

на правах рукописи

Жаркова Ирина Игоревна

**МАТРИКСЫ ИЗ БИОСИНТЕТИЧЕСКОГО СОПОЛИМЕРА ПОЛИ-3-
ОКСИБУТИРАТА С ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ ДЛЯ ИНЖЕНЕРИИ КОСТНОЙ
ТКАНИ**

03.01.06 биотехнология

(в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2017

Работа выполнена на кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Научные руководители: **Бонарцев Антон Павлович**
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник,
Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова

Официальные оппоненты: **Новикова Светлана Петровна**
доктор биологических наук, профессор, Федеральное
государственное бюджетное учреждение науки «Научный
центр сердечно-сосудистой хирургии имени А.Н. Бакулева»,
зав. лабораторией химии и технологии материалов для
сердечно-сосудистой хирургии.

Роговая Ольга Сергеевна
кандидат биологических наук, Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки Институт биологии развития
им. Н. К. Кольцова Российской академии наук, научный
сотрудник лаборатории клеточной биологии

Ведущая организация: **ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»**

Защита диссертации состоится 4 апреля 2017г. в 15.30 на заседании диссертационного совета Д 501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12, биологический факультет МГУ, ауд. М-1.

Тел. 8(495)939-54-83, эл. почта: npiskunkova@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «__» _____ 2017 года.

**Ученый секретарь
диссертационного совета**

к.б.н. Пискунова Нина Федоровна

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. За последние годы тканевая инженерия стала одним из перспективных и важных направлений исследований, которая занимается изучением не только тканей и органов для трансплантации, но также открывает новые перспективы для лечения заболеваний. Одной из наиболее важных областей исследований в тканевой инженерии является заместительная клеточная терапия. Клетки могут быть трансплантированы в организм в суспензионной форме или в составе некой конструкции с твердым носителем. Причем второй тип имплантации является более предпочтительным для использования в терапии твердых соединительных тканей. Таким образом, изучение полимерных материалов и их подбор для реализации тех или иных биологических задач является актуальной задачей. Наиболее распространенными в медицинской практике являются полимерные материалы синтетического происхождения (полимолочная и полигликолевая кислоты, поликапролактон и др.), основными преимуществами которых являются доступное сырье для производства, возможность производства в промышленных масштабах, низкая токсичность. Но из-за ряда недостатков, таких как химический способ производства, который приводит к остаточному содержанию неорганических примесей, а также высокая скорость биodeградации и, связанное с этим, локальное закисление тканей, что приводит к развитию хронической воспалительной реакции, на первый план постепенно выходят полимерные материалы микробиологического происхождения, такие как поли-3-оксиалканоаты (ПОА) (например, поли-3-оксибутират (ПОБ)) и их изучение становится более востребовано. Наряду с проблемой выбора самого материала, не менее актуальным является поиск оптимальной формы полимерной конструкции. Что касается твердой соединительной ткани, то здесь наиболее приоритетными свойствами имплантата являются прочность и пористость, но, зачастую, эти характеристики биоимплантатов являются взаимоисключающими, поэтому выбор приоритета того или иного свойства зависит от конкретной задачи: компенсации механических свойств поврежденной ткани или стимуляции ее регенерации. Одной из наиболее острых проблем, возникающих при использовании биоматериалов и изделий, получаемых на их основе, является неудовлетворительное взаимодействие поверхности имплантата с окружающими тканями. Другими словами, улучшение биосовместимости материалов также является одной из первоочередных задач исследователей. Одним из популярных методов модификации нежелательных свойств полимерных материалов является использование различных добавок, в частности полиэтиленгликоля (ПЭГ). Имеется много работ, где показано положительное влияние ПЭГа, как композитной добавки на свойства полимерных материалов и при его сополимеризации с полимерами медицинского назначения.

С учетом изложенного выше в данной работе были исследованы свойства полимерного материала на основе сополимера ПОБ с ПЭГ (ПОБ-ПЭГ), полученного методом биотехнологической сополимеризации, в сравнении с материалами на основе гомополимера ПОБ и композита ПОБ с ПЭГ (ПОБ/ПЭГ). В рамках работы разработана методика получения пористых полимерных матриц из вышеуказанных материалов, основанная на принципе выщелачивания - простом, достаточно популярном и воспроизводимом методе. Проведены комплексные исследования этих матриц, в частности изучены морфологические, физико-химические свойства, биосовместимость, способность поддерживать рост и дифференцировку в остеогенном направлении мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в условиях *in vitro*. На примере имплантации матрикса из ПОБ-ПЭГ в костную ткань крысы, показана его способность к поддержанию остеогенеза *in vivo*.

Цель и задачи исследования.

Целью данной работы была разработка и исследование пористых полимерных конструкций на основе сополимера поли-3-оксибутирата-со-полиэтиленгликоля для инженерии костной ткани. В данном исследовании проводилась работа по сравнению свойств материалов, а также изделий на их основе.

В соответствии с целью исследования были сформулированы следующие *задачи*:

1. Биосинтез сополимера ПОБ-ПЭГ и изучение его физико-химических свойств.
2. Разработка методики создания пористых матрицков из полученного сополимера и материалов сравнения – гомополимера ПОБ и композита ПОБ/ПЭГ.
3. Изучение морфологии, физико-химических свойств и биосовместимости *in vitro* полученных матрицков.
4. Исследование роста и дифференцировки МСК в остеогенном направлении *in vitro* на полученных матрицках.
5. Исследование способности матрицков поддерживать рост костной ткани в условиях *in vivo*.

Научная новизна. В ходе данной работы впервые были исследованы свойства сополимера ПОБ-ПЭГ в сравнении с ПОБ и композитом ПОБ/ПЭГ. Изучены сходство и различие в морфологии полимерного материала не только на физическом уровне, но и его ультраструктуры с помощью атомно-силовой микроскопии. Впервые был разработан метод получения пористых плоских матрицков из ПОБ-ПЭГ. Подобраны оптимальные условия для культивирования МСК на его поверхности как при нормальных условиях, так и при стимуляции их дифференцировки по остеогенному пути. Впервые изучена тканевая реакция при имплантации и показана эффективность использования пористых матрицков из сополимера ПОБ-ПЭГ в стимуляции остеогенеза.

Практическая значимость работы. При сравнении свойств сополимера, гомополимера и композита было показано, что композит обладает более ярко выраженными свойствами, присущими ПЭГ: гидрофильность, пластичность, высокое водопоглощение и пр., но при этом совершенно четко прослеживается отличие сополимера от гомополимера. Все эти материалы проявляют хорошие показатели биосовместимости и могут использоваться в тканевой инженерии. Получен новый вид пористых плоских матрицков, пригодный для культивирования МСК как нативных, так и дифференцированных по остеогенному пути. Разработанные биополимерные конструкции могут быть рекомендованы к использованию в инженерии костной ткани в качестве изолирующих мембран или в качестве подложек для более быстрой регенерации костной ткани.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы были доложены на Первой международной конференции "Неделя клеточных технологий " (Украина, Киев, май 2013), на Пятой Всероссийской научно-практической конференции "Стволовые клетки и регенеративная медицина" (Москва, ноябрь 2013), на Второй международной конференции по биоинформатике и биомедицинской инженерии (Испания, Гранада, апрель 2014), на Международной конференции "Клеточные технологии на рубеже: Исследования и практика" (Санкт-Петербург, апрель 2016), на одиннадцатом симпозиуме "Поликонденсация 2016", Москва, сентябрь 2016)

Публикации. По теме диссертации опубликовано 3 статьи в журналах из перечня ВАК ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, 2 статьи в зарубежных рецензируемых журналах, 4 статьи в сборниках статей по материалам конференций (1 российская, 3 международных), отражающие основной объем диссертационной работы.

Личное участие автора. Автор освоила все экспериментальные методы, используемые в данной работе, за исключением атомно-силовой микроскопии, используемой при анализе ультратонких пленок. Основные результаты были получены автором лично, выводы сделаны на основе анализа собственных результатов.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 143 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы, содержащий ссылки на 179 источников. Диссертация иллюстрирована 36 рисунками и 15 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Материалы и их исследования

1.1. Условия биосинтеза. В работе использовали штамм-продуцент ПОб *Azotobacter chroococcum* 7Б, способный синтезировать до 80 % ПОб от сухого веса клеток. Коллекционный штамм *Azotobacter* поддерживали на среде Эшби. Для достижения максимального синтеза поли-3-оксибутирата, культуру клеток выращивали на среде Берка, содержащей 20 г/л сахарозы, как первичный источник углерода. Для синтеза сополимеров ПОб в культуральную среду добавляли дополнительный источник углерода: валериановую, 4-метилвалериановую кислоты или полиэтиленгликоль. Для синтеза сополимера ПОб-ПЭГ к среде был добавлен ПЭГ 300 в концентрации 150 мМ. Оптическую плотность контролировали нефелометрически. Культивирование проводили в качалочных колбах на 200 мл на качалке (180 об/мин) при 37°C в течение 72 часов.

1.2. Определение молекулярной массы полимера. Величину молекулярной массы (ММ) поли-3-оксибутирата и сополимера ПОб-ПЭГ определяли методом капиллярной вискозиметрии, используя капиллярный стеклянный вискозиметр марки ВПЖ-2 (диаметр капилляра 0,56 мм) (ULAB, Россия).

1.3. Ядерно-магнитный резонанс. Спектры ¹H-ЯМР 1-2% растворов ПОб и его сополимера ПОб-ПЭГ в дейтерированном хлороформе сняты на спектрометре MSL-300 (Bruker, Германия).

1.4. Изготовление полимерных пленок. Пленки из ПОб, ПОб-ПЭГ и ПОб/ПЭГ были получены методом осаждения из 3% раствора полимеров в хлороформе на стеклянную чашку Петри.

1.5. Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). Тепловые свойства пленочных образцов и матриц были измерены с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии с использованием DSC 204 F1 Phoenix (Netzsch, Германия).

1.6. Измерение контактных углов. Измерение производилось на цифровом угломере - системе анализа формы капли Drop Shape Analysis System - DSA100 (KRÜSS GmbH, Германия). Определялся динамический угол натекания.

1.7. Водопоглощение. Водопоглощение полимерных пленок измерялось в соответствии со стандартом [ISO U. 62: 2008] и рассчитывалось по формуле: Водопоглощение (%) = $(m_1 - m_0)/m_0 \times 100\%$, где m_0 и m_1 - массы обезвоженного и насыщенного водой образцов соответственно.

1.8. Атомно-силовая микроскопия макро- и ультратонких пленок. Ультратонкие пленки готовили методом нанесения на вращающуюся подложку (spin-coating). Сканирование осуществлялось на микроскопах Solver PRO и Smena (НТ-МДТ, Россия).

1.9. Механические свойства полимерных материалов. Механические испытания полимерных материалов проводили на приборе Инстрон Zwick/Roell BZ 25/TN1S (Zwick Roell, Германия).

1.10. Биосовместимость *in vitro*. Для оценки биосовместимости использовали метод оценки цитотоксичности, а также метод культивирования клеток на поверхности пленок. В работе были использованы линии фибробластов COS-1, фибробластов 3Т3 и МСК. Прикрепление и рост клеток на полимерных пленках и матриксах оценивали биохимическим тестом ХТТ с помощью ХТТ Cell Proliferation Kit (Biological Industries, Израиль).

Основными материалами для изготовления матриц были выбраны: гомополимер ПОб (ММ = 485 000 Да), его сополимер ПОб-ПЭГ (ММ= 217 000 Да), а также композит ПОб/ПЭГ (ПЭГ с ММ=1500 Да, Химмед, Россия).

2. Получение и исследования матриц

2.1. Метод выщелачивания. Матрицы были получены методом выщелачивания. Для этого чашку Петри покрывали слоем карбоната аммония, затем добавляли 3% раствор полимера в хлороформе и дожидались полного испарения растворителя. Карбонат аммония удаляли нагреванием Чашки Петри на водяной бане. Затем матрикс промывали и высушивали.

2.2. Пористость и размер пор. Пористость матриц рассчитывали по формуле

$$\text{Пористость}(\%) = \left(\frac{\text{Плотность матрикса (г/см}^3\text{)}}{\text{Плотность материала (г/см}^3\text{)}} \right) \times 100\%$$

Размер пор оценивали по фотографиям, полученным с помощью сканирующей электронной микроскопии (JSM-6380LA, JEOL, Japan).

2.3. Адсорбция белка. Полимерные матриксы инкубировали в растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА) (Sigma, США) с концентрацией 1 мг/мл. После инкубации образцы отмывали в фосфатно-солевом буфере (pH=7,4) на шейкере при 37°C 1 ч, затем отмывали в буфере с 0,1 % SDS (Химмед, Россия) в тех же условиях. Количество белка в растворе оценивали методом адсорбционной спектроскопии при 280 нм (Hitachi-557, Япония).

2.4 Конфокальная микроскопия. Для построения трехмерной модели матрикса с адсорбированным на его поверхности белком и для идентификации и визуализации прикрепленных и растущих в объеме матрикса клеток использовали конфокальный микроскоп LSM710 (Carl Zeiss, Germany). Предварительно матрикс инкубировали в течении часа в растворе FITC-меченного БСА (Sigma, США) и затем проводили трехкратную отмывку в ФСБ. Клетки окрашивали кальцеином (Calcein AM, eBioscience, USA) в концентрации 2 мкМ в течении 15 мин при комнатной температуре.

3. Мезенхимальные стволовые клетки МСК

3.1. Выделение МСК. Мезенхимальные стволовые клетки получали выделением из бедренных костей 5-дневных крыс породы Вистар. Удаляли костный мозг из диафизов бедренных костей путем промывания. Полученную суспензию инкубировали в Среде DMEM с коллагеназой 1 типа (1075 ед/мл) (ПанЭко, Россия) 1 час при 37°C. Осадок, полученный после центрифугирования 10 мин 100 об/мин, высаживали на культуральный пластик.

3.2. Фенотипирование МСК мыши методом проточной цитометрии. Клетки снимали инкубацией в растворе Трипсин, подсчитывали и готовили суспензию в буфере (2 мМ ЭДТА, 0,5% ЭТС в PBS) . После этого нкубировали с антителами к поверхностным маркерам CD90, CD45, CD11b и CD29 в темноте в течение 20 минут при температуре +5°C. Клетки отмывали центрифугированием один раз в PBS и анализировали на проточном цитометре FACSAria SORP (Becton Dickinson, USA).

3.3. Сканирующая электронная микроскопия. Полимерные образцы с прикрепленными к ним живыми клетками подвергали дегидрированию в растворах с повышающейся концентрацией этанола 30%, 50%, 70%, 82%, и 96%, а затем в смеси спирта и ацетона 3:1, 1:1, 1:3 и в 100% ацетоне. В каждом типе раствора образцы инкубировали 5 мин и затем подвергали сушке в критической точке на аппарате Hitachi critical point dryer HCP-1 (Hitachi Ltd., Япония). Исследования проводились на электронных микроскопах JSM-25S (JEOL, Япония) и SAM-SCAN-S2 (Cambridge Instruments, Англия).

3.4. Остеонаправленная дифференцировка МСК. Культуральная среда для остеодифференцировки МСК готовилась на основе DMEM и содержала 10% ЭТС (Biological Industries, Израиль), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, 0,1 мкМ дексаметазона (KRKA, Чехия), 10 мМ β-глицерофосфата (Sigma, США) и 50 мМ аскорбиновой кислоты (Sigma, США). Образцы с прикрепленными МСК инкубировали в остеогенной среде в течении 21 суток. В качестве контролей использовались матриксы с МСК, инкубировавшиеся в обычной ростовой среде, а также клетки, инкубировавшиеся на культуральном пластике, одна часть которых подвергалась, а вторая не подвергалась дифференцировке в остеогенном направлении.

Окраска ализариновым красным. Образцы фиксировали 10% формалином 10 мин и затем окрашивали 40 мМ раствором Ализаринового красного S в PBS и анализировали с помощью световой микроскопии на микроскопе AxioLab A1FL (Carl Zeiss, Германия).

Щелочная фосфатаза. Для определения щелочной фосфатазы использовали образцы полимерных матриксов диаметром 1 см. Изначально МСК заседали из расчета 20000 клеток на образец и анализировали на 7, 14 и 21 сутки. Образцы, с растущими на них клетками,

промывали 2 раза в PBS, затем помещали в лизирующий буфер (250 мМ NaCl, 0,1% Triton X-100, 50мМ Hepes, pH 7,5) и подвергали 3-м циклам замораживания-оттаивания. Пробы инкубировали в буфере (15 мМ н-нитрофенилфосфат (Sigma, США), 2 мМ MgCl₂, 1 М диэтаноламин, pH = 10) в течении часа и измеряли оптическую плотность при 405 нм.

3.5. Имплантация *in vivo* и тканевая реакция на мелких лабораторных животных. Исследование биосовместимости пористых матриц *in vivo* проводили при имплантации в костную ткань. Для этого в бедренной кости создавали несквозной дефект диаметром 1,5 мм и заполняли его пористым матриксом. Анализировали тканевую реакцию на 3, 7, 14, 40, 90 и 180 сутки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Получение и исследование материалов.

В нашей лаборатории разработан эффективный способ микробиологического получения сополимеров поли-3-оксибутирата: поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерата (ПОВВ), поли-3-оксибутират-полиэтиленгликоля (ПОВ-ПЭГ), поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат-полиэтиленгликоля (ПОВВ-ПЭГ) и, впервые в рамках той работы поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерата (ПОВ4МВ) с использованием штамма продуцента *Azotobacter chroococcum* 7Б. Включение звеньев в полимерную молекулу ПОВ было доказано методом ЯМР и показано в таблице 1.

	ПОВ	ПОВВ	ПОВ4МВ	ПОВ-ПЭГ	ПОВВ-ПЭГ
3-оксивалерат, моль%	0	2,5	0,6	0	7,5
ПЭГ, моль%	0	0	0	0,33	0,23

Таблица 1. Состав полученных сополимеров.

Для дальнейшей работы нами был выбран сополимер ПОВ-ПЭГ как полимер, обладающий наименьший контактный угол с водой (данные здесь не представлены), что указывает на его наибольшую гидрофильность.

2. Исследование физико-химических свойств полимерных материалов

2.1. Физико-термические свойства полимеров

Включение ПЭГ в цепь ПОВ вызывает следующие аномалии: а) уменьшение площади пика плавления при первом прогреве, что указывает на уменьшение общей степени кристалличности и его увеличение при втором прогреве, что является свидетельством необратимости фазового перехода (Таблица 2); б) снижение температуры плавления на 1°C и на 3°C по сравнению с ПОВ при первом и втором прогреве соответственно; в) смещение пика плавления в область низких температур. Таким образом, несмотря на низкий уровень включения ПЭГ в цепи ПОВ, кристалличность и температура плавления полученного сополимера ПОВ-ПЭГ заметно изменились, что указывает на значительное влияние связывания ПЭГ и конца цепи полимера ПОВ на физико-термические свойства и внутреннюю структуру полимерной матрицы.

Полимеры	Температура начала плавления, (t плав., °C)	Пик плавления. (t пик., °C ^к)	Энтальпия плавления (ΔH, Дж/г)	Кристалличность (X _c ,%)	I прогрев		II прогрев	
					Температура начала плавления, (t плав., °C)	Пик плавления. (t пик., °C ^к)	Энтальпия плавления (ΔH, Дж/г)	Кристалличность (X _c ,%)
ПОВ	170	178,0	92,72	63,25	167,4	175,0	99,6	67,94
ПОВ/ПЭГ	146,3/ 159	153/ 172	82,31	80,21*	150,5	157/173,0	76,12	74,18*
ПОВ-ПЭГ	155,6/ 169,3	161/ 176	74,4	50,75	164,4	172,0	102,6	69,99

Таблица 2. Физико-термальные свойства полученных сополимеров: ПОВ, ПОВ/ПЭГ и ПОВ-ПЭГ, *- кристалличность компонента ПОВ.

2.2. Гидрологические свойства сополимеров

Сополимеризация приводит к повышению процента кислорода и водорода (гидроксо-групп) в полимере, что способствует повышению гидрофильности: контактный угол уменьшается на 12,6%, а водопоглощение увеличивается в 2,45 раза по сравнению с гомополимером. Как и следовало ожидать, добавление ПЭГ в количестве 30% от массы приводит к значительному уменьшению контактного угла (на 18,3%) и повышению водопоглощения в 17,6 раз (таблица 3).

Полимеры	Контактный угол с водой (θ , °)	Водопоглощение, (вес/вес, %)
ПОБ	$87,2 \pm 1,5$	$1,62 \pm 0,24^*$
ПОБ/ПЭГ	$68,3 \pm 3,0^*$	$28,56 \pm 0,82$
ПОБ-ПЭГ	$76,0 \pm 3,0^*$	$3,97 \pm 0,18^*$

Таблица 3. Контактные углы и водопоглощение полимерных пленок.

Наличие фрагментов ПЭГ в сополимере ПОБ-ПЭГ дало в результате более высокий процент кислорода и водорода в полимере, что повлияло на снижение гидрофобности и более высокое связывание воды.

2.3. Исследование ультратонких пленок из сополимеров.

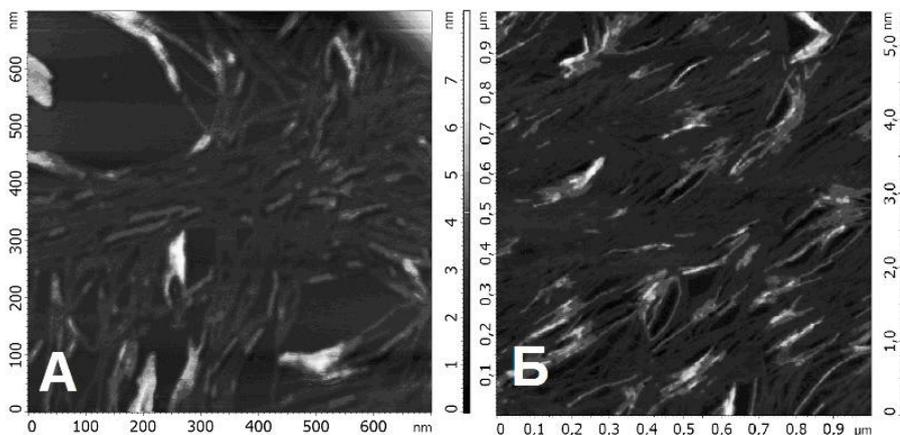


Рисунок 1. Изображение сополимера ПОБ-ПЭГ (А) и композита ПОБ/ПЭГ (Б), полученное методом АСМ.

Было показано, что ультратонкие пленки ПОБ и ПЭГ схожи по своей структуре: обоим полимерам присуще наличие большого количества аморфного вещества. Однако на пленках ПОБ были обнаружены также кристаллические участки, что может говорить о том, что ПОБ проявляет большие способности к кристаллизации, чем ПЭГ. Было обнаружено, что создание композита и сополимера из ПОБ с ПЭГ (Рисунок 1) приводит к изменению морфологии поверхности: появляются монослойные ламели со средней высотой $0,7 \pm 0,1$ нм.

2.4. Механические свойства полимерных материалов.

Среднее значение модуля Юнга для гомополимера ПОБ составило около 1,46 ГПа, для сополимера ПОБ-ПЭГ - около 0,76 ГПа, а для композитного материала значение этого параметра составило 0,42 ГПа (таблица 4).

	Максимальное напряжение, Н	Относительное удлинение, σ_R , %	Модуль Юнга, $E_{\text{мод}}$, МПа
ПОБ	$44,91 \pm 1,98$	$4,52 \pm 1,71$	$1458,33 \pm 154,46$
ПОБ/ПЭГ	$14,07 \pm 1,17$	$7,91 \pm 1,99$	$424,36 \pm 152,31$
ПОБ-ПЭГ	$36,38 \pm 0,06$	$1,61 \pm 0,05$	$758,37 \pm 204,52$

Таблица 4. Механические свойства полимерных материалов, полученные на приборе Инстрон.

Относительное удлинение составило для ПОБ, ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ 4,52, 7,91 и 1,61% соответственно.

Полученные данные свидетельствуют об изменении механических свойств у сополимера ПОБ-ПЭГ по сравнению с гомополимером, что является хорошим доказательством различия этих двух материалов, получаемых по сходной технологии с использованием одного и того же бактериального штамма. Причиной отличий механических

свойств могут быть изменения структуры полимерных нитей, приводящие к потере эластичности. Композитный материал демонстрирует значительное повышение относительного удлинения и значительное снижение модуля Юнга, что говорит об увеличении эластичности, что вполне логично, учитывая свойства ПЭГ как пластификатора.

2.5 Биосовместимость полученных полимеров *in vitro*.

Результаты теста на цитотоксичность с использованием культуры COS-1 показывают, что ПОБ-ПЭГ обладает способностью поддерживать жизнеспособность клеток и их рост. Композитный материал ПОБ/ПЭГ в свою очередь также обладает достаточно хорошими свойствами для поддержания роста клеточной линии COS-1 (рисунок 2).

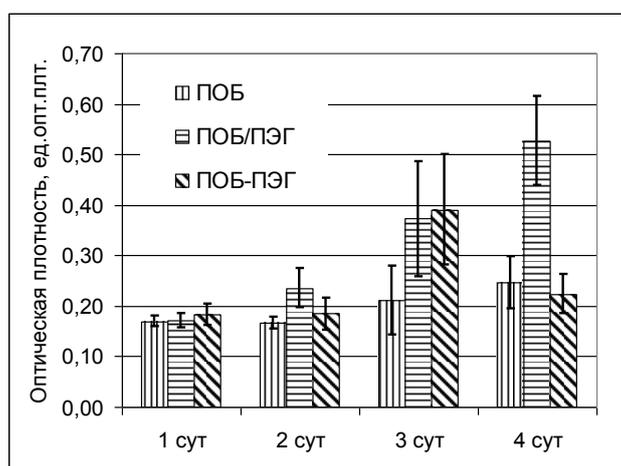


Рисунок 2. Адгезия и пролиферация фибробластов COS-1 на пленках из испытываемых биополимеров, ХТТ-тест: ПОБ, ПОБ/ПЭГ, ПОБ-ПЭГ. Данные были представлены как средние значения \pm стандартное отклонение, $p < 0.05$ ($n = 6$).

3. Плоские пористые матрицы, полученные методом выщелачивания

3.1. Структура плоских матриц из различных материалов.

Пористые матрицы были изготовлены методом выщелачивания с использованием в качестве порогена карбоната аммония, который при повышенной температуре разлагается на аммиак, углекислый газ и воду: $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3 \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$. В горячей воде процесс газообразования происходит довольно активно, поэтому пористость достигается не только удалением соли с помощью растворения, но так же и благодаря деформациям, происходящим в полимере во время газообразования. При более подробном анализе пористости мы введем некоторые дополнительные термины: поры, которые образовывались в результате разрыва поверхности полимера, мы будем называть "разрывные поры", а складки полимера, которые также участвуют в создании шероховатости, мы будем именовать "лакуны". Также из-за особенностей процесса изготовления изделий, мы получаем две не совсем одинаковые поверхности - одну более гладкую, которую мы будем называть внутренней, т.к. технологически она соприкасается со стеклом, а другую более шероховатую, которую мы будем называть внешней.

Полимер	Внешняя сторона, мкм		Внутренняя сторона, мкм		Пористость, %
	разрывные поры	лакуны	разрывные поры	лакуны	
ПОБ	102,8 \pm 37,3 [#]	215,4 \pm 137,0	7,2 \pm 3,9	43,1 \pm 14,9	87,1 \pm 7,1
ПОБ/ПЭГ	33,4 \pm 17,5 [*]	100,3 \pm 52,7	6,8 \pm 5,2	52,5 \pm 26,4	75,1 \pm 16,0
ПОБ-ПЭГ	15,6 \pm 5,2 ^{*#}	105,2 \pm 73,9	4,7 \pm 3,3	37,8 \pm 13,5	69,0 \pm 12,3 [*]

Таблица 5. Пористость и размер пор пористых плоских матриц из ПОБ и его производных, $n = 6$, * $p < 0.05$ vs. ПОБ, # $p < 0.05$ vs. ПОБ/ПЭГ.

Средние данные по размерам пор всех полученных матриц, а также пористость приведены в таблице 5. Все матрицы имеют размер пор подходящий для роста клеток, но наиболее оптимальные параметры имеет сополимер ПОБ-ПЭГ с диапазоном размеров пор около 150 - 250 мкм (таблица 5). Значительной разницы в пористости изделий, изготовленных из композита и сополимера, не наблюдалось, но по сравнению с гомополимером ПОБ, уменьшение пористости матрикса из сополимера ПОБ-ПЭГ является значительным. Распределение пор по размерам двух разных сторон представлено на рисунке 3. Было отмечено, что большинство пор имеют размер от 20 до 150 мкм.

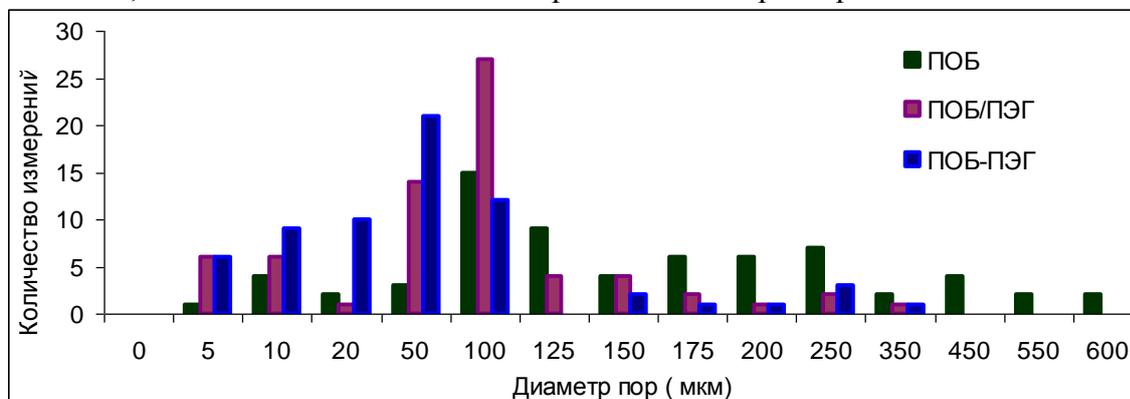


Рисунок 3. Распределение диаметра пор плоских пористых матриц из ПОБ, ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ.

Данный метод позволяет получить плоские пористые структуры, одна сторона которых более гладкая, а другая более шероховатая. Добавление ПЭГ к полимеру в качестве композитной добавки уменьшает шероховатость и размер пор, сополимеризация ПОБ с ПЭГ также способствует уменьшению пористости получаемых каркасов.

3.2. Термические свойства плоских матриц

Анализ физико-термических свойств пористых матриц в сравнении с пленочными материалами был проведен для исследования влияния технологии изготовления матриц на данные характеристики (таблица 6).

При сравнении данных кристалличности, полученных для пленок (таблица 1) и для матриц можно наблюдать её повышение. Причем кристалличность матриц из сополимера не изменяется, что может подчеркивать разницу в строении и укладке полимерных нитей с гомополимером. При этом температура пика плавления практически не изменяется, а снижение температуры начала плавления наблюдается только при первом цикле нагрева - охлаждения.

Полимеры	Температура начала плавления, (t плав., °C)	Пик плавления, (t пик., °C)	Энтальпия плавления (ΔH, Дж/г)	Кристалличность (X _c , %)	Температура начала плавления, (t плав., °C)	Пик плавления, (t пик., °C)	Энтальпия плавления (ΔH, Дж/г)	Кристалличность (X _c , %)
	I прогрев				II прогрев			
ПОБ	125	178,0	100,9	68,83	144,4	170	105,6	72,03
ПОБ/ПЭГ	140,1	179	101,7	99,10*	151,1	168	99,08	96,55*
ПОБ-ПЭГ	125	179	97,15	66,27	164	169	103,1	70,33

Таблица 6. Физико-термальные свойства пористых полимерных матриц из ПОБ, ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ.

*- кристалличность компонента ПОБ

3.3. Адсорбция белка.

Результаты, полученные с помощью конфокальной микроскопии, показали, что после инкубации в 0,1% растворе додецилсульфата натрия большая часть адсорбированного белка перешла в буфер. Для того чтобы оценить относительное количество необратимо адсорбированного белка, было использовано программное обеспечение ImageG 1.45s (США). Анализ изображений показал, что относительное количество белка, необратимо

связывающегося с полимерным материалом, составляет 31,3%, 26,6%, 28,5% для ПОБ, ПОБ + ПЭГ и ПОБ-ПЭГ, соответственно (таблица 7), но достоверных различий не наблюдается.

С помощью спектрофотометрических данных и конфокальной микроскопии, мы смогли определить количество белка, адсорбированного на поверхности полимера. Оно составило 82,3, 13,0 и 43,0 мкг белка на 1 мг полимера соответственно. Полученные результаты согласуются с литературными данными о том, что гидрофобная поверхность способствует адсорбции белка в большей степени, чем гидрофильная.

Полимер	Адсорбция белка, мкг/мг полимера	Необратимая адсорбция, %
ПОБ	82.3±9.6	31.3±5.6
ПОБ/ПЭГ	13.0±5.2*	26.0±4.7
ПОБ-ПОБ	43.0±8.7*	28.5±3.0

Таблица 7. Адсорбция БСА на полимерных матриксах, n = 6, * p < 0.05 vs. ПОБ.

Также с помощью конфокального микроскопа LSM710 (Carl Zeiss, Германия) была построена 3D модель матрикса на основе ПОБ с адсорбированным FITC-меченым БСА (рисунок 4). Благодаря этой модели мы можем представить истинную форму матрикса и увидеть, что адсорбция происходит равномерно по всей поверхности полимерной конструкции.

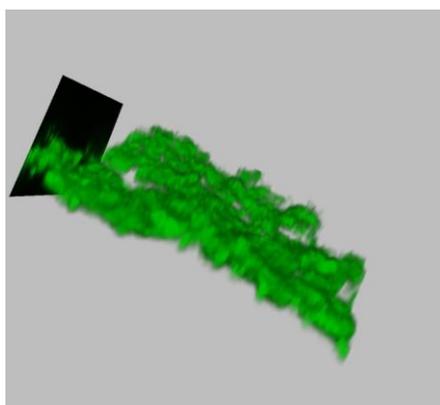


Рисунок 4. 3D модель матрикса на основе ПОБ с адсорбированным FITC-меченым БСА.

3.4. Мезенхимальные стволовые клетки.

По литературным данным МСК крысы сразу после выделения имеют фенотип (CD 90(+) ~ 30%, CD 45(-) ~ 30 %, CD 11b/c(-) ~ 66%, CD 29(+) ~ 42%), представленный на слайде и к третьему пассажу популяции клеток, имеющие все представленные маркеры составляют более 95 % от всех клеток.

По нашим данным, полученным для 3 пассажа используемых клеток, доля жизнеспособных клеток в популяции составила 95,8 % (7AAD), доля клеток CD 90(+) - 95%, CD 45(-) - 97,9 %, CD 11b/c(-) - 74%, CD 29(+) - 50% (рисунок 5). По данным рецепторов CD 90 и CD45 наблюдаем полное сходство с литературными данными, по двум другим мы видим переходные значения между первым и третьим пассажами.

Таким образом, полученные нами методом избирательной адгезии к пластику и используемые в дальнейшей работе клетки соответствуют по своему фенотипу мезенхимальным стволовым клеткам.

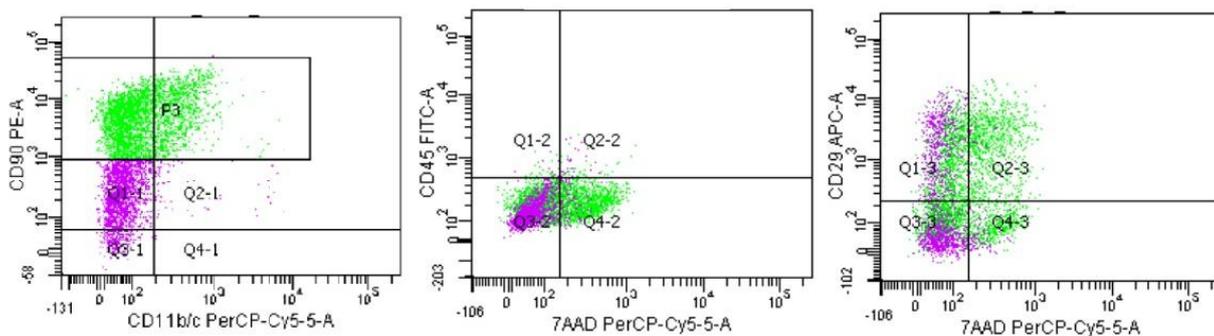


Рисунок 5. Фенотип мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из костного мозга 5-дневных крыс, 3 пассаж.

3.5. Биосовместимость пористых матриц

Оценка биосовместимости полученных полимерных конструкций, проводилась с помощью биохимического теста ХТТ на активность митохондрий. Мы определяли цитотоксичность матриц, а также рост клеток на самих полимерных подложках.

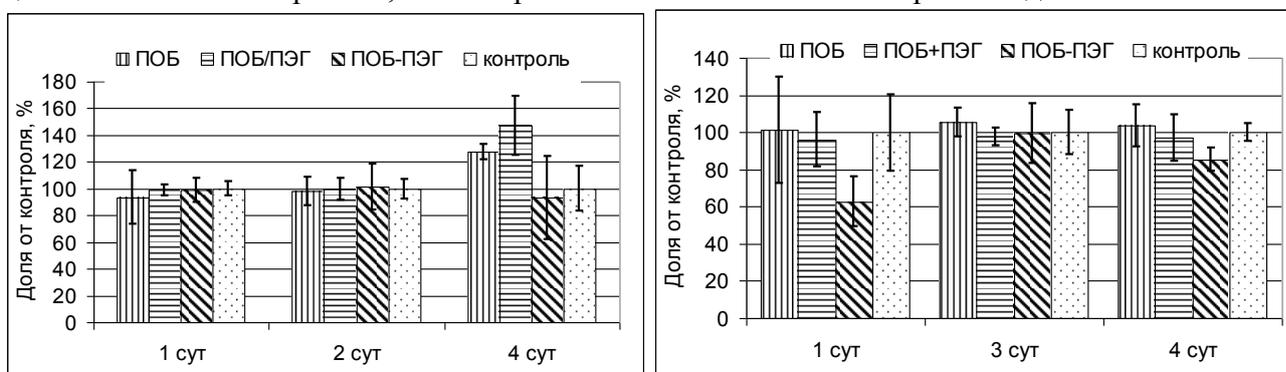


Рисунок 6. Цитотоксичность пористых полимерных матриц из ПОБ, ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ на культурах фибробластов 3Т3 (слева) и МСК (справа).

На рисунке 6 представлены результаты исследования на культуре фибробластов 3Т3 и на культуре МСК. Во всех случаях не наблюдалось значительных изменений в контрольных группах по сравнению с контролем. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии цитотоксичности исследуемых матриц для культуры фибробластов 3Т3 и для мезенхимальных стволовых клеток крысы.

Результаты экспериментов по изучению роста клеток на самих подложках представлены на рисунке 7.

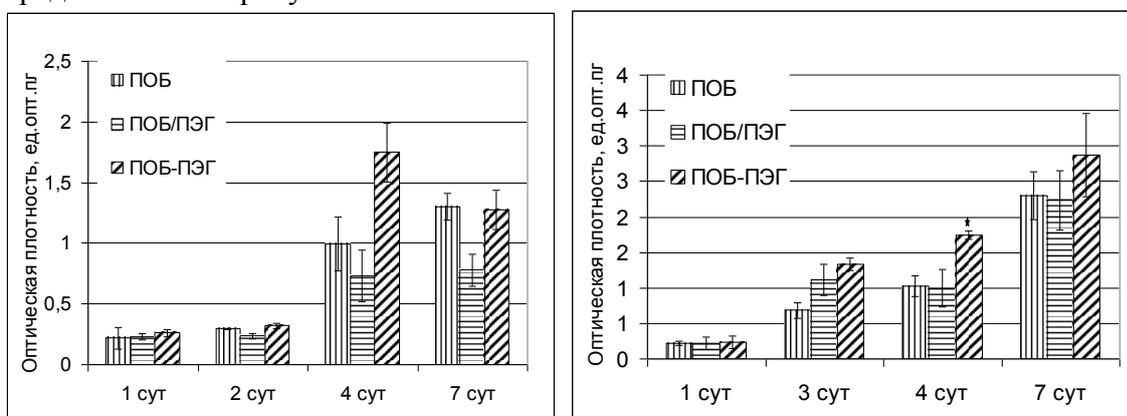


Рисунок 7. Рост клеток 3Т3 (слева) и МСК (справа) на полимерных пористых матрицах из ПОБ, ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ.

Полученные данные свидетельствуют о том, что матрицы из представленных материалов способны поддерживать рост клеточных культур. В случае с культурой фибробластов заметно медленное повышение количества клеток, только на подложке из

сополимерного материала ПОб-ПЭГ мы наблюдаем быстрый рост и затем снижение количества активных клеток. Это может свидетельствовать об оптимальных параметрах данной подложки для культивирования фибробластов.

В случае с МСК мы видим стабильный и более быстрый рост культуры на подложках. В данном случае также можно выделить матрикс из сополимера ПОб-ПЭГ, показывающий более высокие средние значения активности клеток, но достоверно отличающиеся от остальных подложек лишь на 4 сутки.

Таким образом, можно заключить, что данные виды полимерных пористых матриксов всех трех типов способны поддерживать клеточный рост на своей поверхности и могут быть использованы как подложки для культивирования клеток.

4. Направленная остеогенная дифференцировка

Для изучения возможности применения данных полимерных структур в инженерии костной ткани, мы проводили исследование направленной дифференцировки МСК в остеогенном направлении.

Изменения морфологии, происходящие с клетками при культивировании в остеогенной среде хорошо заметны в световой микроскоп (Рисунок 8). Видно, что они изменяют свою морфологию: увеличивается число вакуолей и включений, ложноножки становятся более тонкими и вытянутыми. При окраске Ализариновым красным наблюдается увеличение солей кальция.

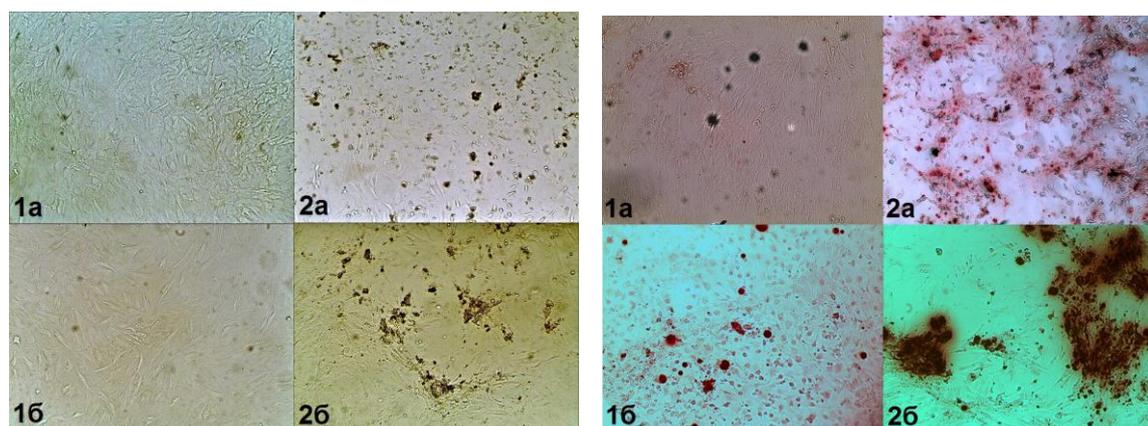


Рисунок 8. Образование солей и включений при культивировании МСК в остеогенной среде (2) по сравнению с обычной ростовой средой (1) . Фотографии сделаны на 14 (а) и на 21(б) день культивации: без окраски (слева) и окраска Ализариновым красным (справа).

4.1 Сканирующая электронная микроскопия

На рисунке 9 представлены МСК, культивируемые на матриксе из сополимера ПОб-ПЭГ в обычной ростовой среде и в остеогенной среде.

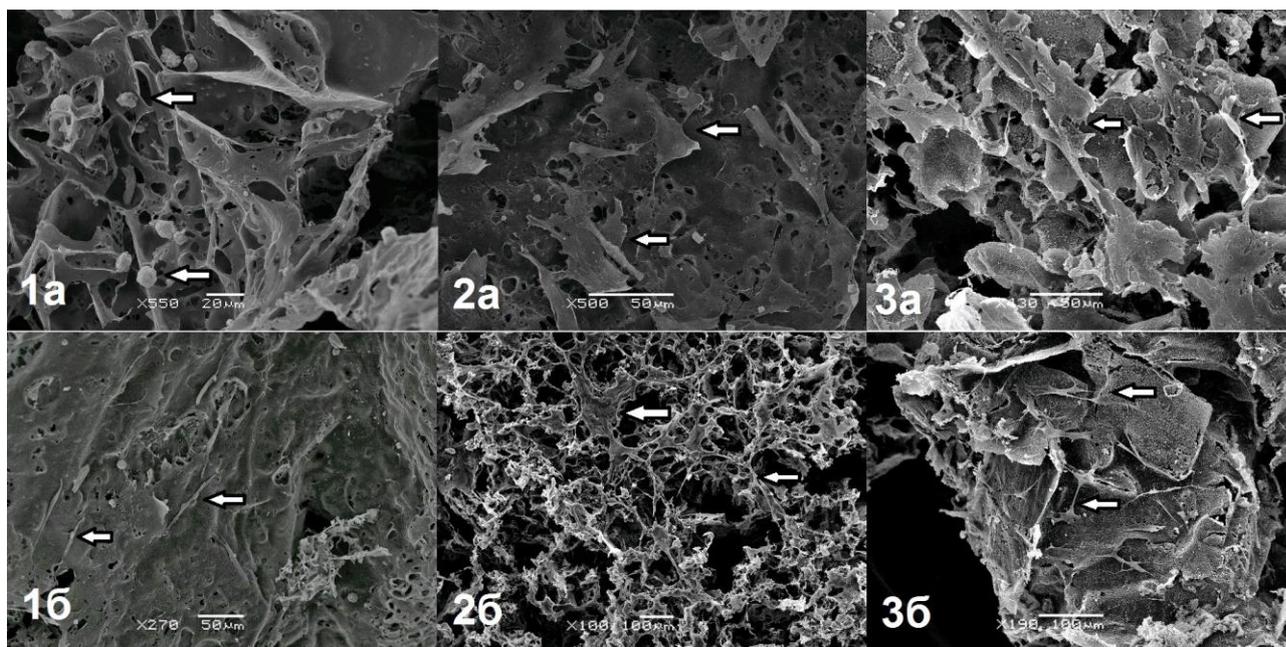


Рисунок 9. МСК, культивируемые на матриксе из сополимера ПОБ-ПЭГ в нормальной ростовой среде (а) и в остеогенной среде (б) на 7 (1), 14 (2) и 21 (3) сутки культивации.

На фотографиях видно, что клетки увеличиваются в количестве со временем и изменяют форму: само тело клетки становится больше, а псевдоподии более тонкими и длинными.

Также при использовании данного метода исследования хорошо визуализируются минеральные отложения на поверхности полимера, количество которых отчетливо увеличивается со временем (Рисунок 10).

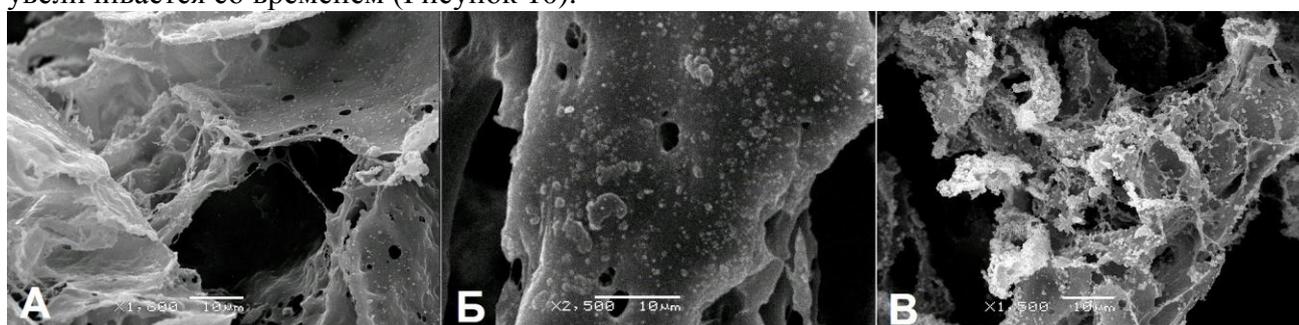


Рисунок 10. Минеральные отложения на матриксе из сополимера ПОБ-ПЭГ при культивировании в остеогенной среде на 7 (А), 14 (Б), 21 (В) сутки.

4.2. Щелочная фосфатаза.

Изофермент щелочной фосфатазы присутствует на клеточной поверхности остеобластов. При увеличенном синтезе фермента клетками костной ткани повышается его количество в плазме крови, поэтому определение активности щелочной фосфатазы является информативным показателем костного ремоделирования, а в нашем случае остеогенеза.

На рисунке 11 видны изменения уровня щелочной фосфатазы в зависимости от сроков культивирования. У клеток, растущих в остеогенной среде на культуральном пластике, а также у клеток, растущих на матриксах из гомополимера и композита, происходит повышение выработки щелочной фосфатазы к 21 суткам. Причем наиболее высокие значения наблюдаются у клеток, культивируемых на матриксах из композита ПОБ/ПЭГ в остеогенной среде.

При сравнении данных, полученных при культивировании в среде без остеогенных компонентов, наблюдается повышение уровня фермента у клеток, растущих на полимерных подложках. Таким образом, можно предположить, что данные матриксы сами по себе

способны стимулировать дифференцировку МСК в остеогенном направлении. Клетки, растущие на сополимере ПОБ-ПЭГ, не показывают никакого изменения экспрессии щелочной фосфатазы с течением времени.

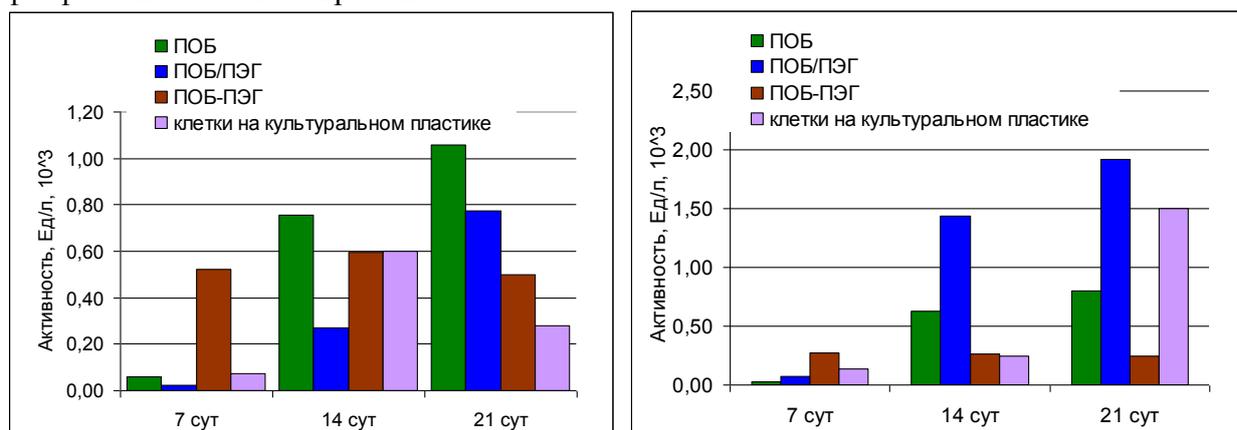


Рисунок 11. Экспрессия щелочной фосфатазы МСК, культивируемых на различных видах полимерных подложек в обычной ростовой (слева), а также в остеогенной среде (справа).

Это может быть связано с увеличением биоинертности полимерной поверхности, связанной с изменениями в расположении полимерных цепей, произошедших в ходе сополимеризации ПОБ с полиэтиленгликолем в процессе микробиологического биосинтеза. Подобные результаты по увеличению биоинертности других природных полимеров при их сополимеризации с ПЭГ как в естественных, так и искусственных условиях были продемонстрированы ранее для белков и липидов.

4.3. Экспрессия поверхностных маркеров МСК

Для фенотипирования полученных из костного мозга крыс мезенхимальных стволовых клеток мы использовали несколько типичных поверхностных маркеров CD 90, CD 45, CD 11b/c, CD 29. При исследовании особенностей направленной дифференцировки МСК в остеогенном направлении при культивировании на полимерных подложках различного состава, мы решили провести наблюдения за изменениями, происходящими с данными поверхностными маркерами в этих условиях.

На рисунке 12 представлены графики изменения процентного содержания вышеуказанных рецепторов в зависимости от времени, питательной среды и вида подложки.

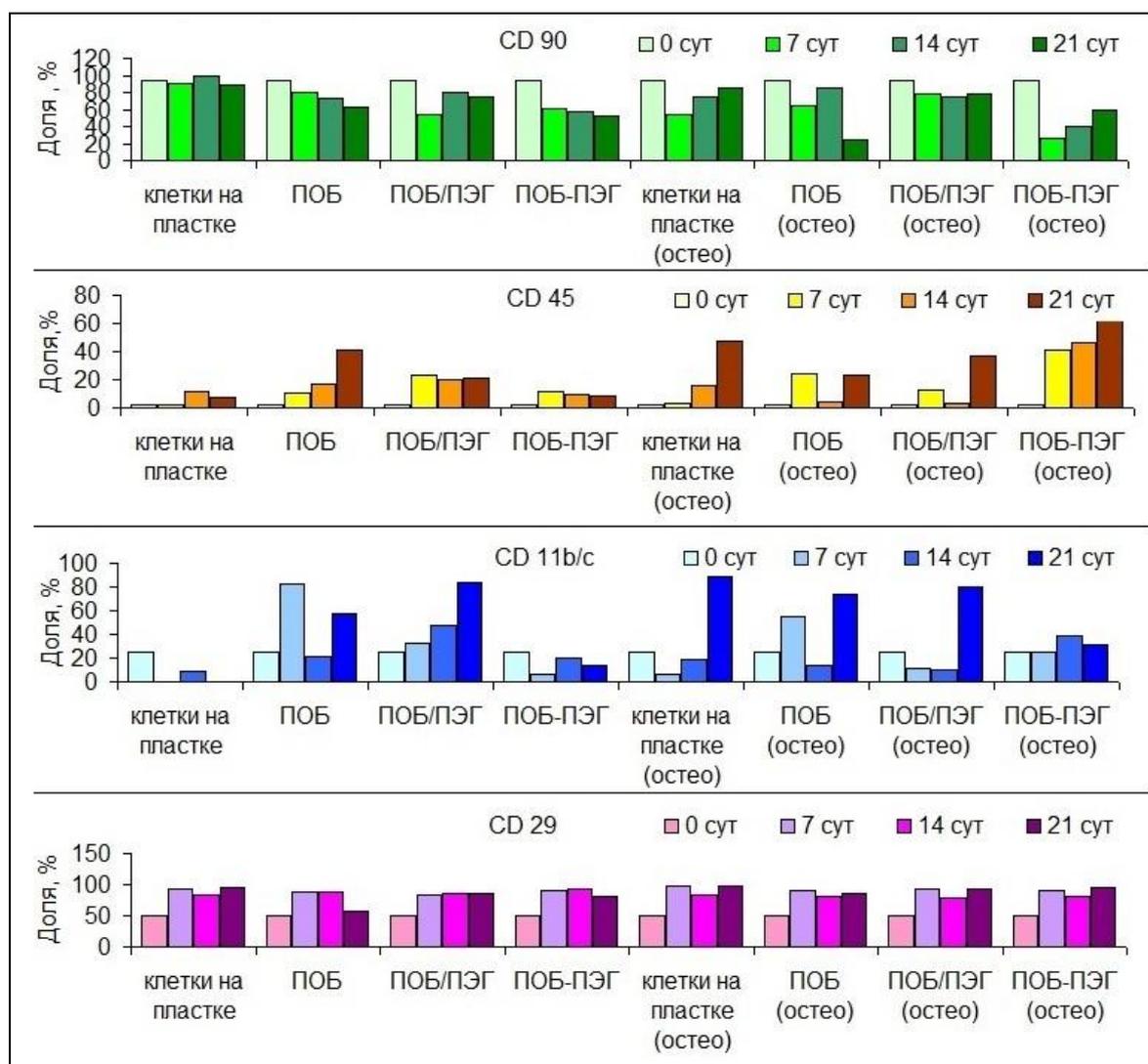


Рисунок 12. Изменение экспрессии поверхностных маркеров МСК при культивировании на пластике (кл), на матриксе из гомополимера (ПОБ), из композита (ПОБ/ПЭГ) и сополимера (ПОБ-ПЭГ) в нормальной ростовой среде и в остеогенной среде ("остео") в течение 7, 14 и 21 суток.

Для CD 90 мы наблюдаем тенденцию к снижению, причем на матриксах это происходит чуть более интенсивно; для CD 45, наоборот, тенденцию к увеличению популяции, причем в остеогенной среде этот процесс идет более интенсивно; для CD 11 - виден резкий скачок на 21 день для всех клеток, кроме отрицательного контроля, где это количество сходит на нет, и кроме клеток, культивируемых на матриксе из сополимера, где его количество остается на постоянном низком уровне; для CD 29 показано постоянное высокое число клеток в популяции независимо от среды или подложки.

Из этого можно сделать вывод о том, что сами по себе полученные пористые полимерные конструкции влияют на изменение фенотипа МСК, что отчетливо видно при сравнении с контролем. Причем матрикс из сополимера ПОБ-ПЭГ оказывает влияние на МСК отличное от двух других матриксов как по активности щелочной фосфатазы, так и по экспрессии поверхностных маркеров.

Таким образом, мы показали, что морфология клеток, культивируемых на матриксах, в остеогенной среде изменяется, что было показано с помощью СЭМ, клетки начинают образовывать внеклеточный матрикс, обогащенный солями кальция, что было показано как с помощью микрофотографий СЭМ, так и с помощью окраски классическим красителем на соли кальция Ализариновым красным. Также клетки со временем начинали экспрессировать щелочную фосфатазу, которая является классическим биохимическим маркером образования новой кости. Причем клетки без остеогенной стимуляции, растущие на плоской поверхности не демонстрировали такой феномен. Т.е. матриксы сами по себе обладают остеокондуктивным

действием. Более того, это предположение подтверждают данные проточной цитометрии. Мы видим, что изменения в экспрессии исследуемых поверхностных маркеров у таких клеток не наблюдаются, за исключением CD 90. Нужно отметить, что значительной разницы в скорости дифференцировки в остеогенном направлении МСК на различных типах полимерных матрицков отмечено не было. Плоские пористые матрицксы из гомополимера ПОб, композита ПОб/ПЭГ и сополимера ПОб-ПЭГ, представленные в данной работе предполагается использовать в инженерии костной ткани.

5. Имплантация *in vivo* и тканевая реакция

Для исследования *in vitro* были выбраны матрицксы из сополимера ПОб-ПЭГ как нового материала для тканевой инженерии, а также на основании продемонстрированной ранее хорошей биосовместимости *in vitro* этих матрицксов.

Имплантация в костную ткань

Гистологическая картина тканевой реакции при имплантации матрицкса из ПОб-ПЭГ в зону костного дефекта на разных сроках представлена на рисунке 13.

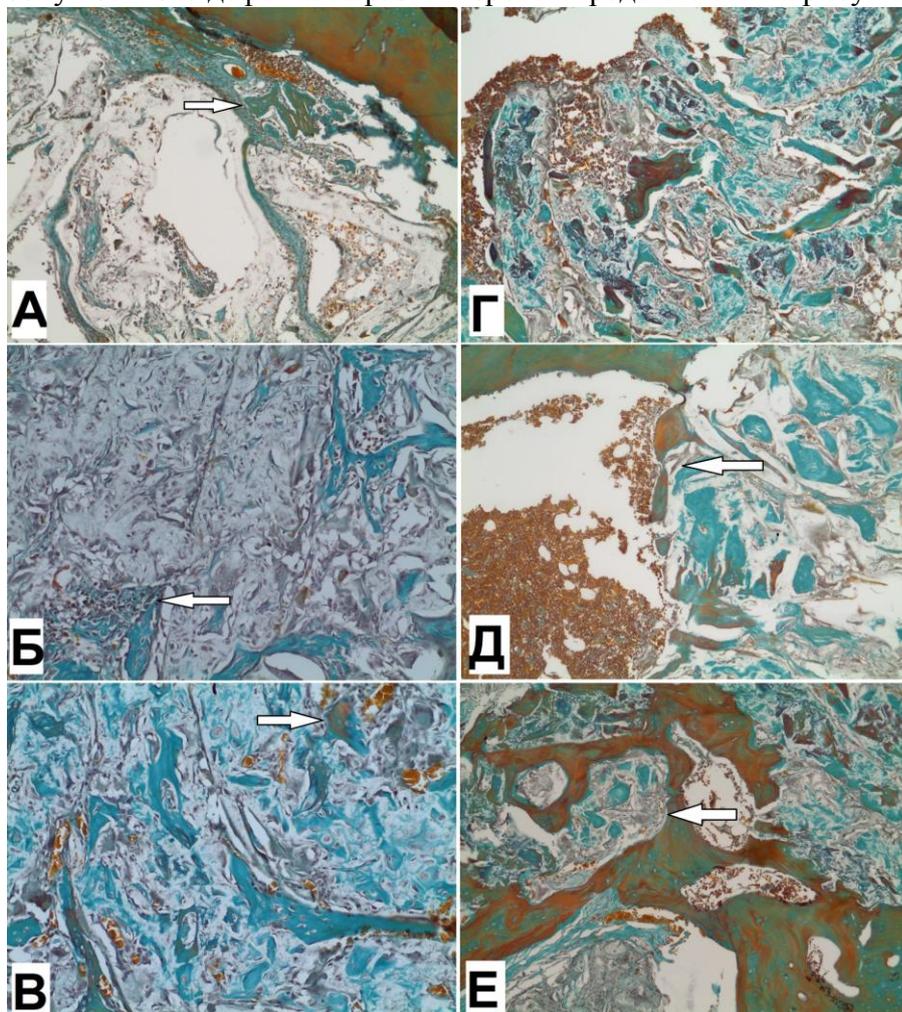


Рисунок 13. Гистологическое исследование матрицксов из ПОб-ПЭГ. Внутрикостная имплантация в бедренную кость: 3 (А), 7(Б), 14(В), 40(Г), 90 (Д) и 180 (Е) суток. Увеличение А,Г,Д,Е -x100; Б,В - x200.

На 3 сутки имплантации (рис. 13А) - видна компактная костная ткань и новая костная ткань. Голубая окраска - это коллаген I типа. Сформировавшаяся костная ткань выглядит островками; красные точки - это сосуды. Стрелкой указан островок костной ткани, который образовался со стороны эндооста. Также видны другие маленькие островки, следовательно, можно сказать, что процесс остеогенеза идет довольно интенсивно.

На 7 сутки (рис. 13Б) видно большое количество гигантских клеток инородных тел (серые клетки), содержащих большое количество ядер (10-20). Эти клетки являются

свидетельством гранулематозного воспаления. Также на этой фотографии можно видеть остеобласты в центре матрикса (обозначены стрелкой).

На 14 сутки (рис. 13В) можно видеть остециты - клетки внутри голубого коллагена, костные балки (голубые тяжи с оранжевыми разводами). Цвет окраски коллагена зависит от плотности его упаковки - более плотные скопления окрашиваются в оранжевый цвет, менее плотные - в голубой. Также здесь видна компактная костная ткань (обозначена стрелкой). Хаотичный рост кости отдельными островками является особенностью роста кости именно в матриксе.

На 40 сутки (рис. 13Г) мы видим в центре матрикса сформировавшуюся компактную костную ткань. Также наблюдаем большее (по сравнению с 14 сут) количество костных балок.

К 90 суткам (рис. 13Д) количество балок сильно увеличивается. На данной фотографии виден переход от материнской кости к новообразованной (плотной) компактной костной ткани. Хорошо заметно отсутствие фиброзной капсулы на границе матрикса - костный мозг.

На 180 сутки (рис. 13Е) мы наблюдаем замыкание костного дефекта. На фотографии видно, что новая кость выросла посередине матрикса (полость кости обозначена стрелкой). То, что мы видим на данном этапе, можно назвать сформированной губчатой тканью.

Заключение

Основным результатом проведенной работы явилась разработка плоского пористого биodeградируемого матрикса, основой которого является высокоочищенный сополимер поли-3-оксипропионат-со-полиэтиленгликоль (ПОБ-ПЭГ), полученный методом микробиологического биосинтеза с включением звеньев этиленгликоля 0,33% по молярному содержанию в полимерной цепи. Данный сополимер обладает повышенными гидрофильными свойствами по сравнению с гомополимером ПОБ.

Исследование ультратонких плёнок этого материала показало отличие в укладке полимерных нитей сополимера от гомополимера.

Была показана высокая биосовместимость матрикса из ПОБ-ПЭГ, способность к адсорбции белка. По результатам изучения физико-термических свойств было обнаружено отсутствие влияния способа изготовления матрикса на кристалличность данного матрикса.

Положительные результаты по культивированию мезенхимальных стволовых клеток костного мозга крыс и фибробластов мышцы линии 3ТЗ на матриксах из сополимера в условиях *in vitro* показали, что разработанные матриксы способны выполнять роль каркаса и поддерживать прикрепление и пролиферацию клеток.

Результаты исследований влияния матрикса на процесс остеогенной дифференцировки МСК говорят о биоинертности полимерной поверхности матрикса, вероятно связанной с особенностями укладки полимерных нитей в процессе микробиологического синтеза.

Результаты экспериментов *in vivo* на модели механических повреждений бедренной кости с использованием матрикса из биосинтетического сополимера доказали возможность применения матрикса как матрицы для роста остеобластоподобных клеток в объеме.

Выводы

На основании проведенных исследований и полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Методом микробиологического биосинтеза с использованием штамма-продуцента *Azotobacter chroococcum* получены сополимеры ПОБ с полиэтиленгликолем и 3-оксипропионатом совместно с полиэтиленгликолем, с 3-оксипропионатом и с 3-окси-4-метилпропионатом.

2. Сополимер ПОБ-ПЭГ является наиболее гидрофильным из полученных сополимеров, но менее гидрофильным, чем композит ПОБ/ПЭГ, имеет более низкое значение модуля Юнга, и относительное удлинение, чем ПОБ и ПОБ/ПЭГ, все матриксы не проявляют цитотоксических свойств.

3. Разработан метод получения пористых плоских матриксов из ПОБ-ПЭГ, ПОБ и ПОБ/ПЭГ с диаметром пор около 150 мкм.

4. Плоские пористые матрицы из сополимера ПОБ-ПЭГ обладают пористостью 69% и средним размером пор 100 мкм, кристалличность составляет порядка 70%, они способны к адсорбции белка на поверхности, причем доля необратимо адсорбированного белка составляет 28%. Все матрицы не проявляют цитотоксических свойств.

5. Пористые матрицы из сополимера ПОБ-ПЭГ способны к поддержанию роста и пролиферации мезенхимальных стволовых клеток, а также фибробластов 3Т3.

6. Дифференцировка по остеогенному пути на матрицах из сополимера ПОБ-ПЭГ происходит не так интенсивно, как на матрицах из гомополимера и композита.

7. Показана способность пористого матрикса из сополимера ПОБ-ПЭГ поддерживать рост костной ткани в объеме в условиях *in vivo* при имплантации в бедренную кость крыс.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

Статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК РФ

1. **Жаркова И.И.**, Бонарцев А.П., Босхомджиев А.П., Ефремов Ю.М., Багров Д.В., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Иванов Е.А., Воинова В.В., Яковлев С.Г., Зернов А.Л., Филатова Е.В., Андреева Н.В., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В. Влияние модификации поли-3-оксибутирата полиэтиленгликолем на жизнеспособность клеток, культивируемых на полимерных пленках. Биомедицинская химия, 2012 г. Т.58 вып.5 стр.579-591.
2. Староверова О.В., Шушкевич А.М., Кузьмичева Г.М., Ольхов А.А., Воинова В.В., **Жаркова И.И.**, Шайтан К.В., Склянчук Е.Д., Гурьев В.В. Волокнистые матрицы для ткане-инженерных конструкций из поли-3-гидрооксибутирата и его композитов. Технологии живых систем, 2013, Т. 10, №8, стр. 74-79.
3. **Жаркова И.И.**, Староверова О.В., Воинова В.В., Шушкевич А.М., Склянчук Е.Д., Кузьмичева Г.М., Андреева Н.В., Акулина Е.А., Беспалова А.Е., Шайтан К.В., Ольхов А.А. Биосовместимость матриц для тканевой инженерии из поли-3-оксибутирата и его композитов, полученных методом электроформования. Биомедицинская химия, 2014, Т.60, вып.5, стр. 553-560.

Статьи в иностранных периодических изданиях

4. Bonartsev A.P., Yakovlev S.G., **Zharkova I.I.**, Boskhomdzhiev A.P., Bagrov D.V., Myshkina V.L., Makhina T.K., Kharitonova E.P., Samsonova O.V., Feofanov A.V., Voinova V.V., Zernov A.L., Efremov Yu.M., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P. Cell attachment on poly(3-hydroxybutyrate)-poly(ethylene glycol) copolymer produced by Azotobacter chroococcum 7B. BMC Biochemistry, 2013, 14:12.
5. Bonartsev A.P., **Zharkova I.I.**, Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Makhina T.K., Zernov A.L., Kudryashova K.S., Feofanov A.V., Akulina E.A., Ivanova E.V., Zhuikov V.A., Volkov A.V., Andreeva N.V., Voinova V.V., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P. 3D-Scaffolds from Poly (3-hydroxybutyrate) Poly (ethylene glycol) Copolymer for Tissue Engineering. Journal of Biomaterials and Tissue Engineering, 2016, 6(1), 42-52.

Другие издания

6. Ольхов А.А., Староверова О.В., Бонарцев А.П., **Жаркова И.И.**, Склянчук Е.Д., Иорданский А.Л., Роговина С.З., Берлин А.А., Ищенко А.А. Структура и свойства ультратонких волокон поли-(3-гидроксибутирата), модифицированных наночастицами кремния и диоксида титана. Все материалы. Энциклопедический справочник. 2014, №12, 2-13 (Olkhov A.A., Staroverova O.V., Bonartsev A.P., Zharkova I. I., Sklyanchuk E.D., Iordanskii A.L., Rogovina S.Z., Berlin A.A, Ishchenko A.A. Structure and properties of ultrathin poly-(3-hydroxybutyrate) fibers modified by silicon and titanium dioxide particles. Polymer Science, Series D. Glues and Sealing Materials, 2015, 8(2), 100–109).

Тезисы конференций

1. **Zharkova I.I.** , Akulina E.A. , Bepalova A.A. , Bonartsev A.P. Biodegradable porous scaffold from copolymer poly(3- hydroxybutyrate)-poly(ethyleneglycol) (PHB-PEG) as the substrate for the growth and differentiation of mesenchymal stem cells. Cell Technology Week, 2013, Kiev, Ukraina

2. **I. I. Zharkova**, E. A. Akulina, N. V. Andreeva, Konstantin V. Shaitan: The experimental model of mesenchymal stem cells growth and differentiation based on application of porous scaffold from bacterial origin poly(3-hydroxybutyrate)-poly(ethylene glycol). IWBBIO 2014: 1520-1526
3. **Жаркова И.И.**, Акулина Е.А. Биоразлагаемые пористые матрицы из поли-3-оксибутирата-со-полиэтиленгликоля как подложка для роста и дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток, Стволовые клетки и регенеративная медицина, 2013, Москва
4. Zhuikov V.A., **Zharkova I.I.**, Bykova G.S., Taraskin N.Y., Kireinov A.V., Kopitsyna M.N., Bessonov I.V., Bonartsev A.P., G.A. Bonartseva, Poly(3-hydroxybutyrate) and its blends with polyethylene glycol- high potential materials for tissue engineering, 2016, Polycondensation, Moscow