

На правах рукописи



НИКОЛАЕВА Елена Дмитриевна

**СВОЙСТВА РЕЗОРБИРУЕМЫХ МАТРИКСОВ ИЗ
ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ РАЗЛИЧНОГО ХИМИЧЕСКОГО
СОСТАВА**

03.01.06 – Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Красноярск

2011

Работа выполнена в Институте биофизики Сибирского отделения РАН и на базовой кафедре биотехнологии Института фундаментальной биологии и биотехнологии, ФГАОУ ВПО «Сибирский Федеральный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук
Шишацкая Екатерина Игоревна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Бондарь Владимир Станиславович

кандидат медицинских наук
Деев Роман Вадимович

Ведущая организация: Институт химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН

Защита состоится «__» _____ 2011 года в 10-00 час. на заседании диссертационного совета Д 003.007.01 при Институте биофизики СО РАН по адресу: 660036, г. Красноярск, Академгородок, д.50, стр.50, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеках ФГАОУ ВПО СФУ и Института биофизики СО РАН.

Автореферат разослан «_____» _____ 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биол. наук



Л.А.Франк

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Современная биотехнология позволяет получать широкий спектр целевых продуктов различной природы, включая новые экологически чистые биоматериалы с высокими потребительскими свойствами. Наиболее актуальной областью применения биоматериалов является биомедицина, остро нуждающаяся в биосовместимых материалах для изготовления медицинского инструментария, систем депонирования и доставки лекарственных средств, эндопротезов, сорбентов, биоконструкторов органов и тканей (Хенч, Джонс, 2007; Штильман, 2006; Nair, Laurencin, 2006). Открытие полигидроксиалканоатов (ПГА) – полимеров микробиологического происхождения, явилось значимым событием для биотехнологии новых материалов. ПГА – это линейные, термопластичные, биоразрушаемые и биосовместимые полимеры, сферы применения которых потенциально широки, включая восстановительную медицину, фармакологию, сельское и коммунальное хозяйство, радиоэлектронику и др. (Volova, 2004).

Новое и актуальное направление исследований ПГА ориентировано на решение задач для клеточной и тканевой инженерии. Многообещающей представляется перспектива использования этих полимеров для регенерации поврежденных кожных покровов и нервов, реконструкции дефектов мягких и костной тканей, кровеносных сосудов и клапанов сердца и др. (Williams et al., 1999; Williams, Martin, 2004; Chen, Wu, 2005; Волова с соавт., 2006). Используемый в тканевой инженерии междисциплинарный подход направлен на создание биоматериалов и биоконструкций для восстановления утраченных функций отдельных тканей или органов в целом.

Использование потенциала клеточных технологий в реконструктивных целях реализуется с использованием нескольких подходов. В одном из них суспензию клеток необходимого фенотипа, выросших *in vitro*, вводят в поврежденные ткани органов или в кровоток. В другом, технологически более сложном, клетки выращивают вне организма на матриксе (scaffold), и далее биоинженерную конструкцию или сформированную ткань имплантируют реципиентному организму. Успех второго направления зависит во многом от свойств каркасов (матрикс), используемых в качестве носителей клеток (Wang et al., 2002; Хенч, Джонс, 2007).

Все необходимые свойства матрикса определяются свойствами исходного материала и технологией его переработки. Поэтому ключевой проблемой для успеха создания эффективных биоконструкций является наличие адекватного биodeградируемого и биосовместимого материала. Для конструирования матриксов используют биостабильные и биodeградируемые материалы неорганической и органической природы (металлы/сплавы, полимеры, керамику, гидроксиапатиты, композитные материалы, кораллы, коллаген, желатин, эластин, фибронектин, альгинат, хитозан и др.). Среди изучаемых материалов – полимеры монокарбоновых кислот: молочной, гликолиевой, алкановых (масляной, валериановой и др.). Большие надежды связаны сегодня с

полигидроксиалканоатами (Волова с соавт., 2003; 2006; Штильман, 2006; Chen, 2009).

Однако относительно ПГА, как за рубежом, так и в России в основном исследования выполнены на двух типах, – гомогенном ПЗГБ и сополимерах 3-гидроксибутирата с 3-гидроксивалератом (ПЗГБ/ЗГВ). Высокая биосовместимость ПЗГБ базируется на том, что 3-гидроксималяная кислота – естественный метаболит клеток и тканей высших животных и человека (Reusch et al., 1992). Недостатком этого высококристаллического ПГА (степень кристалличности свыше 70 %) является то, что он не кристаллизуется упорядоченно, его весьма сложно перерабатывать в изделия, которые характеризуются низкой ударной прочностью, жесткостью и «старятся» во времени (Lakshmi et al., 2002). Особо ценным в ПГА является возможность синтеза полимеров различного состава, образованных мономерами с различной длиной С-цепи. Соплимерные ПГА более перспективны, т. к. в зависимости от соотношения мономеров их базовые свойства могут изменяться в достаточно широких пределах (Sudesh et al., 200; Volova, 2004; Волова с соавт., 2006). Однако наличие в ПГА, помимо 3-гидроксималяной кислоты, других мономеров, делает необходимым проверку биосовместимости материала в полном объеме. Так, для доказательства биосовместимости более технологичных сополимеров 3-гидроксибутирата с 3-гидроксивалератом, которые имеют пониженную степень кристалличности (50-60 %), понадобилось около 10 лет (Gogolewski et al., 1993; Shyshatskaya, Volova, 2004; Shyshatskaya et al., 2003; 2004).

Относительно других типов ПГА информация весьма отрывочна. В США компанией Terpha проводят исследования резиноподобного с низкой температурой плавления полимера 3-гидроксиоктановой кислоты (Martin, Williams, 2002). Одним из перспективных, но мало изученным ПГА, является сополимер 3-гидроксибутирата/4-гидроксибутирата (ЗГБ/4ГБ), для которого характерны более высокие скорости биодеградации *in vivo*, и он является эластомером (Martin, Williams, 2003; Cheng et al., 2008). В Китае с недавних пор активно исследуют сополимеры 3-гидроксибутирата с 3-гидроксигексаноатом (ЗПГБ/ЗГГ) (Chen et al., 2006; 2008; 2010). Имеются единичные сообщения о трехкомпонентных ПГА, образованных мономерами масляной, валериановой и гексановой кислот (Ji et al., 2008; 2009; Wang et al., 2010).

Немногочисленные исследования биосовместимости ПГА различного химического состава выполнены в основном в культурах клеток. Опубликованные к настоящему моменту результаты не дают однозначного ответа о биосовместимости того или иного типа ПГА. Связано это с тем, что в экспериментах были использованы различные типы ПГА, различной степени очистки (об этом важном моменте информация в публикациях не представлена). Анализируемые изделия (пленки, мембраны и др.) были изготовлены различными методами, и далеко не во всех работах биосовместимость матриц оценена комплексно, то есть с учетом физико-химических свойств полимеров, структуры и свойств поверхности. Поэтому для ответа на вопрос о том, какие типы ПГА безопасны и наиболее перспективны для применения, необходимы комплексные исследования.

Цели и задачи исследования. Цель исследования – конструирование матриц из ПГА различного химического состава, исследование биологической совместимости в культурах клеток и экспериментах на лабораторных животных и закономерностей биоразрушения *in vivo*.

Для достижения цели сформулированы следующие задачи:

1. Сконструировать семейство клеточных матриц различной геометрии и структуры из ПГА различного химического состава: гомогенного поли-3-гидроксibuтирата и сополимеров 3-гидроксibuтирата с 4-гидроксibuтиратом, 3-гидроксивалератом, 3-гидроксигексаноатом.

2. Исследовать свойства матриц из ПГА в сопоставлении с контрольным матрицом из полимолочной кислоты (полилактида, ПМК).

3. Изучить возможность модификации поверхности матриц обработкой H_2O_2 -плазмой.

4. Исследовать биологическую совместимость и функциональные свойства матриц из ПГА различного химического состава в культурах клеток.

5. Исследовать биосовместимость и закономерности биоразрушения ПГА различного химического состава в эксперименте на лабораторных животных.

Научная новизна. Впервые из ПГА различного химического состава (ПЗГБ и сополимеров ПЗГБ/4ГБ, ПЗГБ/3ГВ, ПЗГБ/3ГГ) с применением различных технологий сконструированы и исследованы матрицы в виде плотных и пористых пленок, объемных форм, микрочастиц, нетканого полотна, сформированного ультратонкими волокнами. Установлено, что на свойства поверхности матриц влияет химический состав ПГА и техника переработки полимера. Показана возможность модификации поверхности матриц обработкой H_2O_2 -плазмой, что положительно сказывается на адгезии и жизнеспособности функционирующих клеток. В культурах клеток и в экспериментах на лабораторных животных показана биологическая безопасность всех типов матриц, изготовленных из ПЗГБ, ПЗГБ/4ГБ, ПЗГБ/3ГВ, ПЗГБ/3ГГ, на уровне клеток, тканей и организма. Доказано отсутствие цитотоксичности всех исследованных типов ПГА при прямом контакте с пролиферирующими клетками; по адгезивным свойствам и способности поддерживать пролиферацию клеток все матрицы сопоставимы с полистиролом и превосходят полимолочную кислоту. В хроническом 6-ти месячном эксперименте впервые исследованы последствия подкожной имплантации матриц из ПГА различного химического состава и показано, что ответная реакция тканей однотипна и характеризуется не продолжительным посттравматическим воспалением без образования выраженных фиброзных капсул и иных неблагоприятных реакций. Установлено, что активность биоразрушения ПГА *in vivo* возрастает в ряду ПЗГБ < ПЗГБ/3ГВ < ПЗГБ/4ГБ < ПЗГБ/3ГГ, и в этом процессе активное участие принимают макрофаги и гигантские клетки инородных тел. С применением ВЭЖХ показано, что наибольшее изменение молекулярной массы и полидисперности ПГА было у быстро разрушающихся сополимеров ПЗГБ/4ГБ и ПЗГБ/3ГГ, для которых характерна более выраженная на ранних сроках гиганто-клеточная реакция тканей.

Практическая значимость. Разработано семейство матриц различной геометрии и структуры из охарактеризованных и высокоочищенных образцов ПГА различного химического состава, отвечающих требованиям, предъявляемым к материалам и изделиям биомедицинского назначения. Разработан способ модификации поверхности матриц и стерилизации с применением H_2O_2 -плазмы, позволяющий повысить гидрофильность поверхности и улучшить эксплуатационные свойства. Физико-химические и биологические свойства матриц позволяют рекомендовать их для клеточных технологий и тканевой инженерии, а также в качестве барьерных средств для реконструктивной хирургии.

Положения, выносимые на защиту:

1. Сконструированное и охарактеризованное семейство матриц из ПГА различного химического состава (ПЗГБ, ПЗГБ/4ГБ, ПЗГБ/3ГВ, ПЗГБ/3ГГ).

2. Возможность модификации поверхности матриц обработкой H_2O_2 плазмой и повышением адгезионных свойств поверхности по отношению к культивируемым клеткам.

3. Доказанная высокая биологическая совместимость матриц, изготовленных из ПГА различного химического состава в культурах клеток и 6-ти месячном эксперименте на лабораторных животных.

4. Закономерности биоразрушения матриц из ПГА различного химического состава (ПЗГБ, ПЗГБ/4ГБ, ПЗГБ/3ГВ, ПЗГБ/3ГГ) *in vivo*.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (2006, 2011), Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (2010), на Международном научном семинаре «Биотехнология новых материалов и окружающая среда» (2011).

Работа выполнена в рамках плановой тематики НИР Института биофизики СО РАН (№ государственной регистрации: 01201000937), Сибирского Федерального университета при поддержке Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (проект № 20.11), Программы Интеграционных программ Сибирского отделения РАН (проекты № 14 «Стволовые клетки – основа клеточных биотехнологий будущего»; № 96 «Фундаментальные основы биотехнологического получения целевых продуктов и препаратов»); Программы Министерства образования и науки РФ «Развитие потенциала высшей школы», проекты №№ 2.1.1.528; РНП-11); по мега-проекту (постановление Правительства РФ № 220 от 09.04.2010 «Для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих учёных в Российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования» (договор №11.G34.31.0013).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 работ: в том числе 3 статьи в центральных изданиях РФ, входящих в список ВАК, 4 тезиса научных конференций.

Вклад автора: Планирование и проведение всех экспериментов по конструированию и исследованию матриц, обработка и анализ полученных результатов, подготовка публикаций.

Структура работы: Диссертация изложена на 138 страницах машинописного текста и содержит 13 таблиц и 41 рисунок; включает обзор литературы, описание объектов и методов исследования, результатов и их обсуждения (6 глав), заключение и выводы. Список цитируемой литературы включает 220 источников, в т. ч. 189 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение. Во введении обоснована актуальность работы и ее вклад в разработку полимерных клеточных носителей для биомедицины.

Аналитический обзор посвящен анализу литературы по биотехнологии материалов и полимерных конструкций для тканевой инженерии, включая описание требований, предъявляемых к биомедицинским изделиям и технологии получения разных форм матриц. В заключительном разделе анализируется современное состояние исследований полигидроксиалканоатов и их биосовместимости *in vitro* и *in vivo*.

Объекты и методы исследования. Для создания матриц использованы высокоочищенные образцы ПГА, полученные в Институте биофизики СО РАН: гомополимер поли-3-гидроксибутират (ПЗГБ) и сополимеры 3-гидроксибутирата и 3-гидроксивалерата (ПЗГБ/ЗГВ) с включением ЗГВ 13 и 27,6 мол. %, 3-гидроксибутирата и 3-гидроксигексаноата (ПЗГБ/ЗГГ) с включением ЗГГ 7 мол. %, 3-гидроксибутирата и 4-гидроксибутирата (ПЗГБ/4ГБ) с включением 4ГБ 10,7 мол. %. Методами испарения растворителя, солевого выщелачивания, холодного прессования, электростатического формования из исследуемых образцов ПГА получены матрицы разной геометрии: пленки и мембраны, объемные матрицы, ультратонкое волокно.

Физико-химические свойства исходных образцов и полученных матриц изучены с использованием газовой хроматографии («Hewlett Packard», США), рентгеноструктурного анализа (D8 ADVANCE «Bruker», Германия), гель-проникающей хроматографии (Breeze System фирмы Waters 2414, Великобритания), дериватографии (MOM, Венгрия), растровой электронной микроскопии (Phillips SEM 525 M) (ЦКП ЛИН СО РАН, Иркутск), атомно-силовой микроскопии (АСМ) («SmartSPM™», ООО «АИСТ-НТ», Россия, Зеленоград). Свойства поверхности рассчитывали на базе измерения контактного краевого угла смачивания водой, используя уравнения Де Жена, находили свободную поверхностную энергию (γ_s), свободную энергию межфазовой поверхности (γ_{SL}) и величину сил сцепления (W_{SL}) (эрг/см²).

Биологическую совместимость матриц из ПГА разных типов оценивали в культурах клеток (окраска клеток (трипановым синим, азур-эозином, DAPI), морфология, адгезия и рост клеток, МТТ-тест (реакция с 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол бромидом), отражающий активность

митохондриальных дегидрогеназ живых клеток). Биосовместимость *in vivo* матриксов из ПГА различного химического состава изучена на крысах линии Вистар при подкожной имплантации в течение 180 суток. Животные распределены на 7 групп (5 экспериментальных – матриксы из ПГА, 2 контрольные – полилактид и интактные животные), по 15 животных в каждой группе. Изучали периферическую кровь, реакцию тканей гистологической техникой. Биодegradацию *in vivo* изучали по изменению веса матриксов, динамике молекулярных масс ПГА (ВЭЖХ).

Эксперименты проведены в соответствии с Международными рекомендациями (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (Разрешение от Комиссии Института биофизики СО РАН по биоэтике).

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel. Для получения данных рассчитывали среднее арифметическое, среднеквадратичное отклонение, ошибку средней арифметической. Достоверность отличия средних значений проверяли по критерию Стьюдента и U-критерию Манна-Уитни (уровень значимости 0,05).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Конструирование матриксов из ПГА различного химического состава и исследование свойств поверхности

Для конструирования матриксов использована серия высокоочищенных образцов ПГА различного химического состава, полученных в Институте биофизики СО РАН: ПЗГБ, ПЗГБ/4ГБ, ПЗГБ/3ГВ, ПЗГБ/3ГГ, свойства которых представлены в табл. 1.

Табл. 1 – Состав и основные характеристики использованных полимеров

№	Состав, мол. %	M_v , Да	M_n , Да	ПД	C_x , %	$T_{пл.}$, °С	$T_{дегр.}$, °С
1	ПЗГБ (100)	1 200 500	722 890	1,66	76	179,7	273
2	ПЗГБ/4ГБ (89,3/10,7)	1 100 000	477 138	2,32	43	171,9	268
3	ПЗГБ/3ГВ (87/13)	1 115 000	332 836	3,35	50	162	266
4	ПЗГБ/3ГВ (82,4/27,6)	1 077 000	347 419	3,1	45	157	263
5	ПЗГБ/3ГГ (93/7)	507 000	253 500	2,0	32	158	240
6	Полилактид (100)	100 000	50 590	1,78	-	50	-

Степень кристалличности (C_x) самая высокая была у ПЗГБ (76 %). Величины C_x сополимеров – ниже: для ПЗГБ/4ГБ и ПЗГБ/3ГВ имели близкие значения (43-50 %), для ПЗГБ/ГГ – 32 %. Температурные характеристики ($T_{пл.}$ и $T_{дегр.}$) исследованных ПГА составили для ПЗГБ, соответственно, 179,7 и 273; для сополимеров варьировали в пределах 158-172,5 и 240-286° С, соответственно, в зависимости от мономерного состава и количественного соотношения мономеров.

Из охарактеризованных образцов ПГА сконструированы матрицы разных типов: пленки и мембраны, объемные формы, нетканое полотно, образованное ультратонкими волокнами, микрочастицы.

Объемные матрицы получены прямым холодным прессованием из порошка ПГА и композитов ПГА с гидроксиапатитом (ГАП) с различным соотношением компонентов. Такие матрицы перспективны для реконструкции дефектов костной ткани. С увеличением доли ГАП поверхность композитов становилась более рельефной, в ней появлялись узоры и поры. Добавление к полимеру ГАП значительно влияло на гидрофильность матриц, которая возрастала с ростом содержания в композите ГАП. Влагопоглощение у образца с 10 %-м содержанием ГАП составляло 2,3, у образца с 30 %-м содержанием ГАП – 9,84 %. Таким образом, варьируя соотношение составляющих в композите ПЗГБ/ГАП, можно получать матрицы различной степени гидрофильности.

Методами нанотехнологий (электростатическое формование – ЭСФ полимерных растворов и эмульсий) получены ультратонкие волокна различного диаметра, из которых сформированы матрицы в виде нетканого полотна. Микрочастицы в силу развитой поверхности перспективны не только для разработки систем доставки лекарственных средств, но и в качестве матриц в технологиях клеточной и тканевой инженерии (Uemura et al., 2005). Получены микрочастицы диаметром от 200 нм до 2 мкм. Установлено отсутствие негативного влияния этих типов матриц на адгезию и рост фибробластов мышцы линии NIH 3T3 и их пригодность для выращивания клеток.

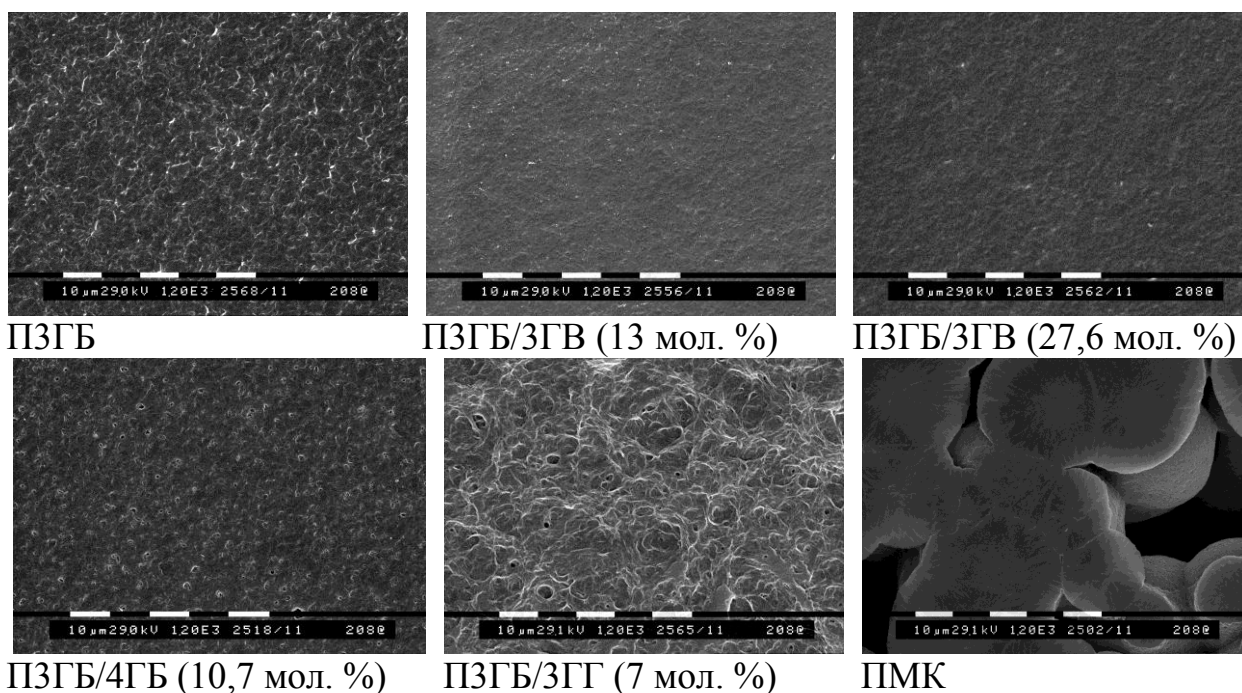


Рис. 1. РЭМ-снимки поверхности пленок, изготовленных из ПГА различного химического состава. Увеличение × 1200. Маркер 10мкм

Из ПГА различного химического состава изготовлены матрицы в виде пленок (рис. 1). Поверхность матриц, полученных из гомополимерного ПЗГБ, имела минимальную рельефность, была плотной и практически без пор.

На поверхности матриц из сополимера ПЗГБ/4ГБ видны множественные поры размером около 1 мкм. Поверхность матриц из сополимеров ПЗГБ/3ГВ более гладкая и однородная. У матриц, изготовленных из сополимера 3-гидроксibuтирата и 3-гидроксигексаноата поверхность наиболее рельефная с многочисленными порами различного диаметра, от 0,5 до 5,0 мкм. Поверхность контрольных матриц из полилактида сформирована сферическими слоистыми структурами.

Важный показатель биосовместимости полимерных матриц – физико-химическая реактивность поверхности, которая определяется шероховатостью, структурой, химическим и фазовым составом материала. Величина контактных краевых углов смачивания поверхности водой, косвенно отражающая гидрофильность, позволяет вычислить важные характеристики поверхности: величину сил сцепления, поверхностное натяжение и свободную энергию межфазовой поверхности (Де Жен, 1987). Самые высокие значения краевого угла имели контрольные матрицы из ПМК ($71,8 \pm 4,8^\circ$) и матрицы из ПЗГБ ($70,0 \pm 0,4^\circ$). Соплимерные матрицы из ПЗГБ/3ГВ и ПЗГБ/3ГГ по этому показателю практически не различались ($60-62,5^\circ$). Это соответствует значению у широко используемых клеточных планшетов из полистирола. Самое низкое значение краевого угла смачивания зафиксировано для матрицы из ПЗГБ/4ГБ – $57,4 \pm 0,6^\circ$. Таким образом, наиболее низкие значения соотношения гидрофильность/гидрофобность поверхности имели сополимерные образцы. Вычисленные по уравнениям Де Жена энергетические характеристики поверхности показали, что наиболее низкие значения поверхностного натяжения и величины сил сцепления характерны для матриц из ПМК и ПЗГБ, (порядка 31-32 и 95-97 эрг/см²), имеющих самую низкую гидрофильность. У сополимерных матриц эти значения выше, соответственно, 38,9-43,1 и 106,4-112,0 эрг/см² (табл. 2).

Табл. 2 – Свойства поверхности матриц, изготовленных из полилактида и ПГА разной химической структуры

№	Состав, мол. %	Контактный угол смачивания $\theta, ^\circ$	Поверхностное натяжение $\gamma, \text{эрг/см}^2$	Свободная энергия межфазовой поверхности $\gamma_{SL}, \text{эрг/см}^2$	Величина сил сцепления $W_{SL}, \text{эрг/см}^2$
1	ПЗГБ (100)	$70,0 \pm 0,4$	32,8	7,9	97,7
2	ПЗГБ/4ГБ (89,3/10,7)	$57,4 \pm 0,6$	43,1	3,9	112,0
3	ПЗГБ/3ГВ (87/13)	$60,3 \pm 2,8$	40,7	4,6	108,9
4	ПЗГБ/3ГВ (82,4/27,6)	$62,5 \pm 2,0$	38,9	5,3	106,4
5	ПЗГБ/3ГГ (93/7)	$60,9 \pm 1,6$	42,4	4,1	111,1
6	Полилактид (100)	$71,8 \pm 4,8$	31,3	8,6	95,5

С использованием атомно-силовой микроскопии (АСМ) исследована другая важная характеристика поверхности – шероховатость (табл. 3). Получены следующие результаты: среднеквадратичная шероховатость (R_q) оказалась близкой как для гомополимера ПЗГБ, так и сополимеров ПЗГБ/4ГБ, ПЗГБ/3ГВ, ПЗГБ/3ГГ, в диапазоне 109-113 нм. Значение R_q поверхности матриц из полилактида составило 241,629 нм, что в 2 раза выше этого показателя для ПГА всех типов.

Табл. 3 – Показатели шероховатости поверхности матриц из ПГА разных типов, вычисленные по результатам атомно-силовой микроскопии (АСМ)

№	Состав, мол. %	R_z – высота неровностей профиля по десяти точкам, нм	R_a – среднее арифметическое отклонение профиля (шероховатость), нм	R_q – средне-квадратичная шероховатость, нм
1	ПЗГБ (100)	1307,2	93,200	109,390
2	ПЗГБ/4ГБ (89,3/10,7)	644,6	98,682	107,931
3	ПЗГБ/3ГВ (87/13)	577,8	99,120	113,466
4	ПЗГБ/3ГГ (93/7)	1405,6	92,909	113,062
5	Полилактид (100)	2188,6	226,000	241,629

Таким образом, показано, что из образцов ПГА, различающихся химическим составом, возможно получение пленочных изделий, имеющих отличия топографии и характеристик поверхности. В целом, поверхность матриц из ПГА гидрофобна и аналогична поверхностям изделий из синтетических полимеров (полиэтилентерефталата, полиметилметакрилата, поливинилхлорида, полиэтилена).

2. Изучение возможности модификации поверхности матриц из ПГА обработкой H_2O_2 -плазмой

Изделия из ПГА гидрофобны, поэтому для повышения адгезионных свойств поверхности изделий из этих полимеров необходимы дополнительные усилия. Один из современных подходов, применяемых для модификации поверхности полимерных изделий, заключается в обработке газовой плазмой. Плазменная обработка представляет интерес не только как средство модификации свойств поверхности изделий, но также и как стерилизующий агент. Необходимо отметить, что отношение материалов и изделий из них к методам стерилизации является важным аспектом успешного применения.

Оценка возможности модификации поверхности H_2O_2 -плазмой выполнена на серии сконструированных матриц разной геометрии: пленочных матрицах из ПГА и ПГА с добавлением полиэтиленгликоля (ПЭГ),

прессованных объемных формах и нетканом полотне, образованном ультратонкими волокнами (рис. 2). На поверхности исходных пленок из ПЗГБ видны микропоры размером до 1 мкм. Более эластичные пленки из менее кристаллического сополимерного ПГА – (ПЗГБ/ЗГВ) имели более выраженную ламинарную структуру. Добавление ПЭГ к полимеру увеличивало структурированность и пористость поверхности пленок. Для прессованных объемных матриц характерна монолитная структура поверхности с наличием единичных трещин. Матрицы из нетканого волокна, образованного ультратонкими волокнами, имели наиболее развитую структуру.

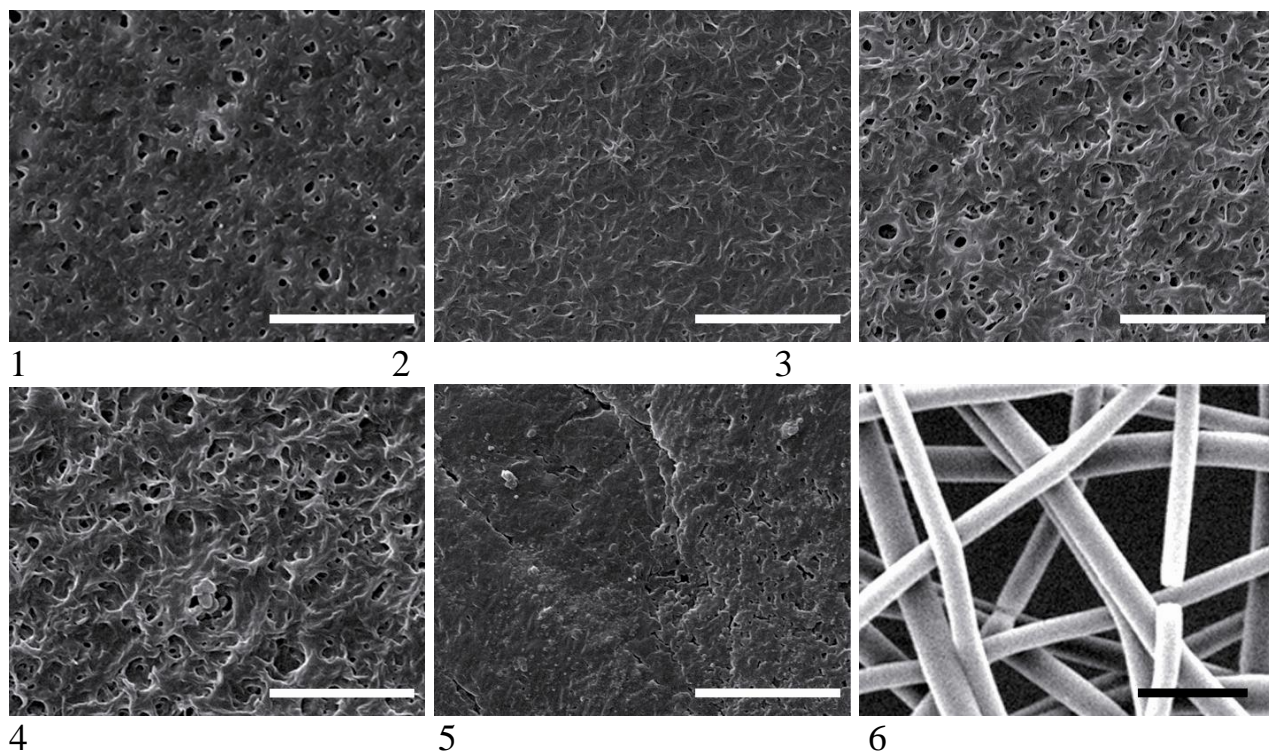


Рис. 2. РЭМ-снимки необработанных матриц, изготовленных из ПГА: 1 – пленка ПЗГБ; 2 – пленка ПЗГБ/ЗГВ; 3 – пленка ПЗГБ+ПЭГ; 4 – пленка ПЗГБ/ЗГВ+ПЭГ; 5 – прессованный образец ПЗГБ; 6 – нетканое полотно. Маркер – 10 мкм

Величины контактных краевых углов смачивания водой существенно зависят от техники изготовления и типа матрикса. Самый низкий показатель ($62,66 \pm 0,80^\circ$) зарегистрирован у матриц, сформированных из ультратонких волокон; самый высокий – у объемных прессованных матриц ($70,88 \pm 1,71^\circ$). Пленочные образцы, независимо от типа использованного полимера, имели близкие значения (от $65,71 \pm 0,55$ до $68,02 \pm 0,36^\circ$). Это значение очень близко к показателям контроля (полистирол – $67,12^\circ$). Добавление к полимеру ПЭГ на величину угла достоверно не влияло.

Полученные матрицы были обработаны H_2O_2 -плазмой в стерилизаторе Sterrad NX («Джонсон&Джонсон», США) в течение 0,5 ч при $45^\circ C$. Для сравнения аналогичные образцы были простерилизованы в автоклаве (1 атм, $120^\circ C$ в течение 2 ч). Независимо от типа матрикса, после стерилизации с применением H_2O_2 -плазмы краевой угол достоверно снижался; наиболее

значительно – у нетканого полотна (до 36,43°). В других вариантах снижение показателей было выражено в меньшей степени – на 4-8 %. Для всех матриц, обработанных H_2O_2 -плазмой, зарегистрировано снижение свободной межфазовой поверхности и увеличение сил сцепления и поверхностного натяжения. Достоверного влияния автоклавирования на величину краевого угла не обнаружено.

Стерильные матрицы были засеяны фибробластами мыши линии NIH 3T3. Через 3 ч после посева подсчет адгезированных клеток показал, что на матрицах, обработанных H_2O_2 -плазмой, количество клеток было сопоставимо с полистиролом и выше, чем на автоклавированных. Наиболее значительное влияние плазменной обработки получено для пленочных матриц. Самое высокое количество клеток (до 28-29 в поле зрения) зафиксировано на пленках из ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ с добавлением ПЭГ. Это выше, чем на матрицах, стерилизованных автоклавированием, соответственно, на 40 и 25 %. На обработанных H_2O_2 -плазмой матрицах из нетканого полотна количество клеток было выше на 18 % по сравнению с автоклавированными.

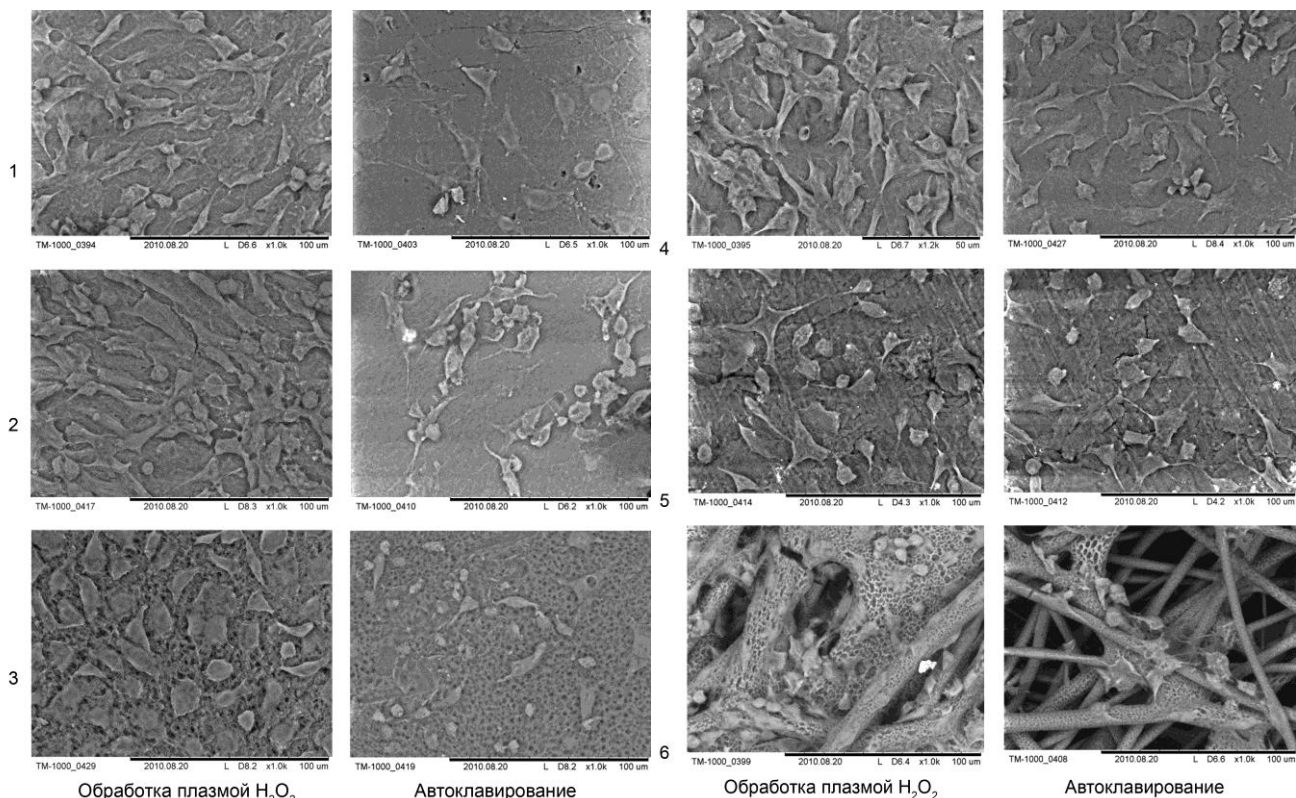


Рис. 3. РЭМ-снимки фибробластов мыши линии NIH 3T3 на матрицах, стерилизованных разными методами через 7 суток после засева матриц (нумерация матриц – аналогично рис. 2)

На пленочных матрицах из ПГА, а также из ПГА с добавлением ПЭГ, простерилизованных H_2O_2 -плазмой, клетки были хорошо распластаны, формировали монослой, среди них преобладали клетки веретенообразной формы (рис. 3). На аналогичных матрицах, но простерилизованных автоклавированием, клеток было в 2-3 раза меньше, и они были неправильной формы. На нетканых матрицах, сформированных ультратонкими волокнами,

морфология клеток была наиболее сходной с морфологией клеток в контроле, преобладали клетки активной звездчатой формы. Клетки проникли во внутренние слои матрикса, их рост сопровождался образованием межклеточного вещества, и это было более выраженным на матриксах, обработанных плазмой. Среди немногочисленных клеток, адгезированных и растущих на объемных матриксах, также наблюдали клетки неправильной формы; при этом, это было более выражено для автоклавированных матриксов.

Результаты МТТ-теста на 7 сутки после засева матриксов клетками также показали, что количество метаболически активных клеток на матриксах, обработанных H_2O_2 -плазмой, было выше, чем на автоклавированных и в контроле. Наибольшее количество клеток зафиксировано на нетканом полотне, подвергнутом стерилизации плазмой, количество клеток возросло до 249×10^6 кл./мл. На пленках, обработанных H_2O_2 -плазмой, количество клеток составило $215-234 \times 10^6$ кл./мл. Наименьшее количество клеток наблюдали на прессованных объемных матриксах ($193,4 \times 10^6$ кл./мл).

Таким образом, клеточные матриксы разных типов, сконструированных из ПГА, характеризуются различной структурой поверхности, свойства которой по разному изменяются при стерилизации автоклавированием и обработкой H_2O_2 -плазмой. Обработка H_2O_2 -плазмой оказывает положительное влияние на свойства поверхности, в особенности, пленочных образцов, снижая контактные краевые углы смачивания водой. Это сопровождается повышением адгезионных свойств поверхности и способствует более активному росту фибробластов.

3. Исследование биосовместимости и функциональных свойств матриксов из ПГА различного химического состава в культуре клеток

Для оценки влияния химического состава ПГА на функциональные характеристики матриксов, перспективных в качестве клеточных носителей и хирургических барьерных средств, сконструирована серия пленочных матриксов из: ПЗГБ, ПЗГБ/ЗГВ (13 мол. % и 27,6 мол. %), ПЗГБ/ЗГГ (7 мол. %) и ПЗГБ/4ГБ (10,7 мол. %). В качестве полимера сравнения использован полилактид (ПМК).

Биосовместимость матриксов из ПГА различного химического состава исследована в культуре фибробластов мышцы линии НИН 3Т3. Подсчет клеток, окрашенных азур-эозином, прикрепленных и растущих на исследуемых матриксах на всех сроках наблюдения выявил достоверно большее ($P=0,05$) количество клеток на матриксах из ПГА всех типов по сравнению с контрольным матриксом из ПМК. Через 24 ч после засева количество клеток (в поле зрения) составляло на матриксах из ПЗГБ ($n=24,3$), ПЗГБ/4ГБ ($n=16,7$), ПЗГБ/ЗГВ (13 и 27,6 мол. %) ($n=30,3$ и $n=38,3$). Через 4 суток количество клеток на всех матриксах из ПГА стало более равномерным ($n = 139-150$); спустя 7 суток количество клеток выросло до $402,7-498,0$. Это выше показателей на полилактиде ($n=265$) и близко к полистиролу ($n=380$). Прикрепленные клетки на всех матриксах были хорошо распластаны, в основном имели звездчатую форму, то есть были в активном состоянии.

Применение флуоресцентных красителей позволяет по сравнению с другими красителями более корректно произвести подсчет клеток. Результаты подсчета клеток с использованием DAPI – флуоресцентного зонда на ДНК, дали результаты, сходные с окрашиванием азур-эозином (рис. 4). Спустя 24 ч после засева матриц фибробластами НИН 3Т3 их количество в контроле (полистирол) и на полилактиде было достоверно ниже, чем на матриксах из всех типов ПГА. Это отставание сохранялось на сроке 4 суток. К концу наблюдения количество клеток на экспериментальных матриксах из ПГА было сопоставимо с полистиролом и составляло (клеток/поле) на ПЗГБ – $440 \pm 27,4$; на ПЗГБ/4ГБ – $366 \pm 18,9$; на ПЗГБ/3ГВ (13 мол. %) – $423 \pm 32,6$; на ПЗГБ/3ГВ (27,6 мол. %) – $452 \pm 13,8$ и на ПЗГБ/ГГ – $402 \pm 19,4$, что от 22 до 50 % в отдельных случаях больше, чем на матриксе сравнения из ПМК.

Таким образом, установлено, что матриксы из ПГА различного химического состава не оказывали негативного влияния при прямом контакте с клетками на их адгезию и рост.

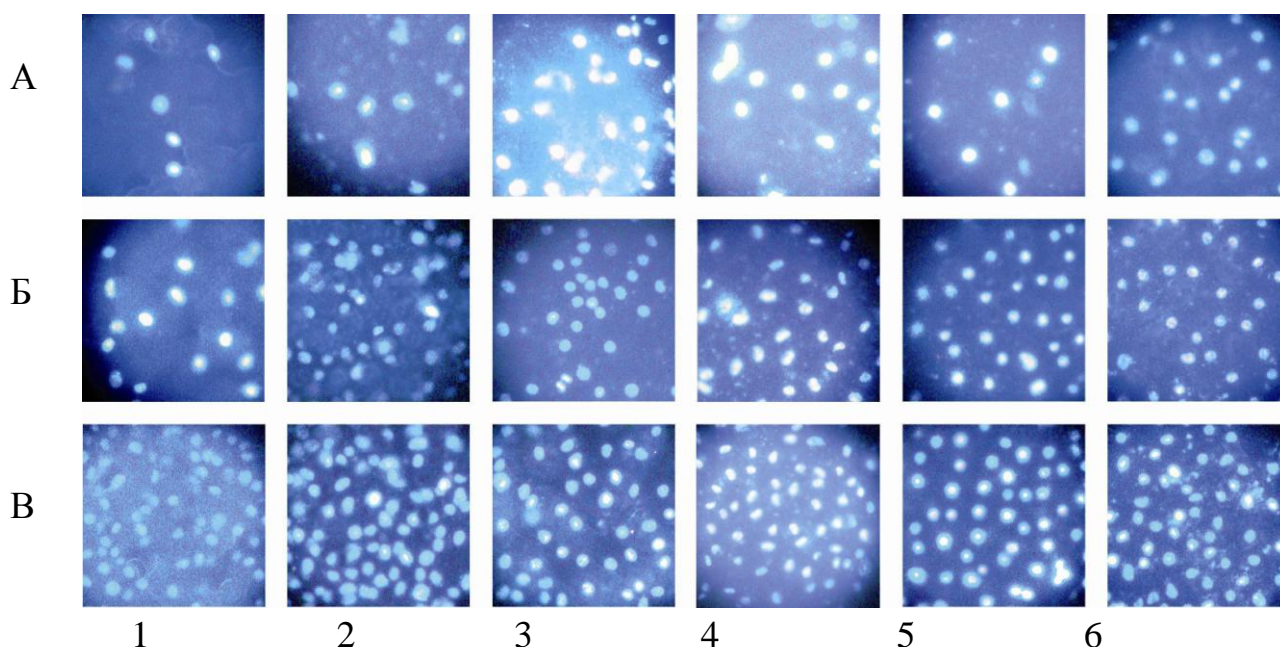


Рис. 4. Окраска DAPI фибробластов НИН 3Т3, растущих на матриксах разных типов: А – через 24 ч, Б – через 4 суток, В – через 7 суток (1 – ПМК, 2 – ПЗГБ, 3 – ПЗГБ/4ГБ (10,7 мол. %), 4 и 5 – ПЗГБ/3ГВ (13 и 27,6 мол. %), 6 – ПЗГГ (7 мол. %))

О высокой биосовместимости матриц, полученных из всех исследованных типов ПГА, свидетельствуют также результаты МТТ-теста (рис. 5). Через 24 ч после засева количество метаболически активных клеток было одинаковым в контроле (полистирол) и на матриксах из всех типов ПГА и несколько выше, чем на полилактиде. Через 4 суток количество клеток на матриксах из ПГА всех типов, а также в контроле было сопоставимым, а количество клеток на полилактиде – практически вдвое ниже. Через 7 суток количество клеток на матриксах из ПГА было близким ($79-94 \times 10^6$ кл./мл), что аналогично контролю (полистирол). Количество клеток на контрольном

полилактиде было ниже в 2 раза по сравнению с данными, полученными для всех типов исследованных типов ПГА (42×10^6 кл./мл).

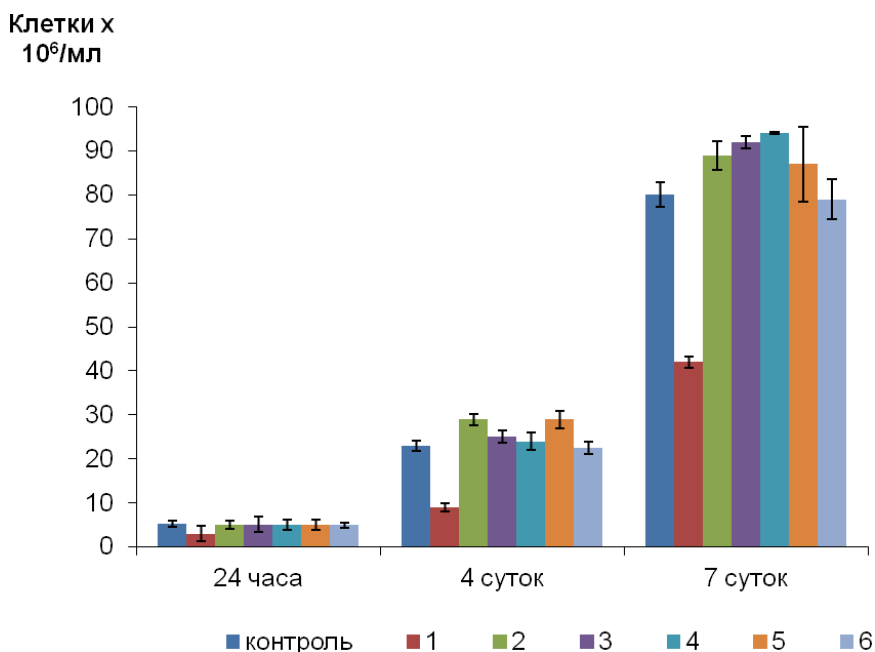


Рис. 5. Динамика прироста фибробластов NIH 3Т3 на матриксах разных типов по результатам МТТ-теста: контроль – полистирол, (нумерация 1-6 – аналогично рис. 4)

Этими экспериментами впервые показано, что пленочные матриксы из ПГА, образованных мономерами с длиной С-цепи от С₄ до С₆, обладают высокой биосовместимостью и пригодны для выращивания клеток в культурах.

4. Оценка биосовместимости матриксов, изготовленных из ПГА разной химической структуры, в эксперименте на животных

Для подтверждения биосовместимости новых материалов и изучения закономерностей взаимодействия с организмом *in vivo* на этапе доклинических исследований необходимы длительные и сложные эксперименты на лабораторных животных. Известно, что реакция тканей на имплантаты зависит не только от химической структуры материала и степени чистоты образца, но также формы и способа изготовления изделия и места введения в организм (Park, Lakes, 2007). Имеющиеся данные в отношении биосовместимости новых типов ПГА весьма ограничены и не свободны от противоречий.

Биосовместимость серии пленочных матриксов из ПГА различного химического состава (аналогичных разделу 3) исследована при подкожной имплантации на крысах линии Вистар (180 суток). В течение всего эксперимента все животные во всех экспериментальных группах, которым были имплантированы матриксы из ПГА различного химического состава, были здоровы и активны, равномерно прибавляли в весе. Достоверных изменений по сравнению с контрольными группами (интактные животные и положительный контроль – матриксы из полилактида) обнаружено не было. Относительные массы внутренних органов у животных всех экспериментальных групп также не отличались от таковых в контроле. Макроскопические исследования внутренних органов животных наблюдения каких-либо отклонений не выявили. Ни у одного

животного не обнаружено отторжения имплантатов, нагноения, расхождения швов и других отрицательных проявлений.

Анализ морфологического состава периферической крови в контрольных и опытных группах показал, что в основном эти показатели находились в пределах физиологических величин и не отличались существенно у животных экспериментальных групп относительно контролей. Незначительное повышение количества лейкоцитов (от 10 до $12,5-13,0 \cdot 10^9/\text{л}$) и уровня СОЭ (до 3.0-3.5) отмечено на 10 сутки после оперативного вмешательства во всех группах у оперированных животных относительно интактного контроля, что было в пределах естественной реакции организма на хирургическое вмешательство. По данным показателям достоверных различий между животными всех 5-ти экспериментальных групп, которым были имплантированы матриксы из ПГА различного химического состава, не выявлено.

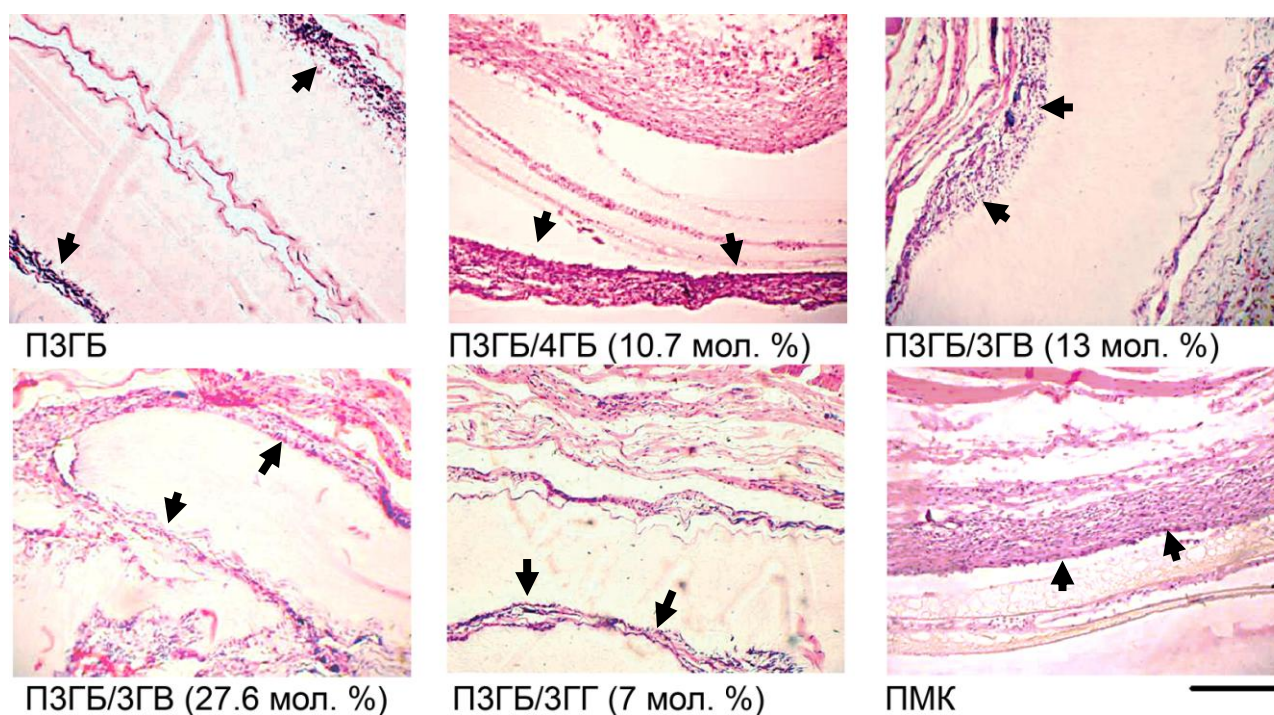


Рис. 6. Состояние матриксов, изготовленных из полимеров различного химического состава, и морфология окружающих тканей через 10 суток после имплантации. Окраска гематоксилин-эозином. Стрелками обозначены границы «матрикс-ткань». Маркер 25 мкм

Гистологические исследования реакции тканей на подкожную имплантацию пленочных матриксов из ПГА различного химического состава существенных отличий и неблагоприятных проявлений не выявили. Начальная реакция тканей на ПГА по характеру воспаления была менее выраженной по сравнению с реакцией на имплантат сравнения (ПМК), количество нейтрофилов и лимфоцитов вокруг которого было выше в 2 раза (рис. 6).

Через 30 суток после имплантации вокруг матриксов всех типов сформировались тонкие фиброзные капсулы. Прорастание соединительной ткани в имплантаты не отмечено. По периферии в окружающей фиброзно-мышечной ткани некрозов, кровоизлияний, лимфогистиоцитарной инфильтрации и отека не

наблюдали. Капсулы характеризуются наличием небольшого количества макрофагов и фибробластов, располагающихся на внутренней поверхности капсулы на границе с пленкой. Определяются единичные гигантские клетки инородных тел (ГКИТ), лежащие в толще внутренней поверхности капсулы. Минимальная толщина капсулы в эти сроки ($22,48 \pm 4,16$ мкм) составляла вокруг имплантатов из ПЗГБ; максимальная ($42,36 \pm 3,43$) – вокруг сополимеров ПЗГБ/4ГБ. В капсуле вокруг контрольного матрикса из ПМК количество нейтрофилов и лимфоцитов было выше в 2,5-3 раза, а ГКИТ, являющихся, как известно, одним из основных агентов биорезорбции ПМК и ПГА – в 20 раз. Капсула вокруг контрольного полилактида была более плотная, толщиной $56,75 \pm 4,5$ мкм. Разрушения матриксов из ПГА не отмечено.

Существенных отличий в состоянии тканей и структуре фиброзных капсул вокруг экспериментальных ПГА-матриксов спустя 60 суток после имплантации не отмечено, за исключением увеличения количества макрофагов и ГКИТ в 3-5 раз. Сформированные капсулы в основном были представлены фибробластами и коллагеновыми волокнами. В капсулах отмечено наличие сосудов микроциркуляторного русла, в их структуре преобладали коллагеновые волокна зрелого типа. В тканях вокруг контрольного матрикса из ПМК отмечено увеличение количества клеток всех типов, а также увеличение толщины фиброзной капсулы до 40-60 мкм.

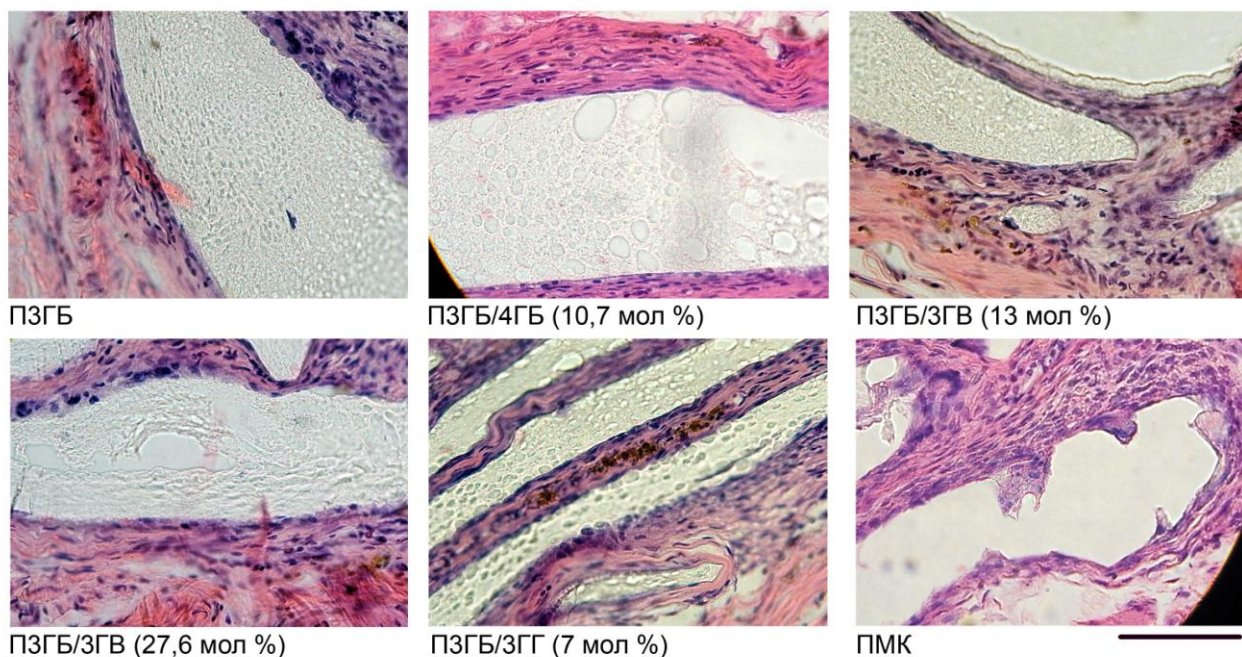


Рис. 7. Состояние матриксов, изготовленных из полимеров различного химического состава, и морфология окружающих тканей через 90 суток после имплантации. Окраска гематоксилин-эозином. Стрелки указывают на границы полимерных матриксов. Маркер 40 мкм

Спустя 90 суток отмечено возрастание толщины фиброзных капсул вокруг всех типов матриксов, однако капсулы были не грубыми, а их толщина не превышала 100 мкм (рис. 7). Капсулы характеризуются наличием ярко

выраженной двухслойности, внутренений слой занимает 1/3 толщины, представлен фиброзной тканью с большим количеством макрофагов, фибробластов и примесью ГКИТ. Наружная поверхность представлена плотной фиброзной тканью в виде пучков коллагеновых волокон и прилегающих к ним фиброцитов. Капсулы характеризуются высокой зрелостью коллагена с наличием фиброцитов в внешнем слое, внутренний представлен тонким слоем фибробластов с примесью макрофагов. Матрицы из ПГА деструктурированы в разной степени, матрицы из ПМК – практически полностью разрушены.

Спустя 180 суток после имплантации вокруг ПГА-матриков зафиксировано значительное истончение капсул до 30-40 мкм, что является показателем высокой биосовместимости ПГА (рис. 8). Средняя толщина капсул вокруг матриков из всех типов ПГА сократилась в 1,5-2,3 раза по сравнению со сроком 90 суток. При этом количество активных макрофагов в тканях, примыкающих к имплантатам, по-прежнему оставались на высоком уровне, выросло количество ГКИТ с 10-12 ядрами. В периферических частях капсулы наблюдали образование зрелой соединительной ткани в виде пучков коллагеновых волокон и прилегающих к ним фиброцитов. За исключением ПЗГБ, практически все матрицы сильно разрушены и дефрагментированы.

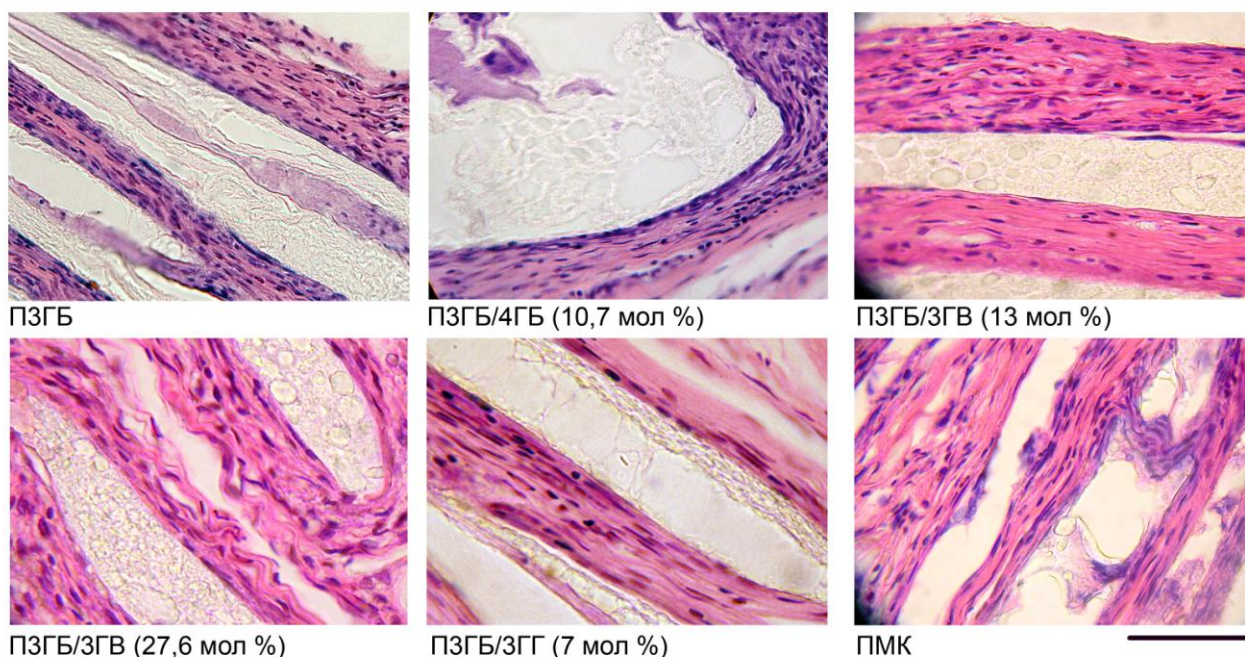


Рис. 8. Состояние матриков, изготовленных из полимеров различного химического состава, и морфология окружающих тканей через 180 суток после имплантации. Окраска гематоксилин-эозином. Стрелки указывают на границы полимерных матриков. Маркер 40 мкм

Таким образом, впервые в экспериментах на животных проведены исследования семейства матриков из ПГА различного химического состава. Не выявлено отрицательного влияния подкожной имплантации ПГА-матриков на физиологические и биохимические характеристики животных. Независимо от состава ПГА и длительности контакта с внутренней средой организма, не

отмечены отклонения в поведении животных, их росте и развитии, а также функции периферической крови. Реакция тканей на ПГА-матрицы характеризуется непродолжительным и умеренным воспалением с образованием негрубых фиброзных капсул не более 100 мкм, которые постепенно инволюционируют. Реакция тканей на ПМК была более выражена на ранних сроках.

5. Исследование динамики разрушения ПГА-матриц *in vivo*

Знание закономерностей разрушения матриц *in vivo* необходимо для разработки биомедицинских изделий из резорбируемых ПГА. Для оценки динамики разрушения матриц *in vivo*, помимо морфологических исследований гистологических срезов, регистрировали остаточное содержание ПГА в тканях, а также показатели, характеризующие изменение полимеров в процессе разрушения: молекулярную массу M_v (средневесовую), M_n (среднечисловую) и полидисперсность ПД (рис. 9-10).

Наиболее активно разрушался контрольный матрикс из полилактида (ПМК): его остаточная масса через 30 суток не превышала 60, через 60 – была на уровне 36; спустя 90 суток – порядка 10-15 %, через 180 суток остаточная масса полимера матрикса из ПМК была следовой. Все матрицы из ПГА разрушались значительно медленнее (рис. 9).

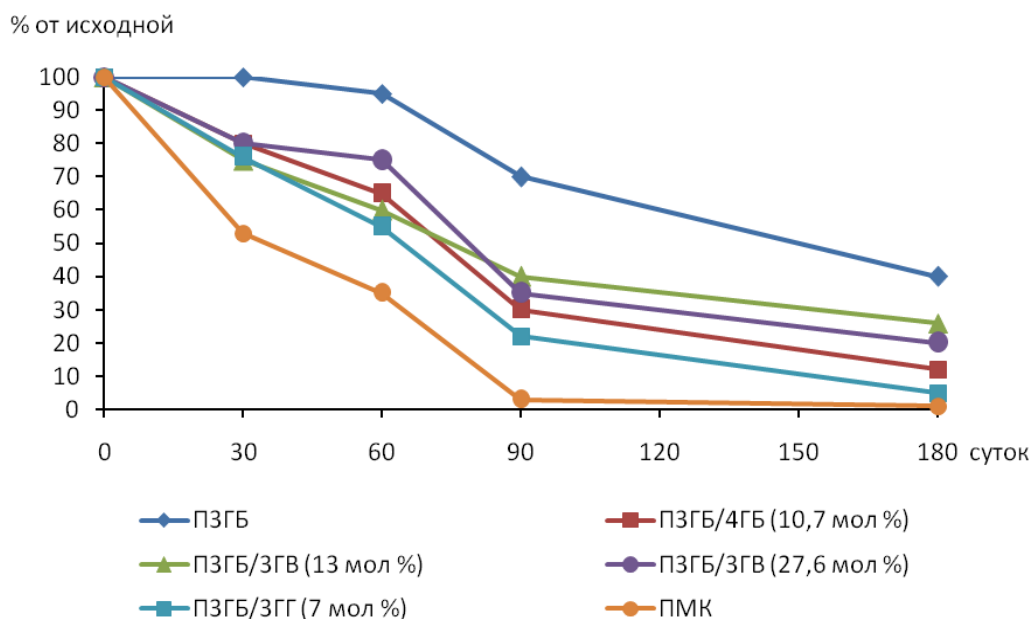
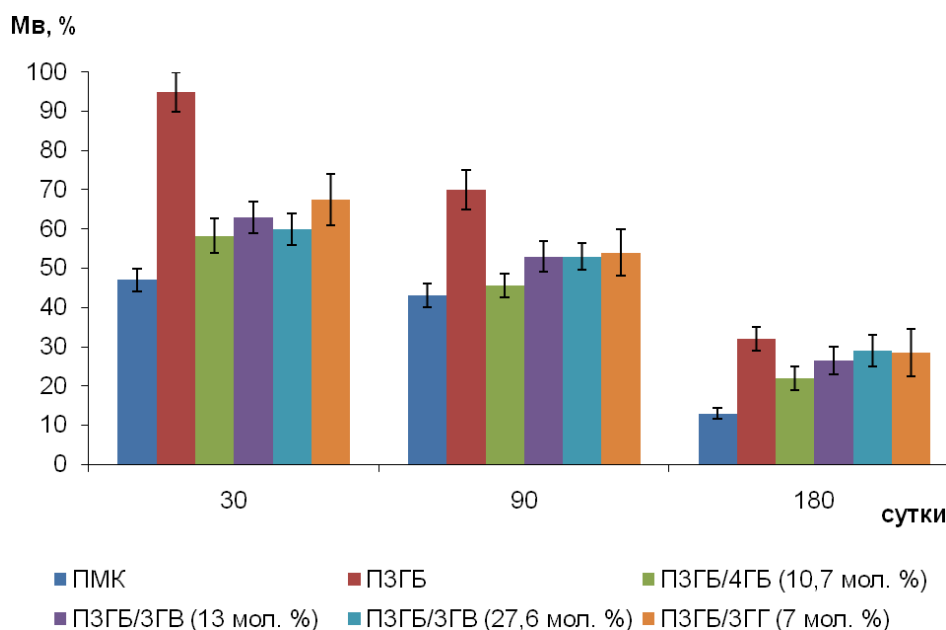


Рис. 9. Изменение веса полимерных матриц в ходе 180-ти суточной подкожной имплантации

Остаточная масса матриц из сополимеров ПЗГБ/3ГГ и ПЗГБ/4ГБ составила соответственно через 30 суток 75-80, через 90 суток – 20 и 33, к концу эксперимента, 10 и 20 % от исходной. Разрушение матриц из сополимеров ПЗГБ/3ГВ происходило практически одинаково и было менее замедленным по сравнению с выше описанными сополимерами: через 90 суток их остаточная масса составляла около 40 %, а через 180 суток – 30-35 % от исходной. Наиболее устойчивы к разрушению *in vivo* матрицы из ПЗГБ,

заметное разрушение которых (на уровне 25 %) зафиксировано только на сроке 90 суток, а через 180 суток остаточная масса этого типа матрикса составляла 45 % от исходной.

У всех матриксов в ходе эксперимента происходило снижение M_v и M_n . У контрольного матрикса из ПМК, исходно характеризующегося существенно более низкими значениями M_v и M_n (табл. 1), зарегистрировано самое быстрое по срокам и значительное изменение молекулярной массы. Так, спустя месяц после имплантации M_v и M_n ПМК снизились практически на половину от исходных величин, а к концу эксперимента через 180 суток составляли, соответственно, 13 и 12 % от исходных. Значения M_v и M_n у матриксов из всех типов ПГА, разрушение которых протекало с различной интенсивностью, и, в целом, менее активно, чем ПМК, также закономерно падали. Наиболее значительно и на ранних сроках величина M_v уменьшалась у матриксов из сополимера ПЗГБ/4ГБ, и составляла через 30 суток 58, через 180 суток – 22 % от исходной величины. Падение M_v у матриксов из сополимеров ПЗГБ/ГВ и ПЗГБ/ЗГГ было сходным, через 30 суток – 60, через 180 суток снизилась до 26-29 % от исходной (рис. 10).



*Рис. 10.
Динамика убывания молекулярной массы M_v образцов полимеров при подкожной имплантации в течение 180 суток, в % от исходной*

Полидисперсность ПГА, характеризующая соотношение в полимере фрагментов с различной степенью полимеризуемости, падала у всех исследованных матриксов, что является показателем вымывания более короткоцепочечных фрагментов. Падение ПД было сопоставимо для матриксов из ПЗГБ/4ГБ и ПЗГБ/ЗГГ (в 1,3 раза от исходной величины) и более заметным у ПЗГБ (в 2,3 раза).

Таким образом, установлено, что по биоразрушаемости сконструированные матриксы из ПГА различного химического состава находятся в ряду: ПЗГБ/ЗГГ – ПЗГБ/4ГБ – ПЗГБ/3ГВ – ПЗГБ. Наиболее активно разрушаемыми ПГА определены матриксы из сополимеров, содержащие 3-

гидроксигексаноат и 4-гидроксибутират. Следующими и более медленно разрушаемыми были матриксы из сополимера ПЗГБ/ЗГВ, и самыми устойчивыми – матриксы из ПЗГБ. Более медленная разрушаемость матриксов из ПГА сопровождалась более поздним развитием гигантоклеточной реакции.

Выводы:

1. Впервые из высокоочищенных образцов ПГА различного химического состава (ПЗГБ и сополимеров ПЗГБ/4ГБ, ПЗГБ/ЗГВ, ПЗГБ/ЗГГ) с применением технологии испарения растворителя, техники выщелачивания, холодного прессования, микродропинга, электростатического формования сконструированы и исследованы матриксы в виде плотных и пористых пленок, объемных форм, микрочастиц, нетканого полотна, сформированного ультратонкими волокнами.

2. С применением РЭМ, АСМ, вычислением характеристик поверхности на базе измерения краевого угла смачиваемости водой установлено, что на свойства поверхности матриксов влияет химический состав ПГА, введение порообразующих компонентов и техника изготовления.

3. Показана возможность модификации поверхности матриксов из ПГА обработкой H_2O_2 -плазмой, которая сопровождается повышением гидрофильности, что положительно сказывается на адгезии и жизнеспособности функционирующих клеток.

4. В культуре фибробластов мыши линии NIH 3T3 по результатам окрашивания клеток флуоресцентным зондом на ДНК DAPI и в МТТ-тесте доказано отсутствие цитотоксичности всех исследованных типов ПГА (ПЗГБ, ПЗГБ/4ГБ, ПЗГБ/ЗГВ, ПЗГБ/ЗГГ) при прямом контакте с клетками; по адгезивным свойствам и способности поддерживать пролиферацию клеток все матриксы сопоставимы с полистиролом и превосходят полимолочную кислоту.

5. Впервые в хроническом эксперименте на лабораторных животных изучены ответ организма и реакция тканей на подкожную имплантацию матриксов из ПГА различного химического состава и получены количественные данные, характеризующие этот процесс; доказана биологическая безопасность матриксов из всех исследованных типов ПГА и соответствие требованиям, предъявляемым к материалам и изделиям медико-биологического назначения.

6. Установлено, что биодegradация ПГА *in vivo* зависит от химической структуры и усиливается в ряду ПЗГБ < ПЗГБ/ЗГВ < ПЗГБ/4ГБ < ПЗГБ/ЗГГ. С применением ВЭЖХ показано, что наибольшие изменение молекулярной массы и полидисперности ПГА имеют место у быстро разрушающихся сополимеров ПЗГБ/ЗГВ и ПЗГБ/ЗГГ, для которых характерна более выраженная на ранних сроках гигантоклеточная реакция тканей.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации по теме диссертации в журналах, рекомендованных ВАК:

1. Николаева Е.Д. Влияние обработки H_2O_2 -плазмой на свойства клеточных носителей из резорбируемых полиэфиров «Биопластотан» / Е.Д. Николаева, Д.Б. Гончаров, Е.И. Шишацкая // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. VI, № 2. – С. 65-70.
2. Николаева Е. Д. Сравнительное исследование клеточных носителей, полученных из резорбируемых полигидроксисалканоатов различного химического состава / Е. Д. Николаева, Е.И. Шишацкая, К.Е. Мочалов, Т.Г. Волова, Э. Дж. Сински // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 6, № 4. – С. 63-67.
3. Zhila N. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymers / N. Zhila, T. Volova, D. Sirvacheva, I. Osipova, E. Nikolaeva // Journal of Siberian Federal University. Part "Biology". – 2011. – V. 4, №2. – P. 155-165.

Тезисы докладов и материалов конференций:

4. Николаева Е. Создание биосовместимых биоразрушаемых сосудистых стентов на основе полиоксисалканоатов / Е. Николаева, Е.И. Шишацкая // XLIV Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс», секция «Медицина». – Сб. тезисов. – Новосибирск. – 2006. – С. 21-22.
5. Николаева Е.Д. Резорбируемые матриксы для культивирования клеток / Е.Д. Николаева, Е.И. Шишацкая // Медицинский академический журнал. – Санкт-Петербург. – 2010. – Т.5, № 10. – С. 216.
6. Гончаров Д.Б. Влияние способов стерилизации на свойства поверхности полигидроксисалканоатов / Д.Б. Гончаров, Е.Д. Николаева // XLIX Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс». – Сб. тезисов. – Новосибирск. – 2011. – С. 228
7. Николаева Е.Д. Сравнительное исследование клеточных матриксов, полученных из резорбируемых ПГА различного химического состава / Е.Д. Николаева, Е.И. Шишацкая // Международный научный семинар с молодежной школой «Биотехнология новых материалов и окружающая среда». – Сб.тезисов. – Красноярск. – 2011, С. 44-46.

Автор благодарит своего научного руководителя Шишацкую Екатерину Игоревну и руководителя Лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза Волову Татьяну Григорьевну за постоянное внимание и участие в работе, сотрудников Института биофизики СО РАН О.Г. Беляеву, Н.О. Жила, А.Н. Бояндина, А.В. Гореву за помощь в проведении экспериментов. Отдельная благодарность сотрудникам Лимнологического института СО РАН Е.В. Лихошвай и В.И. Егорову за помощь в проведении электронно-микроскопических исследований.