данный материал как более жесткий. У матрикса из ПЗГБ/4ГБ с включением 4ГБ 23% наблюдается минимальная способность сопротивляться растяжению, его значение Модуля Юнга составляет 950 МПа, данный матрикс имеет низкий предел прочности 3,9 МПа, выше которого будет происходить разрушение материала. Матрикс из ПЗГБ/3ГВ с включение 3ГВ 13% имеет самый высокий из всех образцов предел прочности 37,4 МПа, но при этом у него самый низкий процент удлинения при разрыве 1,9 %. При включении мономера 4ГБ наблюдается явное увеличение величины удлинения при разрыве (10 – 11%) по сравнению с остальными образцами, что говорит о эластичных свойствах матриксов на основе ПЗГБ/4ГБ.

### **3.4 Исследование жизнеспособности фибробластов на клеточных матриках**

Для эксперимента использовали криоконсервированные клетки – фибробласты мыши линии NIH 3T3 (Рисунок310). После разморозки клетки были помещены в культуральный флакон с добавлением питательной среды, культивировали в СО<sub>2</sub>-инкубаторе в атмосфере 5% СО<sub>2</sub> при 37°С. При культивировании оценили скорость образования монослоя, которое подтверждено падением pH, так как происходило увеличение плотности клеток, которое является главной характеристикой потребности в субкультивировании (пересеве). Признаков контаминации в культуре не было обнаружено.

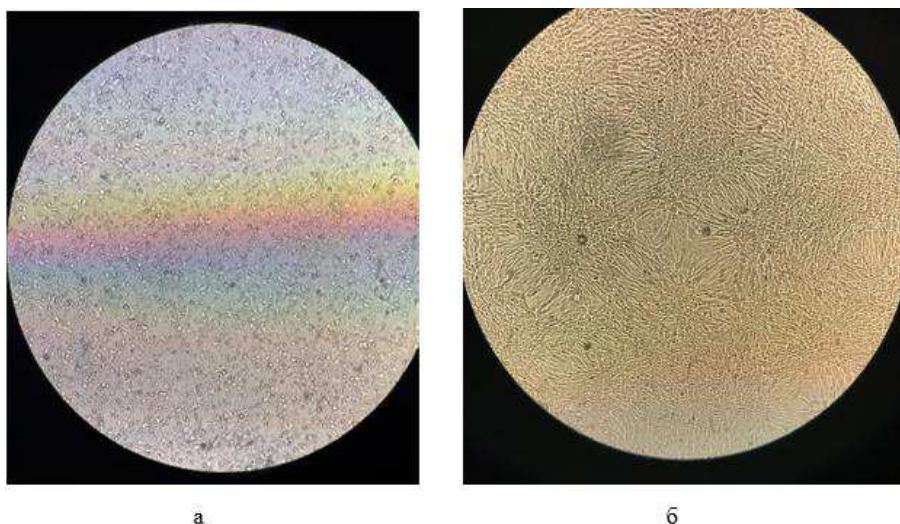


Рисунок 10 – Культивирование мышиных фибробластов NIH 3T3. а - спустя 24 часа после разморозки; б - образование монослоя в культуре клеток

Уровень клеточного метаболизма культивируемых клеток на матриках изучали в реакции с МТТ. Данные представлены на графике и отражают количество жизнеспособных клеток.

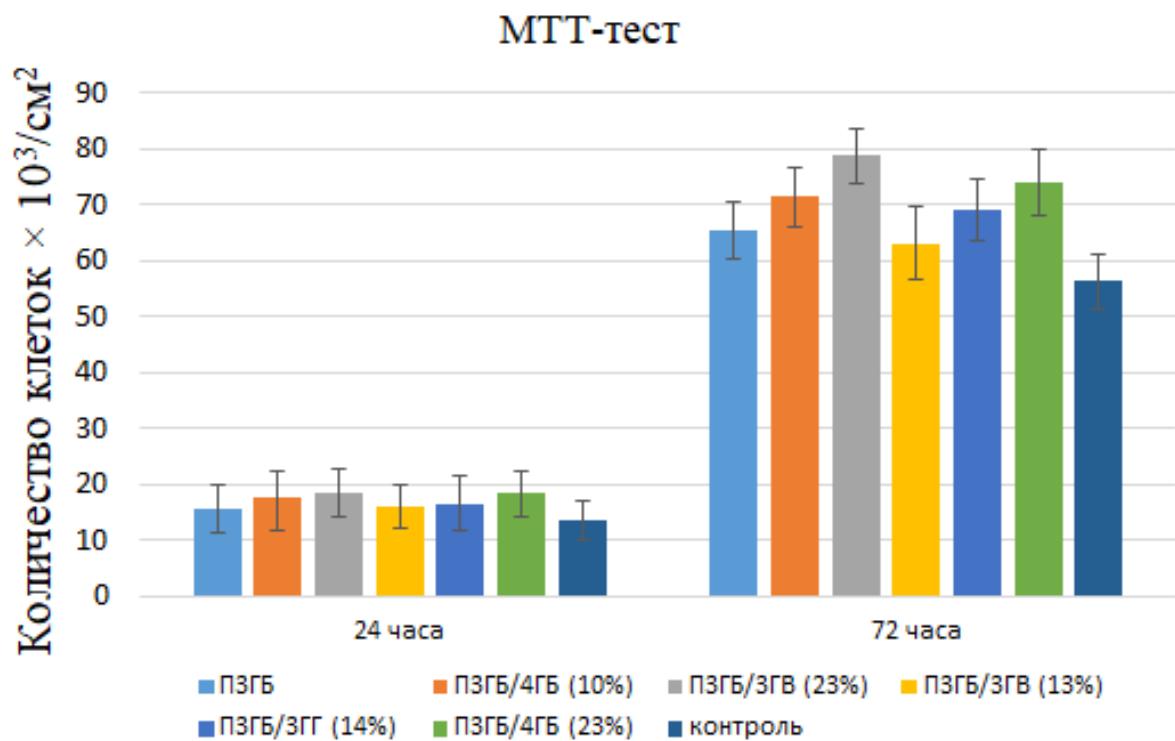


Рисунок 11 – Результаты МТТ-теста

В первые сутки исследования метаболическая активность фибробластов NIH 3T3 на поверхности образцов из ПГА была выше, чем на поверхности контроля. Количество жизнеспособных клеток на матриксах составило: ПЗГБ –  $n = 15,58 \pm 4,25$ ; ПЗГБ/3ГГ –  $n = 16,49 \pm 4,88$ ; ПЗГБ/3ГВ (13 и 23%) –  $n = 15,99 \pm 3,84$  и  $n = 18,43 \pm 4,38$ ; ПЗГБ/4ГБ (10 и 23%) –  $n = 17,45 \pm 4,90$  и  $18,25 \pm 3,10$ . На третьи сутки самый максимальный рост был зарегистрирован на ПЗГБ/3ГВ с включением 3ГВ 23% ( $n = 78,72 \pm 4,81$ ). А наименьший – ПЗГБ/3ГВ с включением 3ГВ 13% ( $n = 62,96 \pm 6,60$ ). При увеличении содержания мономера 3ГВ количество клеток повышалось.

### 3.5 Окрашивание флуоресцентным красителем

С помощью метода флуоресцентной микроскопии удалось проанализировать прикрепление клеток к субстрату и характер распределения по поверхности. Использовали флуоресцентный краситель DAPI.

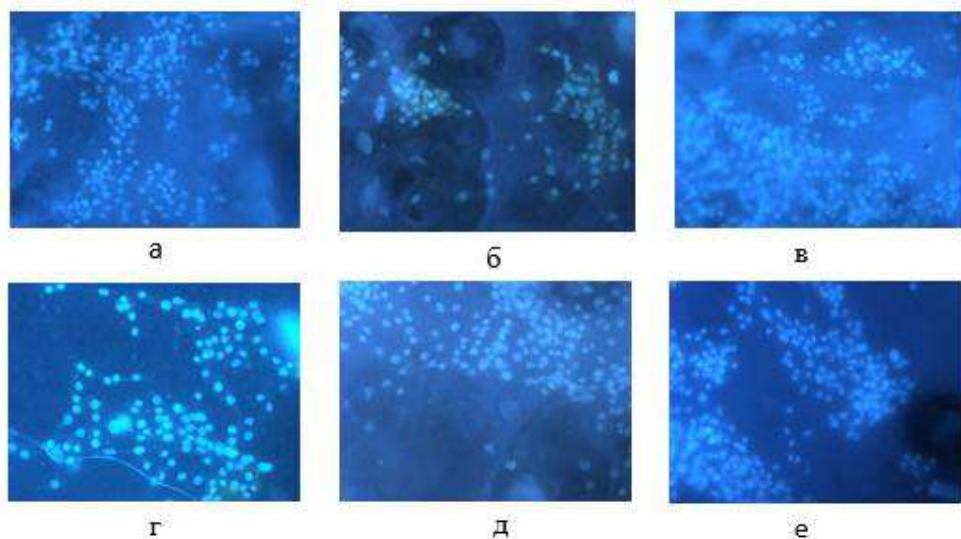


Рисунок 12 – Фибробlastы мыши линии NIH 3T3, окрашены флуоресцентным красителем DAPI, на клеточных матриксах из ПГА. а – ПЗГБ/4ГБ (23%); б - ПЗГБ/3ГВ (13%); в – ПЗГБ/3ГВ (23%); г – ПЗГБ/3ГГ (14%); д – ПЗГБ/4ГБ (10%); е – ПЗГБ.

Результаты флуоресцентного окрашивания показали, что клетки равномерно распределены по поверхности. В целом, абсолютно все

исследуемые матриксы поддерживают рост и клеточную адгезию. Но стоит отметить, что образцы ПЗГБ/3ГВ и ПЗГБ/4ГБ (23%) обладают наилучшими свойствами для адгезии и пролиферации фибробластов, что подтверждается экспериментальными данными флуоресцентного окрашивания и МТТ-теста. Выявленные результаты свидетельствуют о пригодности ПГА для выращивания клеток *in vitro*.

## **Выводы**

1. Получены и исследованы клеточные матрицы в виде пленок на основе ПГА разного химического состава: ПЗГБ, ПЗГБ/ЗГВ с включением 3-гидроксивалерата 13% и 23%, ПЗГБ/ЗГГ с включением 3-гидроксигексаноата 14%, ПЗГБ/4ГБ с включением 4-гидроксибутиратом 10% и 23%.

2. Доказано, что полученные пленки ПГА в зависимости от химического состава обладают различной структурой поверхности. Включение мономеров ЗГВ и 4ГБ приводит к снижению краевого угла смачивания ( $66,05 \pm 3,14^\circ$  и  $68,55 \pm 1,51^\circ$ ) пленок и повышению шероховатости (360 и 363 нм), в отличие от более гладких и гидрофобных пленок ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГГ. По данным физико-механических испытаний установлено, что сополимерные пленки на основе ПЗГБ/4ГБ обладают эластичными свойствами, что подтверждено значениями удлинения при разрыве (10 – 11%) в отличие от прочных пленок на основе ПЗГБ, ПЗГБ/ЗГВ, ПЗГБ/ЗГГ.

3. Доказано, что свойства поверхности клеточных матриц влияют на адгезию и рост фибробластов мыши линии NIH 3T3, а именно при снижении краевого угла и уменьшении шероховатости до значений 249 и 281 нм наблюдается наибольший рост клеток, что подтверждается данными МТТ-теста и флуоресцентной микроскопии. Максимальное количество клеток зафиксировано на пленках ПЗГБ/ЗГВ с включением ЗГВ 23% и ПЗГБ/4ГБ с включением 4ГБ 23%.

## **Список литературы:**

1. Волова, Т. Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов // Учеб. Пособие. – Красноярск: ИПК СФУ, 2009. – с.
2. Saad B. Development of degradable polyesterurerethans for medical applications: in vitro and in vivo evaluations / B. Saad, T. D. Hirt, M. Welti // J Biomed Mater Res. – 1997. – p. 65–74.
3. Shishatskaya E. I. A comparative investigation of biodegradable polyhydroxyalkanoate films as matrices for in vitro cell cultures / E. I . Shishatskaya, T. G. Volova // J Mater Sci-Mater M. – 2004.
4. Esposti M. D. Highly porous PHB-based bioactive scaffolds for bone tissue engineering by in situ synthesis of hydroxyapatite / M. D. Esposti, F. Chiellini // Materials Science and Engineering: C. – 2019. – V. 100. – p. 286-296.
5. Севастьянов, В. И. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины / В. И. Севастьянов. // – 2014.
6. Шурыгина. И.А. Фибробласты и их роль в развитии соединительной ткани / И. А. Шурыгина, М. Г. Шурыгин, Н. И. Аюшинова // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – №3.
7. Левченко В. М. Сравнительная оценка морфофункциональных свойств фибробластов: дис. канд. биол. наук: 06.02.01 – Став. гос. аграрн. университет, Ставрополь, 2017. – 116 с.
8. Cortizo M. S. Biodegradable Polymers for Bone Tissue Engineering / M. S. Cortizo, M. S. Belluzzo // Industrial Applications of Renewable Biomass Products. – 2017. – p. 47-74.
9. Николаева, Е. Д Биополимеры для клеточной и тканевой инженерии / Е. Д Николаева // - Журнал Сибирского Федерального Университета. Серия: Биология. – 2014. – Т. 7. – С. 222-232.
10. Marguerite R. Chitin and chitosan: Properties and applications / R. Marguerite. // - Progress in Polymer Science. – 2006. – V. 31. – p. 603-632.

11. Sevda. S. Potential applications of chitosan in veterinary medicine / S. Sevda. M. C. Clure. // – 2004. – V. 56. – p. 1467-1480.
12. Bayón, B. Biopolymers from Wastes to High-Value Products in Biomedicine / B. Bayón. I. R. Berti. A. M. Gagneten // – 2017.
13. Patrulea. V Chitosan as a starting material for wound healing applications / V. Patrulea, V. Ostafe, G. Borchard, O. Jordan // – European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2015. – V. 97. – p. 417-426.
14. Selvan, N. K. Hydrogel based scaffolding polymeric biomaterials: Approaches towards skin tissue regeneration / N. K. Selvan, T.S. Shanmugarajan // – 2020.
15. Saurabh. B. Natural Polymers vs Synthetic Polymer / B. Saurabh // – Natural Polymer Drug Delivery Systems. – 2016. – p. 95-118.
16. William E. Synthetic Materials: Processing and Surface Modifications for Vascular Tissue Engineering / E. William, III King, A. Benjamin, Minden-Birkenmaier, L. Gary. // Tissue-Engineered Vascular Grafts. – 2020. –p. 1-50.
17. Benatti. B., Chapter 4 - Bioreabsorbable polymers for tissue engineering: PLA, PGA, and their copolymers / B.Benatti, A. F. Pattaro, A. A. Rodrigues, M. V. Xavier // Materials for Biomedical Engineering. Hydrogels and Polymer-Based Scaffolds – 2019. – p.83-116.
18. Волков А. В. Синтетические биоматериалы на основе полимеров органических кислот в тканевой инженерии / А. В. Волков / Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2005. – № 2. – С. 43-45.
19. Ramot. Y. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers / Y. Ramot, A. J. Domb, A. Nyska // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2016. – V. 107. – p. 153-162.
20. Kenneth S. Polymeric Biomaterials for Scaffold-Based Bone Regenerative Engineering / S. Kenneth, L. Jorge, E. Ivirico // Regenerative Engineering and Translational Medicine. – 2018. – p. 128-154.

21. Volova T. G. Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers // T.G. Volova, E. I. Shishatskaya, V.Sevastyanov / Biochemical Engineering Journal. – 2003. – V. 16. – p. 125-133.
22. Chen G. Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio-and materials industry / G. Q. Chen //Chemical Society Reviews. – 2009. – Т. 38. – №. 8. – С. 2434-2446.
23. Lalit K. Frontiers in Biomedical Engineering: PHA-Fabricated Implants / K. Lalit, S. N. Dhasmana // – p. 91-102.
24. Волова, Т. Г. Полиоксиалканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины. / Т. Г. Волова, В.И Севастьянов, Е. И. Шишацкая // – 2003.
25. Николаева, Е. Д Сравнительное исследование клеточных носителей, полученных из резорбируемых полигидроксиалканоатов различного химического состава / Е. Д Николаева, Е. И Шишацкая, К. Е Мочалов, Т. Г Волова, Э. Д Сински // - Клеточная и тканевая трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 6. – С. 54-63.
26. Shangguan, Y. Y. The mechanical properties and in vitro biodegradation and biocompatibility of UV-treated poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) / Y. Y. Shangguan, Y. W. Wang, // – 2006.
27. Bonartsev, A. P. Application of Polyhydroxyalkanoates in Medicine and the Biological Activity of Natural Poly(3-Hydroxybutyrate) / A. P. Bonartsev, G. A. Bonartseva, I. V. Reshetov, M. P. Kirpichnikov K. V. Shaitan // – 2019. – p. 4-16.
28. Шишацкая, Е. И. Клеточные матриксы из резорбируемых полигидроксиалканоатов / Е. И. Шишацкая // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007 – Т. 2, № 2 – С. 68-75.
29. Xiang, H. In vivo studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) based polymers: Biodegradation and tissue reactions / H. Xiang, K. Y. Zhang, G.Q.Chen // Biomaterials. – 2006. – V. 27. – p. 3540-3548.

30. Chee, J. W. The influence of copolymer ratio and drug loading level on the biocompatibility of P(3HB-co-4HB) synthesized by Cupriavidus sp. (USMAA2-4) / J. W. Chee, A. A. Amirul, // Biochemical Engineering Journal. – 2008. – V. 38. – p. 314-318.

31. Боровкова Н. В. Исследование биологической совместимости пленок и нетканых мембран из сополимера 3-гидроксимасляной и 4-гидроксимасляной кислот в культурах *in vitro* / Н. В. Боровкова, А. К. Евсеев, Е. Д. Николаева, Д. Б. Гончаров // Сибирский Федеральный Университет. – 2016. – С. 43-52.

32. Hu, Y. H. Biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) with bone marrow mesenchymal stem cells /Y. J. Hu, X. Wei, Y. S. Liu, G. Q. Chen // Acta Biomaterialia. – 2009. – V. 5. –1115-1125.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

институт

Базовая кафедра биотехнологии

кафедра

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

Т. Г. Волова

подпись

«26 » июня 2020г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 Биология

код и наименование специальности

Культивирование фибробластов на полимерных матрицах из ПГА разного химического состава  
тема работы

Научный  
руководитель:

подпись

доцент, к.б.н.

должность, ученая степень

А. А. Шумилова

инициалы, фамилия

Выпускник

подпись

Н. А. Токмина

инициалы, фамилия

Красноярск 2020