

Б16/2

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

Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии
институт
Базовая Кафедра Биотехнологии
кафедра

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
М. Волова Волова Т. Г.
« 10 » июня 2016 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА
06.03.01.11 «Биоинженерия и биотехнология»
код – наименование направления

Конструирование и исследование пористых матриц на основе ПЗГБ для
реконструкции дефектов костной ткани
тема работы

Руководитель *М. Волова* профессор д.б.н. Волова Т.Г.
подпись, дата Должность, ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник *А.Е.* Анисимова А.Е.
подпись, дата инициалы, фамилия

Красноярск 2016

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА I. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	5
1.1. Биоматериалы для тканевой инженерии кости.	5
1.2. Способы получения пористых матриц.....	11
1.3. Полигидроксиалканоаты (ПГА).....	16
ГЛАВА II. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	21
2.1. ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	21
2.2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	22
2.2.1. Свойства поверхности.....	22
2.2.2. Влагопоглощение, открытая пористость	22
2.2.3. Физико-механические характеристики	23
2.2.4. Остаток порообразующих веществ	23
2.2.5. Краевые углы	24
2.3. ИССЛЕДОВАНИЕ АДГЕЗИВНЫХ СВОЙСТВ 3D-МАТРИЦОВ В КУЛЬТУРЕ ММСК	24
2.3.1. Выделение и посев клеток на матрицы	24
2.3.2. МТТ-тест.....	24
2.3.3. Флуоресцентное окрашивание DAPI и FITC.....	25
2.3.4. Активность щелочной фосфатазы.....	25
2.4. СТАТИСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ.....	26
ГЛАВА III: РЕЗУЛЬТАТЫ.....	27
3.1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛУЧЕННЫХ ОБРАЗЦОВ.....	27
3.1.1. 3D-матрицы полученные методом выщелачивания и лиофилизации	27
3.1.2. 3D-матрицы полученные методом прямого холодного прессования	29
3.1.3. 3D-матрицы полученные методом спекания.....	30
3.2.1. РЭМ поверхности полученных 3D-матриц.....	31
3.2.2. Результаты исследования краевых углов смачивания водой.....	33
3.2.3. Открытая пористость и влагопоглощение	34
3.3. ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОЛУЧЕННЫХ ОБРАЗЦОВ	35
3.4. ИССЛЕДОВАНИЕ АДГЕЗИОННЫХ СВОЙСТВ СКОНСТРУИРОВАННЫХ ПОРИСТЫХ 3D-МАТРИЦОВ В КУЛЬТУРЕ ММСК КОСТНОГО МОЗГА	39
3.4.1. МТТ-тест, активность щелочной фосфатазы.....	39
3.4.2. Окрашивание флуоресцентными красителями DAPI и FITC.....	42
ВЫВОДЫ.....	45
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	38
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	39

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Восстановление дефектов костной ткани с помощью новейших материалов и технологий является одной из актуальных задач современной медицины [9]. Связано это с высоким уровнем травм опорно-двигательного аппарата и других заболеваний костной ткани, имеющих важное социально-экономическое значение [9]. Так, дегенеративные и воспалительные проблемы костной ткани составляют половину всех хронических заболеваний у людей старше 50 лет в развитых странах [34].

Предпочтение в костно-пластической хирургии отдается пористым конструкциям на базе биосовместимых материалов, обеспечивающих их быструю инфильтрацию в среде живого организма. Архитектура пористой структуры должна позволять распространяться жидкости, главным образом, питательным веществам и продуктам метаболической активности клеток, в пределах всей конструкции. Формирующаяся костная ткань прорастает в поры конструкции и образует крепкую связь с костью. Пористая структура обеспечивает матриксу (скаффолду) более высокий уровень остеointegratивных процессов, в связи с увеличением сорбционной способности и увеличением общей площади частиц. Для получения пористых структур часто используют биокерамику, синтетические полимеры и биodeградируемые полимеры на основе полимолочной и полигликолевых кислот. Однако высокая скорость биodeградации последних, не адекватная росту кости, и влияние продуктов распада таких полимеров (молочная кислота) на окружающие ткани, ограничивает их использования, и способствует дальнейшему поиску и разработки новых материалов.

Среди которых особое место занимают биоматериалы микробиологического происхождения – полимеры β - и γ -гидроксимасляной кислот, которые относятся к классу перспективных природных биоматериалов – полигидроксиалканоаты (ПГА) [8]. Имплантаты на основе ПГА имеют выраженные остеопластические свойства, замедленно деградируют *in vivo*, тем

самым обеспечивая корректное течение восстановления дефектов костной ткани.

Цель работы

Получить 3D-матрицы на основе поли-3-гидроксибутирата и исследовать их способность поддерживать рост и дифференцировку ММСК (Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки) костного мозга.

Для достижения заданной цели были поставлены следующие задачи:

1. Сконструировать серию пористых 3D-матриц на основе ПЗГБ с помощью методов: выщелачивания, лиофилизации, спекания, прямого холодного прессования, с последующим удалением порообразователей.
2. Исследовать структуру и свойства поверхности полученных 3D-матриц.
3. Исследовать физико-механические свойства.
4. Оценить способность 3D-матриц поддерживать рост и дифференцировку ММСК костного мозга.

ГЛАВА I. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Биоматериалы для тканевой инженерии кости.

Восстановление дефектов костной ткани является одним из самых сложных и относительно медленных процессов.

Костная ткань – частный вид соединительной ткани, являющийся главной составляющей частью кости. Она ответственна за формирование костных пластинок. Клеточные составляющие костной ткани представлены следующими видами клеток: остеобластами, остеоцитами и остеокластами.

Остеобласты – клетки костной ткани, принимающие участие в формировании межклеточного вещества. Они отвечают за синтез белков матрикса, таких как остеопротейн, остеокальцин, сиалопротейн, остеоонектин и др., ферменты: щелочная, кислая фосфатаза, коллагеназа; коллагеновые волокна. Эти продукты синтеза после переходят в межклеточное вещество [16]. Специфичностью остеобластов является наличие сильно-развитого аппарата белкового синтеза и эндоплазматического ретикулума [3].

Остеоциты – взрослые отростчатые клетки костной ткани, составляют 90-95% от общего объема клетки костной ткани, являются наиболее распространенными и долгоживущими клетками, с продолжительностью жизни до 25 лет [34]. Они производят компоненты межклеточного вещества и, как правило, замурованы в нем, а вокруг клеток в лакунах находится межклеточная жидкость. Остеоциты формируются из остеобластов при формировании костной ткани. В сравнении с остеобластами, их синтетический аппарат развит слабее [16].

Остеокласты – крупные многоядерные клетки костной ткани, их главной функцией является рассасывание обызвествленного хряща и межклеточного вещества костной ткани в процессе преобразования и развития кости. Помимо этого, остеокласты способны синтезировать РНК и белки, однако в остеокластах этот процесс протекает менее интенсивно, чем у остеобластов, из-за того, что у них слабо развит эндоплазматический ретикулум и содержится

низкое число рибосом, но вместо этого у них присутствует большое количество лизосом и митохондрий [3].

Межклеточное вещество кости образовано коллагеновыми волокнами (преимущественно коллаген I типа) и основным (аморфным) веществом, состоящим из 30% органических и 70% неорганических веществ. Органическими веществами кости являются гликозаминогликаны, протеогликаны. Неорганическими веществами преимущественно являются ионы фосфата и кальция в основном, в виде кристаллов гидроксиапатита. Также некоторое количество неорганического вещества представлено ионами натрия, калия, цитрата, бикарбоната, магния, карбоната, флюорита, цинка, бария и стронция. [1;16;36]. Межклеточное вещество представляет собой сложную и организованную основу, которая обеспечивает механическую поддержку и оказывает важную роль в гомеостазе костной ткани. [36]. Если организм еще молодой, то количество органических веществ будет больше, именно этим объяснено то, что кости молодых организмов наиболее гибкие, нежели у взрослых.

Ремоделирование кости является весьма сложным процессом, который осуществляется за счет согласованных действий остеобластов, остеоцитов и остеокластов. Образование, пролиферация, дифференцировка и активность этих клеток находятся под контролем местных и системных факторов. Местные факторы включают аутокринные и паракринной молекулы, такие как факторы роста, цитокины и простагландины, продуцируемые клетками костной ткани которые выделяются во время резорбции кости. Системные факторы, имеют важное значение для поддержания гомеостаза кости включают паратиреоидный гормон, кальцитонин, глюкокортикоиды, андрогены и эстрогены. [36].

Кость как орган слагается в основном из пластинчатой костной ткани, снаружи и со стороны костномозговой полости она покрыта соединительнотканными оболочками (периост - снаружи, эндост - внутри). В полости кости располагаются красный и желтый костный мозг, кровеносные, лимфатические сосуды и нервы [16].

Надкостница, или периост – тонкая соединительнотканная оболочка кости, состоит из наружного (плотная волокнистая соединительная ткань) и внутреннего слоя (рыхлая волокнистая соединительная ткань). Внутренний слой включает в себя остеогенные камбиальные клетки преостеобласты, остеобласты. Периост участвует в процессах клеточного питания костной ткани, ее развитии, росте и регенерировании. На границе с суставным хрящом, покрывающим концы кости, надкостница переходит в надхрящницу (перихондрий). Надхрящница это тонкий, но плотный поверхностный слой хрящевой ткани на растущей кости, обеспечивает рост и питание хряща. Суставные поверхности эпифизов не имеют надкостницы и надхрящницы. Эндост – внутренняя оболочка, где имеются остеобласты и остеокласты [16].

Пластинчатая костная ткань (тонковолокнистая) – преобладающий вид костной ткани в сформировавшемся организме. Имеет следующее строение: остециты и межклеточное вещество (состоит из коллагеновых и оссеиновых волокон и аморфного вещества). Межклеточное вещество представлено пластинками толщиной 3-10 мкм. В пластинке волокна расположены параллельно друг другу, а волокна соседних пластинок располагаются под углом друг к другу. Между пластинками находятся тела остецитов, расположенных в лакунах, а костные каналы с отростками остецитов проникают в пластинки под углом в 90 градусов [16]. В зависимости от уплотнённости размещения костных пластинок выделяется компактное костное вещество и губчатое костное вещество [3]. В губчатом костном веществе костные пластинки являются прямыми, они же входят в состав трабекул – комплекс из двух-трёх пластинок расположенных параллельно друг другу. Эти комплексы сдерживают полости заполненные красным костным мозгом. В сравнении с компактным веществом, губчатое костное вещество имеет большую площадь поверхности, лёгкость, меньшую плотность и прочность, она формирует эпифизы трубчатых костей и практически весь объём губчатых костей [16;36]. В компактном костном веществе, помимо прямых пластинок присутствуют так же концентрические пластинки образующие остеоны,

которые придают большую плотность и прочность. Помимо защитной функции, компактное костное вещество так же является хранилищем химических элементов [16;36].

Хотя костная ткань это высоко васкуляризованная ткань, имеющая способность к регенерации, в критические моменты нельзя обойтись без клинического вмешательства. Ряд синтетических и природных полимеров, а также металлы и керамики разработаны и определены в качестве биоматериалов для инженерии костной ткани. Биоматериалы для применения в данной задаче должны обладать определенными физическими, химическими и биологическими свойствами. Биоматериалы так же должны обладать важными свойствами: биосовместимости, биоактивности и остеоиндукции [34].

Металлические материалы, применяются в силу своей высокой механической прочности. Первые металлические материалы, успешно используемые в течение двадцатого века в ортопедических направлениях, были из нержавеющей стали, основанной на кобальт-хромовом сплаве. Материалы из нержавеющей стали стойкие к широкому спектру коррозионных агентов из-за их высокого содержания Cr (больше чем 12% общего веса). Нержавеющие стали широко используются в травматологических временных устройствах, из-за их относительно низкой стоимости, доступности и простоты обработки. Наиболее широко используются для изготовления и внедрения аустенитные нержавеющие стали. Чтобы быть аустенитной при комнатной температуре, нержавеющая сталь должна содержать определенное количество элементов стабилизации аустенита, таких как никель или марганец. Главным преимуществом таких сталей являются: прочность, пластичность, коррозионная стойкость. Титан и его сплавы стали очень интересными материалами в биомедицинской области, из-за их превосходных свойств, которые включают умеренный упругий модуль приблизительно 110 Гпа, хорошую устойчивость к коррозии и низкую плотность. Сплавы с памятью формы, из никеля и титана (нитинол), открыли целый ряд новых применений. Их упругое восстанавливаемое напряжение может достигнуть до 10 процентов, в то время

как для упругих металлических материалов это – приблизительно 0.1 процента [4;34].

Керамические материалы, показывают долгие темпы изнашивания, превосходную устойчивость к коррозии, хорошую биологическую совместимость, стойкость к воздействию высоких температур и высокую твердость, но одним из недостатков, ограничивающим ее использование, является ломкость. Для улучшения качества материала изменили требования к конструкции, сейчас их применяют в сочетании с металлами, они как раз и придают недостающую механическую прочность [34].

Множество разработок, посвящены созданию биорезорбируемых материалов с высокими механическими свойствами, они используют в качестве полимерной основы природные полимеры: полилактиды (ПЛК), полигликолиды и полигидроксиалканоаты (ПГА). Самым распространённым из семейства ПГА является полигидроксибутират (ПГБ) [12]. ПГБ используется для инженерии костной ткани, так как способствует благоприятной адаптации костной ткани без признаков нежелательного хронического воспалительного ответа после имплантации его в организм [21].

Последние усилия были направлены в направлении разработки гибридных биоматериалов. Это комбинация двух или более биоматериалов, с расширенными функциональными возможностями, в виде сополимеров, смеси полимеров, или полимерно–керамических композитов. Они считаются передовым классом биоматериалов, которые являются наиболее оптимальными для применения реконструктивных каркасов костной ткани [26].

После установления способности коллагена стимулировать регенерацию костной ткани началось получение и изучение биокомпозиционных материалов, содержащих одновременно коллаген и гидроксиапатит. В клинических условиях было показано, что при использовании такого биокомпозиата, резко возрастает скорость заживления костных ран и практически исключается риск послеоперационных воспалительных осложнений [9].

Сополимеры определяются как полимеры, молекулы которых содержат звенья мономеров различного химического состава. Например, сополимер молочной и гликолиевой кислот (ПЛГА), получен из полилактида, который показывает температуру стеклования выше комнатной температуры с неоправданно длительным временем деградации и полигликолида, который отображает температуру стеклования ниже комнатной температуре и с более коротким временем деградации. Развитие такой системы совместного полимера ПЛГА позволяет варьировать настройки температуры стеклования и деградации на основе необходимости [26]. Или же сополимер 3-гидроксibuтирата/4-гидроксibuтирата, для которого характерна высокая скорость биodeградации *in vivo*, он является эластомером, имеет более высокие показатели удлинения при разрыве и относительно высокий предел прочности на разрыв в отличие от большинства общеизвестных полимеров класса ПГА [18].

Полимерные смеси включать в себя смесь из двух полимеров. Выбирая полимеры с требуемыми межмолекулярными или Ван-дер-Вальсовыми взаимодействиями, можно разработать систему смеси с улучшенными свойствами. Сополимер молочной и гликолиевой кислот в сочетании с полифосфазенами являются ярким примером. Известно, что биоматериалы с ПЛГА производят кислотные побочные продукты при разрушении, и это являлось серьезной проблемой, поскольку длительное воздействие на ткани кислых продуктов могло привести к некрозу тканей и потере имплантата. С другой стороны, полифосфазены производят нейтральные или основные продукты при деградации. Поэтому ПЛГА был смешан с широким разнообразием полифосфазена для получения новых биоматериалов с почти нейтральными продуктами распада [26].

Композитные материалы являются привлекательными кандидатами для применений в инженерии костной ткани, поскольку костная ткань так же является, по сути, композитным материалом, состоящим из смеси

неорганических кристаллов гидроксиапатита и органических волокон коллагена.

1.2. Способы получения пористых матриц

Из-за хорошей растворимости некоторых полимеров в неполярных растворителях есть допустимость использования полимерных растворов для изготовления пористых матриц. Растворяющая заливка позволяет получить пористые структуры с регулярной пористостью, но с ограниченной толщиной. Этот метод включает растворение полимера в подходящем растворителе и заливки полученного раствора, в определенную заранее 3D форму, заполненную порообразующими частицами. Такими порообразователями могут быть неорганическая соль как поваренная соль, кристаллы сахарозы, желатина или парафиновые шарики [35]. Размеры порообразующих частиц и отношение полимера к порообразователю непосредственно влияют на размер пор и пористость конечной структуры. После растворения раствор полимера отливают, растворитель испаряется, оставляя матрицу полимера с порообразующими частицами. После этого структуру в форме погружают в ванну с жидкостью, например вода или алифатический растворитель, подходящий для того, чтобы вымыть только порообразователь. Как только порообразователь удалён из матрицы, пористая структура считается полученной. При использовании данной техники могут быть получены высокопористые матрицы с пористостью до 93% и средними диаметрами пор до 500 мкм. Основное преимущество этого метода – простота изготовления, без необходимости специального оборудования. Кроме того, этот метод допускает реализацию большого диапазона размеров пор. Недостатком является то, что из-за необходимости удаления растворимых частиц в полимерной матрице, она может быть использована только для производства тонких мембран или 3D образцов с толщиной до 2 мм. Также трудно предотвратить скопление порообразующих частиц и достигнуть их равномерного распределения в форме. Другой недостаток представляется в использовании органических

растворителей – они должны быть удалены, чтобы избежать любого возможного повреждения посеянных клеток. Так же можно использовать заранее созданные 3D формы: их пропитывают полимерным раствором, после того как полимер высохнет и закрепится – остатки порообразователя вымываются. В этом случае возможная толщина требуемого матрикса может быть увеличена и идет более равномерное распределение порообразующих частиц [35].

Следующий возможный метод получения пористых матриксов: лиофильная или сублимационная сушка веществ. Ее суть состоит в удалении влаги из замороженных образцов при условиях вакуума. Принцип работы лиофильной сушки основан на физическом явлении возгонки. Если значения атмосферного давления ниже определенного порога, то вода может существовать только в двух агрегатных состояниях – твердом и газообразном, жидкое состояние при таких условиях не возможно. И если парциальное давление водного пара в окружающей среде будет ниже парциального давления льда, в котором находится необходимый раствор, то лед из образцов переведется только в газообразное состояние, исключая жидкую фазу. Образовавшийся водяной пар удаляется из камеры лиофильной сушки специальным вакуумным насосом и концентрируется на низкотемпературном конденсоре. Такая сублимация кристаллов льда приводит к образованию очень пористой губки. Окончательная структура пор зависит от условий процесса во время изготовления, как рН, скорость замораживания и парциального давления. Быстрое, неконтролируемое замораживание приводит к неравномерному образованию и росту кристаллов льда и, следовательно, морфологической неоднородности каркасов. Полученные данным методом матриксы имеют очень пористые и взаимосвязанные структуры с мелкими порами. [24;35].

Еще одна применяемая технология основана на вспенивании газом. Сверхкритическая жидкость - состояние вещества, при котором исчезает различие между жидкой и газовой фазой; оно создается, когда вещество подвергается воздействию окружающей среды, где его критическая

температура и давление превышаются. В этих условиях, жидкие и газообразные компоненты материала становятся идентичными, и дальнейшее сжатие этой жидкой фазы не приведет к разжижению. CO_2 является наиболее широко применяемым, из-за его низкой токсичности, воспламеняемости и стоимости, а так же доступности, стабильности и экологической приемлемости. Кроме того, критические условия: 31°C и $73,8$ бар, легко достижимы. Данная технология с CO_2 может быть использована для изготовления высокопористых матриц. Для обработки макропористой структуры, полимерные диски подвергают воздействию высокого давления CO_2 (1-6 МПа) при комнатной температуре, чтобы произошло насыщение газом в полимере с образование однофазного раствора полимера-газа. Растворимость газов в полимере затем быстро снижается за счет снижения давления CO_2 при комнатном уровне, вызывая образование зародышей и рост пузырьков газа, образующих поры с размерами до 500 мкм. Преимущество этого метода состоит в том, что он не требует использования органических растворителей, которые, если не полностью удалены, могут поставить под угрозу биосовместимость матрикса с клетками. Основным недостатком является то, что он дает в основном несвязанную пористую структуру и непористую внешнюю поверхность, что является неблагоприятными условиями для выращивания клеток [35;40].

Так же используется технология инверсии (разделения) фазы. Однородную многокомпонентную систему получают путем смешивания полимерных порошков с этанолом при комнатной температуре. Для того, чтобы контролировать пористость получаемых каркасах изменяется соотношение полимерных порошков к этанолу. После полного перемешивания, смесь заливают в форму и обрабатывают ультразвуковой вибрацией. Затем пресс-форма перемещается в печь при температуре $80,1^\circ\text{C}$. Устанавливается термодинамическая нестабильность в гомогенном многокомпонентном растворе, который, при определенных условиях, имеет тенденцию распадаться на больше чем одну фазу, чтобы понизить полную свободную энергию. Инверсия фаз этанола, вызывается изменением температуры, которая

становится выше критической температуры кипения этанола, то есть этанол в жидкой фазе превращается в газообразную. Раствор распадается на две фазы, богатую полимером и бедную. Богатая полимером фаза укрепляется, бедная фаза удаляется, и остается очень пористая связанная сеть полимера. После полного затвердевания, пористая пена (бедная фаза) удаляется из пресс-формы и проводится ультразвуковая промывка в деионизированной воде в течение 24 часов, чтобы полностью ликвидировать остатки этанола [35].

Метод формования расплава включает заполнение пресс-формы порошком полимера и порообразующим компонентом с последующим нагреванием формы при температуре выше температуры стеклования полимера, прилагая давление в смеси. Эта процедура связывает друг с другом полимерные частицы. После пресс-формы удаляют, порообразователь вымывается и матрикс затем высушивают. Матрикс, полученные этим способом принимают облик пресс-формы. Методика формования расплава, хоть и способна производить 3D-матрикс, но ограничена сложностью в проектировании и строительстве пресс-формы. Это также может привести к ограничению взаимосвязанных сетей пор. Преимущества метода формования расплава включают в себя отсутствие растворителей в процессе изготовления каркасов, и независимый контроль морфологии и макроформы. Недостатки представлены в необходимости высокой температуры для обработки полимеров и возможность не полного удаления порообразователя [35].

Одной из современных технологий является 3D-биопечать. Для изготовления конструкции полимерные микрочастицы (50-100 мкм) суспензируют в водных жидкостях-носителях с образованием плотных паст, которые разливаются через биопечать и затем спекаются путем инкубации в увлажненной среде при температуре 37 °C в течение двух часов с последующим погружением в 0,9% (вес/объем) раствор хлорида натрия и затем в той же среде в течение еще 22 ч. Поры, полученные таким методом, в основном меньше, чем требуется, но многие из них достаточно большие, чтобы позволить движение и пролиферацию клеток в конструкциях [5;35;38].

Электроспиннинг – один из методов, с помощью которого можно создавать трехмерные пористые матриксы, с дополнительной возможностью: включением в их структуру лекарственных веществ. Электроспиннинг является эффективным способом производства волокон с нано- к микро- размером из различных природных и синтетических полимеров. Это вызвало большой интерес в области тканевой инженерии в качестве простых, недорогих средств для имитации нативных волокон. Метод электроспиннинга использует сильное электрическое поле для обработки раствора полимера в волокнистую конструкцию. При подаче высокого напряжения на капилляр, из которого вытекает раствор полимера, капля полимера деформируется в коническую форму, называемую Конусом Тейлора. Раствор полимера вследствие электростатического расталкивания расслаивается на нити, которые, переплетаясь, формируют пористую структуру на подложке. Как правило, полимер растворяют в органическом растворителе (например гексафторизопропанол) [5;35]. Полученный в результате электроспиннинга каркас состоит из тонких цилиндрических (с круглым поперечным сечением) или лентовидных (прямоугольное поперечное сечение) волокон с диаметром от 0,01 до 10 мм. Физические свойства таких матриксов, в том числе размер волокна, величина пористости, размер пор, отношение поверхности к объёму, а также механические свойства, зависят от параметров электроспиннинга. Матриксы, полученные таким методом, будут обладать высокой пористостью, сеть пор будет взаимосвязанной. Большая площадь поверхности матриксов к объёму делают их весьма способными для клеточной адгезии и роста. Однако поры являются слишком мелкими и не могут способствовать адекватной клеточной инфильтрации и вращанию ткани в пористую структуру [5;35].

Несмотря на веяние имеющихся технологий для создания макропористых 3D-матриксов, необходимо решить ряд проблем, прежде чем они могут быть применены в широком смысле для тканевой инженерии. Текущие методы, для изготовления пористых матриксов часто включают условия изготовления, которые слишком резки для клеток, чтобы они смогли

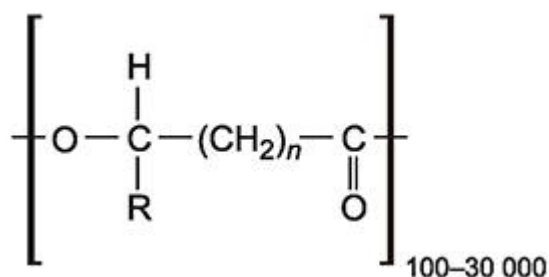
выжить, такие как избыточная высокая температура, чрезвычайное давление или использование органических растворителей. Большинство разработанных методов пока только позволяют изготавливать матриксы с предварительно фиксированной пористостью. В то время как низкая пористость предпочтительна для начальной структурной стабильности и защиты пересаженных клеток, то увеличенная пористость, в течение долгого времени, важна, чтобы приспособить эффективное врастание внутрь кровеносного сосуда, распространение питательных веществ, а также создающая пространство для пролиферации клеток.

Требования к размерам пор специфичны в зависимости от типа культивируемых клеток. У остеобластов маленькие поры вызовут состояние гипоксии и остеохондрозное состояние при костеобразовании, а более крупные поры обеспечат нормальное протекание остеогенеза и поспособствуют васкуляризации имплантата. (минимальный размер пор 100-150мкм) [32].

1.3. Полигидроксиалканоаты (ПГА)

Полигидроксиалканоаты – биоматериалы микробиологического происхождения – полимеры β- и γ-гидроксимасляной кислот и сополимеры β-гидроксимасляной с другими монокарбоновыми кислотами (валериановой, гексановой) [8].

Основные структуры полигидроксиалканоатов можно показать следующим образом:



n = 1 R = водород - поли (3-гидроксипропионат),

R = метил - поли (3-гидроксибутират),

R = этил - поли (3-гидроксивалерат),
R = пропил - поли (3-гидроксигексаноат),
R = пентил - поли (3-гидроксиоктаноат),
R = нонил - поли (3-гидроксидодеканоат),
n = 2 R = водород - поли (4-гидроксибутират),
n = 3 R = водород - поли (5-гидроксивалерат) [7].

Исходя из длины углеродной цепи гидроксикислот, образующих полимеры, полиоксиалканоаты подразделяют на три основные группы:

- короткоцепочечные, состоящие из кислот с длиной углеродной цепи от 3 до 5 углеродных атомов;
- среднецепочечные, в составе которых от 6 до 14 атомов углерода;
- длинноцепочечные, с содержанием кислот C_{17} и C_{18} [7].

Привлекательность и перспективность ПГА обусловлена наличием весьма существенных преимуществ этого класса биоматериалов:

1. Высокая биосовместимость ПГА;
2. ПГА не гидролизуются в жидких средах, т.к. деградация ПГА является истинной биологической и происходит клеточным и гуморальными путями; образующиеся при этом мономеры гидроксимасляной кислоты не вызывают резкого закисления;
3. скорости биорезорбции ПГА значительно ниже, чем полилактидов и полигликолидов, изделия из ПГА в зависимости от формы и места имплантации *in vivo* могут функционировать от нескольких месяцев до 2-3 лет, более того, скоростью деградации ПГА можно управлять;
4. ПГА получают методом прямой ферментации, их производство не требует серии технологических этапов (синтез мономеров, полимеризация, добавление пластификаторов и модифицирующих компонентов);
5. сырьем для синтеза ПГА могут быть сахара, органические кислоты, спирты, смеси CO_2 и H_2 , продукты гидролиза растительного сырья, промышленные отходы производства сахара, пальмового масла,

водородсодержащие продукты переработки бурых углей и гидролизного лигнина [7].

Первые и наиболее изученные ПГА, это – гомогенный полимер 3-гидроксимасляной кислоты (ПЗГБ), и сополимеры 3-гидроксibuтирата с 3-гидроксивалериатом (П(ЗГБ-со-ЗГВ)) – они относятся к короткоцепочечным ПГА.

ПЗГБ обладает высокой биосовместимостью, поскольку мономер, образующий этот полимер является естественным продуктом обмена веществ высших животных и человека и присутствует в крови последних [7]. ПЗГБ имеет широкий диапазон молекулярного веса, от сотен до млн. дальтон; степень кристалличности 70–75 %; температура плавления 170–180 °С; относится к термопластам; разрыв между температурой плавления и деградации составляет 80–100 °С; характеризуется высокими физико-механическими характеристиками; перерабатывается в изделия из растворов, порошков, расплавов, гелей [10]. Недостатком ПЗГБ является то, что он кристаллизуется неупорядоченно, поэтому его весьма сложно перерабатывать, а полученные изделия характеризуются низкой ударной прочностью, жесткостью и «старятся» во времени [15].

Сополимеры ЗГБ и ЗГВ (ПЗГБ/ПЗГВ) в отличие от гомогенного ПЗГБ обладают сниженной степенью кристалличности, поэтому изделия, изготовленные из них, обладают большей эластичностью и механической прочностью [15].

С ПГА связаны большие надежды, т. к. помимо термопластичности, ПГА обладают антиоксидантными и оптическими свойствами и характеризуются высокой биосовместимостью и биоразрушаемостью в биологических средах [3].

Многие природные продуценты ПГА, такие как *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Rhodococcus ruber* и *Syntrophomonas wolfei*, могут синтезировать широкий спектр ПГА в зависимости от источника углерода и условий культивирования. Список микроорганизмов, способных

культивировать ПГА, насчитывает более 300 организмов; он включает природные и генетически модифицированные штаммы [7].

Cupriavidus necator (ранее *Wautersia eutropha*, *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*) – наиболее изученный представитель ПГА-синтезирующих микроорганизмов, потому что эти бактерии могут накапливать до 80-90% ПЗГБ на простом углеродном субстрате. При фосфорном или азотном лимите *C. necator* синтезирует большое количество ПЗГБ на простых углеродных субстратах, таких как глюкоза и фруктоза. Когда к глюкозе добавляли пропионат натрия или валериат натрия, то бактерии синтезировали гетерополимер поли (3-гидроксibuтират-со-3-гидроксивалериат (П(Згб-со-ЗГВ))). [7]

Бактерии *Ralstonia eutropha* относятся к перспективным продуцентам, так как они аккумулируют ПГА с высокими выходами на различных субстратах, включая отходы промышленных и сельскохозяйственных производств. Доминирующим мономером в ПГА, синтезируемых природным штаммом *R. eutropha*, является короткоцепочечный 3-гидроксibuтират, выходы которого могут составлять до 80-90% от веса сухой биомассы. [7]

Производства ПГА в настоящее время осваивают или планируют практически все развитые страны, однако решающим для начала широкомасштабного получения и применения является снижение их стоимости. Так, промышленный процесс синтеза гомополимера 3-гидроксимасляной кислоты реализуется в Австрии, где в качестве продуцента используют *Alcaligenes latus*, синтезирующий ПЗГБ с содержанием до 90 %. В качестве сырья используют различные соединения, включая отходы [11].

Свойствами ПГА (кристалличность, механическая прочность, температурные характеристики, скорости биораспада) можно управлять, варьируя в процессе ферментации состав среды и задавая ту или иную химическую структуру [7].

Касательно ПГА имеются публикации, в которых продемонстрировано, что эти полимеры как самостоятельно, так и в композиции с керамиками,

применимы для выращивания различных клеток, включая остеобласты в культуре *in vitro* [18;29;39].

К настоящему времени полиоксиалканоаты используются для изготовления хирургических имплантатов, используемых в стоматологии и ортопедической хирургии [5;29]. Опубликованы результаты, об исследовании композиционных конструкций из ПГА и синтетического гидроксиапатита (ГА), имплантированных в модельные дефекты костной ткани лабораторных животных [13;25;33].

Из-за своей ограниченной доступности, ПГА остаются в значительной степени неисследованными, но эти полимеры представляют широкий спектр свойств, которые простираются далеко за пределы тех, которые в настоящее время предлагают их синтетические аналоги [43].

ГЛАВА II. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования являются пористые 3D-матрицы, полученные методами: выщелачивания, лиофилизации, прямого холодного прессования и спекания.

В качестве материала для получения 3D-матриц, использовали гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты, поли-3-гидроксибутират. (ПЗГБ). С молекулярной массой (M_n) 760 ± 15 кДа, полидисперсностью (\bar{M}_w) $1,60 \pm 0,03$ кДа, кристалличностью (C_x) $76 \pm 1,3$ %, температура плавления $170-180$ °С; ПЗГБ по своим базовым показателям близок к синтетическим термопластикам, но так же обладает свойствами биосовместимости и биоразлагаемости.

Первый тип матриц был получен методом выщелачивания. Следующий тип матриц был получен с помощью сублимационной сушки. Третий тип получен методом прямого холодного прессования. Четвертый тип получали методом спекания порошка.

[Изъята 1 страница]

2.2. Методы исследования

2.2.1. Свойства поверхности

Микроструктуру поверхности полимерных изделий исследовали с применением сканирующей электронной микроскопии (микроскоп HITACHI TM-3000, Япония)

2.2.2. Влагопоглощение, открытая пористость

Данный метод основан на определении объема воды, заполняющей практически все поры матриц при периодическом механическом встряхивании. Избыток воды из промежутков в матрицах удаляют путем отсасывания при разрежении 80 ± 5 мм вод.ст.

Подлежащую испытанию сухую пробу взвешивают с точностью до 0,001 г. Затем взвешенный образец вносят в коническую колбу емкостью 200-250 мл и заливают 100 мл дистиллированной воды. Содержимое тщательно перемешивается на магнитной мешалке для более интенсивного заполнения пор в течение 15 ± 1 мин.

На дно воронки Бюхнера аккуратно укладывают бумажный фильтр и смачивают водой. После этого в системе создают разрежение 80 ± 5 мм вод.ст. В колбе создается разрежение и фильтр плотно присасывается ко дну воронки.

Испытуемый образец переносят в воронку Бюхнера и начинают отсасывание. Одновременно пускают секундомер. Во время отсасывания поддерживается разрежение 80 ± 5 мм.вод.ст. Через 3 мин прекращают отсасывание и взвешивают образец.

Влагопоглощение EWC (%) образцов определяли по формуле:

$EWC = (W_s - W_d) / W_s * 100$, где: W_d - вес высушенного образца, W_s - вес образца после экспозиции в жидкости.

Открытую пористость V_{Σ} (см³/г) вычисляют по формуле:

$V_{\Sigma} = (G_{в.м} - G_{с.м}) / G_{с.м} * \rho_{в}$, где: $G_{с.м}$ – вес сухого матрикса, г; $G_{в.м}$ – вес влажного матрикса, г; $\rho_{в}$ – плотность воды, г/см. Плотность воды принята равной 1 г/см, что при точности данного метода справедливо для любой комнатной температуры до 35°C.

2.2.3. Физико-механические характеристики

Физико-механические характеристики на сжатие и изгиб исследовали с помощью универсальной тестовой машины Инстрон 5565, 5KN; Использовали кубики размером 1×1 см², высотой 7 мм (выщелачивание сахарозы); пластины размером 3,8×2 см, высотой 1,4 мм (прямое холодное прессование); цилиндры диаметром 1,1 см, высотой 5 см (спекание).

2.2.4. Остаток порообразующих веществ

Полученные образцы, помещали в пробирки, заливали 10 мл дистиллированной воды. После образцы центрифугировали (Centrifuge 5810 R Eppendorf) в течение 2 минут при скорости 6000 оборотов в минуту. Затем, в пять пробирок наливаем по 2 мл ферментнохромогенной смеси.

1 пробирка – добавляем 40 мкл дистиллированной воды,

2 пробирка – добавляем 40 мкл калибратора,

3 пробирка – добавляем 40 мкл надосадочной жидкости;

4 пробирка – добавляем 40 мкл надосадочной жидкости;

5 пробирка – добавляем 40 мкл надосадочной жидкости.

Оставляем на 25 минут при комнатной температуре. Через 5-10 минут после начала инкубации пробирки интенсивно встряхиваем вручную.

Измеряем ОП во 2,3,4,5 пробирках на ФЭКе (длина волны – 490 нм, кювета 5мм.)

Высчитываем концентрацию сахарозы по следующей формуле:

$$K = (O_{Попытной} / O_{Калибратора}) * 9$$

При обнаружении остатков сахарозы в образцах, матриксы повторно промывали в воде, затем вновь проводили измерения, повторяя до тех пор, пока сахара полностью не выйдет из образцов.

2.2.5. Краевые углы

Поверхностные характеристики полимерных изделий оценивали с помощью прибора для измерения краевых углов DSA-25E («*Krüß*», Германия) с использованием программного обеспечения DSA-4 для *Windows*. На поверхность образца с помощью микрошприцов поочередно наносили капли воды и диодметана объемом 1,5 мкл с видеофиксацией моментов взаимодействия каждой жидкости с поверхностью образца.

2.3. Исследование адгезивных свойств 3D-матриков в культуре ММСК

2.3.1 Выделение и посев клеток на матриксы

Функциональные свойства матриков исследованы в культуре мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) крыс. Суспензия клеток выделяли в стерильных условиях из костного мозга бедренной кости молодой крысы линии Wistar сразу после декапитации. Культивирование проводили в среде ДМЕМ с добавлением 20 % ЭТС и раствора антибиотиков. После 3 пассажей проводили рассев клеток на стерильные матриксы из расчета 3×10^4 клеток/мл.

2.3.2 МТТ-тест

Для МТТ-теста изначально приготовили раствор 5мг/мл МТТ, растворённого в натрий-фосфатном буфере, после приготовления раствор стерилизовали фильтрацией через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

В планшете (24 лунки), с культивируемыми на матриксах клетками, заменяли питательную среду на новую (950мкм) и добавляли 50 мкм МТТ и затем, культивировали в течение 4 часов в темноте при температуре 37°C в термостате с CO₂.

По истечению 4 часов, из лунок удалили всю среду и добавили 150 мкм диметилсульфоксида, содержимое лунок пипетировали и после по 100 мкл из каждой лунки перенесли в 96-луночный планшет. На микропланшетном фотометре Bio-Rad 680 («Bio-Rad LABORATORIES Inc.») измеряем

оптическую плотность, при длине волны 490 нм. Количество клеток оценивали по калибровочному графику.

2.3.3 Флуоресцентное окрашивание DAPI и FITC

Окрашивание клеток на матриксах проводили флуоресцентными красителями DAPI и FITC. Для окрашивания клеток изначально удалили питательную среду, затем матриксы промыли фосфатным буфером, клетки на матриксах фиксировали 10% раствором формалина в течение 5 минут и вновь промывали фосфатным буфером. После клетки обрабатывали раствором Triton-X (1% раствор в фосфатном буфере) в течение 5 минут, промывали фосфатным буфером. После окрашивали раствором FITC (50 мкг на 1 мл деионизированной воды) по 1 мл на каждый образец. Экспонировали в течение часа при комнатной температуре. Этот краситель окрашивает цитоплазму клеток. Затем проводится окраска раствором DAPI. Раствор DAPI разводили в соотношении 1 мкг красителя на 1 мл деионизированной воды. К каждому матриксу добавили по 50 мкл. Экспонировали 15 минут, после снова промыли фосфатным буфером и микрокопировали. При помощи данного красителя окрашивается вся ядерная ДНК клетки. Микрокопирование проводилось на микроскопе Leica DM 6000 В. Окрашивание проводили на 14 сутки.

2.3.4 Активность щелочной фосфатазы

Для подтверждения дифференцировки ММСК костного мозга в остеобласты использовали маркер: активность щелочной фосфатазы. Активность щелочной фосфатазы культивируемых клеток регистрировали с использованием набора «Alkaline Phosphatase Detection Kit» (Sigma). Изначально исследуемые образцы с клетками помещали в лизисный буфер (NaCl 250 мМ, 0,1 % Triton-X 100, Hepes 50 мМ, pH 7,5) и подвергали 3 циклам замораживания и оттаивания для полного разрушения клеток. В 96-луночный планшет переносили по 20 мкл полученного клеточного лизата каждого образца, инкубировали 20 минут при 65°C, охлаждали и в каждую лунку

добавляли по 20 мкл буфера разведения и 160 мкл флуоресцентного буфера, входящих в состав набора. Затем добавляли по 1 мкл субстрата и измеряли интенсивность флуоресценции на мультимодальном микропланшетном люминометре Mithras LB 940 (BERTHOLD TECHNOLOGIES, Германия) при λ_{ex} 360 нм и λ_{em} 440 нм. Активность ЩФ оценивали по заранее подготовленному калибровочному графику. Измерение проводили на 7 и 14 сутки.

2.4. Статистические методы

Обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel. Вычислялась средняя арифметическая, коэффициент достоверности существующей разницы (t) и вероятность ошибки (p). При нормальном распределении использовали t-критерий Стьюдента для сравнения средних величин, определения погрешности измерений, достоверности различий параметров между исследуемыми группами. Различия между группами считали достоверными при $t > 2$ и $p < 0,05$.

ГЛАВА III: РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Характеристика полученных образцов

Предпочтение при выборе имплантатов для остеопластики отдается изделиям пористой структуры. Пористые имплантаты обладают большей сорбционной способностью для притока субстратов и отведения продуктов обмена клеток в формирующихся тканях, большей площадью поверхности и совокупного объема, что положительно влияет на эффективность остеointegrативных процессов и костеобразование (Шумилова А.А., 2015).

Для получения пористых скаффолдов из ПЗГБ исследовали разные технологии: выщелачивание, лиофилизация, прямое холодное прессование, спекание.

3.1.1. 3D-матрицы полученные методом выщелачивания и лиофилизации

Методом выщелачивания порообразующих частиц (сахарозы) из растворов ПЗГБ различной концентрации получены макропористые 3D-матрицы размером $1 \times 1 \text{ см}^2$, высотой 7 мм., массой 60 мг (Рисунок 1).



Рисунок 1. Внешний вид макропористых 3D-матриц, полученных методом выщелачивания сахарозы.

Установлено, что концентрация раствора полимера имеет важное значения для получения жесткой и оформленной пористой структуры скаффолда. [Изъят 1 абзац]

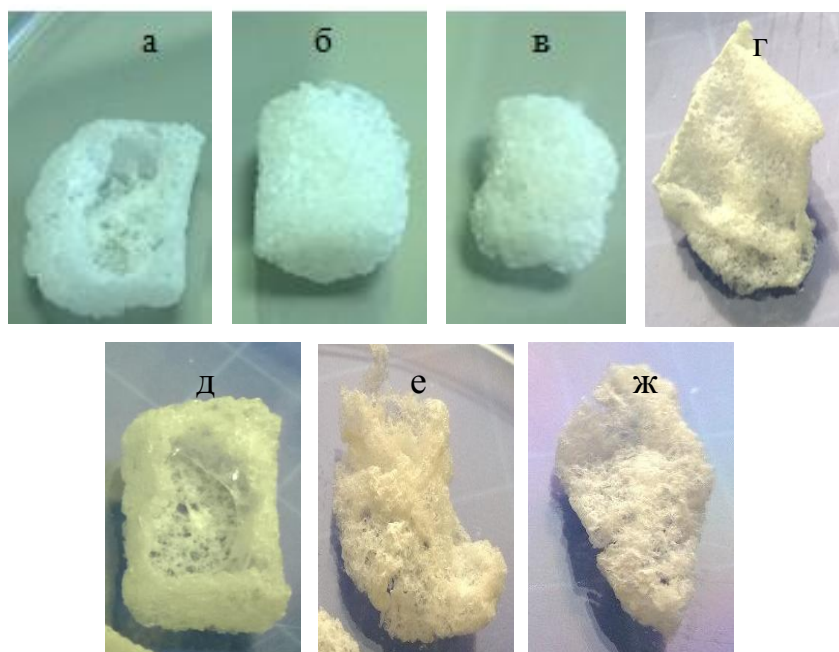


Рисунок 2. Внешний вид 3D-матриков, в зависимости от концентрации полимерного раствора ПЗГБ и времени экспозиции сахарозного блока

Кроме того отмечено, что постепенное пропитывание полимерным раствором сахарного блока намного эффективнее, что позволяет раствору проникать по всей толщине блока и распределяться равномерно, в отличие от погружения в раствор однократно и на длительное время.

Методом сублимационной сушки были получены 3D-матрицы на основе ПЗГБ, диаметром 3,4 см., высотой 1см массой 1060 и 540,6 мг (3% раствор). Установлено, что концентрация полимерного раствора оказывают влияние на прочностные характеристики полученных матриков. Образцы, полученные методом лиофилизации, представлены на рисунке 3.



Рисунок 3. Микропористые матриксы, полученные методом лиофилизации

3.1.2. 3D-матриксы полученные методом прямого холодного прессования

Методом прямого холодного прессования из ПЗГБ получена серия 3D-матриксов массой 300 мг, диаметром 13 мм, в композиции с порообразующим веществом (сахароза) в следующих соотношениях: 50/50, 90/10, 75/25, 25/75, макрофото образцов представлены на рисунке 4.



Рисунок 4. 3D-матриксы, полученные методом холодного прямого прессования, соотношение полимер/сахароза; а) до вымывания сахарозы; б) после вымывания сахарозы.

По данным макрофото отмечено, что поверхность матриксов после процесса прессования, была достаточно гладкая и плотная, визуалью не отличалась. Однако, после вымывания сахарозы, на поверхности скаффолдов сформировались неровности и пустоты в виде невзаимосвязанных пор.

[Изъят 1 абзац]

3.1.3. 3D-матрицы полученные методом спекания

Методом спекания и выщелачивания порообразующего вещества (камфора) из ПЗГБ получена серия 3D-матриц массой 200 мг, диаметром 13 мм, в следующих соотношениях: 50/50, 90/10, 75/25. (рисунок 5)

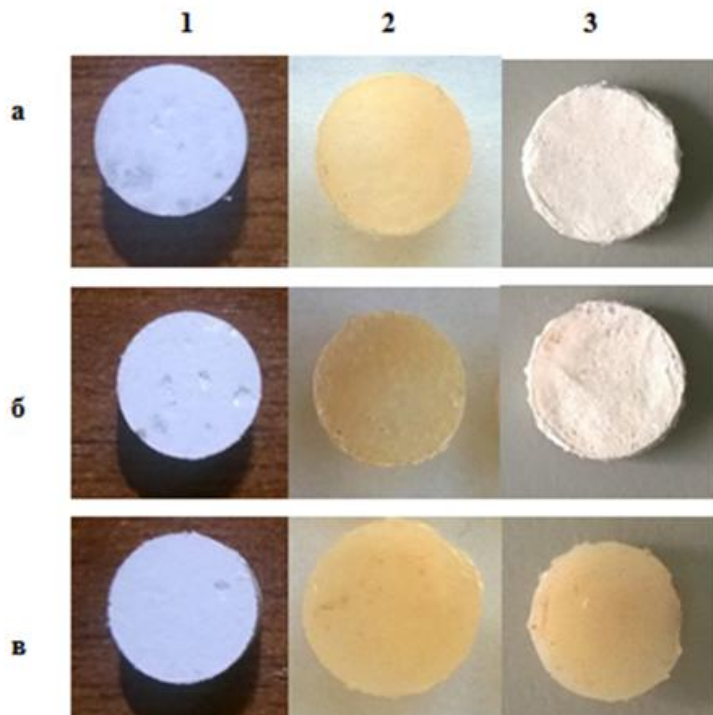


Рисунок 5. Образцы, полученные методом спекания, соотношение полимер/камфора; а) 50/50; б) 75/25; в) 90/10; 1 – изначальный вид матрикса; 2 – вид после спекания; 3 – после вымывания.

Полученные матрицы с различным соотношением полимер/камфора, после прессования не имели различий, поверхность прессованных форм была представлена плотной, достаточно ровной структурой с редкими пустотами. Однако в результате сплавления поверхность 3D-матриц стала матовой и более гладкой, произошли незначительные изменения в цвете от белого до желтоватого.

[Изъят 1 абзац]

3.2. Свойства поверхности полученных 3D-матриц

При создании материалов медицинского и биологического назначения важно учитывать параметры структуры поверхности. Поверхность скаффолда должна обладать достаточным количеством пор с определёнными размерами и формой, достаточной способностью к влагопоглощению. Так же значимым критерием являются высокие физико-механические характеристики.

3.2.1. РЭМ поверхности полученных 3D-матриков

При исследовании микроструктуры матриков полученных методом выщелачивания, отмечено формирование внутри скаффолда системы взаимосвязанных макропор размером от 100 до 150 мкм, пор среднего диаметра 50-90 мкм и микропор от 5 до 40 мкм. Микроструктура 3D-матриков полученных методом выщелачивания представлена на рисунке 6.

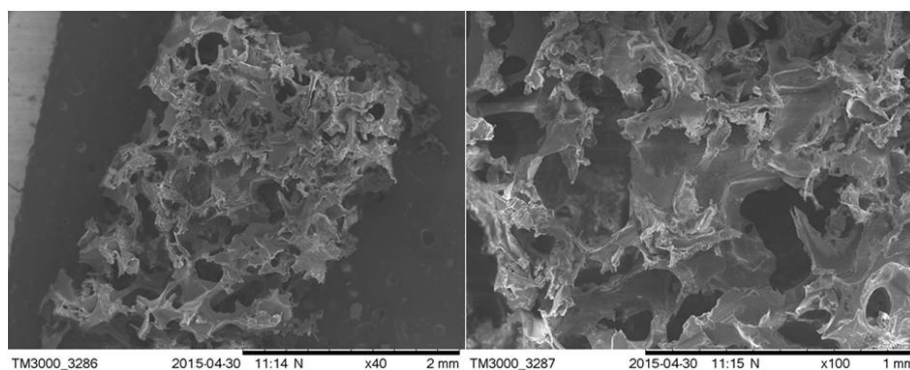


Рисунок 6. Микроструктура 3D-матриков полученных методом выщелачивания: а. Увеличение x40; б. Увеличение x100.

[Изъят 1 абзац]

Микроструктура лиофилизированных матриков представлена на рисунке 7.

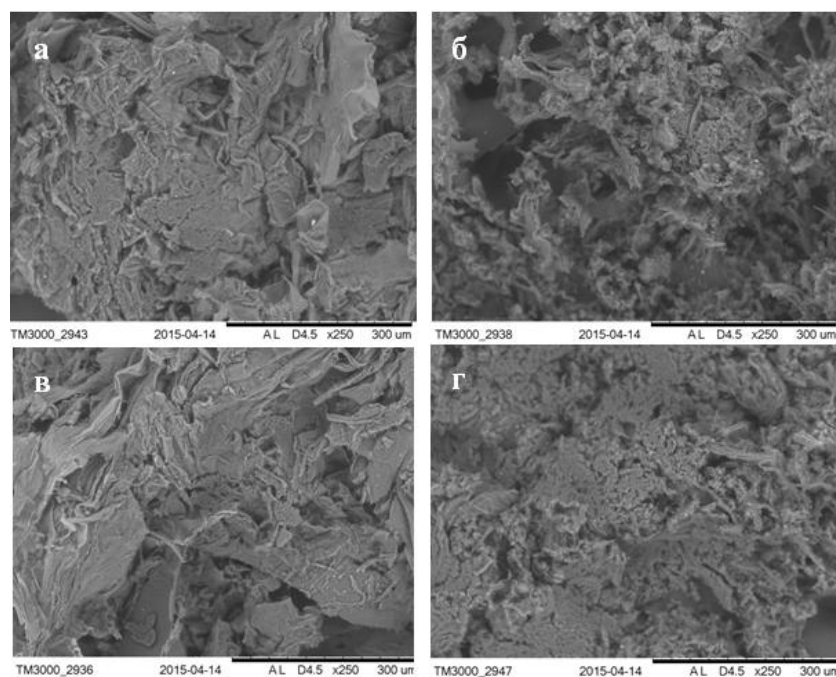


Рисунок 7. Микроструктура образцов полученных методом лиофилизации: а – температура предварительной заморозки

При исследовании микроструктуры матриц полученных методом прямого холодного прессования, было установлено, что вымывание порообразователя приводит к формированию открытых макропор с разорванной структурой размером от 200 до 400 мкм (Рисунок 8).

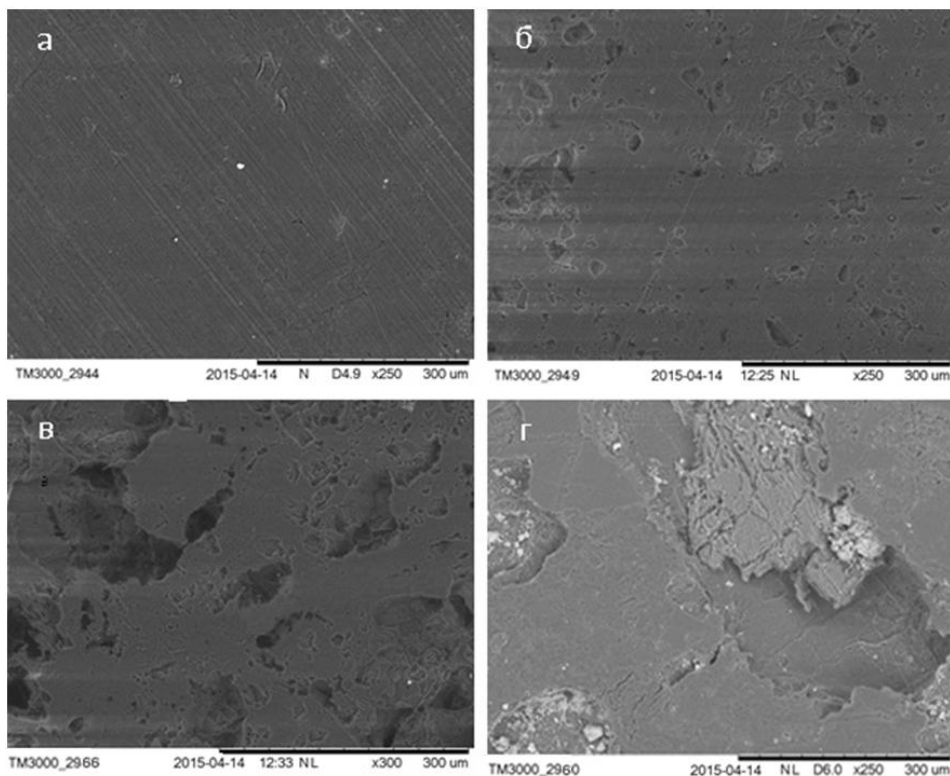


Рисунок 8. Микроструктура матриц, полученных методом прямого холодного прессования.

[Изъято 2 страницы]

Структура поверхности скаффолдов после выщелачивания камфоры в зависимости от ее включения в полимерную матрицу несколько отличалась. Матрицы с включением камфоры 10 % от исходной массы имели плотную, гладкую структуру, остатки камфоры, после выщелачивания отмечены на рисунке 9а белыми бликами в составе матрикса. Структура матриц после выщелачивания 25% камфоры, представлена плотно прилегающими после процесса спекания частицами порошка ПЗГБ, с отчетливыми ячейками на поверхности. Отмечено, что выщелачивание камфоры приводит к появлению трещин и больших пор на поверхности. Оптимальное соотношение полимера и

камфоры (50/50) приводит к формированию однородной ячеистой структуре поверхности, имеющей небольшие неровности и поры.

3.2.2. Результаты исследования краевых углов смачивания водой

Для адсорбции клеток на полимерном каркасе, имеет большое значение гидрофильность поверхности, поскольку клетки имеют высокое сродство именно к гидрофильным поверхностям. Что касается свободной энергии поверхности, она определяется, главным образом, химической природой полимера. У полимерных изделий, с низких значений по данному критерию, взаимодействие таких поверхностей с клетками ничтожно.

В таблице 1 представлены результаты измерения краевых углов смачивания (вода) и свободной энергии поверхности, полимерных матриц, полученных методом спекания и прямого холодного прессования.

Таблица 1. Измерения краевого угла и поверхностной энергии 3D-матриц, полученных методом спекания и прямого холодного прессования

Тип 3D-матрикса	Краевой угол (вода), град	Свободная энергия поверхности, мН/м	Дисперсионная составляющая, мН/м	Полярная составляющая, мН/м
Прессование; 100% ПЗГБ	70,6±2,34	48,6±1,53	40,3±0,58	8,3±0,50
Прессование; полимер/сахароза:	70,8±2,48	48,4±1,13	39,7±0,58	8,7±0,47
Спекание; полимер/камфора	70,2±3,76	48,1±1,4	40,5±1,04	7,6±0,36
Спекание; полимер/камфора	69,1±4,23	49±0,48	41,1±0,21	7,9±0,26
Спекание; полимер/камфора	65,3±8,04	48,3±1,51	37,4±0,87	10,9±0,64

Величина контактного угла смачивания поверхности водой, у 3D-матриц, находится в пределах от 65,3° до 70,92°. С минимальным значением у матриц при соотношении 90/10, и максимальным у 3D-матриц при соотношении 50/50. Данные углы смачивания характеризуют гидрофобную поверхность. Свободная энергия поверхности у данных

матриков практически не различается, и находится в пределах от 48,1 мН/м до 49 мН/м.

[Изъят 1 абзац]

3.2.3. Открытая пористость и влагопоглощение

Высокие значения пористости и влагопоглощения обеспечивают быструю инфильтрацию полимерного матрикса в среде живого организма. Известно, что пористая система матрикса обеспечивает более высокий уровень остеинтегративных процессов, способствует прикреплению и росту клеток, а также транспорту питательных веществ.

Результаты определения влагопоглощающей способности полученных матриков и их открытой пористости для образцов, полученных методом выщелачивания сахарозы, лиофилизации, методом прямого холодного прессования и спекания представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Влагопоглощение и открытая пористость образцов, полученных методом выщелачивания сахарозы, лиофилизации, методом прямого холодного прессования, спекания

Тип 3D-матрикса	Открытая пористость, см ³ /г	Влагопоглощение, %
3D-матрикса (выщелачивание)	2,46±0,027	71,27
3D-матрикса (лиофилизация)	3,95±0,040	79,5
3D-матрикса (прямое холодное прессование; полимер/сахароза- 50/50)	0,086±0,003	7,8
3D-матрикса (прямое холодное прессование; полимер/сахароза- 75/25)	0,043±0,003	4,18
3D-матрикса (прямое холодное прессование; полимер/сахароза- 90/10)	0,022±0,004	2,15
3D-матрикса (спекание; полимер/камфора- 50/50)	0,038±0,021	3,75
3D-матрикса (спекание; полимер/камфора; 75/25)	0,019±0,005	1,87
3D-матрикса (спекание; полимер/камфора - 90/10)	0,017±0,005	1,67

Наибольшей открытой пористостью и способностью к влагопоглощению обладают скаффолды, полученные методом лиофилизации и выщелачивания сахарозы.

Наименьшие показатели по влагопоглощению и пористости показали матриксы полученные методом спекания полимера с синтетической камфорой, скорее всего, потому что большинство пор после спекания оказалось закрытыми.

3.3. Физико-механические характеристики полученных образцов

Матриксы, полученные методом выщелачивания сахарозы, обладают следующими механическими характеристиками: модуль Юнга (упругости) составляет 0,436 МПа, деформация – 22,57 % и данные матриксы способны выдерживать напряжение при сжатии 0,054 МПа. Можно заметить, что данные матриксы обладают достаточно низкой механической прочностью. Наиболее высокие показатели наблюдали у матриксов, полученных методом прямого холодного прессования. Значения по данным характеристикам уменьшаются по увеличению процента включения порообразователя в матриксы. Образцы, полученные методом сплавления, показали немного другую зависимость от включения в матрикс порообразователя. Значения физико-механических характеристик образцов в соотношении 75/25, ниже, чем у образцов в соотношении 50/50, это объясняется тем, что данные матриксы, после вымывания камфоры, имели изменённую поверхность с глубокими выемками и неровностями. В то время как у образцов 50/50, структура была более однородной, имеющей лишь небольшие неровности и поры. Образцы в соотношении 90/10, при данном методе получения имеют наибольшие значения, но структура данных матриксов оказалась с гладкой поверхностью.

[Изъята 1 страница]

3.4. Исследование адгезионных свойств сконструированных пористых 3D-матрицков в культуре ММСК костного мозга

[Изъято 5 страниц]

ВЫВОДЫ

1. Методами выщелачивания, прямого холодного прессования, лиофилизации и спекания были получены серии скаффолдов на основе поли-3-гидроксипропирата.
2. Открытая пористость и размеры пор скаффолдов зависят от методов их получения.
3. Установлено, что высокими прочностными характеристиками обладают 3D-матрицы, полученные методом прямого холодного прессования с последующим удалением порообразователя
4. Доказано, что исследуемые полимерные носители способны поддерживать адгезию, рост и дифференцировку ММСК костного мозга.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГА - гидроксиапатит

ММСК – Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

ПГБ – полигидроксибутират

ПЗГБ – поли-3-гидроксибутират

ПЗГБ/4ГБ – сополимер 3-гидроксибутирата/4-гидроксибутирата

ПГА – полигидроксиалканоаты

П(Згб-со-ЗГВ) – 3-гидроксибутират-со-3-гидроксиивалериат

ПЛК – полилактид

ПЛГА – полилактид-ко-гликолид

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Афанасьев, Ю. И. Гистология / Ю. И. Афанасьев, Н. А. Юрина, Е. Ф. Котовский. — 5-е изд., перераб. и доп. — Москва: Медицина, 2002. — 744 с.
2. Баринов, С. М. Костные ткани «ремонтирует» керамика/С. М. Баринов, В. С. Комплев// Наука в России. 2005. №1. С.27—30
3. Березов, Т. Т. Биологическая химия: учебник. / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин; 3е изд., перераб. и доп.— Москва.: Медицина, 2004. — 704 с.
4. Бояндин А. Н. Получение и исследование полимерных смесей на основе поли-3-гидроксibuтирата/ А. Н. Бояндин, Е. Д. Николаева, А. В. Шабанов, А. Д. Васильев// Журнал Сибирского федерального университета. Биология. - 2014. - Т. 7, № 2. - С. 174-185.
5. Василец, В. И. Разработка новых методов формирования имплантационных материалов с использованием технологий электроспиннинга и биопринтирования/ В. И. Василец, И. В. Казбанов, А. Е. Ефимов, В. И. Севастьянов// Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2009. — Т. 11, №2. — С. 47-53.
6. Войнов, Н. А. Полигидроксиалканоаты - биоразрушаемые полимеры гидроксипроизводственных алкановых кислот: синтез, свойства, области применения [электронный ресурс] / Н. А. Войнов, Т. Г. Волова// — 2013. — Режим доступа: <http://medbe.ru/materials/problem-y-i-metody-biotekhnologii/poligidroksialkanoaty-biorazrushaemye-polimery-gidroksiproizvodstnykh-alkanovykh-kislots-sintez-svoys/>
7. Волова, Т. Г. Биоразрушаемые полимеры: синтез, свойства, применение/ Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая. — Красноярск, Издательство «Красноярский писатель», 2011. — 392 с.
8. Волова, Т. Г. Биосовместимые полимеры / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, О. Н. Шишацкий// Наука в России. 2010. -№ 1. — стр. 4-8.

9. Волова, Т. Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии [Электронный ресурс] : электрон. учеб. пособие / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов. – Электрон. дан. (6 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2009.
10. Волова, Т. Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии [Электронный ресурс] : лаб. практикум / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов. – Электрон. дан. (3 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2009
11. Волова, Т. Г. Современные биоматериалы: мировые тренды, место и роль микробных полигидроксиалканоатов / Т. Г. Волова // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2014. – Т. 7, № 2. – С. 103-133.
12. Волова Т.Г. Полиоксиалканоаты (ПОА) биоразрушаемые полимеры для медицины / Т.Г. Волова, В.И. Севастьянов, Е.И. Шишацкая. — Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2003. — 330 с.
13. Гажва, В. Ю. Разработка и исследование *in vivo* и *in vitro* костно-пластического материала на основе композиции гидроксиапатита, поли-3-гидроксибутирата и альгината натрия/ Ю. В. Гажва, А. П. Бонарцев, Р. Ф. Мухаметшин// Современные технологии в медицине. – 2014. Т.6, № 1. – С. 6-13.
14. Глушен, С. В. Комплексный подход при оценке программируемой гибели (апоптоза) клеток человека : метод. пособие к лабораторным занятиям по специальному курсу «Патология клетки» для студентов биол. фак. /С. В. Глушен, Т. В. Романовская, В.В. Гринев// – Минск: БГУ, 2009. – 43 с.
15. Калачева, Г. С. Синтез полиэфиров гидроксипроизводных жирных кислот (полигидроксиалканоатов) и характеристика состава липидов синезеленых, светящихся и водородокисляющих прокариот. – дисс. докт. биол. (03.01.06. Биотехнология (в том числе бионанотехнология))/ Калачева Галина Сергеевна – Красноярск, ИБФ СО РАН. – 2013. – 71 с.
16. Костные ткани. [электронный ресурс] // – режим доступа: <http://cytohistology.ru/tkani/soeditelnye-tkani/skeletnye-tkani/kostnye-tkani/>

17. Мелешина, А. В. Исследование взаимодействия мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток с опухолями методами флуоресцентного имиджинга: автореф. дис. канд. биол. наук. (04.01.12. – онкология (биологические науки) / Мелешина Александра Викторовна. – Санкт-Петербург - 2014 (10-15 с)
18. 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 трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. Т. 6, №4. – С. 1-10.
19. Функциональная роль остеопонтина в развитии и реконструкции костной ткани. [электронный ресурс]// - режим доступа: <http://www.rusbiotech.ru/article/osteopontin.php>
20. Чичибабин, А. Е. Основные начала органической химии. Том 2/ А. Е. Чичибабин; под. ред. П. Г. Сергеева – М.: Книга по Требованию, 2012. – Т.2. – 672 с.
21. Шишацкая Е.И. Биотехнология полигидроксиалканоатов: научные основы медико-биологического применения : дис. ... докт. биол. наук: 03.00.23. - Красноярск, – 2009. – 259 с.
22. Шумилова, А. А. Материалы для восстановления костной ткани / А. А. Шумилова, Е. И. Шишацкая// Журнал Сибирского федерального университета. Биология. - 2014. - Т. 7, № 2. - С. 209-221.
23. Шумилова, А. А. Потенциал биоразрушаемых полигидроксиалканоатов в качестве костнопластических материалов. – дисс. канд. биол. наук. (03.01.06. Биотехнология (в том числе бионанотехнология)) – 2015.
24. Ahymah Joshy, M. I. Freeze dried cross linking free biodegradable composites with microstructures for tissue engineering and drug delivery application/ M. I. Ahymah Joshy, K. Elayaraja, N. Sakthivel, V. Sarath Chandra, G. M. Shanthini, S. NarayanaKalkura.// Mater. Sci. Eng. C, – 2013. – Vol. 33, P. 466-474.

25. Alves, E. Orthopedic implant of a polyhydroxybutyrate (PHB) and hydroxyapatite composite in cats / E. Alves, C. Rezende, R. Serakides et al. // J. of Fel. Med. and Surg. – 2011.– Vol. 13. – P. 546–552
26. Amini, Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges/ Amini, Cato T. Laurencin, Syam P. Nukavarapu// Crit Rev Biomed Eng. – 2012. – Vol. 40, P. 363–408.
27. Buckwalter, J. A. Bone biology. I: structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization/ J. A. Buckwalter, M. J. Glimcher, R. R. Cooper, and R. Recker. – Instructional Course Lectures, vol. 45, pp. 371–386, 1996.
28. Butscher, A. Structural and material approaches to bone tissue engineering in powder-based three-dimensional printing/ A. Butscher, M. Bohner, S. Hofmann, L. Gauckler, R. Müller// – Acta Biomaterialia – 2011 – Vol.7, P.907–920.
29. Chen, G. Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials./G.Q. Chen, Q. Wu// Biomaterials . – 2005. – Vol. 26(33). – P. 6565
30. Clarke, B Normal bone anatomy and physiology/ B. Clarke – Clinical Journal of the American Society of Nephrology, vol. 3, no. 3, pp. 131–139, 2008.
31. Han, L-H. Dynamic tissue engineering scaffolds with stimuli-responsive macroporosity formation/ L-H. Han, Janice H. Lai, Stephanie Yu, Fan Yang.// Biomaterials. – 2013. – Vol. 34. P. 1-8.
32. Kariem, H. Micro-poro-elasticity of baghdadite-based bone tissue engineering scaffolds: A unifying approach based on ultrasonics, nanoindentation, and homogenization theory/ H. Kariem, Maria-Ioana Pastrama, Seyed Iman Roohani-Esfahani, Peter Pivonka, Hala Zreiqat, Christian Hellmich// Materials Science and Engineering C, – 2015. – Vol. 46, P. 553-564.
33. Luklinska, Z.B. In vivo response to HA – polyhydroxybutyrate /polyhydroxyvalerate composite / Z. B. Luklinska, H. Schluckwerder // J. of Micros. – 2003. – Vol. 2. – P. 121–129.

34. Navarro, M. Biomaterials in orthopaedics/M. Navarro, A. Michiardi, O. Castano, J. A. Planell//Biomaterials, Implants and Tissue Engineering, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC). – 2008. – Vol. 5, P. 1137–1158.
35. Puppi, D. Polymeric materials for bone and cartilage repair/ D. Puppi, F. Chiellini, A. M. Piras, E. Chiellini. // Progress in Polymer Science– 2010. – Vol. 35, P.403–440
36. Rinaldo Florencio-Silva, Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells/ Gisela Rodrigues da Silva Sasso, Estela Sasso-Cerri, Manuel Jesus Simões, Paulo Sérgio Cerri//BioMed Research International, Vol. 2015, Article ID 421746, 17 pages.
37. Rnjak-Kovacina, J. Increasing the Pore Size of Electrospun Scaffolds/ J. Rnjak-Kovacina, Anthony S. Weiss// Tissue Engineering Part B: Reviews. – 2011. – Vol. 17, P.365-372.
38. Sawkinset, M. J. Cell and protein compatible 3D bioprinting of mechanically strong constructs for bone repair/ M. J. Sawkinset, P. Mistry, B. N. Brown, K. M. Shakesheff, L. J. Bonassar, J. Yang// Biofabrication – 2015. – Vol. 7, P.1-10.
39. Wang, H. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering/ H. Wang, Yubao Li, Yi Zuo, Jihua Li, Sansi Ma, Lin Cheng// Biomaterials– 2007. – Vol. 28, P.3338-3348
40. Watson, N. J. Post-processing of polymer foam tissue scaffolds with high power ultrasound: A route to increased pore interconnectivity, pore size and fluid transport/ N. J. Watson, R. K. Johal, Z. Glover, Y. Reinwald, L. J. White, A.M. Ghaemmaghami, S. P. Morgan, F. R. A. J. Rose, M. J. W. Povey, N. G. Parker// Materials Science and Engineering C, – 2013. – Vol. 33, P.4825–4832
41. White, L. J. The effect of processing variables on morphological and mechanical properties of supercritical CO₂ foamed scaffolds for tissue engineering/ L. J. White, Victoria Hutter, Hongyun Tai, Steven M. Howdle, Kevin M. Shakesheff// Acta Biomaterialia – 2012. – Vol. 8, P. 61–71.

42. Willerth, S. M. Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery/ S. M. Willerth, S. E. Sakiyama-Elbert// StemBook. 2008.
43. Williams S. F. Applications of PHAs in Medicine and Pharmacy/ S. F. Williams, D. P. Martin//Biopolymers online. – 2005 – Vol. 10 – P. 1-38