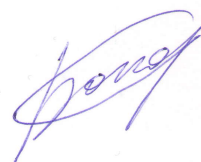


МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Бонарцев Антон Павлович

**БИОИНЖЕНЕРИЯ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА, ПОЛУЧАЕМОГО
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМ ПУТЕМ: КОНТРОЛИРУЕМЫЙ
БИОСИНТЕЗ ЕГО СОПОЛИМЕРОВ, СВОЙСТВА *IN VITRO* И
ПРИМЕНЕНИЕ НА МОДЕЛЯХ ЗАБОЛЕВАНИЙ *IN VIVO***

Специальность: 1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Москва – 2022 г.

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

Научный консультант: доктор физико-математических наук, профессор **Шайтан Константин Вольдемарович**

Официальные оппоненты: **Ножевникова Алла Николаевна**, доктор биологических наук, ФГУ «ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН», Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, лаборатория микробиологии антропогенных мест обитания, главный научный сотрудник

Сербин Александр Владимирович, доктор химических наук, доцент, ФГБУН Ордена Трудового Красного Знамени Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук, отдел синтеза, модификации и переработки полимеров и полимерных композитов, лаборатория химии полиэлектролитов и медико-биологических полимеров, главный научный сотрудник

Яминский Игорь Владимирович, доктор физико-математических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», физический факультет, отделение физики твердого тела, кафедра физики полимеров и кристаллов, профессор

Защита состоится 14 июня 2022 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета МГУ.015.2(МГУ.03.13) при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет МГУ, ауд. М-1.

Тел. 8(495)939-35-46, эл. почта nvkostina@mail.ru

Диссертация находится на хранении в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27). С диссертацией в электронном виде можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/444580983/>

Автореферат разослан 11 апреля 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, к.б.н.



Костина Наталья Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

В настоящее время происходит бурный рост междисциплинарных инженерно-технологических направлений на стыке естественных наук: биотехнологии, биоинженерии, нанотехнологии, нейронаук (Лысак, 2016; Stock and Burton, 2011). Биоинженерия и биотехнология биосовместимых и биodeградируемых материалов являются одними из таких ярко-выраженных примеров междисциплинарного подхода. Комплексные исследования различных биоматериалов на основе синтетических и природных полимеров, алло- и ксенобиоматериалов, а также их композитов и их дальнейшее использование демонстрируют очень быстрый рост во всем мире и находят широкое применение в медицине. Биоматериал в таких исследованиях выступает в качестве объединяющего элемента междисциплинарного исследования, которое, как правило, проводится на нескольких уровнях: получение биоматериала, получение изделий и препаратов из этого биоматериала, исследование их морфологии, физико-химических свойств, исследование их биосовместимости и биоактивности на биохимическом уровне, на культурах клеток, и с использованием моделей заболеваний на лабораторных животных. На каждом из этих уровней используется широкий набор методов. Совокупность полученных данных анализируется для поиска новых свойств биоматериала и изделий на его основе и/или конструирования биоматериала и изделий из него, обладающего новыми свойствами (Севастьянов и Кирпичников, 2011; Nasirci and Nasirci, 2018). Природные биополимеры – наиболее интересный объект для таких исследований. Очень большой спектр функциональности этих биополимеров достигается не только за счет первичной структуры (последовательности различных мономеров в полимерной цепи), но и за счет более высоких уровней организации биомакромолекул. Так, например, поли-3-оксибутират (ПОБ) и его сополимеры, выполняющие запасающую функцию у многих видов бактерий также обладают сложной надмолекулярной структурой и рядом уникальных свойств: специфическим сочетанием физико-химических свойств (механической прочностью, термопластичностью, относительной гидрофобностью, диффузионными свойствами), биосовместимостью, способностью к биodeградации и биологической активностью (Nelson and Cox, 2008; Mokhtarzadeh et al., 2016). Синтетические аналоги этих биополимеров, такие как полилактиды, полигликолиды, поликапролактон, полидиоксанон и другие, обладающие в целом похожими свойствами, широко используются в медицине и фармацевтике (Farah et al., 2016; Sikhosana et al., 2021). Но в отличие от синтетических полимеров поли-3-оксибутират и некоторые из его сополимеров прошли естественный отбор в течение сотен миллионов лет эволюции как биополимеры бактериальной клетки со специфическими функциями (не только запасающей). Поэтому конструирование различных типов изделий из ПОБ, таких как пленки, пористые матрицы для тканевой инженерии и микрочастицы для пролонгированного высвобождения низкомолекулярных лекарственных веществ и биоактивных белков, предназначенных для применения в медицине и фармацевтике, служит не только сугубо прикладным целям, но и позволяет раскрыть некоторые неизвестные ранее аспекты биофункциональности природного поли-3-оксибутирата (Бонарцев и др., 2018; Бонарцев и др., 2019; Voinova et al., 2019).

В связи с этим особую актуальность приобретает создание системы экспериментальных моделей для комплексного междисциплинарного исследования поли-3-оксибутирата. Для комплексного исследования биополимеров необходима интеграция целого ряда экспериментальных моделей и методик, принадлежащих к различным уровням организации живой материи и различным естественным наукам, например, на надмолекулярном уровне это может быть экспериментальная модель исследования взаимосвязи надмолекулярной структуры полимера с его физико-химическими свойствами, на клеточном – экспериментальная модель исследования биосовместимости *in vitro* полимеров и изделий из них, на тканевом – экспериментальная модель исследования биосовместимости полимеров *in vivo* и т.д.

Особую роль в таком комплексном исследовании играет метод контролируемого биосинтеза этого биополимера, который позволяет получать полимер с заданными свойствами и химически модифицировать его. Использование этой технологии как уникального инструмента собственно и позволяет провести комплексное многоуровневое биоинженерное исследование, а именно использовать биоинженерные методы (а не химические методы, например) как для получения и химической модификации биополимера в ходе его биосинтеза, так и для исследования и выявления особенностей его биологических свойств на каждом из уровней исследования: молекулярном, клеточном, организменном. При этом в таком исследовании происходит сочетание и пересечение различных направлений биотехнологии и биоинженерии: молекулярной (контролируемый биосинтез полимеров), надмолекулярной (взаимосвязь наноструктуры полимера с его физико-химическими и биологическими свойствами), клеточной (биоинженерия стволовых клеток) и тканевой (биоинженерия костной ткани) в тесной связи с биомедициной и биофармакологией (Бонарцев и др., 2019; Voinova et al., 2019).

Степень разработанности темы исследования

Долгое время ПОА и их природный предшественник, поли-3-оксибутират, рассматривали и применяли в биомедицинских исследованиях исключительно как конструкционные материалы с удовлетворительными механическими свойствами, относительно хорошей биосовместимостью и, главное, способностью к биodeградации. Поэтому на основе ПОА преимущественно были разработаны медицинские изделия, предназначенные для механического скрепления тканей и восполнения механических свойств тканей при их повреждении: биоразлагаемые скобы, винты, пластины, штифты и шпигаты, шовные нити и скобы, пародонтологические мембраны, хирургические сетчатые эндопротезы, хирургические заплаты, плагги-эндопротезы, протезы сосудов, кардиоваскулярные стенты-эндопротезы, каркасные проводники для регенерации нервов, искусственные клапаны сердца и другие имплантируемые эндопротезы (Бонарцев и др., 2019; Mokhtarzadeh et al., 2016; Lim et al., 2017; Hasirci and Hasirci, 2018; Voinova et al., 2019;). При этом предпочтение было отдано химически синтезируемым полимолочной, полигликолевой кислоте и их сополимерам, соответственно, и природные поли-3-оксиалканоаты рассматривались также как аналоги синтетическим термопластикам с соответствующей биомедицинской функциональностью (Бонарцев и др., 2019; Farah et al., 2016; Hasirci and Hasirci, 2018; Voinova et al., 2019; Sikhosana et al., 2021). Внимание к биологической активности материалов на основе ПОА в современной науке обращено в основном через разработку и применение нано- и микрочастиц, а также медицинских изделий, загруженных лекарственными веществами, и с инкапсулированными терапевтическими белками для их пролонгированного, контролируемого высвобождения и направленной доставки. В этих работах, как правило, используют лекарственные вещества с давно доказанной и известной лекарственной активностью, а ПОА также рассматривается лишь как биоинертное средство доставки этого лекарственного агента (Qi et al., 2019; Abu Hajleh et al., 2020). Такой однобокий взгляд на природные поли-3-оксиалканоаты был и остается обусловлен традиционной системой исследования материалов медицинского назначения, где силами одной исследовательской лаборатории (научной группы, института, научного центра, R&D подразделения компании) или в рамках одного комплексного исследовательского проекта изучается то или иное свойство или группа свойств полимера, непосредственно необходимых для разработки уже спроектированного медицинского изделия с предварительно запланированной функциональностью (Castellano et al., 2014; Fan et al., 2014; Karahaliloğlu et al., 2015; Lim et al., 2017). К сожалению, такой узкоспециальный подход иногда приводит к серьезным просчетам в функциональности и биобезопасности разрабатываемых на основе ПОА медицинских изделий и лекарственных препаратов, что вынуждает смириться с рядом нежелательных побочных эффектов при применении уже давно разработанных и внедренных в клиническую практику медицинских изделий, как, например, недостаточно высокая механическая прочность полимеров (например, полимолочной кислоты) для фиксации костей

(Farah et al., 2016), несоответствие скорости биodeградации процессу регенерации костной ткани (Pereira et al., 2013) или локальное закисление тканей при их биodeградации из-за выделения продуктов деструкции полимера (Майбородин и др., 2013; Lickorish et al., 2004; Kim et al., 2007; Vacanti et al., 2012; Pereira et al., 2013). Тогда как фундаментальных исследований биоматериалов в области столь ориентированной на прикладные разработки биоинженерии гораздо меньше (Löbner et al., 2002; Peñaloza et al., 2017; Paula et al., 2020).

Тем не менее, есть целая серия мультидисциплинарных исследований природных поли-3-оксиалканоатов (в т.ч. поли-3-оксибутирата) с грамотным и последовательным использованием биоинженерных подходов, выполненные, как правило, большими научными группами и институтами, которые совершенно на другом уровне ведут исследование этих замечательных полимеров, что позволяет раскрывать те стороны их биофункциональности, которые ранее были совершенно скрыты от нас (Löbner et al., 2002; Peñaloza et al., 2017; Paula et al., 2020). Но даже самые комплексные из этих исследований не охватывают необходимые уровни междисциплинарного биотехнологического и биоинженерного исследования биополимеров, как правило, отсутствует начальный уровень - биотехнологического получения полимеров с помощью бактериальных штаммов-продуцентов или конечный уровень – исследования биофункциональности полимеров на экспериментальных моделях *in vivo* на лабораторных животных в тесном контакте со специалистами-медиками. Работы с широким охватом научных компетенций крайне редки, однако, именно такой комплексный биоинженерный подход и дает надежду составить максимально полную картину биофункциональности того или иного биоматериала, в данном случае - поли-3-оксибутирата.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ

Цель работы – создание широкой научной и методической базы для биотехнологического и биоинженерного исследования свойств биосинтетического поли-3-оксибутирата и его сополимеров на различных уровнях: молекулярном, надмолекулярном, клеточном и тканевом.

Для достижения поставленной цели решали следующие **задачи**:

1. Разработать метод контролируемого биосинтеза поли-3-оксибутирата и его сополимеров различной молекулярной массы и мономерного состава, в т.ч. биотехнологический метод сополимеризации поли-3-оксибутирата с синтетическим полимером, полиэтиленгликолем - биоПЭГилирование, а также метод выделения и очистки биополимеров.
2. Исследовать надмолекулярную структуру и физико-химические свойства полученных поли-3-оксибутирата и его сополимеров.
3. Исследовать биodeградацию полученных поли-3-оксибутирата и его сополимеров в модельных условиях *in vitro*.
4. Получить микрочастицы из поли-3-оксибутирата и его сополимеров, в т.ч. биоПЭГилированного ПОБ, загруженные различными лекарственными веществами, в частности, противоопухолевым цитостатиком паклитакселом и модельным белком, лизоцимом, и исследовать кинетику их высвобождения.
5. Исследовать токсичность и противоопухолевую активность микрочастиц из поли-3-оксибутирата, загруженных паклитакселом, на культурах опухолевых клеток и на лабораторных мышах с моделью опухолевого заболевания.
6. Получить пористые матрицы различной формы и строения из поли-3-оксибутирата и его биоПЭГилированного сополимера и исследовать их остеогенные свойства на мезенхимальных стволовых клетках *in vitro* и на модели некротического костного дефекта на крысах *in vivo*.
7. Получить тканеинженерные конструкции с использованием матриц на основе поли-3-оксибутирата и мезенхимальных стволовых клеток и исследовать их остеогенные свойства на модели критического костного дефекта на крысах.

ОБЪЕКТ И ПРЕДМЕТ ИССЛЕДОВАНИЙ

Предмет исследования состоит в разработке новых системных подходов экспериментального многоуровневого междисциплинарного исследования полимерных биоматериалов с использованием различных экспериментальных моделей: контролируемого биосинтеза полимеров, исследования взаимосвязи надмолекулярной структуры полимера с его физико-химическими свойствами, исследования гидролитической и ферментативной деградации полимеров *in vitro*, исследования кинетики высвобождения низкомолекулярных лекарственных веществ и белков из полимерных изделий, исследования биосовместимости полимеров и изделий из них *in vitro* и *in vivo*, исследования биосовместимости полимеров, изучения остеогенных свойств полимеров и изделий из них *in vitro* и *in vivo*, создания и исследования тканеинженерной конструкции на основе полимерного матрикса. Объектами исследования являлись поли-3-оксибутират и его сополимеры, полученные биотехнологическим путем, и различные изделия на их основе: композиты, пленки, нано- и микрочастицы, загруженные низкомолекулярными лекарственными веществами и белками, 2D- и 3D-матрикс для тканевой инженерии.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Впервые создана фундаментальная научно-методическая база для экспериментального исследования поли-3-оксибутирата и его сополимеров, позволяющая комплексно исследовать взаимосвязь физико-химических и биомедицинских свойств этих биополимеров на различном уровне: атомно-молекулярном, надмолекулярном, клеточном и тканевом. Проведенные экспериментальные исследования полимерных материалов позволили установить целый ряд новых данных об этих биополимерах.

Впервые создана экспериментальная биотехнологическая модель контролируемого биосинтеза ПОБ и его сополимеров с использованием бактерии-продуцента вида *Azotobacter chroococcum* и были синтезированы сополимеры поли-3-оксибутирата с полиэтиленгликолем (ПОБ-ПЭГ), терполимер поли-3-оксибутирата с 3-оксивалератом и полиэтиленгликолем (ПОБВ-ПЭГ) и сополимер с 4-метилвалериановой кислотой (ПОБ4МВ). Установлены закономерности для контролируемого биосинтеза ПОБ и его сополимеров с заданным мономерным составом и молекулярной массой.

Была создана экспериментальная модель исследования взаимосвязи надмолекулярной структуры полимера с его физико-химическими свойствами и проведено комплексное сравнительное исследование морфологии и физико-химических свойств различных полимеров, полученных биотехнологическим путем (ПОБ различной молекулярной массы, ПОБВ с различным содержанием 3-оксивалерата, ПОБ-ПЭГ, ПОБВ-ПЭГ и ПОБ4МВ и композита ПОБ с ПЭГ). Установлены закономерности взаимосвязи надмолекулярной структуры биополимера ПОБ и его сополимеров (ПОБВ, ПОБ-ПЭГ, ПОБВ-ПЭГ и ПОБ4МВ) и различных его физико-химических свойств. Впервые показано, каким образом влияет биоПЭГилирование ПОБ на морфологию и физико-химические свойства этого биополимера.

Создана экспериментальная модель исследования гидролитической и ферментативной деградации полимеров *in vitro*, которая позволила исследовать, каким образом происходит изменение физико-химических свойств ПОБ и его сополимеров различной молекулярной массы и мономерного состава, в процессе их биodeградации *in vitro*, описать математически изменение этих свойств, и раскрыть механизм биodeградации ПОА *in vitro*, позволяющий прогнозировать кинетику биodeградации ПОА в зависимости от их молекулярной структуры. Для сополимеров ПОБВ найдена граница фазового перехода (при содержании 3-оксивалерата у ПОБВ в 5,7-5,9%) структурно-физических свойств полимера, при пересечении которой меняется закономерность кинетики изменения физико-химических свойств ПОБВ в процессе его биodeградации. Впервые показано, что биоПЭГилирование ПОБ приводит к краткосрочному (до 1 мес.) изменению кинетики изменения молекулярной массы и степени кристалличности биополимера.

Создана экспериментальная модель изучения кинетики высвобождения низкомолекулярных лекарственных веществ и белков из микрочастиц, которая позволила исследовать высвобождение целого ряда лекарственных веществ из микрочастиц на основе ПОБ, дать математическое описание кинетики их высвобождения, раскрыть механизм их высвобождения как преимущественно диффузию по закону Фика, а также впервые исследовать каким образом биотехнологическая сополимеризация ПОБ с ПЭГ влияет на кинетику высвобождения паклитаксела из полимерных микрочастиц. Впервые продемонстрирована более высокая противоопухолевая эффективность *in vitro* (на опухолевых клетках линий MCF-7 и МН-22а) микрочастиц на основе ПОБ-ПЭГ при пролонгированном высвобождении из них паклитаксела и этопозида. Впервые методом электродинамического распылительного высушивания были получены загруженные паклитакселом микрочастицы из ПОБ, которые обладают пролонгированной противоопухолевой активностью. Было показано, что полученная нами новая лекарственная форма паклитаксела на основе микрочастиц из ПОБ обладает сниженной острой токсичностью и более высокой противоопухолевой эффективностью на моделях внутрибрюшинно трансплантированной эпидермоидной карциномы легкого Льюис и рака молочной железы человека РМЖ-1 при локальном торможении роста опухолей по сравнению с препаратом Таксол в традиционной лекарственной форме. Впервые исследовано влияние биоПЭГилирования ПОБ на кинетику пролонгированного высвобождения модельного белка, фермента лизоцима, из микрочастиц, полученных по оригинальной методике инкапсулирования белка с использованием в качестве носителя белка наноразмерного гидроксиапатита (нГА). Продemonстрировано возрастание вклада диффузии белка по закону Фика в его высвобождение из микрочастиц на основе ПОБ-ПЭГ, увеличение стабильности белка (по сохранению его ферментативной активности) и отсутствие цитотоксичности микрочастиц, загруженных лизоцимом, по отношению к мезенхимальным стволовым клеткам.

Создана экспериментальная модель исследования влияния ПОБ и его сополимеров на остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток с использованием пористых матриц на основе ПОБ и его сополимера с ПЭГ с заданной формой и микроструктурой. Впервые показано, что биоПЭГилирование ПОБ приводит к частичному подавлению способности ПОБ к спонтанной остеогенной дифференцировке мезенхимальных стволовых клеток (МСК) при их росте в плоском пористом матриксе из этого полимера.

Использование моделей некротического и критического костных дефектов позволило выявить остеоиндуктивные свойства пористых матриц и микросфер на основе ПОБ и ПОБ-ПЭГ, их способность стимулировать образование новой костной ткани в области дефекта, заполненного полимерным материалом. Наблюдается превосходная интеграция полимерного материала на основе ПОБ и ПОБ-ПЭГ с костной тканью, о чем свидетельствует то, что фиброзная капсула вокруг биоматериала не формируется.

Показана возможность создания тканеинженерной конструкции на основе пористых матриц из композита ПОБ, изготовленных методом не прямой 3D-печати с использованием мезенхимальных стволовых клеток, и их остеоиндуктивная функциональность, которая обеспечила >90% восстановление критического костного дефекта за 1 месяц.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Диссертационная работа представляет собой комплексное междисциплинарное исследование, в основе которого – биотехнологический способ контролируемого биосинтеза бактериальных полимеров, поли-3-оксибутирата и его сополимеров, в котором происходит тесная интеграция биотехнологии, классических естественных наук: физики, химии, биологии и медицины, а также развитие биоинженерных направлений исследования полимерных материалов. Так, в работе продемонстрировано влияние биотехнологической сополимеризации поли-3-оксибутирата с полиэтиленгликолем на различных уровнях экспериментального исследования полимерных материалов: атомно-молекулярном, надмолекулярном, клеточном и тканевом. Созданная система экспериментального исследования полимерных материалов, ПОБ и его сополимеров, позволила выявить закономерности взаимосвязи структуры полимеров с их

физико-химическими и биологическими свойствами, закономерности динамики биодegradации *in vitro* и высвобождения низкомолекулярных лекарственных веществ и белков из полимерных изделий, биологическую активность ПОБ и изделий на его основе.

Нами обнаружены закономерности взаимосвязи надмолекулярной кристаллической структуры ПОА и их физико-химических свойств, такие как линейная зависимость жесткости (по модулю Юнга) и гидрофильности поверхности полимера (по контактному углу смачивания водой), от степени кристалличности, которая складывается благодаря организации полимерных цепей в кристаллические, преимущественно ламеллярные структуры, и отсутствие такой зависимости от молекулярной массы гомополимера; а также закономерности изменения надмолекулярной структуры полимеров и их физико-химических свойств в процессе биодegradации *in vitro*, такие как наличие граничного значения содержания 3-оксивалерата в цепи сополимера ПОБВ (5,7-5,9 мол.%), определяющей закономерность кинетики изменения степени кристалличности ПОБВ в процессе их биодegradации *in vitro*. Обнаруженные закономерности имеют как большую теоретическую значимость в области физической химии частично-кристаллических полимеров, обладающих способностью к биодegradации, так и практическую значимость при конструировании имплантируемых медицинских изделий на основе таких полимеров с прогнозируемым изменением их свойств в процессе эксплуатации.

Обнаруженные закономерности пролонгированного высвобождения лекарственных низкомолекулярных веществ и белков из полимерных микрочастиц имеют важную теоретическую значимость в области физической химии полимерных систем контролируемого высвобождения веществ. Проведенный цикл доклинических исследований разработанной новой лекарственной формы паклитаксела продемонстрировал снижение острой токсичности и повышение эффективности при сравнении с традиционной лекарственной формой этого препарата; разработанная лекарственная форма пролонгированного высвобождения лизоцима обеспечивает высвобождение этого белка в течение 14 суток без потери его активности. Таким образом, имеется и большая практическую значимость полученных результатов при создании новых лекарственных форм химиотерапевтических препаратов пролонгированного действия, а также систем доставки ростовых факторов и цитокинов в тканевой инженерии.

Была показана высокая биосовместимость ПОБ и его сополимеров (ПОБВ, ПОБ-ПЭГ, ПОБВ-ПЭГ и ПОБ4МВ) *in vitro* и *in vivo*, а также разработанных на основе ПОБ и ПОБ-ПЭГ пористых матриксов различной формы и пористых микросфер, которые хорошо подходят для культивирования в них как нативных, так и дифференцированных по остеогенному пути МСК, что позволяет их использовать в регенеративной медицине и тканевой инженерии. Продемонстрированы выраженные остеоиндуктивные свойства матриксов и микросфер на основе ПОБ и его сополимера и их отличная интеграция с костной тканью, что имеет важное теоретическое значение, т.к. тесно связано с природными свойствами ПОБ, а также позволяет их использовать в пластической хирургии в качестве наполнителей и в челюстно-лицевой хирургии и ортопедии в качестве барьерных мембран и остеопластического материала. Показана перспективность разработки тканеинженерных конструкций с использованием МСК для регенерации костных дефектов критического размера, что открывает возможность внедрения инженерии костной ткани в клиническую практику в челюстно-лицевой хирургии и ортопедии.

МЕТОДОЛОГИЯ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Представленная нами работа является междисциплинарным исследованием, в котором применяются методы из весьма различных естественно-научных дисциплин: полимерной химии (выделение и очистка полимеров, гельпроникающая хроматография, вискозиметрия, газовая хроматография, спектроскопия ядерного магнитного резонанса, изготовление обычных и ультратонких пленок), биотехнологии и микробиологии (культивирование бактериального штамма-продуцента *Azotobacter chroococcum* 7Б, биосинтез полимеров), молекулярной биологии (анализ 16S рРНК бактериального штамма-продуцента), физической химии (определение пористости, дифференциальная сканирующая калориметрия,

рентгеноструктурный анализ, ИК-спектроскопия, измерение контактных углов смачивания и водопоглощения, измерение механических свойств полимерных изделий на разрывной машине, с помощью наноиндентирования и реометрии), микроскопии (световой, флуоресцентной, конфокальной, просвечивающей и сканирующей электронной), клеточной биологии (выделение и культивирование стволовых клеток, тестирование цитотоксичности, исследование пролиферации клеток, анализ фенотипа стволовых клеток, исследование дифференцировки стволовых клеток), биохимии (измерение концентрации лекарственных веществ и белков, активности ферментов, измерение адсорбции белков на полимерной поверхности, электрофорез белков, круговой дихроизм), тканевой инженерии (непрямая 3D-печать, изготовление 2D- и 3D-матриц, пористых микросфер, тканеинженерных конструкций на их основе), биофармакологии (получение микрочастиц, загруженных низкомолекулярными лекарственными веществами и белками, в т.ч. методом пьезоэлектрического распылительного высушивания), физиологии и экспериментальной медицины (исследование острой токсичности, исследование тканевой реакции при подкожной имплантации, модели некротического и критического костных дефектов, компьютерная томография, гистологическое исследование), а также методы математического моделирования при анализе кинетики высвобождения лекарственных веществ и биodeградации полимеров, визуализации данных микроскопии (программы Image J, Zeiss LSM Browser, Image Pro Plus, Photoshop CC) и статистического анализа данных (программный пакет SPSS/PC+ Statistics™ 12.1).

В работе были использованы экспериментальные модели на различных уровнях: молекулярном, надмолекулярном, клеточном и тканевом: модель контролируемого биосинтеза полимеров, модели гидролитической и ферментативной деградации полимеров *in vitro*, модели высвобождения низкомолекулярных веществ и белков из полимерных пленок и микрочастиц, модель дифференцировки мезенхимальных клеток в остеогенном направлении, модели эпителиальных опухолей, модели некротического и критического костных дефектов.

В работе широко применяются биоинженерные технологии конструирования новых биообъектов: биополимеров нового химического строения и надмолекулярной структуры с новыми физико-химическими и биологическими свойствами, новых конструкций на основе этих биополимеров (нано- и микрочастиц, пористых 2D- и 3D-матриц), комбинированных систем (микрочастиц с инкапсулированными лекарственными веществами и белками, способных к их пролонгированному высвобождению с заданной кинетикой) и гибридных конструкций (композитных 3D-матриц с мезенхимальными стволовыми клетками).

Все эксперименты и полученные результаты высоко воспроизводимы и выявленные различия статистически значимы.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Контролируемый биосинтез поли-3-оксибутирата и его сополимеров позволяет синтезировать поли-3-оксибутират и его сополимеры с 3-оксивалератом, с 3-окси-4-метилвалератом, с ди-, три- и полиэтиленгликолем с заданной молекулярной массой и мономерным составом.
2. Комплексное исследование надмолекулярной структуры и физико-химических свойств поли-3-оксибутирата и его сополимеров позволяет выявить закономерности во взаимосвязи химической структуры полимеров с их надмолекулярной структурой и основными физико-химическими параметрами (степень кристалличности, модуль Юнга и гидрофильность поверхности).
3. Комплексное исследование биodeградации *in vitro* поли-3-оксибутирата и его сополимеров позволяет установить содержание 3-оксивалерата в цепи сополимера (5,7-5,9 моль%), при пересечении которой меняется закономерность кинетики изменения физико-химических свойств в процессе его биodeградации *in vitro*, а также выявить

изменение кинетики ранней стадии биodeградации биополимера *in vitro* у биоПЭГилированного поли-3-оксибутирата.

4. Комплексное исследование кинетики высвобождения низкомолекулярных лекарственных веществ и белка лизоцима из микрочастиц на основе поли-3-оксибутирата позволяет установить, что кинетика высвобождения паклитаксела из микрочастиц на основе поли-3-оксибутирата наилучшим образом соответствует кинетики биodeградации этого биополимера, а наилучшими параметрами высвобождения лизоцима обладают микрочастицы на основе биоПЭГилированного поли-3-оксибутирата.
5. Микрочастицы из поли-3-оксибутирата, загруженные паклитакселом, полученные методом электродинамического распылительного высушивания, обладают повышенной пролонгированной противоопухолевой эффективностью *in vitro* на опухолевых клетках и *in vivo* на моделях эпителиальных опухолей мышей по критерию локального торможения роста опухоли при сниженной острой токсичности в сравнении с традиционной противоопухолевой лекарственной формой (Таксолом).
6. Поли-3-оксибутират и его сополимеры не обладают цитотоксичностью по отношению к фибробластам и мезенхимальным стволовым клеткам, пористые матриксы из поли-3-оксибутирата вызывают спонтанную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток по остеогенному пути, а биоПЭГилирование этого полимера приводит к частичному подавлению этого эффекта. Пористые матриксы на основе поли-3-оксибутирата и его биоПЭГилированного сополимера поддерживают рост костной ткани на модели некротического костного дефекта на крысах *in vivo*.
7. Тканеинженерная конструкция на основе композитных 3D-матрикс на основе поли-3-оксибутирата и мезенхимальных стволовых клеток способствует почти полной регенерации критического костного дефекта у крыс *in vivo* за 1 месяц.

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ И АПРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Личный вклад автора. Диссертационная работа является самостоятельным научным исследованием соискателя, выполнявшимся в течение 15-ти лет. Личный вклад Бонарцева А.П. присутствует на всех этапах выполнения работы: большая часть идей, исследований, результатов и текстов, изложенных в диссертации, либо получены автором лично, либо автор играл существенную роль в планировании и организации исследований, постановке задач, их решении, в анализе данных литературы, методических разработках экспериментов и их проведении, в обработке, анализе и интерпретации полученных данных, написании статей и обзоров по полученным результатам. Данный факт подтверждается тем, что автор является первым, вторым или последним соавтором (в том числе с указанием равноценности вклада авторов) в большом числе публикаций по теме диссертации. Вклад автора в совместных экспериментально-теоретических работах заключается в применении разработанных методов, моделировании и интерпретации экспериментальных результатов, полученных коллегами. Работа выполнена на базе биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; некоторые исследования были проведены на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». Совместное участие отражено в публикациях по теме диссертации.

Степень достоверности результатов. Все полученные результаты являются оригинальными. Достоверность полученных результатов основывается на большом объеме данных, использовании широкого спектра современных методик, корректном применении статистических методов, на использовании критического анализа результатов исследований и их сравнительного анализа с данными литературы. Степень достоверности подтверждается опубликованными по теме работы статьями в ведущих рецензируемых отечественных и

зарубежных рецензируемых научных журналах, в том числе, входящих в первый квартиль. Опубликованные работы в полной мере отражают содержание диссертации.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы докладывались и обсуждались на научных семинарах в МГУ, ряде международных университетов и исследовательских центров (включая, Томский политехнический университет, Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Дрезденский технический университет, Университет Мартина Лютера Галле-Виттенберг, Ланкастерский университет, Университет Томаша Бати в Злине, Корейский институт науки и техники, Университет МГУ-ППИ в Шэньчжэне и др.). Основные результаты работы докладывались на следующих научных конференциях: на международном семинаре KIST-МГУ по нанотехнологиям (Сеул, Корея, 2007), на 2-ом русско-корейском совместном семинаре по нанотехнологиям (Москва, 2008), на 11-ой MirTec конференции – ведущей европейской конференции по исследованию лекарственных средств (Базель, Швейцария, 2008), международной конференции MirTec 2010 (Базель, Швейцария, 2010), на 8-ой международной встрече по фармацевтике, биофармацевтике и фармацевтическим технологиям (Турция, Стамбул, 2012), на международной конференции TechConnect World (США, Санта-Клара, 2012), на международной конференции EuroNanoForum 2013 (Ирландия, Дублин, 2013), на международной научной школе «Полимеры в медицине и здравоохранении» (Казань, 2013), на 38-ом конгрессе европейского биохимического общества (FEBS) (Санкт-Петербург, 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" (STERP) (Санкт-Петербург, 2016), на Сеченовском международном биомедицинском саммите 2017 (СМБС-2017), (Москва, 2017), на Юбилейной конференции, посвященной 25-летию кафедры травматологии и ортопедии РУДН (Москва, 2017), на 6-ом Китайско-Европейском симпозиуме по биоматериалам в регенеративной медицине (Порту, Португалия, 2017), на 26-ой конференции по биоматериалам в медицине и ветеринарной медицине (Рытро, Польша), на 2-ой Международной конференции "Клеточные технологии на рубеже: Исследования и практика" (STERP) (Москва, 2018), на X Международном форуме: Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни (Москва, 2018), на 4-ой международной конференции по биомедицинским полимерам и полимерным биоматериалам (ISBPPB) (Краков, Польша, 2018), на Семинаре по научным связям Британского совета «Предотвращение контаминации биоматериалов для регенерации тканей и заживлению ран» (Ланкастер, Великобритания, 2018), на 12-ой Ежегодной научно-практической конференции «Философские проблемы биологии и медицины: между биофилософией и биоэтикой» (Москва, октябрь 2018), на 4-ом международном конгрессе биоматериалов и биосенсоров (Олюдениз, Мугла, Турция, 2019) (приглашенный доклад), на 30-ой ежегодной конференции Европейского общества биоматериалов (Дрезден, Германия, 2019), на XXIII Российском онкологическом конгрессе (Москва, Россия, 2019), на I Международном конгрессе по ортобиологии «Технологии регенеративной медицины в травматологии и ортопедии» (Москва, Россия, 2020), на совместной Зимней школе Европейского общества искусственных органов и Международного общества тканевой инженерии и регенеративной медицины (Зарагоза, Испания, 2021), на IX Приоровских чтениях совместно с II Конгрессом Ортобиология 2021 «Регенеративные технологии в травматологии и ортопедии с позиции доказательной медицины» (Москва, Россия, 2021), на заседании кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 61 работа: из них 51 – статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых базами данных (Web of Science, Scopus и RSCI), рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова (из них 6 – в журналах первого квартиля Q1); 2 – статьи в Российских научных журналах,

входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки РФ; 6 патентов и 2 обзорные главы в книгах.

Объем, структура и логика работы.

Диссертационная работа состоит из 7 глав: введения, обзора литературы, материалов и методов, раздела результатов и их обсуждения, состоящего из 10-ти разделов, заключения, выводов и списка литературы. В главе «Обзор литературы» обсуждается различие и сходство научно-технологических дисциплин биотехнология и биоинженерия, приводится описание современного состояния исследования и медицинского применения биоматериалов в России и мире, прежде всего, биоразлагаемых и биосовместимых полимеров, полиоксикапролатов и их природного предшественника, поли-3-оксибутирата, дается обзор основных проблем исследования полиоксикапролатов: биодegradации, биосовместимости, применения этих полимеров для тканевой инженерии и систем пролонгированного высвобождения лекарств. В главе «Материалы и Методы» дано описание используемых в работе экспериментальных методов исследования. Первый раздел главы «Результаты» посвящен разработке контролируемого биосинтеза ПОБ и его сополимеров различной молекулярной массы и мономерного состава. Второй раздел - исследованию микро- и наноструктуры ПОБ и его сополимеров. Третий раздел - исследованию физико-химических свойств ПОБ и его сополимеров. Четвертый раздел - исследованию биодegradации ПОБ и его сополимеров *in vitro*. Пятый раздел – изучению биосовместимости *in vitro* поли-3-оксибутирата и его сополимеров. Шестой раздел – разработке и исследованию систем пролонгированного высвобождения низкомолекулярных веществ на основе ПОБ и его сополимеров. Седьмой раздел - разработке и исследованию систем пролонгированного высвобождения белков на основе микрочастиц из ПОБ и его сополимеров. Восьмой раздел – разработке 2D-матрикс на основе ПОБ и его сополимеров и исследованию их остеогенных свойств. Девятый и десятый разделы - разработке 3D-матрикс на основе ПОБ и его сополимеров, а также исследованию и разработке тканеинженерной конструкции на их основе и исследованию их остеогенных свойств.

Полный объем диссертации составляет 543 страницы, включая 195 рисунков и 36 таблиц. Список литературы содержит 791 наименование источников, из них 82 на русском и 709 на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ВВЕДЕНИЕ

Во Введении обосновывается актуальность исследования и избранной темы, формулируется цель, ставятся задачи работы, определены объекты и предмет исследования, изложены основные положения, выносимые на защиту, сформулированы научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология исследования, приведены сведения о личном вкладе автора, апробации и публикации результатов.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе «Обзор литературы» проводится анализ определений, обсуждается различие и сходство научно-технологических дисциплин «Биотехнология» и «Биоинженерия», приводится описание современного состояния исследования и медицинского применения биоматериалов в России и мире, прежде всего, биоразлагаемых и биосовместимых полимеров, полиоксикапролатов и их природного предшественника, поли-3-оксибутирата. Дается обзор основных проблем исследования полиоксикапролатов: исследования физико-химических свойств полимеров, биодegradации, биосовместимости, культивирования клеток (в т.ч. стволовых), применения этих полимеров для тканевой инженерии (в т.ч. для регенерации костной ткани) и систем пролонгированного высвобождения низкомолекулярных лекарственных веществ и терапевтических белков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В главе «Материалы и методы исследования» дано описание используемых в данном междисциплинарном исследовании экспериментальных методов, относящихся к различным наукам: биотехнологии (микробиологии), полимерной и физической химии, микроскопии, клеточной биологии, тканевой инженерии, биофармакологии, физиологии и экспериментальной медицины, математического моделирования и анализа изображений, статистического анализа данных.

Методы биосинтеза, выделения, очистки и определение химического состава полимеров включали контролируемый биосинтез поли-3-оксибутирата и его сополимеров с использованием штамма-продуцента *Azotobacter chroococcum* 7Б с использованием подхода добавления в культуральную среду дополнительных источников углерода – предшественников новых мономеров для синтеза сополимеров ПОБ, методы выделения и очистки бактериальных полимеров, анализ 16S рРНК бактериального штамма-продуцента, определение молекулярной массы полимеров с помощью вискозиметрии и гель-проникающей хроматографии, исследование состава полимеров методами газовой хроматографии и спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Основная методология описана в работах: Мышкина и др., 2008; Мышкина и др., 2010; Бонарцев и др., 2016; Bonartsev et al., 2013a; Bonartsev et al., 2013b; Bonartsev et al., 2017b.

Методы изготовления различных изделий из полученных полимеров включали: методы изготовления ультратонких и стандартных полимерных пленок, 2D- и 3D-матрикс с помощью выщелачивания и непрямого 3D-печати, методы получения композитных матрикс и микрочастиц, пористых микросфер, нано- и микрочастиц и методы загрузки в них лекарственных веществ и белков с помощью одно-, двух и многоэтапного эмульгирования и пьезоэлектрического распылительного высушивания. Основная методология изложена в работах: Зернов и др., 2017a; Зернов и др., 2017b; Bonartsev et al., 2017b; Zhuikov et al., 2017b; Bonartsev et al., 2018a; Volkov et al., 2020.

Методы микроскопии включали методы световой, флуоресцентной, конфокальной, просвечивающей электронной, сканирующей электронной (СЭМ), атомно-силовой микроскопии (АСМ). Описание методов микроскопии приведены в работах Bonartsev et al., 2013a; Bonartsev et al., 2013b; Bonartsev, 2017a; Bonartsev et al., 2018; Volkov et al., 2020.

Методы исследования физико-химических свойств полимеров и изделий на их основе включали такие методы как: определение пористости матрикс, дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), рентгеноструктурный анализ, ИК-спектроскопия, измерение контактных углов смачивания, механические испытания на разрывной машине и с помощью наноиндентации и реометрии, измерение водопоглощения, адсорбции белков на полимерной поверхности, экспериментальные модели гидролитической и ферментативной деградации полимерных изделий *in vitro*, изучение кинетики высвобождения ЛВ и белка из микрочастиц на основе ПОБ, электрофорез белков, круговой дихроизм белка, измерение активности лизоцима. Методология изложена в статьях Зернов и др., 2015; Зернов и др., 2017a; Зернов и др., 2017b; Bonartsev et al., 2013a; Bonartsev et al., 2013b; Bonartsev et al., 2017a; Bonartsev et al., 2018; Volkov et al., 2020; Zhuikov et al., 2020; Zhuikov et al., 2021.

Методы исследования цитотоксичности, биосовместимости и остеогенной активности полимеров и изделий на их основе *in vitro* включали методы исследования цитотоксичности полимерных изделий *in vitro* с использованием опухолевых культур клеток (MCF-7 и МН-22a), фибробластов обезьяны COS-1, фибробластов мыши 3Т3 и МСК крысы, методы культивирования этих культур клеток на пленках и матриксах на основе ПОБ, методики выделения МСК из костного мозга крысы, фенотипирования МСК методом проточной цитометрии, остеонаправленная дифференцировка МСК (в т.ч. активности щелочной фосфатазы (ЩФ), отложения солей кальция, экспрессии фенотипических маркеров МСК), помещение МСК в 3D-матрикс и изготовление тканеинженерных конструкций

Методология описана в работах: Bonartsev et al., 2013a; Bonartsev et al., 2013b; Bonartsev et al., 2017b; Bonartsev et al., 2018; Volkov et al., 2020.

Методы исследования биосовместимости конструкций на основе поли-3-оксибутирата и их биоактивности на моделях заболеваний *in vivo* включали методы подкожной имплантации полимерных изделий, модель некритического костного дефекта, модель критического костного дефекта, гистологические методы исследования тканевой реакции на имплантацию полимерных изделий с помощью пленок на основе ПОБ и его сополимеров, введение флуоресцентных меток для изучения процесса регенерации костного дефекта, компьютерная томография, гистологическое исследование костной ткани, тестирование острой токсичности биополимерных частиц *in vivo* на мышах, исследование противоопухолевой эффективности биополимерных частиц *in vivo* на моделях эпителиальных опухолей. Методология описана в работах: Bonartsev et al., 2017b; Ermakova et al., 2017; Volkov et al., 2020.

Математическая обработка результатов включала методы математического моделирования при анализе кинетики высвобождения лекарственных веществ и биodeградации полимеров, визуализации данных микроскопии (программы Image J, Zeiss LSM Browser, Image Pro Plus, Photoshop CC) и статистического анализа данных (программный пакет SPSS/PC+ Statistics™ 12.1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биосинтез сополимеров поли-3-оксибутирата. Нами была разработана методика и экспериментальная модель контролируемого биосинтеза гомополимера ПОБ и ряда его сополимеров с заданным мономерным составом и молекулярной массой, что позволяет получать полимерные материалы с достаточно широким спектром физико-химических свойств. Экспериментальная модель была разработана на основе технологии контролируемого биосинтеза ПОБ и его сополимеров штаммом-продуцентом *Azotobacter chroococcum* 7Б при применении подхода добавления в культуральную среду штамма-продуцента помимо основного источника углерода (сахарозы) предшественников мономеров новых сополимеров ПОБ и регуляторов его ММ в различных концентрациях, что позволяет регулировать молекулярную массу (ММ) синтезируемого полимера и синтезировать различные сополимеры ПОБ: поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат (ПОБВ) (при добавлении солей пропионовой и валериановой кислот), поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерат (ПОБ4МВ) (при добавлении соли 4МВК). Метод позволяет регулировать молекулярную массу синтезируемых полимеров (от $0,11 \times 10^6$ до $1,63 \times 10^6$ Да), получать сополимеры ПОБВ с различным молярным содержанием 3-оксивалерата (от 2,5 до 21,3 моль%) с заданной молекулярной массой (от $0,17 \times 10^6$ до $1,42 \times 10^6$ Да). Разработана модификация метода – синтез сополимеров ПОБ с синтетическими ди-, три- и полиэтиленгликолями – биоПЭГилирование, в результате чего получены новые ди-блок сополимеры ПОБ: ПОБ-ДЭГ (при добавлении ДЭГ), ПОБ-ТЭГ (при добавлении ТЭГ), ПОБ-ПЭГ (при добавлении ПЭГ-200, ПЭГ-300 и ПЭГ-400) и ПОБВ-ПЭГ (при одновременном добавлении ПЭГ-300 и соли ВК) с различным содержанием мономеров в цепи сополимера; максимальное содержание полиэтиленгликоля было в ПОБ-ПЭГ 300 и составляло 0,33 моль%. На Рисунке 1 показаны спектры ^1H -ЯМР вновь синтезированных нами сополимеров ПОБ: ПОБ4МВ, ПОБ-ДЭГ, ПОБ-ТЭГ и ПОБ-ПЭГ, которые доказывают химическую структуру синтезированных сополимеров ПОБ (Бонарцев и др., 2016; Bonartsev et al., 2013a; Bonartsev et al., 2013b; Bonartsev et al., 2017).

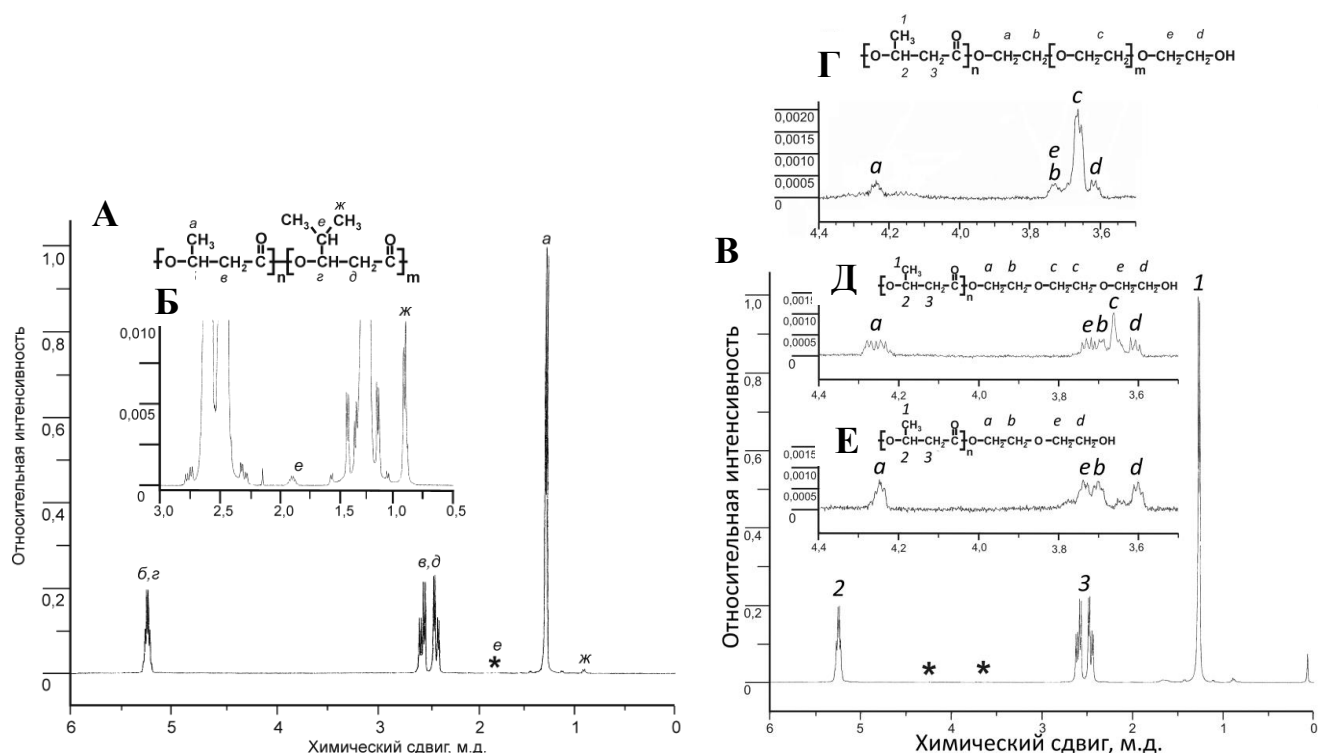


Рисунок 1. Спектр ^1H -ЯМР сополимера ПОБ с 3-окси-4-метилвалератом (справа) и сополимеров ПОБ с ДЭГ, ТЭГ и ПЭГ (слева). А, В – поли-3-оксибутират (справа и слева): $\text{CH}_3(\text{s})$ - а, $\text{CH}(\text{b})$ - б, $\text{CH}_2(\text{b})$ - в, поли-3-окси-4-метилвалерат (Б): $\text{CH}(\text{b})$ - г, $\text{CH}_2(\text{b})$ - д, $\text{CH}_2(\text{s})$ - е, $\text{CH}_3(\text{s})$ - ж, основная полимерная цепь - б; боковые группы – s. Поли-3-оксибутират-со-(ди, три- и поли)этиленгликоль (справа): $-\text{O}-\text{CH}_2$ эфирная связь (4.24 ppm) - а, CH_2 следующая группа (3.73) - б, совокупный сигнал групп центра ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) (3.66 ppm) - с, концевые группы – CH_2- (3.70 ppm) – е; $-\text{CH}_2-\text{OH}$ (3.61 ppm) – д, соответственно, основная полимерная цепь – б, боковые группы – s,* на врезках представлены увеличенные участки графика (Г, Д, Е).

Добавление в культуральную среду натриевых солей гексановой, гептановой, октановой, додекановой кислот в концентрации 20 mM, а также ПЭГ 1500 и пропиленгликоля 400 в концентрации 150 mM не привело к синтезу сополимеров ПОБ. Использование дополнительных источников углерода, карбоновых кислот и производных ЭГ, вызывало ингибирование роста клеток, снижение выхода полимера, падение молекулярной массы полимера, уменьшение содержания 3-гидроксивалерата в полученном сополимере ПОБВ-ПЭГ и изменение морфологии бактериальных клеток, что зависело от природы полученного сополимера, природы добавляемого в культуральную среду предшественника (карбоновых кислот или производных ПЭГ) и времени их добавления. На Рисунке 2 представлены основные параметры биосинтеза сополимеров ПОБ при использовании разработанного метода (Bonartsev et al, 2017).

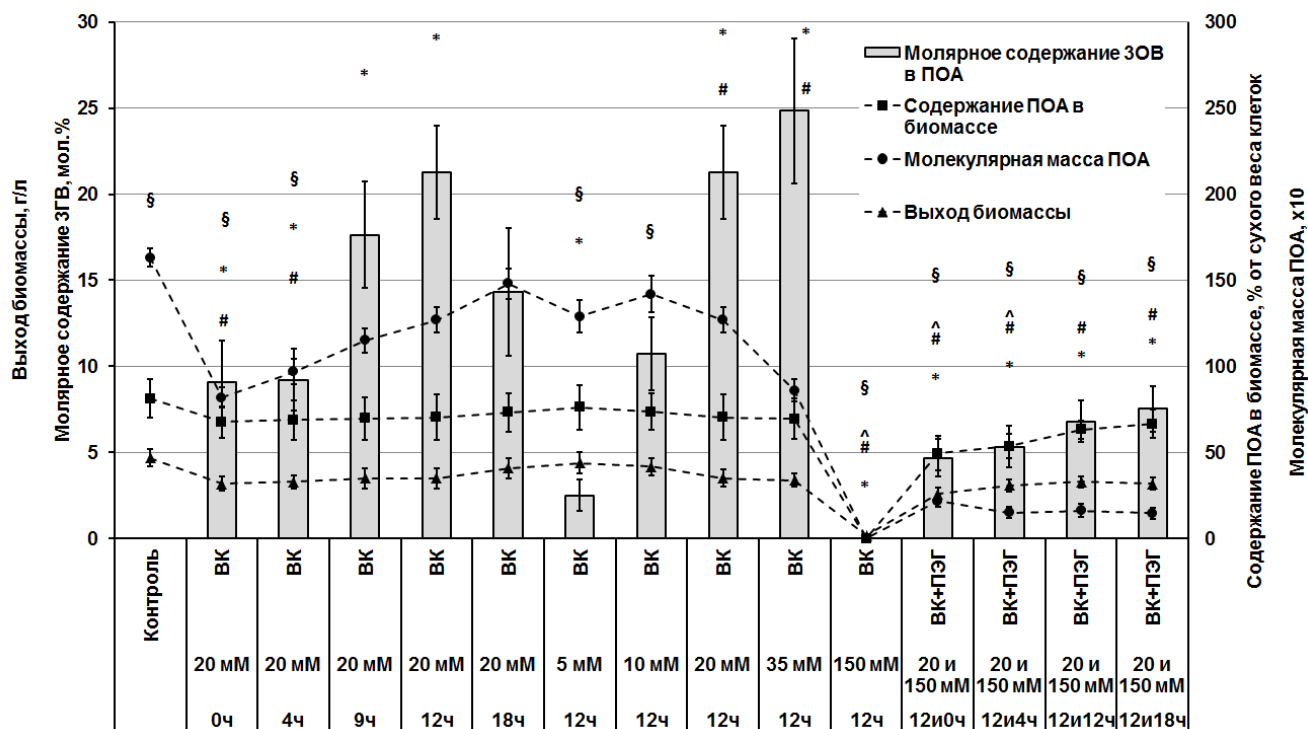


Рисунок 2. Содержание синтезируемых полимеров, ПОБ и ПОБВ, в клетках (% сух. вес.) (по оси у справа), их молекулярная масса ($\times 10000$ г/моль) (по оси у справа) и молярное содержание 3-оксивалерата (мол.%) в сополимере ПОБ (по оси у слева), а также урожай биомассы (г/л сух.вес.) штамма-продуцента *A. chroococcum* 7Б (по оси у слева) в зависимости от добавления в культуральную среду валерата (ВК) в различной концентрации и ПЭГ в концентрации 150 мМ, через различные промежутки времени. ^, #, * $p < 0,05$ содержание полимера в биомассе, выход биомассы и ММ синтезируемого полимера, соответственно, в сравнении с группой Контроль; § $p < 0,05$ ММ синтезируемых полимеров в сравнении с ММ в группе ВК 20 мМ 12 час.

Таким образом, нами была разработана экспериментальная модель контролируемого биосинтеза ПОБ и его сополимеров с заданным мономерным составом и молекулярной массой, что позволяет получать полимерные материалы с достаточно широким спектром физико-химических свойств для проведения комплексных биоинженерных исследований полимеров, т.е. это биотехнологическая модель регуляции надмолекулярной структуры и физико-химических свойств природных биополимеров (Раздел 3.1).

Исследование микро- и ультраструктуры поли-3-оксибутирата и его сополимеров.

Исследование ультраструктуры поверхности полимерных пленок показывает наличие кристаллических структур ПОБ и его сополимеров. Кристаллические структуры ПОБ организованы в форме стопок ламелей. На поверхности макроскопической пленки (толщиной 40 мкм) они видны как полосы, ширина которых составляет 11 – 40 нм (Рисунок 3 А, Б). В связи с тем, что ламели могут лежать к поверхности под разными углами, их ширина может довольно значительно различаться (Рисунок 3 В). Ультратонкие (толщиной 4,5 нм) полимерные пленки из ПОБ, полученные методом нанесения покрытия с помощью центрифугирования (спин-коатинг), образуют водорослево-подобные кристаллические структуры, окруженные аморфной фазой в виде капель (Рисунок 3 Г) (Zhuikov et al., 2017a; Zhuikov et al., 2017b).

Если сравнивать изображения ультратонких пленок из ПОБ, сополимера ПОБ-ПЭГ и композита ПОБ/ПЭГ, то видна существенная разница между морфологией ультратонких пленок из ПОБ, с одной стороны, и его сополимера ПОБ-ПЭГ и композита ПОБ/ПЭГ, с другой стороны. На изображениях ультратонких пленок ПОБ-ПЭГ и ПОБ/ПЭГ видны нитеобразные структуры, которые можно интерпретировать как отдельные ламели (Chan and Li, 2005). Нитеподобные структуры лежат как в один слой (тогда их высота составляет $0,7 \pm 0,1$ нм), так и в два слоя (тогда их высота составляет $1,5 \pm 0,3$ нм) (Zhuikov et al., 2017b).

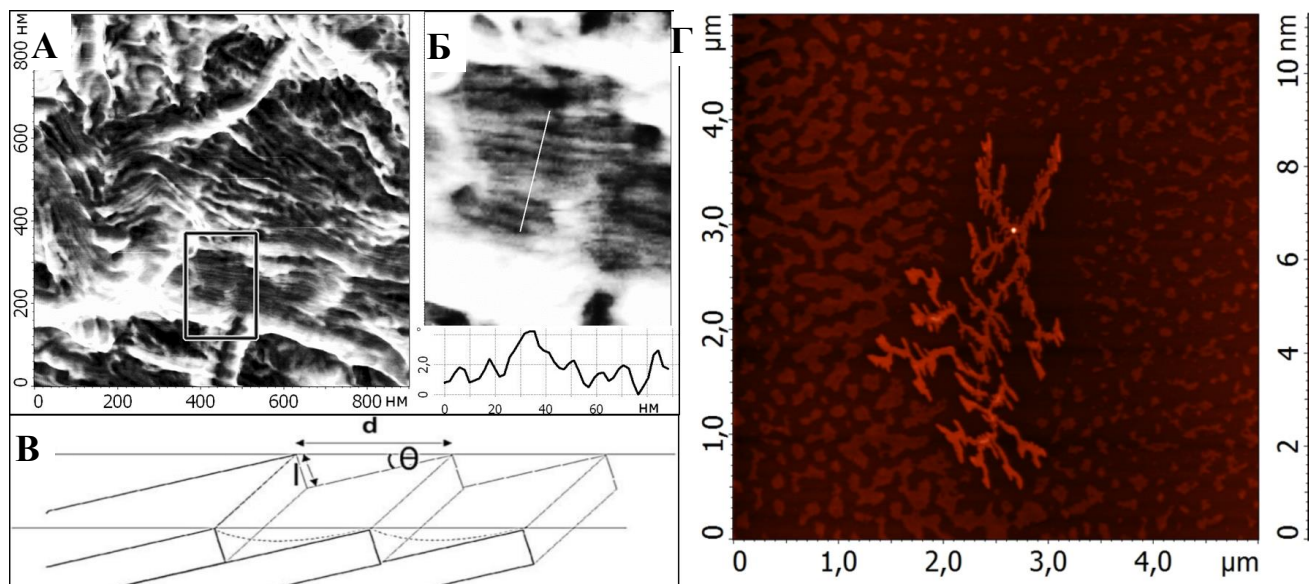


Рисунок 3. Изображение (АСМ, в фазовом контрасте, черно-белое) гладкой поверхности макроскопической плёнки ПОБ (А). Изображение участка гладкой поверхности пленки (выделено черным прямоугольником на общем изображении А), на которой хорошо видна стопка ламелей (Б); внизу показан график изменения высоты пленки над подложкой по белой линии (Б). Схема расположения ламелей под углом θ к поверхности (В). Топографическое изображение ультратонкой пленки ПОБ (Г).

Исследование физико-химических свойств поли-3-оксибутирата и его сополимеров.

Введение ЗОВ, 4МЗОВ и ПЭГ в полимерную цепь ПОБ приводит к значительным изменениям физико-химических характеристик полученных сополимеров по сравнению с гомополимером ПОБ. На Рисунке 4 А и Б показано, что степень кристалличности сополимеров ПОБВ ниже, чем у гомополимера ПОБ, причем, наблюдается обратная линейная зависимость между степенью кристалличности биополимера и молярным содержанием ЗОВ в его составе. Интересно, что кристалличность ПОБ4МВ (49%) с содержанием ЗО4МВ всего лишь 0,6 моль% почти соответствует и даже немного меньше кристалличности ПОБВ (51%), содержащего 5,9 моль%. Т.е. наблюдается десятикратная разница во влиянии мономеров ЗОВ и ЗО4МВ на кристалличность их сополимеров с ПОБ. Сополимер ПОБ-ПЭГ также обладает немного меньшей степенью кристалличности, чем гомополимер ПОБ со сходной ММ (105 или 255 кДа) и его кристалличность даже ниже, чем у высокомолекулярных ПОБ (Рисунок 4 А, Б). Увеличение молярного содержания ЗОВ в ПОБВ приводит также и к изменению механических свойств полимеров, в частности, их жесткости. Он изменяется в широких пределах от 0,4 до 2,2 ГПа и обратно пропорционален содержанию ЗОВ в полимере, т.е. включение в полимерную цепь ПОБ мономеров ЗОВ снижает жесткость гомополимера. Наблюдается двукратное падение модуля Юнга у сополимеров ПОБ4МВ и ПОБ-ПЭГ по сравнению с гомополимером ПОБ, практически такое же, как у сополимеров ПОБВ с молярным содержанием ЗОВ от 2,5 до 9 мол.%, тогда как содержание мономеров ЗО4МВ в цепи сополимера ПОБ4МВ составляет всего 0,6 мол.%, а мономеров ЭГ в составе сополимера ПОБ-ПЭГ еще меньше – 0,3 мол.% (Рисунок 3В). Включение в цепь гомополимера других полимеров также оказывает влияние и на гидрофильность полимера. У высокомолекулярных сополимеров ПОБВ наблюдается обратно-пропорциональная зависимость между содержанием ЗОВ в составе ПОБВ и контактным углом смачивания водой, т.е. при увеличении содержания ЗОВ возрастает гидрофильность поверхности полимеров, хотя гидрофильность гомополимера ПОБ все равно остается выше, чем у всех сополимеров (Рисунок 4Г). Таким образом, механические свойства и гидрофильность ПОБ и его сополимеров значительным образом зависят от их кристалличности (Жуйков и др., 2018; Zhuikov et al., 2017a; Zhuikov et al., 2017b; Zhuikov et al., 2020).

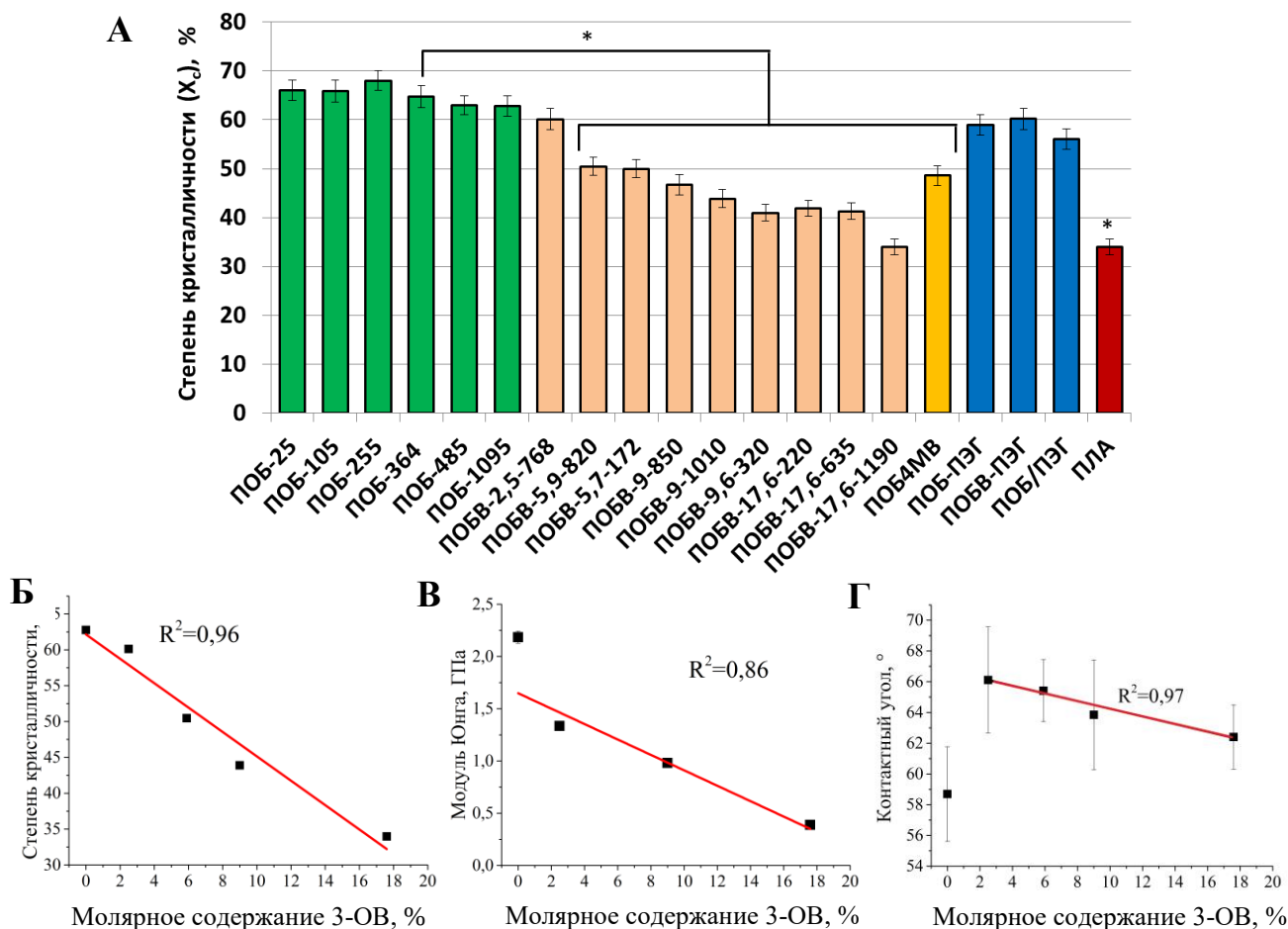


Рисунок 4. Степень кристалличности пленок ПОА (А). Зависимость степени кристалличности (Б), модуля Юнга (В) и контактного угла смачивания водой (Г) ПОБ и ПОБВ от молярного содержания 3ОВ в составе высокомолекулярных полимеров. * $p < 0,05$ степени кристалличности исследуемых полимеров в сравнении с этим параметром у ПОБ-364.

Таким образом, результаты, описанные в Разделах 3.2 и 3.3 позволили создать экспериментальную модель исследования взаимосвязи надмолекулярной структуры полимера с его физико-химическими свойствами. Анализ кристалличности поли-3-оксибутирата является основной задачей для этой модели, т.к. кристалличность этого полимера определяет все прочие его свойства. Эта экспериментальная модель позволяет прогнозировать физико-химические свойства полученных полимеров для их использования на более высоких уровнях экспериментального исследования.

Исследование биodeградации ПОБ и его сополимеров *in vitro*. Исследование гидролитической и ферментативной деградации ПОБ и его сополимеров в модельных условиях *in vitro* (в буферном растворе без добавления и с добавлением панкреатической липазы) показало, что происходит незначительное (менее 10%) снижение массы пленок из ПОБ и его сополимеров при большом падении молекулярной массы полимеров. Наибольшее падение ММ наблюдается у высокомолекулярных полимеров – до 79% у ПОБ с исходной ММ 1095 кДа (Жуйков и др., 2018; Zhuikov et al., 2017a; Zhuikov et al., 2017b).

Математическая обработка данных по кинетике снижения молекулярной массы полимеров позволяет раскрыть в той или иной мере механизм их деградации. Чтобы проанализировать кинетику изменения ММ исследуемых полимеров, мы использовали математические модели автокаталитической и неавтокаталитической деградации полимеров с частичной кристалличностью, которые были описаны в работах Weir et al., 2004a и Pan, 2015. Для этого экспериментальные данные изменения ММ помещали на графики зависимости $1/MM$ и $\ln(MM)$ от времени деградации, что позволяет проанализировать их соответствие неавтокаталитическому и автокаталитическому механизму гидролитической деградации,

соответственно (Weir et al., 2004a и Pan et al., 2015). При этом, неавтокаталитическая модель является кинетической моделью нулевого порядка, а автокаталитическая – кинетической моделью первого порядка, что позволяет оценить вклад автокатализа в процесс гидролитической и ферментативной деградации *in vitro*. Оказалось, что для большинства полимеров кривые на этих графиках аппроксимируются с хорошей степенью корреляции ($R^2 > 0,95$) одновременно по неавтокаталитической и автокаталитической моделям деградации, т.е. ферментативная деградация ПОА идет сразу по двум механизмам – неавтокаталитическому и автокаталитическому. Для сравнения, при гидролитической деструкции автокатализ свойственен только для 3-х полимеров (одновременно при 8-ми полимерах по неавтокаталитическому механизму). А при воздействии липазы, уже 11 полимеров подвергаются деструкции по данному механизму (одновременно при 9-ти полимерах по неавтокаталитическому механизму) (Zhuikov et al., 2020). Сополимер ПОБ-ПЭГ в этом отношении больше похож на низкомолекулярный ПОБ-105, чем на гомополимеры с большей ММ: ПОБ-364 и ПОБ-1095, хотя кинетика изменения его ММ не очень хорошо аппроксимируется как по модели неавтокаталитической, так и по модели автокаталитической деградации ($R^2 = 0,91$ и $0,89$, соответственно).

На поверхности полимера наблюдались три основных типа изменения макромолекулярных структур при ферментативной деградации, что было показано с помощью метода АМС: проявляются новые ламели (из-за расщепления прикрывающего их слоя аморфного полимера), ламели исчезают, и они фрагментируются на более короткие участки (из-за расщепления в области дефектов кристаллических структур) (Zhuikov et al., 2017a; Zhuikov et al., 2017b).

Интегральный показатель кристалличности полимеров – степень кристалличности (X_c) при ферментативной деструкции также изменяется (Рисунок 5). Этот показатель плавно повышается, выходит на плато или плавно снижается. Причем, наблюдается четкая зависимость кинетики изменения степени кристалличности в зависимости от молярного содержания 3-ОВ в цепи сополимера. Если аппроксимировать поздний период изменения степени кристалличности линейной функцией, то становится видно, что изменяется угол наклона этих прямых (значения tg_α на Рисунке 5Б). То есть при биodeградации *in vitro* к 6-му месяцу степень кристалличности гомополимера ПОБ-1095 растет, тогда как степень кристалличности ПОБВ-17,6%-1090 с максимальным содержанием 3-ОВ, напротив, падает. Из графика на Рисунке 5А видно, что от 1 до 6 месяцев ферментативной деградации степень кристалличности полимеров будет снижаться, если содержание 3-оксивалерата в цепи ПОБВ будет больше 5,7%. Это значение очень близко к значению 5,9% молярного содержания 3-ОВ в ПОБВ, полученному ранее как точки перелома падения молекулярной массы полимеров при исследовании их гидролитической деструкции. Таким образом, содержание 3-ОВ у ПОБВ в 5,7-5,9%, по-видимому, является той границей фазового перехода структурно-физических свойств всего полимера, при пересечении которой меняется закономерность кинетики изменения физико-химических свойств ПОБВ в процессе его биodeградации (Zhuikov, 2020).

Изменение степени кристалличности в процессе ферментативной деградации отличается и у сополимера ПОБ-ПЭГ: происходит резкий рост степени кристалличности (более чем на 10%), тогда как у ПОБ различной ММ наблюдается, напротив, падение этого показателя на различную величину (рис. 5В). Такой эффект похож на рост степени кристалличности у многих сополимеров ПОБВ с разным содержанием 3-ОВ и у ПОБ4МВ, хотя величина этого роста не столь велика.

На основании полученных результатов можно предложить следующую модель деградации ПОА в буферном растворе в присутствии липазы (Рисунок 5Г). При разложении кристаллической фазы ПОА (ламелей) образуется аморфная составляющая – переплетения полимерных цепей, что приводит к уменьшению степени кристалличности. Далее происходит расщепление полимера в аморфном состоянии и происходит вторичная его кристаллизация, что опять же приводит к повышению степени кристалличности. Такой процесс будет иметь волнообразный вид, что мы и показали в нашей работе. Меньшие же колебания степени

кристалличности при ферментативной деградации связаны, вероятно, с более интенсивным разложением аморфной фазы полимерной матрицы, в результате чего начинают проявляться долговременные тенденции разложения кристаллической фазы, имеющие выраженные закономерности, связанные с химической структурой полимера – молярным содержанием 3-ОВ в сополимерах ПОБВ и граничным значением в 5,7-5,9 мол.%, при переходе через который меняется закономерность кинетики изменения физико-химических свойств ПОБВ в процессе его биodeградации (Zhuikov, 2020).

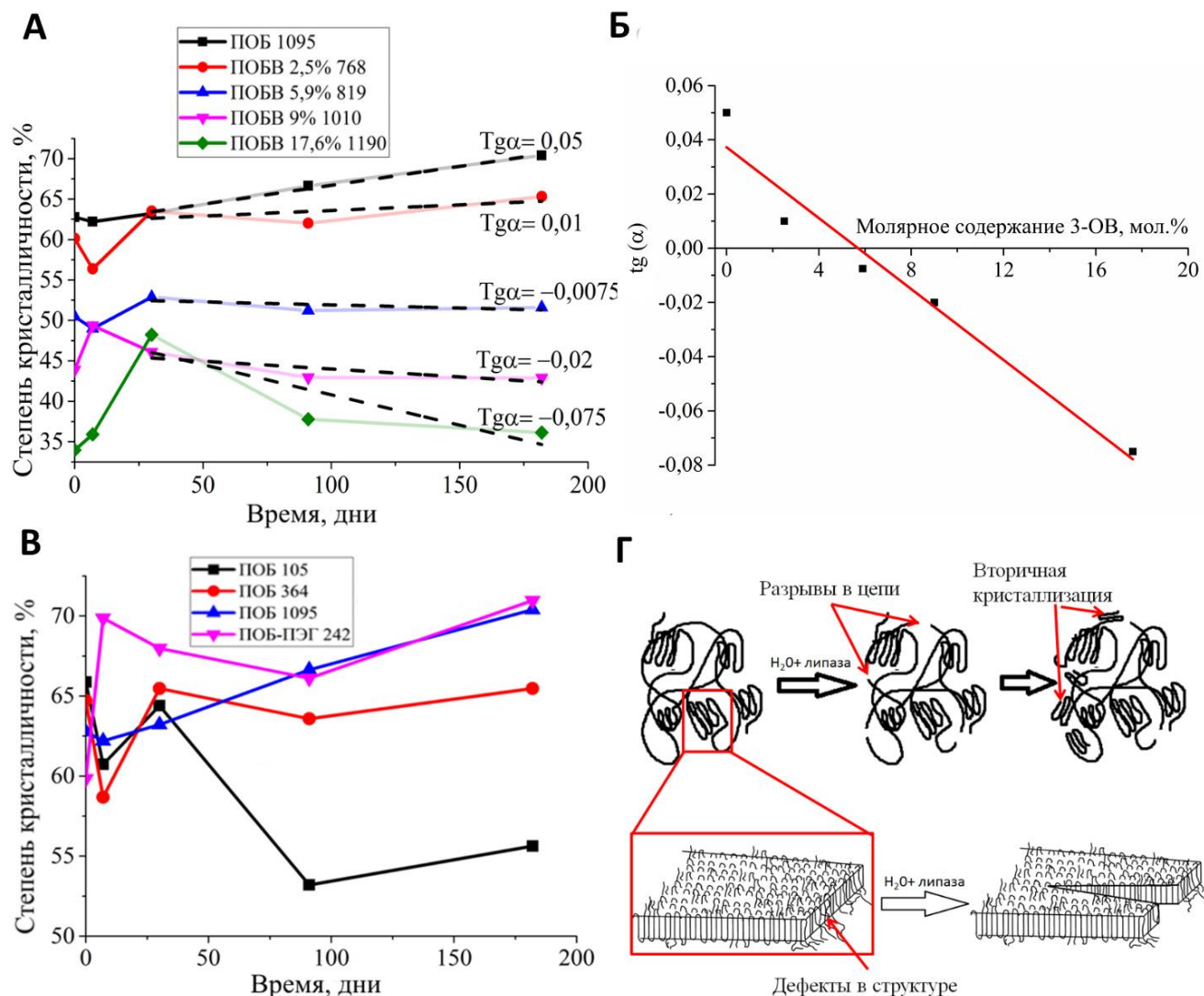


Рисунок 5. Кривые изменения степени кристалличности ПОБ(В) с разным содержанием 3-ОВ при ферментативной деградации *in vitro* в течение 6 месяцев (А). Зависимость тангенса угла наклона линейной аппроксимации данных по изменению степени кристалличности ПОБ и ПОВВ в ходе ферментативной деградации *in vitro* от содержания 3-ОВ в сополимере ПОВВ (Б). Кривые изменения степени кристалличности ПОБ-ПЭГ в сравнении с ПОБ разной ММ при ферментативной деградации *in vitro* в течение 6 месяцев (В). Модель разложения ПОА в присутствии панкреатической липазы (Г).

Было проведено также сравнительное исследование гидролитической и ферментативной деградации *in vitro* пленок из ПОБ, полилактида (ПЛА) и их композита (ПОБ/ПЛА 50:50 вес.). Для пленок из ПОБ и ПЛА наблюдалась двухэтапная картина изменения ММ при ферментативной (но не гидролитической) деградации пленок из ПОБ и ПЛА на ранних сроках наблюдения (до 1,5 мес.): наиболее быстрое снижение ММ наблюдалось в течение первых 2-х недель инкубации для обоих полимеров, тогда как в последующие 4 недели скорость разложения снизилась в несколько раз. Тогда как кинетика деградации композита ПОБ/ПЛА оставалась линейной в течение всего эксперимента как в буферном растворе в присутствии

липазы, так и без нее. Такое поведение полимерной системы можно объяснить взаимодействием ПОБ и ПЛА между собой в композите. Скорость деградации композита примерно в 4 раза меньше, чем у гомополимеров на первой стадии. Это может означать, что разложение ПЛА вносит наибольший вклад в скорость деградации композита (Zhuikov, 2021).

В дополнение к разработанным гидролитической и ферментативной моделям нами была разработана также и модель клеточной деградации *in vitro*, т.е. изучение влияния культивирования клеток на полимерных пленках на их биodeградацию. Результаты показали, что ММ всех полимеров уменьшалась при культивировании фибробластов мыши 3Т3 на пленках. Падение ММ гомополимеров ПОБ и ПЛА происходило нелинейно. В первую неделю наблюдалось более сильное снижение ММ для ПЛА – на 31%, для ПОБ — на 17%, а для композита ПОБ/ПЛА – только на 6,5% (Zhuikov, 2021).

Таким образом, нами была создана экспериментальная модель исследования гидролитической и ферментативной деградации полимеров *in vitro* (Раздел 3.4). Установленные при помощи этой модели закономерности позволяют прогнозировать изменение свойств полимеров и изделий из них на более высоких уровнях при их исследовании на клетках и животных. Временной масштаб модели (до 6 месяцев) соответствует продолжительности эксплуатации изделий из ПОБ и его сополимеров в моделях более высокого уровня – на лабораторных животных *in vivo*.

Биосовместимость *in vitro* поли-3-оксибутирата и его сополимеров. Было проведено исследование цитотоксичности и биосовместимости исследуемых полимеров: ПОБ, ПОБВ, ПОБ4МВ, ПОБ-ПЭГ, ПОБВ-ПЭГ, ПОБ/ПЭГ и ПМК на фибробластах линии 3Т3 при помощи ХТТ-теста. Было показано, что ни один из исследуемых полимерных материалов не проявлял статистически достоверной цитотоксичности по отношению к фибробластам. Только композит ПОБ/ПЭГ проявлял тенденцию к более низким значениям жизнеспособности клеток, которая составила наименьшее значение из всех полимеров (87%) и стала статистически достоверной по сравнению с ПОБ на 4-ый день культивирования клеток. Для исследования биосовместимости полученных полимеров был изучен рост клеток на всей поверхности полимерных пленок в течение 7-ми сут. Число клеток на пленках из ПОБ, ПОБВ, ПОБ4МВ и ПМК достоверно не отличалось друг от друга на каждом сроке и плавно повышалось с 1-ого до 7-ого (ПОБ, ПОБ4МВ) дня или до 4-ого (ПОБВ, ПМК) дня и далее не увеличивалось. Наилучший рост клеток наблюдался на пленках из биоПЭГилированного ПОБ. Наименьшая скорость пролиферации клеток наблюдался на пленках из композита ПОБ с ПЭГ, что, вероятно, связано с некоторой токсичностью ПЭГ, входящего в его состав в довольно значительной доле (30 вес.%) (Bonartsev et al., 2013a; Bonartsev et al., 2013b).

Таким образом, было показано, что ПОБ и его сополимеры не обладают цитотоксичностью по отношению к фибробластам линии 3Т3 и МСК, а также поддерживают рост этих клеток на поверхности пленок из этих биополимеров. Наиболее выраженный рост клеток наблюдается на пленках из биоПЭГилированных ПОБ. По этой причине для дальнейших исследований по изготовлению микросфер и матриксов и их комплексного исследования были выбраны наиболее биосовместимые полимеры ПОБ со средней молекулярной массой и биоПЭГилированный сополимер ПОБ-ПЭГ, а в качестве контроля – композит ПОБ/ПЭГ (Раздел 3.5).

Системы пролонгированного высвобождения низкомолекулярных веществ на основе ПОБ и его сополимеров. Было проведено исследование кинетики высвобождения различных низкомолекулярных лекарственных веществ (ЛВ): дексаметазона, хлорамбуцила, паклитаксела (ПТЛ), этопозида, симвастатина, ивермектина, дипиридамола, индометацина, левофлоксацина, флурбипрофена и рифампицина. Путем математического анализа было показано, что кинетика высвобождения всех ЛВ, кроме ПТЛ, так или иначе не соответствует кинетики биodeградации этого полимера: скорость высвобождения ЛВ либо значительно выше скорости его деградации, либо, напротив, значительно ниже. В связи с этим для дальнейших исследований систем пролонгированного высвобождения низкомолекулярных ЛВ на основе ПОБ и его сополимеров и композитов в качестве ЛВ нами был выбран Паклитаксел. Были

получены микрочастицы на основе ПОБ, низкомолекулярного ПОБ (ПОБнм), композитов ПОБ и ПОБнм с ПЭГ (ПОБ/ПЭГ и ПОБнм/ПЭГ), сополимера ПОБ-ПЭГ и его композита ПОБ-ПЭГ/ПЭГ. Высвобождение ПТЛ из микрочастиц на основе биоПЭГилированного ПОБ хорошо соответствует ($R^2 > 0,95$) диффузионной кинетике по Фику, рассчитанные коэффициент диффузии – минимальный, а характеристическое время высвобождения максимальное по сравнению со всеми другими типами микрочастиц. Несмотря на то, что различия этих параметров невелики (коэффициент диффузии на 20% ниже, а время высвобождения T – на 25% больше), тем не менее, учитывая достоверность этих различий, можно предположить, что, либо изменение физико-химических свойств сополимера ПОБ-ПЭГ (кристалличности, гидрофильности, механических свойств), либо изменение морфологии укладки полимерных цепей, наноструктуры полимерной матрицы биоПЭГилированного ПОБ, а также микроструктуры самих частиц приводит к лучшему удержанию ПТЛ в полимерной матрице микрочастиц за счет образования новых связей (например, водородных) между ПТЛ и полимерными макромолекулами, как было показано с помощью ИК-спектроскопии или за счет большего морфологического препятствования диффузии ПТЛ в матрице этого полимера. Было показано, что нано- и микрочастицы, загруженные паклитакселом оказывают пролонгированное (в течение 120 суток) цитотоксическое действие на опухолевые клетки линии МН-22а. (Бонарцев и др., 2012; Филатова и др., 2012).

Разработанная технология позволила провести полный цикл доклинических исследований противоопухолевой лекарственной формы на основе микрочастиц из ПОБ, загруженных ПТЛ. Микрочастицы из ПОБ, загруженные паклитакселом, полученные методом электродинамического распылительного высушивания, загруженные паклитакселом, обладают повышенной пролонгированной противоопухолевой эффективностью *in vivo* на моделях эпителиальных опухолей мышей, привитых внутрибрюшинно: карциномы легкого Льюис и рака молочной железы человека РМЖ-1 по критерию локального торможения роста опухоли при сниженной острой токсичности в сравнении с традиционной противоопухолевой лекарственной формой (Таксолом) (Зернов и др., 2017; Bonartsev et al., 2017a; Ermakova et al., 2017).

Микрочастицы из поли-3-оксибутирата и его сополимеров для пролонгированного высвобождения белков. Влияние биоПЭГилирования ПОБ на функциональные свойства биополимера было рассмотрено также на примере системы контролируемого высвобождения белков из полимерных микрочастиц. Была разработана методика инкапсулирования фермента лизоцима в микрочастицы на основе ПОБ и его сополимера ПОБ-ПЭГ с помощью метода двухэтапного эмульгирования «твердая фаза/масляная фаза/водная фаза» и с использованием сорбента для белка - нГА. Для получения микрочастиц и исследования высвобождения из них модельного белка, лизоцима, был использован ПОБ средней молекулярной массы (ПОБ-255, $MM = 2,55 \times 10^5$) и низкой молекулярной массы (ПОБ-25, $MM = 2,5 \times 10^4$), а также сополимер, полученный методом биоПЭГилирования (ПОБ-ПЭГ, $MM = 1,6 \times 10^5$). К сожалению, использовать композит ПОБ с ПЭГ для этих экспериментов не представилось возможным, т.к. при его использовании по данной методике микрочастицы не образовывались. Полученные микросферы имели правильную округлую форму. Рассчитанный на основании данных СЭМ диаметр микрочастиц составил от 22 до 25 мкм, и они по диаметру статистически не отличались друг от друга. Микрочастицы имели пористую поверхность с диаметром пор около 1 мкм и по микроструктуре поверхности также не различались. Использование флуоресцентно-меченого белка позволило подтвердить загрузку микрочастиц лизоцимом методом конфокальной микроскопии. Включение белка в полимерную матрицу микрочастиц происходит в виде конгломератов, что может повышать стабильность загружаемого белка, благодаря уменьшению площади контакта нативного белка с окружающей полимерной матрицей, которая может необратимо сорбировать белок (Van Tassel et al., 1998). Далее было проведено сравнительное исследование *in vitro* кинетики высвобождения лизоцима из полученных композитных микросфер на основе ПОБ-255, ПОБ-25 и биоПЭГилированного сополимера ПОБ-ПЭГ (Рисунок 6). Параллельно с этим при помощи электрофореза по Лэммли и метода

кругового дихроизма было показано, что лизоцим при высвобождении из микросфер на основе ПОБ-255 и ПОБ-ПЭГ не денатурирует. Кривые высвобождения белка из микрочастиц различного полимерного состава значительно различаются: профиль высвобождения лизоцима из микрочастиц на основе ПОБ-255 характеризуется ранней фазой «взрывного эффекта» высвобождения (более 50% в 1-ые сутки от всего вышедшего за 25 суток белка), тогда как профили высвобождения белка из микрочастиц на основе низкомолекулярного ПОБ-25 и сополимера ПОБ-ПЭГ гораздо более пологие. Исследование гидролитической деструкции микросфер показало, что на поздних этапах на высвобождение белка может оказывать влияние деградация полимерной матрицы микрочастиц.

Обработка данных по кинетике высвобождения белка из микросфер при помощи математической модели высвобождения веществ из сфер по закону диффузии Фика, показало, что кинетика высвобождения лизоцима из микросфер на основе ПОБ-ПЭГ подчиняется закону диффузии Фика, тогда как кинетика высвобождения белка из микросфер на основе гомополимеров ПОБ-255 и ПОБ-25 слабо соответствуют «финовскому» диффузионному механизму высвобождения веществ из микросфер, что можно объяснить большим вкладом гидролитической деградации микрочастиц.

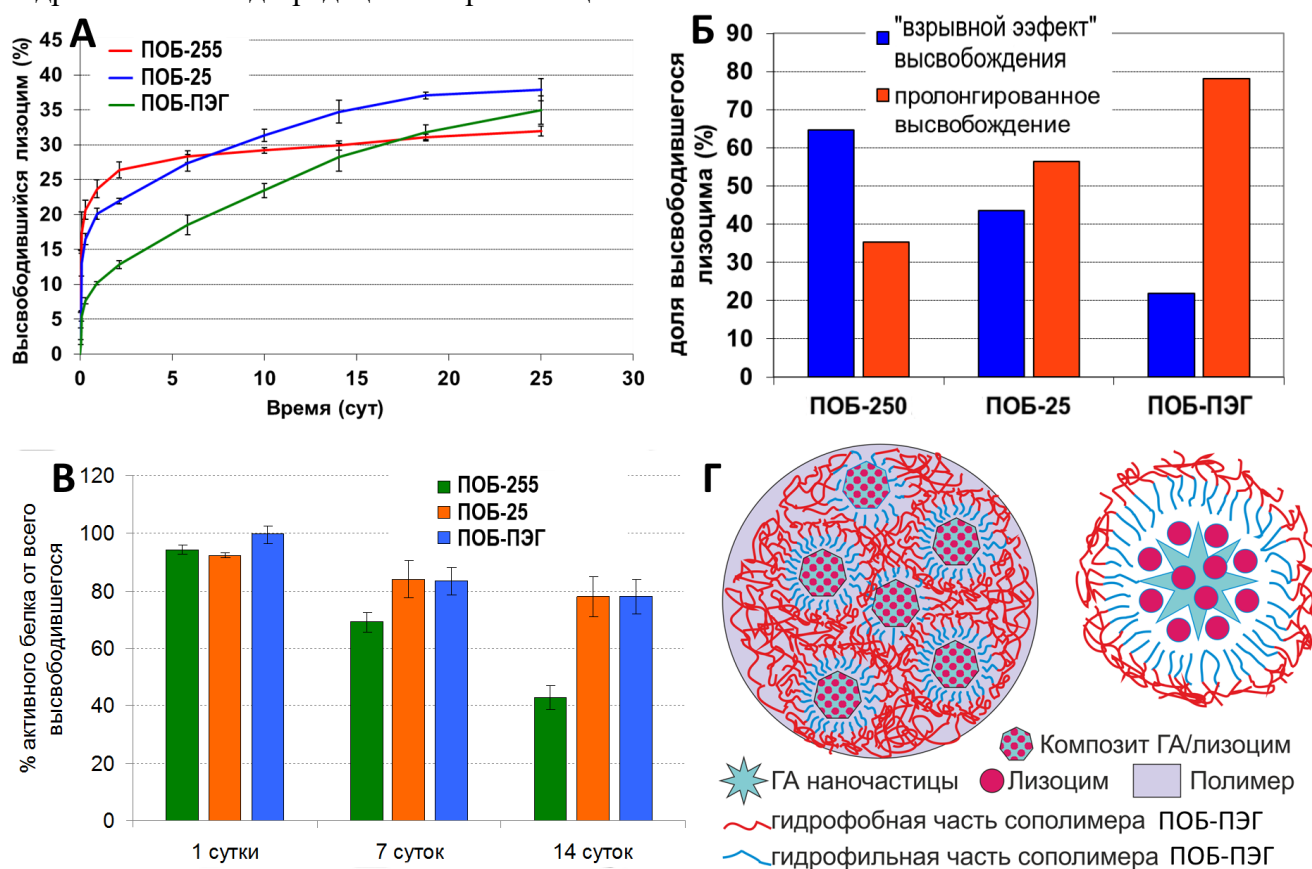


Рисунок 6. Кинетика высвобождения лизоцима из микрочастиц на основе ПОБ (255 кДа), ПОБ (25 кДа) и ПОБ-ПЭГ (А). Доля высвободившегося лизоцима на каждом этапе (Б). Высвободившийся на 1-ые, 7-ые и 14-е сутки ферментативно-активный лизоцим (в % от всего вышедшего из микрочастиц белка) (В). Предположительная схема ориентации молекул ПОБ-ПЭГ в микросферах с инкапсулированным лизоцимом (Г).

Наконец, была проанализирована ферментативная активность лизоцима при его высвобождении из полимерных микросфер. Анализ активности лизоцима, высвободившегося из композитных микрочастиц, по его способности гидролизовать пептидогликаны клеточных стенок бактерий *Micrococcus luteus* (Рисунок 6В), продемонстрировал, что активность лизоцима, высвобождающегося из микрочастиц на основе ПОБ-255 и ПОБ-ПЭГ в течение 14 суток, снижается примерно на 22% от исходного, тогда как снижение активности фермента, высвободившегося к этому сроку из микрочастиц на основе низкомолекулярного ПОБ, гораздо

более сильное – на 58%, что согласуется достаточно хорошо с данными спектров кругового дихроизма (Рисунок 6В). Микрочастицы на основе биоПЭГирированного ПОБ обеспечивают наилучшие характеристики высвобождения белка с сохранением его биоактивности. На схеме Рисунка 6Г предложен механизм сохранения исходной конформации (его вторичной и третичной структуры) и, как следствие, ферментативной активности при загрузке в микрочастицы на основе ПОБ-ПЭГ. Мы предполагаем, что к амфифильным молекулам белка обращены короткие концевые молекулы гидрофильного ПЭГ, которые экранируют химически «агрессивные» концевые карбоксильные группы ПОБ.

Таким образом, результаты, описанные в Разделах 3.6 и 3.7 позволили разработать экспериментальную модель исследования кинетики высвобождения низкомолекулярных лекарственных веществ и белков из полимерных пленок и микрочастиц.

Остеогенные свойства 2D-матриц на основе поли-3-оксибутирата и его сополимеров. Для исследования влияния биоПЭГирирования на остеогенные свойства ПОБ были изготовлены пористые матрицы на основе ПОБ, ПОБ-ПЭГ, а в качестве контроля – на основе композита ПОБ/ПЭГ. Полученные методом выщелачивания с использованием газообразователя карбоната аммония плоские матрицы обладали сложной пористой структурой (Рисунок 7). Для сравнения также даны изображения СЭМ бедренной (трубчатой и губчатой) кости крысы породы Вистар (возрастом две недели).

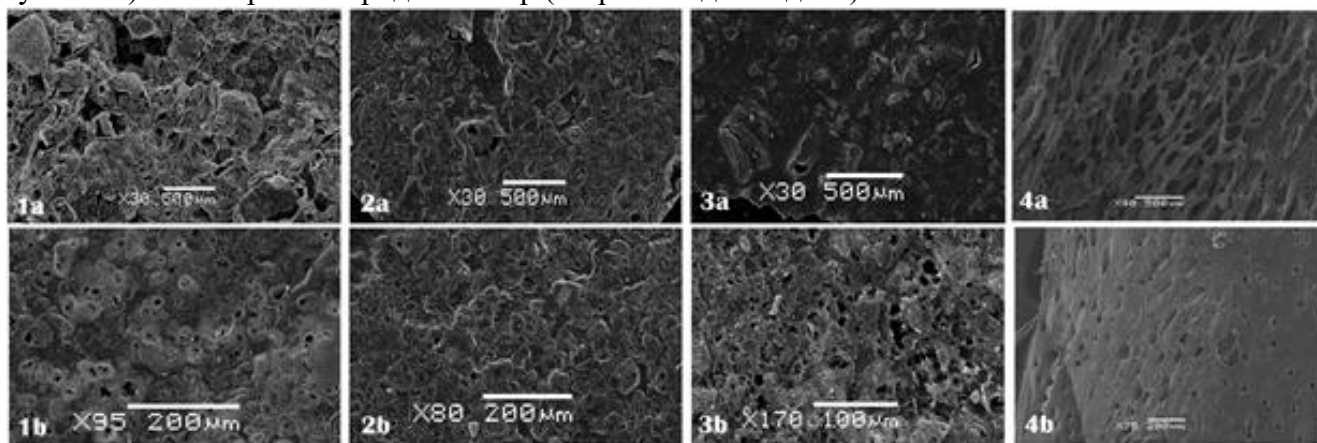


Рисунок 7. Изображения СЭМ пористых матриц на основе: ПОБ (1), ПОБ/ПЭГ (2), ПОБ-ПЭГ (3), бедренная (трубчатая) кость (4); внешняя сторона (а), внутренняя сторона (b).

Можно выделить два типа пор в полученных матрицах: крупные «лакуны», представляющие собой складки полимерных пластов, в которых имеются более мелкие поры, которые мы будем называть «малые поры». Кроме того, полученные плоские матрицы обладают разной морфологией на разных поверхностях: внутренней, лежащей на стекле при получении матрикса, и внешней, обращенной к воздуху. Размеры пор на внутренней стороне матриц из разных полимерных материалов статистически значимо не различались, значительно не различались размеры пор матриц из ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ на внешней стороне матриц, а размеры пор матриц из ПОБ на внешней стороне были в 2 – 6 раз больше. Размеры пор-лакун полученных матриц (40 – 215 мкм) подходят для роста клеток (Ribeiro-Samy et al., 2013; Hadjicharalambous et al., 2015; Houben et al., 2017). Размер пор на внешней стороне трубчатой кости составил 36 ± 11 мкм, на внутренней стороне трубчатой кости 42 ± 15 мкм, на внутренней стороне губчатой кости 169 ± 55 мкм (Таблица 1).

Изготовление матриц из композита ПОБ/ПЭГ и сополимера ПОБ-ПЭГ привело к статистически значимому уменьшению размера пор, а в случае ПОБ-ПЭГ и пористости. Чернильный тест показал, что матрицы из всех полимеров обладают связанной внутренней пористой структурой (Bonartsev et al., 2016).

Таблица 1. Пористость и размер пор матриц из ПОБ, его сополимера ПОБ-ПЭГ и композита ПОБ/ПЭГ, * $p < 0,05$ по сравнению с группой ПОБ, # $p < 0,05$ по сравнению с группой ПОБ/ПЭГ, $n = 6$.

Полимер	Внешняя сторона, мкм		Внутренняя сторона, мкм		Пористость, %
	разрывные поры	лакуны	разрывные поры	лакуны	
ПОБ	103 ±37 [#]	215 ±137	7 ±4	43 ±15	87 ±7
ПОБ/ПЭГ	33 ±18*	100 ±53	7 ±5	53 ±26	75 ±16
ПОБ-ПЭГ	16 ±5* [#]	105 ±74	5 ±3	38 ±14	69 ±12*

Таким образом, получаемые нами плоские пористые матриксы имеют гетерогенную морфологию с различных сторон (внутренней и внешней), а по размеру пор и пористости соответствуют губчатой костной ткани (Вавилова, 2008). Матриксы из композита ПОБ/ПЭГ и сополимера ПОБ-ПЭГ обладают меньшим размером пор и меньшей пористостью, чем матриксы из гомополимера ПОБ.

Для комплексной оценки биосовместимости матриксов из биоПЭГилированного ПОБ *in vitro* нами было проведено исследование цитотоксичности полученных матриксов, а также исследование роста в них клеток: фибробластов мыши линии 3Т3 и МСК крысы (Рисунок 8).

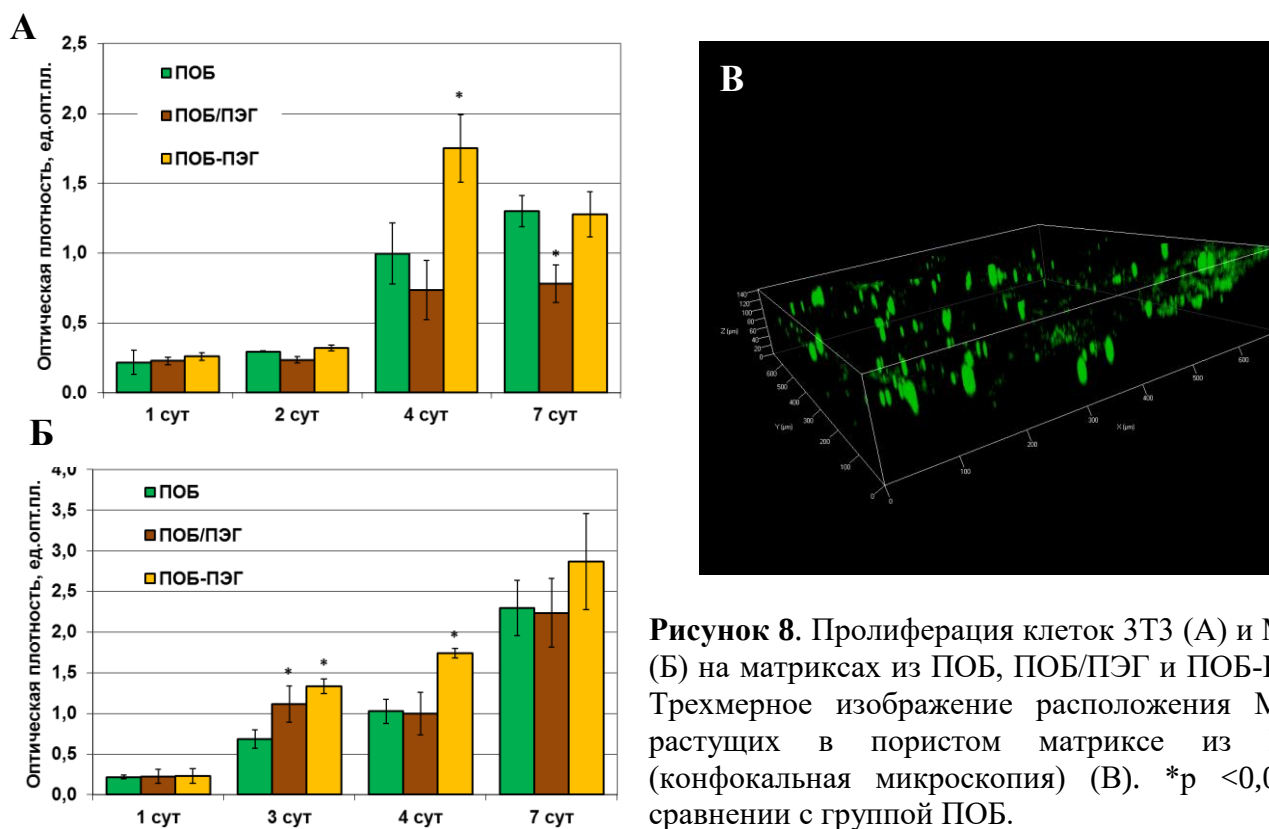


Рисунок 8. Пролиферация клеток 3Т3 (А) и МСК (Б) на матриксах из ПОБ, ПОБ/ПЭГ и ПОБ-ПЭГ. Трехмерное изображение расположения МСК, растущих в пористом матриксе из ПОБ (конфокальная микроскопия) (В). * $p < 0,05$ в сравнении с группой ПОБ.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в присутствии матриксов из всех исследуемых полимерных материалов, жизнеспособность клеток обеих линий не уменьшается, т.е. матриксы не обладают цитотоксичностью *in vitro*. Результаты исследования роста клеток в матриксах свидетельствуют об их способности поддерживать рост клеток обеих линий, но пролиферация фибробластов 3Т3 была в целом менее интенсивной, чем МСК. Если же сравнивать матриксы из разных полимерных материалов, то видно, что пролиферация как фибробластов 3Т3, так и МСК более выражена (на 4-ые сутки) в матриксах из ПОБ-ПЭГ, а наихудшим образом поддерживают рост фибробластов 3Т3 матриксы из композита ПОБ/ПЭГ (Рисунок 8). Исследование с помощью конфокальной и сканирующей электронной микроскопии показали, что происходит прикрепление и распластывание клеток на поверхности

матрицков всех трех типов. Было также создано 3D-изображение расположения клеток в пористом матриксе из ПОБ на основе данных изображений конфокальной микроскопии (Рисунок 8В), которая подтверждает, что клетки растут не только на поверхности матрицков, но и во всем их объеме, в порах матрикса. Таким образом, полимерные пористые матриксы всех трех типов способны поддерживать рост клеток, но наилучшие характеристики в качестве подложки для роста клеток обладают матриксы из биоПЭГилированного ПОБ (Bonartsev et al., 2016).

Для исследования остеогенных свойств матрицков на основе ПОБ, композита ПОБ/ПЭГ и сополимера ПОБ-ПЭГ было проведено исследование остеогенной дифференцировки МСК *in vitro* при их росте на матриксах как в стандартной, так и в остеогенной культуральной среде (Shakibaei et al., 2012). Исследование методом СЭМ показало, что при культивировании на матриксах из ПОБ со временем как в обычной ростовой среде (с 21-ых сут.), так и в остеогенной среде (уже с 7-ых сут.) МСК приобретают характерную для остеобластов форму (угловатая форма клеток, длинные тонкие отростки), имеющую высокое сходство с остеобластоподобными клетками после индукции их остеогенной дифференцировки (Рисунок 9А). Кроме того, наблюдалось постепенное увеличение количества отложений солей кальция при выращивании МСК в остеогенной среде на матриксах из всех 3-х полимерных материалов, что было показано, как с помощью СЭМ, так и с помощью стереомикроскопии при использовании окраски солей кальция ализариновым красным (Рисунок 9Б).

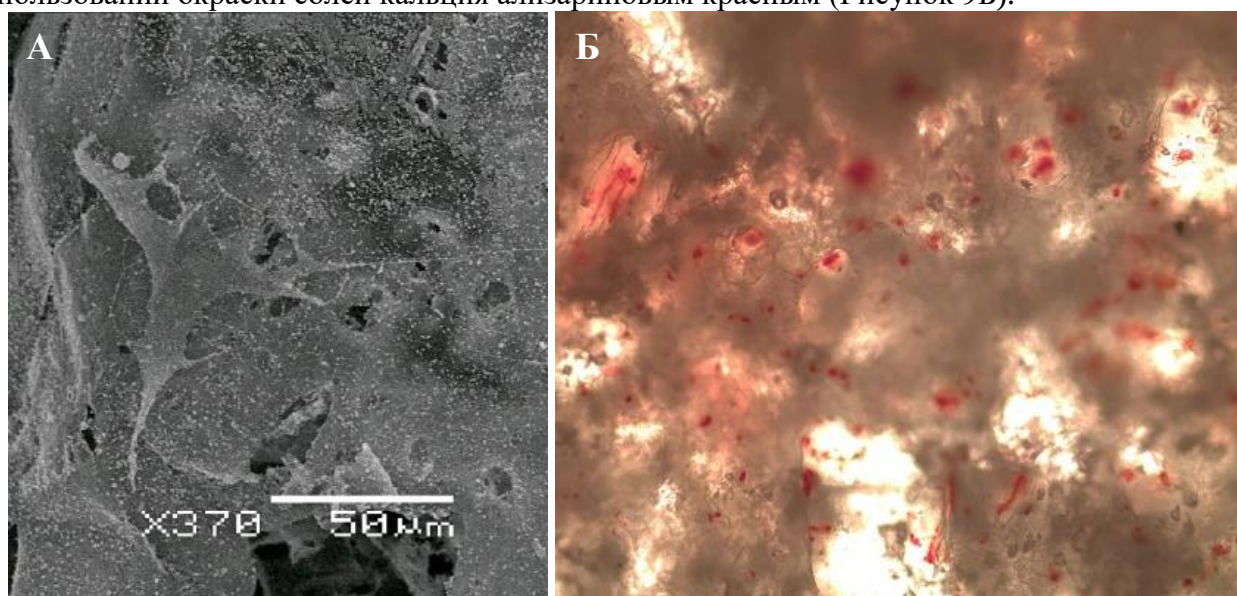


Рисунок 9. Морфология МСК и отложение солей кальция на 21-ые сут. культивирования клеток на матриксе ПОБ-ПЭГ в остеогенной среде (СЭМ, $\times 370$) (А). Отложение солей кальция на 14-ые сут. культивирования МСК на матриксе ПОБ-ПЭГ в остеогенной среде (стереомикроскоп, окраска ализариновым красным, $\times 20$).

Одним из важнейших маркеров остеогенной дифференцировки МСК является повышение активности щелочной фосфатазы (Pittenger et al., 1999; Coelho and Fernandes, 2000). В остеогенной среде наблюдается многократное повышение активности ЩФ как при культивировании МСК на культуральном пластике, так и на матриксах из ПОБ и его композита с ПЭГ. Однако, повышение активности ЩФ в МСК имеет место и при выращивании их на матриксах из ПОБ, ПОБ/ПЭГ и ПОБ/ПЭГ в стандартной среде, причем увеличение активности ЩФ на 14-ые и 21-ые сутки было достоверно меньшее для матрицков из биоПЭГилированного ПОБ и композита ПОБ/ПЭГ, чем для матрицков из ПОБ. Показано также, что даже в остеогенной среде активность ЩФ в МСК, выращиваемых на матриксах из ПОБ-ПЭГ также сильно снижена к 21-м суткам культивирования (Рисунок 10), т.е. основному сроку, по которому проводится оценка формирования остеогенной дифференцировки МСК в остеогенной среде (Caliari and Harley, 2014).

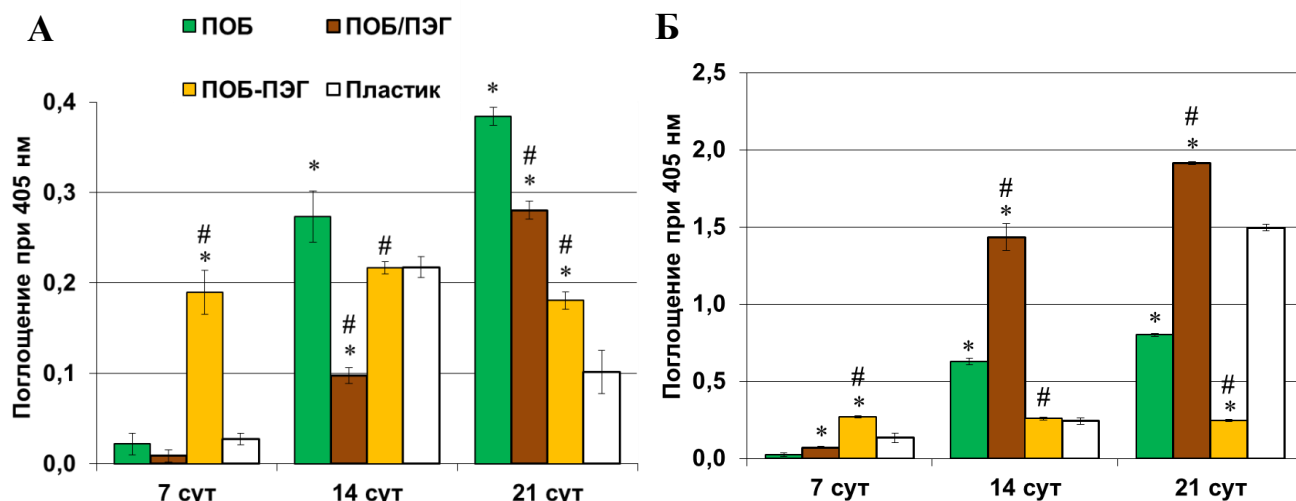


Рисунок 10. Изменение активности щелочной фосфатазы МСК, культивируемых на 2D-матриксах в стандартной (А) и остеогенной (Б) ростовых средах (* $p < 0,05$ в сравнении с группой Пластик, # $p < 0,05$ в сравнении с группой матрицы из ПОБ).

Мы исследовали также изменение экспрессии поверхностных маркеров фенотипирования МСК (CD 90, CD 45, CD 11b и CD 29) при культивировании на матриксах в стандартной и остеогенной среде. Показано, что имеет место повышение экспрессии отрицательных маркеров CD 45 и CD 11b/c в МСК, выращиваемых на матриксах из ПОБ и ПОБ/ПЭГ не только в остеогенной среде, но и в стандартной, как и в случае повышения активности ЩФ, что указывает на потерю фенотипа стволовых клеток культивируемых на матриксах МСК, тогда как в МСК, выращиваемых на матриксах из биоПЭГилированного ПОБ, этого не происходило.

Таким образом, полученные нами результаты, а именно изменение морфологии клеток, отложение солей кальция, повышение активности ЩФ и изменение экспрессии маркеров фенотипирования (CD 45 и CD 11b/c) (Yoshikawa et al., 1996; Pittenger et al., 1999; Caliarì and Harley, 2014) свидетельствуют о том, что наблюдается дифференцировка МСК при их выращивании на матриксах не только в остеогенной среде, но и в стандартной культуральной среде, т.е. имеет место спонтанная остеогенная дифференцировка, а такие полимерные материалы как ПОБ и его композит с ПЭГ способны к индукции дифференцировки МСК в этом направлении, тогда как биоПЭГилированный ПОБ практически не обладает этой способностью. Это позволяет использовать как МСК, так и матриксы, обладающие способностью к их остеогенной дифференцировке для регенерации костной ткани (Деев и др., 2007; Деев и др., 2011).

Для того чтобы исследовать остеогенные свойства матриксов из биоПЭГилированного ПОБ была использована модель некротического дефекта бедренной кости (1,5 мм) кости крысы, исследование тканевой реакции проводили на сроках 3, 7, 14, 40, 90 и 180 суток (Рисунок 11).

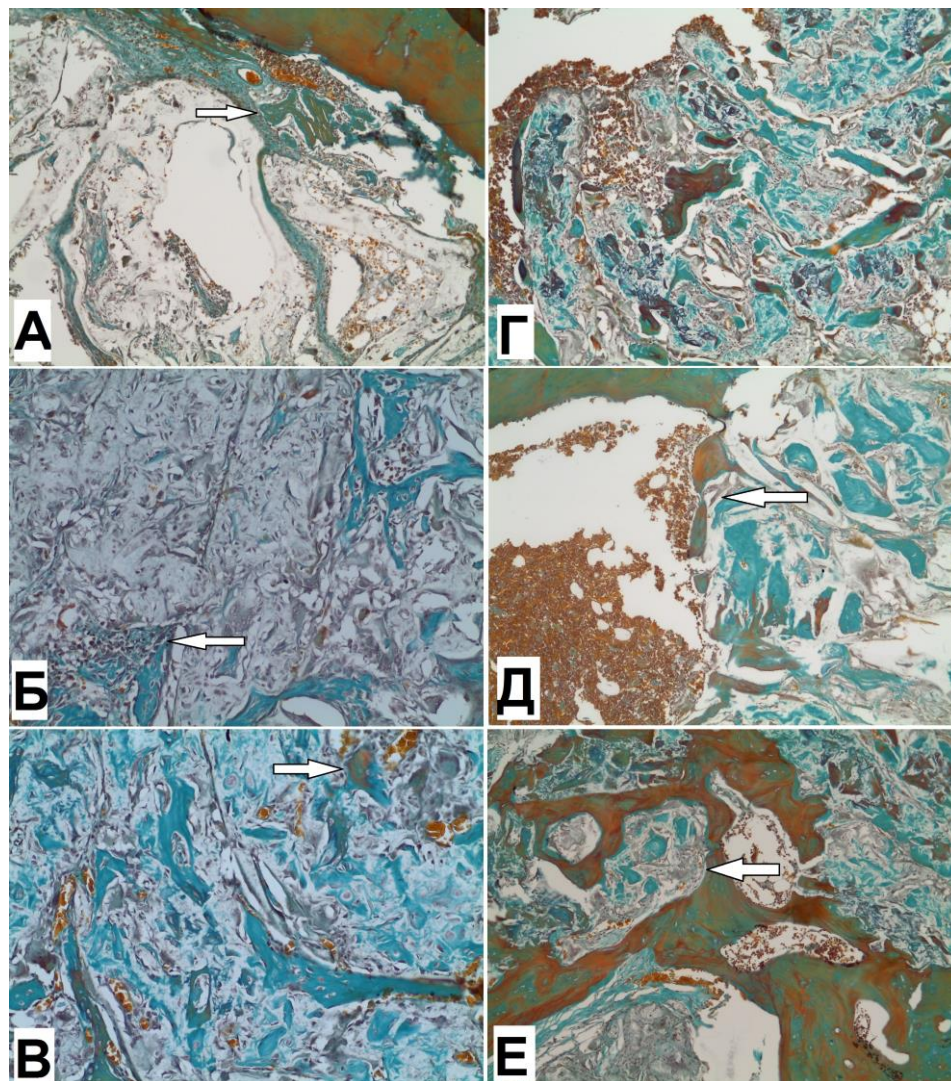


Рисунок 11. Поперечные срезы костной ткани в области некритического дефекта бедренной кости крысы через: 3 (А), 7(Б), 14(В), 40(Г), 90 (Д) и 180 (Е) суток. Оригинальная окраска трихромовым синим (оранжевый Г, эозин, толуидиновый синий, основной фуксин), $\times 100$ (А, Г, Д, Е), $\times 200$ (Б, В).

Результаты гистологического исследования демонстрируют, что с 3-х суток имплантации матриксов в костную ткань происходит прорастание новообразованной костной ткани (голубая окраска – это коллаген костного межклеточного вещества) в поры 2D-матриксов и образование ее островков (показан стрелкой на Рисунке 11А). Воспалительная реакция (гранулематозное воспаление) была слабо выраженной, хотя на 7-ые сутки в зоне имплантации присутствовали гигантские клетки инородных тел (серые) с большим количеством ядер (10-20), одновременно присутствуют остеобласты (показаны стрелкой), соединительно-тканная капсула не стала образовываться (Рисунок 11Б). На 14-ые сутки стали формироваться костные балки (плотная костная ткань окрашена в бурый цвет и лежит среди окрашенный в голубой менее плотной) и созревали остециты (Рисунок 11В). При этом рост костной ткани происходит хаотично, что, по-видимому, характерно для роста костной ткани в порах матрикса. Наблюдалась активная васкуляризация матриксов, которая была связана с образованием новой костной ткани – по всей видимости предшественники остеобластов проникали в поры матрикса из проросших туда капилляров. Через 90 суток формировалась компактная костная ткань в виде регулярно расположенных костных балок, которая полностью заполняла поры матрикса, тогда как полимерное вещество матрикса подвергалась постепенной биорезорбции остеокластами. Яркой особенностью этого процесса было то, что хорошо заметно отсутствие фиброзной капсулы на границе между матриксом и костным мозгом (показано стрелкой) (Рисунок 11Д). Через 180 суток происходит замыкание костного дефекта, происходит формирование зрелой

губчатой кости, которая заполняет весь объем, ранее занятый матриксом, вытесняя его остатки на край (полость кости обозначена стрелкой) (Раздел 3.8).

Таким образом, на модели некритического костного дефекта было показано, что имплантация пористых матриксов из биоПЭГилированного ПОБ способствует регенерации костной ткани. В ходе восстановления костного дефекта наблюдалась активная васкуляризация матрикса, новая костная ткань образуется в порах матрикса, в виде островков, равномерно по всему объему матрикса, а не с краев, что связано, по-видимому, с миграцией стволовых клеток из капилляров и их дифференцировкой в остеобласты в порах матрикса. При этом не происходит образование фиброзной капсулы вокруг материала матрикса, что свидетельствует о полной интеграции биополимерного материала с костной тканью, т.е. на высокую биосовместимость матрикса. Полученные нами результаты указывают на выраженную остеокондуктивную и даже остеоиндуктивную способность матриксов на основе ПОБ-ПЭГ.

Остеогенные свойства 3D-матриксов на основе ПОБ. Методом не прямой 3D-печати из ПОБ и его композита с гидроксиапатитом были получены 3D-матриксы, которые имеют взаимосвязанную (сквозную) пористую структуру с порами неправильной формой и шероховатой поверхностью. На следующем этапе 3D-матриксы были заполнены альгинатным гидрогелем, который использовали в качестве средства доставки МСК в поры матриксов. Альгинатный гидрогель полностью заполнял поры матриксов и немного покрывал их снаружи. Изготовление матриксов на основе композита ПОБ с ГА и заполнение пористого матрикса альгинатным гидрогелем привело к значительному увеличению их механической прочности. Заполнение 3D-матриксов альгинатным гидрогелем закономерно привело к резкому увеличению их гидрофильности: возрастание водопоглощения составило в 65 и в 100 раз по сравнению с матриксами на основе ПОБ/ГА и ПОБ, соответственно. Исследование ферментативной деструкции *in vitro* пористых 3D-матриксов показало, что идет гораздо более выраженный процесс деградации, чем пленок из ПОБ, что можно объяснить гораздо большей площадью контакта хорошо развитой поверхности пор матриксов с водой и растворенной в ней панкреатической липазой. Пролиферация МСК в матриксах ПОБ и ПОБ/ГА была намного ниже, чем на культуральном пластике. Значительное повышение активности ЩФ в МСК, растущих в матриксах из ПОБ и композита ПОБ с ГА (в 2,7 и 4,6 раза, соответственно, по сравнению с клетками, выращенными на культуральном пластике) и увеличение экспрессии фенотипического маркера CD45 (в 1,9 и 12,2 раза, соответственно, по сравнению с МСК, культивируемыми на пластике) указывает на спонтанную дифференцировку МСК в 3D-матриксах ПОБ и ПОБ/ГА в обычной среде начиная с 7-ых суток культивирования клеток (Bonartsev et al., 2018; Volkov et al., 2020).

При подкожной имплантации пористого 3D-матрикса из ПОБ происходит постепенное прорастание соединительной ткани в порах матрикса. При этом воспалительная тканевая реакция на биоматериал была слабо выражена, что свидетельствует о хорошей биосовместимости ПОБ по отношению к мягкой соединительной ткани. Изготовленные 3D-матриксы на основе ПОБ и ПОБ/ГА, заполненные альгинатным гидрогелем, были исследованы на модели критического дефекта теменной кости крысы при помощи компьютерной томографии, гистологических и гистоморфометрических методов с отдельным флуоресцентным окрашиванием (Рисунок 12).

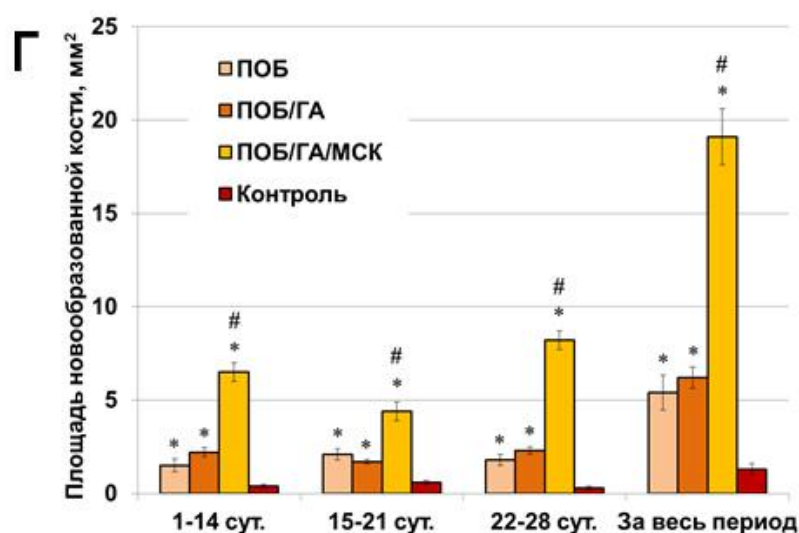
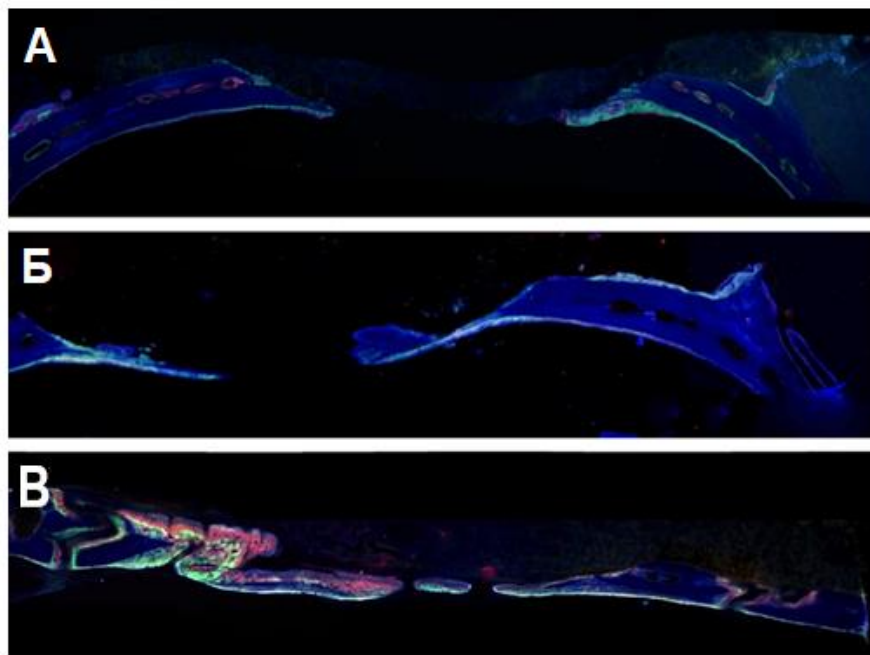


Рисунок 12. Мультиканальная гистопантограмма гистологического среза с раздельным флуоресцентным окрашиванием радиального критического дефекта теменной кости крысы через 28 сут. после имплантации бесклеточных ПОБ (Б) и засеянных МСК ПОБ/ГА/МСК (В) матриц в сравнении с контролем без имплантации матрикса (А). Скорость роста новообразующей костной ткани при использовании различных типов 3D-матриц и тканеинженерной конструкции (Г), * $p < 0.05$ в сравнении с Контролем, # $p < 0.05$ в сравнении с группой матрикс на основе ПОБ.

Было показано, что использование 3D-матриц из ПОБ/АЛГ и ПОБ/ГА/АЛГ привело к частичной регенерации дефекта теменной кости критического размера: $37,0 \pm 5,9\%$ и $60,1 \pm 6,2\%$ соответственно (Volkov et al., 2020) (Рисунок 12).

С использованием матриц ПОБ/ГА была разработана гибридная тканеинженерная конструкция, заполненная МСК-содержащим альгинатным гидрогелем. Было показано, что при закрытии критического дефекта кости она усиливает его регенерацию за счет как остеоиндуктивных свойств матрикса, так и регенеративного потенциала МСК. Исследование области критического костного дефекта с помощью флуоресцентной микроскопии при использовании флуоресцентного мечения позволило рассмотреть динамику регенерации костной ткани за счет накопления в новообразованной костной ткани флуоресцентных маркеров на трех разных сроках: 1–14 сутки (накопление доксицилина, желтое окрашивание), 15–21 сутки (накопление тетрациклина, зеленое окрашивание) и 22–28 сутки (накопление ализаринового красного, красное окрашивание). Объем новообразованной костной ткани после закрытия дефекта матриксами, засеянными МСК, был значительно выше на всех этапах процесса заживления костного дефекта по сравнению с использованием бесклеточных матриц ПОБ/АЛГ и ПОБ/ГА/АЛГ – разработанная тканеинженерная конструкция вызывала $>90\%$ восстановление костной ткани в месте дефекта за 1 месяц, что указывает на ее

выраженные остеоиндуктивные свойства (Рисунок 12) (Volkov et al., 2020). Эти результаты подтверждают высокий потенциал природных биоматериалов как костезамещающих материалов и тканевой инженерии для регенерации костной ткани (Раздел 3.9).

Остеогенные свойства пористых микросфер на основе ПОБ. Были получены пористые микросферы (диаметр - 510 ± 60 мкм, диаметр пор - $2,5 \pm 0,5$, пористость – 90%) из ПОБ для исследования их остеогенных свойств на МСК *in vitro* и на некротическом дефекте бедренной кости крысы *in vivo*. Показано, что пористые микросферы поддерживают рост МСК на их поверхности, при этом в процессе роста клеток идет процесс минерализации матрикса, что свидетельствует об остеогенной дифференцировке МСК. При использовании пористых микросфер из ПОБ мы также наблюдали выраженные остеокондуктивные и остеоиндуктивные свойства ПОБ. Наблюдалось не только проявление уже наблюдаемой остеоиндуктивной активности ПОБ, но и более активное биорассасывание полимерного материала (в течение 90 суток). Уже на шестой день после имплантации матрикса из ПОБ на срезе внутри микросфер обнаруживаются кровеносные сосуды, проросшие сквозь поры. На 14 сутки на поверхности микросфер можно обнаружить формирующуюся ретикуло-фиброзную костную ткань, которую можно видеть на Рисунок 15Б, отмеченную большими маркерами. Кровеносные сосуды в сферах становятся крупнее. К 30-му дню на поверхности микросфер и внутри крупных пор обнаруживаются участки сформировавшейся пластинчатой кости. Через три месяца вокруг микросфер сформирована, постепенно сливающаяся в одну пластинчатая кость. Кроме того, тонкие трубочки костной ткани можно заполняют крупные поры микросфер. Внутри этих костных трубочек присутствуют кровеносные сосуды и появляется костномозговой канал с костным мозгом. Внутрипоровые остеониды имеют тенденцию сливаться и перестраиваться в более масштабные костные структуры, которые обведены на рисунке овалами. В контрольном образце процессы заживления протекают нормально для изучаемого срока: костномозговой канал заполнен рыхловолокнистой соединительной тканью с кровеносными элементами. Фиброзная капсула вокруг биоматериала также не образовывалась. Пористые микросферы наиболее перспективны в качестве медицинского изделия – остеопластического материала, разработка которого находится на стадии доклинических исследований (Раздел 3.10).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы была создана система междисциплинарного биотехнологического и биоинженерного исследования биомедицинских полимеров на примере поли-3-оксибутирата и его сополимеров, состоящая из 4-х блоков экспериментальных моделей и методик, принадлежащих к различным уровням организации живой материи и исследований в естественных науках:

- 1) Молекулярному: экспериментальная модель контролируемого биосинтеза поли-3-оксибутирата и его сополимеров с заданным мономерным составом и молекулярной массой;
- 2) Надмолекулярному: экспериментальная модель исследования взаимосвязи надмолекулярной структуры полимера с его физико-химическими свойствами; экспериментальная модель исследования гидролитической и ферментативной деградации полимеров *in vitro*; экспериментальная модель исследования кинетики высвобождения низкомолекулярных лекарственных веществ и белков из полимерных пленок и микрочастиц;
- 3) Клеточному: экспериментальная модель исследования биосовместимости *in vitro* полимеров и изделий из них, экспериментальная модель исследования влияния полимеров и изделий из них на остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток;
- 4) Тканевому: экспериментальная модель исследования биосовместимости полимеров *in vivo*, модели некротического и критического костных дефектов для изучения

остеогенных свойств полимеров и изделий из них *in vivo*; тканеинженерная конструкция на основе полимерного матрикса.

Разработанная нами система экспериментальных исследований и каждая из используемых экспериментальных моделей для изучения полимеров позволяет также проводить комплексные исследования не только по указанным выше разным уровням организации живой материи, но и на длительном временном масштабе изменения свойств полимеров в процессе их эксплуатации на каждом из этих уровней. Исследования на каждом из указанных выше уровнях требует изготовления и разработки экспериментальных объектов возрастающей сложности: стандартных полимерных пленок, микрочастиц, 2D-матрикса, пористых микросфер, композитных 3D-матрикса, тканеинженерных конструкций (Рисунок 13).

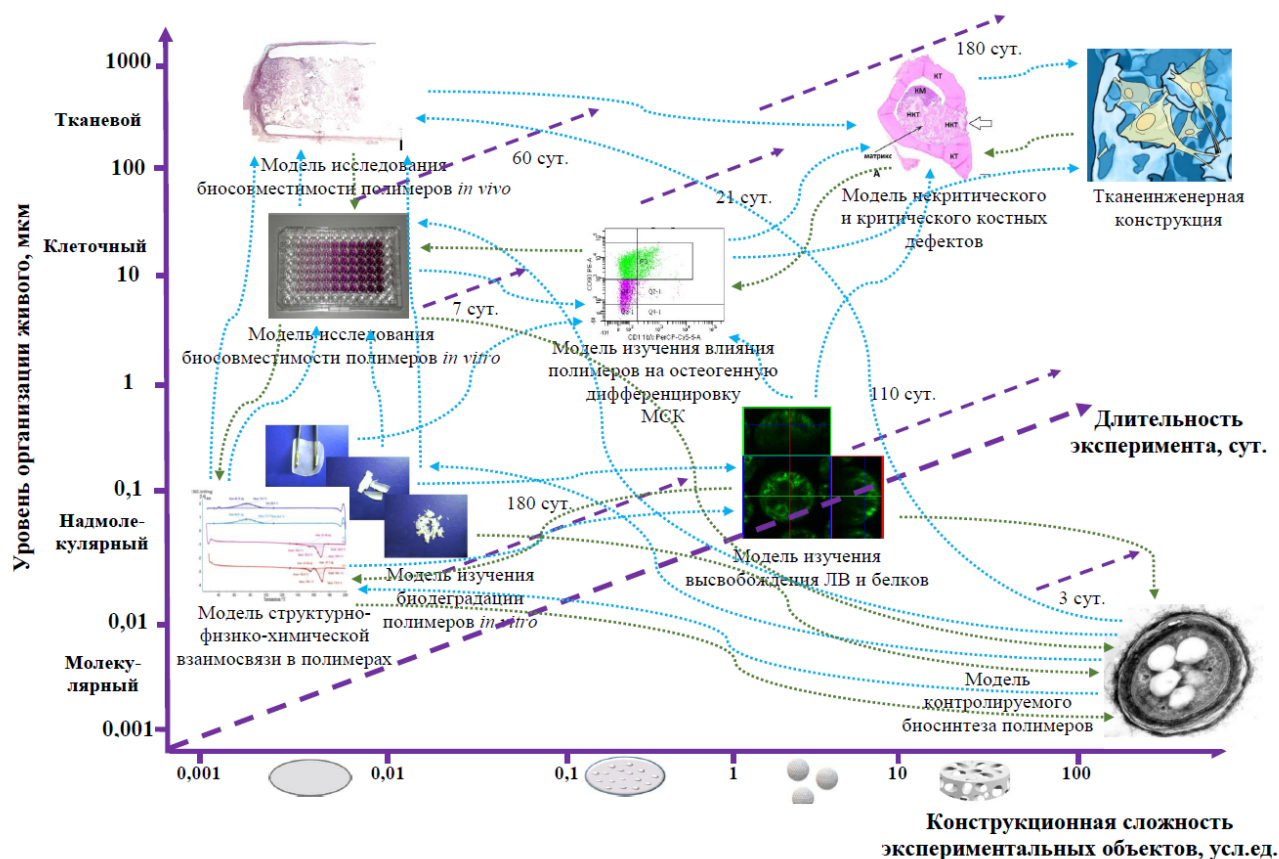


Рисунок 13. Общая схема организации системы экспериментальных биоинженерных исследований поли-3-оксибутирата. (пунктирными стрелками показаны прямые (голубые) и обратные (зеленые) связи между различными экспериментальными моделями).

В основе созданной нами системы лежит экспериментальная модель контролируемого биосинтеза ПОБ и его сополимеров с заданным мономерным составом и молекулярной массой, что позволяет получать полимерные материалы с достаточно широким спектром физико-химических свойств, т.е. это биоинженерная модель регуляции надмолекулярной структуры и физико-химических свойств природных биополимеров. Экспериментальная модель была разработана на основе технологии контролируемого биосинтеза ПОБ и его сополимеров с использованием способности штамма-продуцента *Azotobacter chroococcum* 7Б использовать добавленные в культуральную среду карбоновые кислоты и производные этиленгликоля для синтеза сополимеров ПОБ и регуляции их молекулярной массы. Метод позволяет регулировать молекулярную массу синтезируемых полимеров (от $0,11 \times 10^6$ до $1,63 \times 10^6$ Да), получать сополимеры ПОБВ с различным молярным содержанием 3-оксивалерата (от 2,5 до 21,3 моль%) с заданной молекулярной массой (от $0,17 \times 10^6$ до $1,42 \times 10^6$ Да) и сополимеры с 3-окси-4-метилвалератом, и регулировать молярное содержание мономеров в синтезируемых сополимерах. Разработана модификация метода – синтез сополимеров ПОБ с синтетическими

ди-, три- и полиэтиленгликолями – биоПЭГилирование, в результате чего получены новые ди-блок сополимеры ПОБ: ПОБ-ДЭГ, ПОБ-ТЭГ, ПОБ-ПЭГ 200, ПОБ-ПЭГ 300, ПОБВ-ПЭГ 300; максимальное содержание полиэтиленгликоля было в ПОБ-ПЭГ 300 и составляло 0,33 моль%. Разработан метод выделения ПОБ и его сополимеров из бактериальной биомассы и его очистки, позволяющий получать полимеры химической чистоты до 99,5% (вес.). Разработка этой модели позволила получить экспериментальную серию полимеров (19 партий) с различным мономерным составом и молекулярной массой для всех других экспериментальных моделей системы и позволяет при необходимости получать полимеры с заданными характеристиками для последующих исследований (Раздел 3.1).

Экспериментальная модель исследования взаимосвязи надмолекулярной структуры полимера с его физико-химическими свойствами включает целый ряд методик и экспериментальных подходов: получение стандартных и ультратонких пленок, атомно-силовой микроскопии, дифференциальной сканирующей калориметрии, наноиндентации, контактного угла смачивания водой, водопоглощения и других. Анализ кристалличности поли-3-оксибутирата является основной задачей для этой модели, т.к. кристалличность этого полимера определяет все прочие его свойства. Поли-3-оксибутират, будучи частично кристаллическим биополимером, обладает способностью образовывать различные надмолекулярные структуры: ламели (в виде параллельных полос шириной от 11 до 40 нм) в стандартных пленках и кристаллические наноструктуры из них более высокого порядка, такие как двумерные сплошные и разветвленные водорослевидные сферолиты (высотой $4,5 \pm 0,5$ нм) в ультратонких пленках. Соплимер ПОБ-ПЭГ, полученный методом биоПЭГилирования, менее склонен к образованию кристаллических наноструктур, его кристаллическая компонента проявлялась также в виде отдельных протяженных ламелей (от $0,7 \pm 0,1$ до $1,5 \pm 0,3$ нм высотой). Степень кристалличности ПОБ не зависит от его молекулярной массы, тогда как степень кристалличности сополимера ПОБВ линейно зависит как от молярного содержания 3-оксивалерата в сополимере, так и от молекулярной массы полимера. Модуль Юнга ПОБ также не зависит от его молекулярной массы, тогда как модуль Юнга сополимера ПОБВ обратно пропорционален молярному содержанию 3-оксивалерата в сополимере и его молекулярной массе. Гидрофильность поверхности (по контактному углу смачивания водой) ПОБ также не зависит от его молекулярной массы, тогда как гидрофильность поверхности сополимера ПОБВ прямо пропорциональна молярному содержанию 3-оксивалерата в сополимере и его молекулярной массе. Соплимер ПОБ-ПЭГ, полученный методом биоПЭГилирования, содержащий лишь 0,33 моль% звеньев этиленгликоля, значительно отличается от гомополимера по своим физико-химическим свойствам: обладает меньшей кристалличностью, меньшей жесткостью и пластичностью, большей гидрофильностью (Разделы 3.2 и 3.3). Эта экспериментальная модель позволяет прогнозировать физико-химические свойства полученных полимеров для их использования на более высоких уровнях экспериментального исследования. Эта модель служит в системе ключевую роль, т.к. на более высоких уровнях (клеточном и тканевом) при разработке и изготовлении новых экспериментальных объектов требуется характеристика и контроль их морфологии и физико-химических свойств, благодаря чему осуществляется коррекция хода исследований, например, изменение размера пор матриц, выбор состава полимерного композита, изменение самой конструкции матрикса и др.

Экспериментальная модель исследования гидролитической и ферментативной деградации полимеров *in vitro* в отличие от предыдущей статической модели является динамической моделью, которая позволяет исследовать изменение физико-химических (и биологических) свойств полимеров в процессе их биodeградации. Важной характеристикой данной экспериментальной модели является изготовление стандартизованных образцов полимерных пленок. Показано, что при ферментативной деградации *in vitro* в течение 6 месяцев масса пленок из ПОБ и его сополимеров снижается незначительно (не более 10%), наблюдается большое падение молекулярной массы полимеров, наиболее выраженное у высокомолекулярных образцов (до 5-кратного снижения). Для большинства ПОА ферментативная деградация идет по двум механизмам – не автокаталитическому и

автокаталитическому. Обнаружены три вида изменения морфологии поверхности пленок из ПОБ в ходе ферментативной деградации *in vitro*: фрагментация ламелей, исчезновение ламелей и появление новых ламелей, которые происходят из-за расщепления кристаллических структур в области их дефектов и расщепления слоя аморфного полимера, покрывающего кристаллические структуры, соответственно. Показано, что содержание 3-оксивалерата в цепи сополимера ПОБВ более 5,7 моль% является границей, при пересечении которой меняется закономерность кинетики изменения степени кристалличности ПОБВ в процессе его биodeградации *in vitro*. БиоПЭГилирование ПОБ приводит к изменению кинетики ранней стадии биodeградации биополимера *in vitro*. Установленные при помощи этой модели закономерности позволяют прогнозировать изменение свойств полимеров и изделий из них на более высоких уровнях при их исследовании на клетках и животных. Временной масштаб модели (до 6 месяцев) соответствует продолжительности эксплуатации изделий из ПОБ и его сополимеров в моделях более высокого уровня – на лабораторных животных *in vivo* (Раздел 3.4).

Другой динамической экспериментальной моделью является экспериментальная модель исследования кинетики высвобождения низкомолекулярных лекарственных веществ и белков из полимерных пленок и микрочастиц. Важной характеристикой модели является необходимость создания композитных микрочастиц, т.е. более сложных экспериментальных биообъектов, чем в предыдущих моделях. Для этого получены микрочастицы из ПОБ, загруженные различными лекарственными веществами, способные к их пролонгированному высвобождению. Кинетика высвобождения различных низкомолекулярных лекарственных веществ как из пленок, так и из микрочастиц на основе ПОБ зависит, прежде всего, от химической структуры этих соединений и их физико-химических свойств. Кинетика высвобождения паклитаксела из микрочастиц на основе ПОБ наилучшим образом соответствует кинетики биodeградации этого биополимера. БиоПЭГилирование ПОБ оказывает влияние на параметры кинетики диффузионного высвобождения паклитаксела из биополимерных микрочастиц на ранней стадии. Была разработана также оригинальная методика инкапсулирования белка лизоцима в микрочастицы на основе поли-3-оксибутирата и его биоПЭГилированного сополимера с использованием гидроксиапатита, как носителя. Основной механизм высвобождения лизоцима из полимерных микрочастиц – диффузия белка из полимерной матрицы, но, по-видимому, деградация полимерной матрицы микрочастиц значительным образом влияет на высвобождение белка. Из микрочастиц на основе биоПЭГилированного ПОБ лизоцим высвобождался в течение 14 суток с кинетикой, наиболее близкой к кинетике диффузии белка по закону Фика с сохранением стабильности и ферментативной активности (Разделы 3.6 и 3.7).

Экспериментальная модель исследования биосовместимости *in vitro* полимеров и изделий из них необходима для отбора полимеров, не обладающих цитотоксичностью и пригодных для выращивания на них клеток, а также для анализа противоопухолевой эффективности нано- и микрочастиц на основе ПОБ, загруженных противоопухолевыми ЛВ. Она также требует изготовления не только стандартных образцов полимерных пленок, но и более сложноустроенных экспериментальных объектов – 2D- и 3D-матрикс и композитных микрочастиц. Соответственно, эта модель позволяет исследовать также как морфология этих конструкций влияет на рост в них клеток. Использование этой модели показало, что ПОБ и его сополимеры не обладают цитотоксичностью по отношению к фибробластам линии 3T3 и МСК, а также поддерживают рост этих клеток на поверхности пленок из этих биополимеров. Наиболее выраженный рост клеток наблюдается на пленках из биоПЭГилированных ПОБ и ПОБВ. Полученные 2D- и 3D-матрикс, пористые микросферы не проявляют цитотоксических свойств и способны к поддержанию роста фибробластов 3T3 и МСК. Микро- и наночастицы на основе ПОБ, загруженные паклитакселом, обладают противоопухолевой эффективностью *in vitro* в течение 120 суток. Показано, что композитные микрочастицы с инкапсулированным модельным ферментом, лизоцимом, не обладают цитотоксичностью по отношению к мезенхимальным стволовым клеткам крысы. Полученные с использованием этой модели

данные также позволяют корректировать состав и конструкцию экспериментальных объектов (Раздел 3.5).

Экспериментальная модель исследования влияния полимеров и изделий из них на остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток также является биоинженерной динамической моделью. Эта модель требует изготовления 2D- и 3D-матриц и других довольно сложно сконструированных конструкций, используемых одновременно и в предыдущей модели. Соответственно, эта модель позволяет исследовать также как морфология этих конструкций влияет на дифференцировку клеток. Получены матрицы на основе поли-3-оксибутирата и его биоПЭГилированного сополимера, обладающие высокой пористостью и средним размером пор около 100 мкм. Матрицы из поли-3-оксибутирата вызывают спонтанную дифференцировку МСК по остеогенному пути, а биоПЭГилирование этого полимера приводит к подавлению этого эффекта. 3D-матрицы с регулируемой микроструктурой и формой из ПОБ и его композита ПОБ/ГА и на основе пористых микросфер из ПОБ также вызывают спонтанную остеогенную дифференцировку МСК (Разделы 3.8, 3.9 и 3.10).

Использование экспериментальных моделей некритического и критического костного дефектов на крысах позволило исследовать остеогенные свойства *in vivo* 2D- и 3D-матриц и пористых микросфер на основе ПОБ. В качестве экспериментальных объектов были использованы 2D- и 3D-матрицы, исследованные на моделях более низкого - клеточного уровня. Показана способность пористых 2D-матриц на основе поли-3-оксибутирата и его биоПЭГилированного сополимера, 3D-матриц на основе ПОБ и его композитов с гидроксиапатитом и альгинатным гидрогелем, а также на основе пористых микросфер из ПОБ поддерживать и стимулировать рост костной ткани в объеме на модели некритического костного дефекта бедренной кости и на модели критического дефекта теменной кости крысы (Разделы 3.8, 3.9 и 3.10). Наряду с предыдущей моделью данные, полученные при использовании этой модели легли в основу разработки и доклиническим исследованиям остеопластического материала на основе пористых микросфер из ПОБ.

Тканеинженерная конструкция как экспериментальная модель также является биоинженерной динамической моделью, где в качестве экспериментального объекта необходимо изготовить гибридную конструкцию, состоящую из композитного полимерного мат 3D-матрикса и клеток – МСК, т.е. она является как моделью искусственной костной ткани, так и сложным экспериментальным объектом, свойства которого можно исследовать только при использовании других экспериментальных моделей, прежде всего: модели исследования влияния полимеров и изделий из них на остеогенную дифференцировку МСК и модели некритического и критического костных дефектов для изучения остеогенных свойств полимеров и изделий из них *in vivo*. Такое комплексное исследование позволило продемонстрировать, что разработанные гибридные конструкции на основе матриц ПОБ/ГА, заполненных МСК-содержащим альгинатным гидрогелем, усиливают регенерацию критического костного дефекта благодаря остеоиндуктивным свойствам матрикса и регенеративного потенциала МСК, который проявляется при помещении клеток в биополимерно-минерально-гидрогелевые матрицы. Эти результаты подтверждают высокий потенциал природных биоматериалов как костезамещающих материалов и тканевой инженерии для регенерации костной ткани (Раздел 3.9).

Таким образом, проведенное нами комплексное исследование с использованием созданной системы экспериментальных моделей показало, что полученный путем биосинтеза поли-3-оксибутират обладает целым рядом уникальных свойств: способностью к образованию кристаллических надмолекулярных структур, специфическим сочетанием физико-химических свойств, способностью к биодеструкции, биосовместимостью, контролируемому высвобождению низкомолекулярных лекарственных веществ и белка, и биоактивностью как по отношению к клеткам *in vitro*, так и на модели заболеваний *in vivo*, которые проявляются на разных уровнях биоинженерии этого биополимера: молекулярном, надмолекулярном, клеточном и тканевом и тесно связаны друг с другом. А биотехнологическая сополимеризация

ПОБ с синтетическим ПЭГ - биоПЭГилирование приводит к изменению этих свойств на всех этих уровнях.

Полученные результаты могут быть использованы для создания новых отечественных имплантированных медицинских изделий (например, стентов-эндопротезов), лекарственных форм пролонгированного действия, отечественных остеопластических материалов, в т.ч. с пролонгированной лекарственной активностью, тканеинженерных конструкций для восстановления костной ткани и других медицинских изделий. Некоторые из этих изделий (остеопластический материал на основе пористых микросфер из ПОБ и парадонтологическая мембрана) уже находятся на стадии доклинических исследований.

ВЫВОДЫ

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

1. Разработана технология контролируемого биосинтеза поли-3-оксибутирата и его сополимеров с 3-оксивалератом и 3-окси-4-метилвалератом, а также с полиэтиленгликолем и его производными – метод биоПЭГилирования. Метод позволяет регулировать молекулярную массу синтезируемых полимеров и мономерный состав сополимеров.
2. Кристаллические структуры поли-3-оксибутирата представлены водорослеподобными и двумерными сферолитами, а также стопками ламелей; биоПЭГилирование поли-3-оксибутирата приводит к изменению надмолекулярной структуры биополимера: в качестве кристаллических структур появляются монослойные ламели. Степень кристалличности, модуль Юнга и гидрофильность поверхности поли-3-оксибутирата не зависят от его молекулярной массы, тогда как эти физико-химические свойства сополимера поли-3-оксибутирата с 3-оксивалератом линейно зависят от молярного содержания 3-оксивалерата в сополимере и его молекулярной массы. Механические свойства (модуль Юнга) поли-3-оксибутирата и его сополимеров с 3-оксивалератом линейно зависят от степени кристалличности полимера.
3. Для большинства образцов поли-3-оксибутирата и его сополимеров ферментативная деградация *in vitro* идет по двум механизмам – неавтокаталитическому и автокаталитическому, сопровождаясь незначительным снижением массы (не более 10%), значительным снижением молекулярной массы (до 5-кратного снижения) и изменением структуры поверхности. Показано, что содержание 3-оксивалерата в цепи сополимера поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерата более 5,7моль% является границей, при пересечении которой меняется закономерность кинетики изменения степени кристалличности ПОБВ в процессе его биодеградации *in vitro*. БиоПЭГилирование поли-3-оксибутирата приводит к изменению кинетики ранней стадии биодеградации биополимера *in vitro*.
4. Разработана оригинальная методика загрузки противоопухолевого вещества паклитаксела и инкапсулирования белка лизоцима в микрочастицы на основе поли-3-оксибутирата и его биоПЭГилированного сополимера. Кинетика пролонгированного (более 20 суток) высвобождения паклитаксела и лизоцима из микрочастиц на основе биоПЭГилированного поли-3-оксибутирата осуществляется за счет диффузии по закону Фика, что позволяет ее прогнозировать с высокой точностью. Ферментативная активность лизоцима сохраняется в течение 2-х недель высвобождения белка из микрочастиц. Микрочастицы из поли-3-оксибутирата, загруженные паклитакселом, полученные методом электродинамического распылительного высушивания, обладают повышенной пролонгированной противоопухолевой эффективностью *in vitro* на опухолевых клетках и *in vivo* на моделях эпителиальных опухолей мышей по критерию локального торможения роста опухоли при сниженной острой токсичности в сравнении с традиционной противоопухолевой лекарственной формой (Таксолом).

5. Получены пленки и пористые матриксы на основе поли-3-оксибутирата и его биоПЭГилированного сополимера, а также пористые микросферы на основе поли-3-оксибутирата, способные к поддержанию роста фибробластов 3T3 и мезенхимальных стволовых клеток. Пористые матриксы на основе поли-3-оксибутирата вызывают спонтанную дифференцировку МСК по остеогенному пути, а биоПЭГилирование этого полимера приводит к частичному подавлению этого эффекта.
6. Показана способность пористых матриксов из биоПЭГилированного поли-3-оксибутирата и пористых микросфер из поли-3-оксибутирата поддерживать и стимулировать рост костной ткани на модели некротического костного дефекта бедренной кости крысы, что позволяет разработать на их основе остеоиндуктивный материал. Тканеинженерная конструкция на основе 3D-матриксов из композита поли-3-оксибутирата и гидроксиапатита, полученная методом не прямой 3D-печати и заполненная альгинатным гидрогелем, содержащим мезенхимальные стволовые клетки, способствует почти полной регенерации критического костного дефекта у крыс *in vivo* за 1 месяц.
7. Таким образом, нами создана система биотехнологического и биоинженерного исследования природного поли-3-оксибутирата, полученного бактериальным биосинтезом, которая позволила исследовать целый ряд уникальных свойств этого биополимера и его сополимеров, проявляющихся на разных уровнях: молекулярном, надмолекулярном, клеточном и тканевом, и тесно связанных с их возможными биомедицинскими приложениями. БиоПЭГилирование приводит к мультиплицирующему изменению этих свойств: от молекулярной структуры до биологической активности.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI (РИНЦ):

1. **Бонарцев А.П.**, Бонарцева Г.А., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Лучинина Е.С., Лившиц В.А., Босхомджиев А.П., Маркин В.С., Иорданский А.Л. Новые полимерные системы для контролируемого высвобождения дипиридамола и индометацина на основе поли-3-гидроксибутирата // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42. № 6. – С. 710–715 [**Bonartsev A.P.**, Bonartseva G.A., Makhina T.K., Mashkina V.L., Luchinina E.S., Livshits V.A., Boskhomdzhiev A.P., Markin V.S., Iordanskii A.L. New poly-(3-hydroxybutyrate)-based systems for controlled release of dipyrindamole and indomethacin / // Applied biochemistry and microbiology. – 2006. – V. 42, N. 6. – P. 625–630]; DOI: 10.1134/S0003683806060159; IF RSCI (РИНЦ): 1.493 (здесь и далее по данным <https://elibrary.ru/defaultx.asp> на момент обращения 01.02.2021); Scopus SJR = 0.247; WoS IF: 0.886; квартиль Q4 (здесь и далее по данным <https://www.scimagojr.com/journalrank.php> на момент обращения 11.02.2022); (0,4/0,2) (здесь и далее в скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах).
2. Iordanskii A.L., Ol'khov A.A., Pankova Yu.N., **Bonartsev A.P.**, Bonartseva G.A., Popov V.O. Hydrophilicity impact upon physical properties of the environmentally friendly poly(3-hydroxybutyrate) blends: modification via blending. // Macromolecular Symposia. 2006. – V. 233. – P. 108–116. DOI: 10.1002/masy.200690005; Scopus SJR = 0.257; квартиль Q3; (0,6/0,1).
3. Косенко Р.Ю., Иорданский А.Л., Маркин В.С., **Бонарцев А.П.**, Бонарцева Г.А. Контролируемое высвобождение антисептика из мембран на основе поли(3-гидроксибутирата): сочетание диффузионного и кинетического механизма // Химико-фармацевтический журнал. – 2006. – Т. 41. – № 12. – С. 30-33[Kosenko R.Yu., Iordanskii A.L., Markin V.S., Arthanarivaran G., **Bonartsev A.P.**, Bonartseva G.A. Controlled release of

- antiseptic drug from poly(3-hydroxybutyrate)-based membranes. combination of diffusion and kinetic mechanisms // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2007. – V. 41. – N. 12. – P. 652-655]; DOI: 10.1007/s11094-008-0041-x; IF RSCI (РИНЦ): 1.332; Scopus SJR = 0.191; WoS IF: 0.837; квартиль Q4; (0,3/0,1).
4. **Bonartsev A.P.**, Livshits V.A., Makhina T.A., Myshkina V.L., Bonartseva G.A., Iordanskii A.L. Controlled release profiles of dipyrnidamole from biodegradable microspheres on the base of poly(3-hydroxybutyrate) // *Express Polymer Letters*. – 2007. – V. 1. – N. 12. – P. 797–803. DOI: 10.3144/expresspolymlett.2007.110; Scopus SJR = 0.695; WoS IF: 4.161; квартиль **Q1**; (0,4/0,2).
 5. Мышкина В.Л., Николаева Д.А., Махина Т.К., **Бонарцев А.П.**, Бонарцева Г.А. Влияние условий культивирования на молекулярную массу поли-3-гидроксибутирата, синтезируемого *Azotobacter chroococcum* 7 Б // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2008. – Т. 44. – № 5. – С. 533–538 [Myshkina V.L., Nikolaeva D.A., Makhina T.K., **Bonartsev A.P.**, Bonartseva G.A. Effect of growth conditions on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum* 7B // *Applied biochemistry and microbiology*. 2008. – V. 44. – N. 5. – P. 482–486]; DOI: 10.1134/S0003683808050050; IF RSCI (РИНЦ): 1.493; Scopus SJR = 0.247; WoS IF: 0.886; квартиль Q4; (0,4/0,2).
 6. **Bonartsev A.P.**, Iordanskii A.L., Bonartseva G.A., Zaikov G.E. Biodegradation and medical application of microbial poly(3-hydroxybutyrate) // *Journal of the Balkan tribological association*. – 2008. – V. 14. – N. 3. – P. 359-395. Scopus SJR = 0.289; квартиль Q3; (2,3/1,7).
 7. Лившиц В.А., **Бонарцев А.П.**, Иорданский А.Л., Иванов Е.А., Махина Т.А., Мышкина В.Л., Бонарцева Г.А. Микросферы из поли-3-оксибутирата для пролонгированного высвобождения лекарственных веществ // *Высокомолекулярные соединения. Серия Б*. – 2009. – Т. 51. – № 7. – С. 1243–1251. [Livshits V.A., **Bonartsev A.P.**, Iordanskii A.L., Ivanov E.A., Makhina T.A., Myshkina V.L., Bonartseva G.A. Microspheres based on poly(3-hydroxy)butyrate for prolonged drug release // *Polymer Science Series B*. – 2009. – V. 51. – N. 7–8. – P. 256-263]; DOI: 10.1134/S1560090409070082; IF RSCI (РИНЦ): 1.279; Scopus SJR = 0.246; WoS IF: 1.049; квартиль Q3; (0,4/0,2).
 8. Босхомджиев А.П., **Бонарцев А.П.**, Иванов Е.А., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Багров Д.В., Филатова Е.В., Бонарцева Г.А., Иорданский А.Л. Гидролитическая деструкция биополимерных систем на основе поли-3-оксибутирата // *Кинетический и структурный аспекты. Пластические массы*. – 2009. – № 8. – С. 13–18. [Boskhomdzhiyev A.P., **Bonartsev A.P.**, Ivanov E.A., Makhina T.K., Myshkina V.L., Bagrov D.V., Filatova E.V., Bonartseva G.A., Iordanskii A.L. Hydrolytic degradation of biopolymer systems based on poly(3-hydroxybutyrate). Kinetic and structural aspects // *International Polymer Science and Technology*. – 2010. – V. 37. – N. 11. – P. 25-30]; DOI: 10.1177/0307174X1003701103; IF RSCI (РИНЦ): 0.635; Scopus SJR = 0.113; квартиль Q4; (0,3/0,1).
 9. Босхомджиев А.П., **Бонарцев А.П.**, Махина Т.К., Мышкина В.Л., Иванов Е.А., Багров Д.В., Филатова Е.В., Иорданский А.Л., Бонарцева Г.А. Сравнительное изучение кинетики биodeградации биополимерных систем на основе поли-3-оксибутирата // *Биомедицинская химия*. – 2009. – Т. 55. – № 6. – С. 702-712. [Boskhomdzhiyev A.P., **Bonartsev A.P.**, Makhina T.K., Myshkina V.L., Ivanov E.A., Bagrov D.V., Filatova E.V., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A. Biodegradation kinetics of poly(3-hydroxybutyrate)-based biopolymer systems // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. – 2010. – Т. 4. – N. 2. – P. 177–183]; DOI: 10.1134/S1990750810020083; IF RSCI (РИНЦ): 1.377; Scopus SJR = 0.185; квартиль Q4; (0,7/0,3).
 10. Мышкина В.Л., Иванов Е.А., Николаева Д.А., Махина Т.К., **Бонарцев А.П.**, Филатова Е.В., Ружицкий А.О., Бонарцева Г.А. Биосинтез сополимера поли-3-гидроксибутирата-3-гидроксивалерата штаммом *Azotobacter chroococcum* 7Б // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2010. – Т. 46. – № 3. – С. 315-323. [Myshkina V.L., Ivanov E.A., Nikolaeva D.A., Makhina T.K., **Bonartsev A.P.**, Filatova E.V., Ruzhitskii A.O., Bonartseva G.A. Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate copolymer by *Azotobacter*

- chroococum strain 7B // Applied biochemistry and microbiology. – 2010. – V. 46. – N. 3. – P. 289–296]; DOI: 10.1134/S0003683810030075; IF RSCI (РИНЦ): 1.493; Scopus SJR = 0.247; WoS IF: 0.886; квартиль Q4; (0,5/0,1).
11. **Бонарцев А.П.**, Яковлев С.Г., Филатова Е.В., Соболева Г.М., Махина Т.К., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В., Попов В.О., Кирпичников М.П. Пролонгированное высвобождение противоопухолевого лекарственного вещества, паклитаксела, из микросфер на основе поли-3-оксибутирата // Биомедицинская химия. – 2011. – Т. 57. – № 2. – С. 232–240. [**Bonartsev A.P.**, Yakovlev S.G., Filatova E.V., Soboleva G.M., Makhina T.K., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Popov V.O., Kirpichnikov M.P. Sustained release of the antitumor drug paclitaxel from poly(3-hydroxybutyrate)-based microspheres // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2012. – V. 6. – N. 1. – P. 42–47]; DOI: 10.1134/S1990750812010027; IF RSCI (РИНЦ): 1.377; Scopus SJR = 0.185; квартиль Q4; (0,6/0,3).
 12. **Бонарцев А.П.**, Бонарцева Г.А., Шайтан К.В., Кирпичников М.П. Поли-3-оксибутират и биополимерные системы на его основе // Биомедицинская химия. – 2011. – Т. 57. – № 4. – С. 374–391. [**Bonartsev A.P.**, Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P. Poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate)-based biopolymer systems. Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2011. – V. 5. – N. 1. – P. 10–21]; DOI: 10.1134/S1990750811010045; IF RSCI (РИНЦ): 1.377; Scopus SJR = 0.185; квартиль Q4; (1,1/0,8).
 13. Филатова Е.В., Яковлев С.Г., **Бонарцев А.П.**, Махина Т.К., Мышкина В.Л., Бонарцева Г.А. Пролонгированное высвобождение хлорамбуцила и этопозиды из полимерных микросфер из поли-3-оксибутирата // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т. 48. – № 6. – С. 662–667. [Filatova E.V., Yakovlev S.G., **Bonartsev A.P.**, Mahina T.K., Myshkina V.L., Bonartseva G.A. Prolonged release of chlorambucil and etoposide from poly-3-oxybutyrate-based microspheres // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2012. – V. 48. – N. 6. – P. 598–602]; DOI: 10.1134/S000368381206004X; IF RSCI (РИНЦ): 1.493; Scopus SJR = 0.247; WoS IF: 0.886; квартиль Q4; (0,4/0,2).
 14. **Bonartsev A.P.**, Boskhomodgiev A.P., Voinova V.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Yakovlev S.A., Zharkova I.I., Zernov A.L., Filatova E.A., Bagrov D.V., Rebrov A.V., Bonartseva G.A., Iordanskii A.L. / Degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and its derivatives: characterization and kinetic behavior // Chemistry and Chemical Technology. – 2012. – V. 6. – N. 4. – P. 385–392. DOI: 10.23939/chcht06.04.385; Scopus SJR = 0.257; квартиль Q3; (0,5/0,2).
 15. **Bonartsev A.P.**, Boskhomodgiev A.P., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A., Rebrov A.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Yakovlev S.A., Filatova E.A., Ivanov E.A., Bagrov D.V., Zaikov G.E. Hydrolytic degradation of poly(3-hydroxybutyrate), polylactide and their derivatives: kinetics, crystallinity, and surface morphology // Molecular Crystals and Liquid Crystals. – 2012. – V. 556. – N. 1. – P. 288–300. DOI: 10.1080/15421406.2012.635982; Scopus SJR = 0.219; WoS IF: 0.896; квартиль Q4; (0,8/0,5).
 16. Artsis M.I., **Bonartsev A.P.**, Iordanskii A.L., Bonartseva G.A., Zaikov G.E. Biodegradation and medical application of microbial poly(3-hydroxybutyrate) / Molecular Crystals and Liquid Crystals. – 2012. – V. 555. – N. 1. – P. 232–262. DOI: 10.1080/15421406.2012.635549; Scopus SJR = 0.219; WoS IF: 0.896; квартиль Q4; (1,9/1,6).
 17. **Bonartsev A.P.**, Yakovlev S.G., Boskhomdzhiev A.P., Zharkova I.I., Bagrov D.V., Myshkina V.L., Mahina T.K., Charitonova E.P., Samsonova O.V., Zernov A.L., Zhuikov V.A., Efremov Yu.M., Voinova V.V., Bonartseva G.A., Shaitan K.V. The terpolymer produced by *Azotobacter chroococum* 7B: effect of surface properties on cell attachment // PLoS ONE, – 2013. – V. 8. N. 2. P. e57200. DOI: 10.1371/journal.pone.0057200; Scopus SJR = 0.99; WoS IF: **3.24**; квартиль **Q1**; (0,7/0,4).
 18. **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. – V. 14. N 1. – P. 12. DOI: 10.1186/1471-2091-14-12; Scopus SJR = 0.497; WoS IF: **4.059**; квартиль Q3; (0,8/0,5).
19. Гажва Ю.В., **Бонарцев А.П.**, Мухаметшин Р.Ф., Жаркова И.И., Андреева Н.В., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Беспалова А.Е., Зернов А.Л., Рябова В.М., Иванова Э.В., Бонарцева Г.А., Миронов А.А., Шайтан К.В., Волков А.В., Мураев А.А., Иванов С.Ю. Разработка и исследование in vivo и in vitro костно-пластического материала на основе композиции гидроксиапатита, поли-3-оксибутирата и альгината натрия // Современные технологии в медицине. – 2014. – Т. 6. – № 1. – С. 6–13. [Gazhva J.V., **Bonartsev A.P.**, Mukhametshin R.F., Zharkova I.I., Andreeva N.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Beshpalova A.E., Zernov A.L., Ryabova V.M., Ivanova E.V., Bonartseva G.A., Mironov A.A., Shaitan K.V., Volkov A.V., Muraev A.A., Ivanov S.Y. In vivo and in vitro Development and Study of Osteoplastic Material Based on Hydroxyapatite, Poly-3-Hydroxybutyrate and Sodium Alginate Composition // Sovremennye tehnologii v medicine. – 2014. – V. 6. – N. 1. – P. 6–11]; IF RSCI (РИНЦ): 0.871; Scopus SJR = 0.161; квартиль Q4; (0,5/0,1).
 20. 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. – P. 8. – N. 2. – P. 100–109]; DOI: 10.1134/S1995421215020124; IF RSCI (РИНЦ): 0.715; Scopus SJR = 0.253; квартиль Q3; (0,8/0,2).
 21. Андреева Н.В., **Бонарцев А.П.**, Жаркова И.И., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Харитонов Е.П., Воинова В.В., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В., Белявский А.В. Культивирование мезенхимальных стволовых клеток мыши на матриксах из поли-3-оксибутирата // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2015. – № 2. – С. 114–119. [Andreeva N.V., **Bonartsev A.P.**, Zharkova I.I., Makhina T.K., Myshkina V.L., Kharitonova E.P., Voinova V.V., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Belyavskii A.V. Culturing of mouse mesenchymal stem cells on poly-3-hydroxybutyrate scaffolds. Bulletin of Experimental Biology and Medicine – 2015. – V. 159. – N. 4. – P. 567–571] DOI: 10.1007/s10517-015-3015-5; IF RSCI (РИНЦ): 0.624; Scopus SJR = 0.288; WoS IF: 0.804; квартиль Q3; (0,4/0,2).
 22. Зернов А.Л., Иванов Е.А., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Самсонова О.В., Феофанов А.В., Волков А.В., Гажва Ю.В., Рябова В.М., Мураев А.А., Иванов С.Ю., Шайтан К.В., Бонарцева Г.А., **Бонарцев А.П.** Микрокапсулы из поли(3-гидроксибутирата) для пролонгированного высвобождения белка // Современные технологии в медицине. – 2015. – Т. 7. – № 4. – С. 50–57. [Zernov A.L., Ivanov E.A., Makhina T.K., Myshkina V.L., Samsonova O.V., Feofanov A.V., Volkov A.V., Gazhva J.V., Muraev A.A., Ryabova V.M., Shaitan K.V., Ivanov S.Y., Bonartseva G.A., **Bonartsev A.P.** Microcapsules of poly(3-hydroxybutyrate) for prolonged protein release. Sovremennye tehnologii v medicine. – 2015. – V. 7. – N. 4. – P. 50–57]; DOI: 10.17691/stm2015.7.4.06; IF RSCI (РИНЦ): 0.871; Scopus SJR = 0.161; квартиль Q4; (0,5/0,2).
 23. **Бонарцев А. П.**, Бонарцева Г.А., Мышкина В.Л., Воинова В.В., Махина Т.К., Жаркова И.И., Яковлев С.Г., Зернов А.Л., Иванова Э.В., Акулина Е.А., Кузнецова Е.С., Жуйков В.А., Алексеева С.Г., Подгорский В.В., Бессонов И.В., Копицына М.Н., Морозов А.С., Милановский Е.Ю., Тюгай З.Н., Быкова Г.С., Кирпичников М.П., Шайтан К.В. Биосинтез сополимера поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерат штаммом *Azotobacter chroococcum* 7B // Acta Naturae. – 2016. – Т. 8. – № 3(30). – С. 85–96. [**Bonartsev A.P.**, Bonartseva G.A., Myshkina V.L., Voinova V.V., Mahina T.K., Zharkova I.I., Yakovlev S.G.,

- Zernov A.L., Ivanova E.V., Akoulina E.A., Kuznetsova E.S., Zhuikov V.A., Alekseeva S.G., Podgorskii V.V., Bessonov I.V., Kopitsyna M.N., Morozov A.S., Milanovskiy E.Y., Tyugay Z.N., Bykova G.S., Kirpichnikov M.P., Shaitan K.V. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-4-methylvalerate) by strain *Azotobacter chroococcum* 7B // *Acta Naturae*. – 2016. – V. 8. – N. 3. – P. 77–87]; DOI: 10.1166/jbt.2016.1414; IF RSCI (РИИЦ): 2.220; Scopus SJR = 0.475; WoS IF: 1.845; квартиль Q3; (0,8/0,5).
24. Мураев А.А., **Бонартцев А.П.**, Гажва Ю.В., Рябова В.М., Волков А.В., Жаркова И.И., Стамболиев И.А., Кузнецова Е.С., Жуйков В.А., Мышкина В.Л., Махина Т.К., Бонартцева Г.А., Яковлев С.Г., Кудряшова К.С., Воинова В.В.; Шайтан К.В., Иванов С.Ю. Разработка и доклинические исследования ортотопических костных имплантатов на основе гибридной конструкции из поли-3-оксибутирата и альгината натрия // *Современные технологии в медицине*. – 2016. – Т. 8. – № 4. – С. 42–50. [Muraev A.A., **Bonartsev A.P.**, Gazhva Yu.V., Riabova V.M., Volkov A.V., Zharkova I.I., Stamboliev I.A., Kuznetsova E.S., Zhuikov V.A., Myshkina V.L., Mahina T.K., Bonartseva G.A., Yakovlev S.G., Kudryashova K.S., Voinova V.V., Mironov A.A., Shaitan K.V., Ivanov S.Yu. Development and preclinical studies of orthotopic bone implants based on a hybrid construction from poly(3-hydroxybutyrate) and sodium alginate // *Sovremennye tehnologii v medicine*. – 2016. – V. 8. – N. 4. – P. 42–50]; DOI: 10.17691/stm2015.7.4.06; IF RSCI (РИИЦ): 0.871; Scopus SJR = 0.161; квартиль Q4; (0,5/0,2).
 25. **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. – V. 6. – N. 1. – P. 42–52. DOI: 10.1166/jbt.2016.1414; Scopus SJR = 0.165; WoS IF: 0.287; квартиль Q4; (0,7/0,4).
 26. **Bonartsev A.P.**, Zernov A.L., Yakovlev S.G., Zharkova I.I., Myshkina V.L., Mahina T.K., Bonartseva G.A., Andronova N.V., Smirnova G.B., Borisova J.A., Kalishjan M.S., Shaitan K.V., Treshalina H.M. New poly(3-hydroxybutyrate) microparticles with paclitaxel sustained release for intraperitoneal administration // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. – 2017. – V. 17. – N. 3. – P. 434–441. DOI: 10.2174/1871520615666160504095433. Scopus SJR = 0.508; WoS IF: 2.505; квартиль Q3; (0,5/0,2).
 27. **Bonartsev A.P.**, Zharkova I.I., Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Mahina T.K., Voinova V.V., Zernov A.L., Zhuikov V.A., Akoulina E.A., Ivanova E.V., Kuznetsova E.S., Shaitan K.V., Bonartseva G.A. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) copolymers by *Azotobacter chroococcum* 7B: A precursor feeding strategy // *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. – 2017. – V. 47. – N. 2. – P. 173–184. DOI: 10.1080/10826068.2016.1188317. Scopus SJR = 0.36; WoS IF: 2.162; квартиль Q3; (0,8/0,6).
 28. Ermakova N.P., **Bonartsev A.P.**, Zernov A.L., Konyaeva O.I., Kulbachevskaya N.Y., Merkulova I.B., Abramova T.V., Chaley V.A., Yakovlev S.G., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Bukhman V.M. Preclinical toxicity evaluation of paclitaxel biopolymer formulation // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. – 2017. – V. 17. – N.12. – P. 1661–1668. DOI: 10.2174/1871520616666160817104529; Scopus SJR = 0.508; WoS IF: 2.505; квартиль Q3; (0,5/0,2).
 29. Zhuikov V., **Bonartsev A.**, Bagrov D., Rusakov A., Useinov A., Myshkina V., Mahina T., Shaitan K., Bonartseva G. The changes in surface morphology and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymer films during *in vitro* degradation // *Solid State Phenomena*. – 2017. – V. 258. – P. 354–357. DOI: 10.4028/www.scientific.net/SSP.258.354; Scopus SJR = 0.215; квартиль Q3; (0,3/0,1).
 30. Zhuikov V.A., **Bonartsev A.P.**, Zharkova I. I., Bykova G.S., Taraskin N.Y., Kireynov A.V., Kopitsyna M.N., Bagrov D.V., Bonartseva G.A., Shaitan K.V. Effect of poly(ethylene glycol) on the ultrastructure and physicochemical properties of the poly(3-hydroxybutyrate) //

- Macromolecular Symposia. – 2017. – V. 375. – P. 1600189. DOI: 10.1002/masy.201600189; Scopus SJR = 0.257; квартиль Q3; (0,3/0,1).
31. Pavlova E.R., Bagrov D.V., Kopitsyna M.N., Shchelokov D.A., **Bonartsev A.P.**, Zharkova I.I., Mahina T.K., Myshkina V.L., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Klinov D.V. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and bovine serum albumin blend prepared by electrospinning // Journal of Applied Polymer Science. – 2017. – V. 134. – N. 29. – P. 45090. DOI: 10.1002/app.45090; Scopus SJR = 0.575; WoS IF: **3.125**; квартиль **Q1**; (0,6/0,1).
 32. Zhuikov V.A., **Bonartsev A.P.**, Bagrov D.V., Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Makhina T.K., Bessonov I.V., Kopitsyna M.N., Morozov A.S., Rusakov A.A., Useinov A.S., Shaitan K.V., Bonartseva G.A. Mechanics and surface ultrastructure changes of poly(3-hydroxybutyrate) films during enzymatic degradation in pancreatic lipase solution // Molecular Crystals and Liquid Crystals. – 2017. – V. 648. – N. 1. – P. 236–243. DOI: 10.1080/15421406.2017.1302580. Scopus SJR = 0.219; WoS IF: 0.896; квартиль Q4; (0,5/0,2).
 33. Зернов А.Л., **Бонарцев А.П.**, Яковлев С.Г., Мышкина В.Л., Махина Т.К., Паршина Е.С., Харитонов Е.П., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В. Микрочастицы из низкомолекулярного поли(3-гидроксibuтирата) для пролонгированного высвобождения паклитаксела, полученные методом пьезоэлектрического распылительного высушивания // Российские нанотехнологии. – 2017. – Т. 12. – № 3–4. – С. 84–90. [Zernov A.L., Bonartsev A.P., Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Makhina T.K., Parshina E.S., Kharitonova E.P., Bonartseva G.A., Shaitan K.V. Low molecular weight poly(3-hydroxybutyrate) microparticles synthesized by piezoelectric spray drying for the sustained release of paclitaxel // Nanotechnologies in Russia. – 2017. – V. 12. – N. 3–4. – P. 218–225]; DOI: 10.1134/S1995078017020136; IF RSCI (РИНЦ): – ; Scopus SJR = 0.207; квартиль Q3; (0,4/0,1).
 34. Жуйков В.А., **Бонарцев А.П.**, Махина Т.К., Мышкина В.Л., Воинова В.В., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В. Гидролитическая деградация поли-3-оксибутирата и его сополимера с 3-оксивалератом различной молекулярной массы *in vitro* // Биофизика. – 2018. – Т. 63. – № 2. – С. 249–257. [Zhuikov V.A., **Bonartsev A.P.**, Makhina T.K., Myshkina V.L., Voinova V.V., Bonartseva G.A., Shaitan K.V. Hydrolytic degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymer with 3-hydroxyvalerate of different molecular weights *in vitro* // Biophysics. – 2018. – V. 63. – N. 2. – P. 169–176]; DOI: 10.1134/S0006350918020288; IF RSCI (РИНЦ): 1.073; Scopus SJR = 0.198; квартиль Q4; (0,6/0,2).
 35. **Bonartsev A.P.**, Zharkova I.I., Voinova V.V., Kuznetsova E.S., Zhuikov V.A., Makhina T.K., Myshkina V.L., Potashnikova D.M., Chesnokova D.V., Khaydapova D.D., Bonartseva G.A., Shaitan K.V. Poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ethylene glycol) scaffolds with different microstructure: the effect on growth of mesenchymal stem cells // 3 Biotech. – 2018. – V. 8. – P. 328. DOI: 10.1007/s13205-018-1350-8. Scopus SJR = 0.557; WoS IF: 2.406; квартиль **Q2**; (0,6/0,4).
 36. **Бонарцев А.П.**, Воинова В.В., Кузнецова Е.С., Жаркова И.И., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Чеснокова Д.В., Кудряшова К.С., Феофанов А.В., Шайтан К.В., Бонарцева Г.А. Адсорбция БСА пористыми матриксами на основе БиоПЭГирированного поли-3-оксибутирата // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54. – №. 4. – С. 366–374. [**Bonartsev A.P.**, Voinova V.V., Kuznetsova E.S., Zharkova I.I., Makhina T.K., Myshkina V.L., Chesnokova D.V., Kudryashova K.S., Feofanov A.V., Shaitan K.V., Bonartseva G.A. BSA adsorption on porous scaffolds prepared from bioPEGylated poly(3-hydroxybutyrate)// Applied biochemistry and microbiology. – 2018. – V. 54. – N. 4. – P. 379–386]; DOI: 10.1134/S0003683818040038; IF RSCI (РИНЦ): 1.493; Scopus SJR = 0.247; WoS IF: 0.886; квартиль Q4; (0,6/0,3).
 37. **Бонарцев А.П.**, Воинова В.В., Бонарцева Г.А. Поли-3-оксибутират и микробиота человека (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54. – №. 6. – С. 561–584. [**Bonartsev A.P.**, Voinova V.V., Bonartseva G.A. Poly(3-hydroxybutyrate) and human microbiota (review)// Applied biochemistry and microbiology. – 2018. – V. 54. – N. 6. – P. 547–

- 568]; DOI: 10.1134/S0003683818060066; IF RSCI (РИНЦ): 1.493; Scopus SJR = 0.247; WoS IF: 0.886; квартиль Q4; (1,5/1,2).
38. Popletaeva S.B., Voinova T.M., Kartashov M.I., Pasechnik T.D., Arslanova L.R., Shcherbakova L.A., Statsyuk N.V., **Bonartsev A.P.**, Zernov A.L., Bonartseva G.A., Dzhavakhiya V.G. Biodegradable poly-3-hydroxybutyrate as a shielding carrier for a plant-protecting MF3 protein from *Pseudomonas fluorescens* // Biointerface Research in Applied Chemistry. – 2018. – V. 8. – N. 3. – P. 3224–3231. DOI: 10.3934/microbiol.2018.1.192; Scopus SJR = 0.216; квартиль Q4; (0,5/0,1).
 39. **Бонарцев А.П.**, Бонарцева Г.А., Воинова В.В., Кирпичников М.П., Шайтан К.В. Лекарственные системы на основе поли-3-оксиалканоатов: их микро- и наноструктура // Вестник Российского государственного медицинского университета (рубрика «Мнения», тематический номер «Наномедицина»). – 2018. – №. 6. – С. 130–134. DOI: 10.24075/vrgmu.2018.083; IF RSCI (РИНЦ): - ; Scopus SJR = 0.122; квартиль Q4; (0,3/0,2).
 40. **Бонарцев А.П.**, Мураев А.А., Деев Р.В., Волков А.В. Материал-ассоциированная костная резорбция // Современные технологии в медицине. – 2018. – Т. 10. – №. 4. – С. 26–33. [**Bonartsev A.P.**, Muraev A.A., Deyev R.V., Volkov A.V. Material-associated bone resorption]. Sovremennye tehnologii v medicine. – 2018. – V. 10. – N. 4. – P. 26–33]. DOI: 10.17691/stm2018.10.4.03; IF RSCI (РИНЦ): 0.871; Scopus SJR = 0.161; квартиль Q4; (0,5/0,1).
 41. **Бонарцев А.П.**, Бонарцева Г.А., Решетов И.В., Шайтан К.В., Кирпичников М.П. Применение полиоксиалканоатов в медицине и биологическая активность природного поли-3-оксибутирата // Acta Naturae. – 2019. – Т. 11. – №. 2 (41). – С. 4–16. [**Bonartsev A.P.**, Bonartseva G.A., Reshetov I.V., Kirpichnikov M.P., Shaitan K.V. Application of polyhydroxyalkanoates in medicine and the biological activity of natural poly(3-hydroxybutyrate) // Acta Naturae. – 2019. – V. 11. – N. 2 (41). – P. 4–16]; DOI: doi: 10.32607/20758251-2019-11-2-4-16; IF RSCI (РИНЦ): 2.220; Scopus SJR = 0.475; WoS IF: 1.845; квартиль Q3; (0,8/0,6).
 42. Voinova V., Bonartseva G., **Bonartsev A.** Effect of poly (3-hydroxyalkanoates) as natural polymers on mesenchymal stem cells // World Journal of Stem Cells. – 2019. – V. 11. – N. 10. – P. 764–786. DOI: 10.4252/wjsc.v11.i10.764; Scopus SJR = 0.907; WoS IF: **5.326**; квартиль **Q2**; (0,8/0,6).
 43. Zhuikov V.A., Zhuikova Y.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Rusakov A., Useinov A., Voinova V.V., Bonartseva G.A., Berlin A.A., **Bonartsev A.P.**, Iordanskii A.L. Comparative structure-property characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)s films under hydrolytic and enzymatic degradation: finding a transition point in 3-hydroxyvalerate content // Polymers (Basel). – 2020. – V. 12. – N. 3. – P. 728. DOI: 10.3390/polym12030728; Scopus SJR = 0.77; WoS IF: **4.329**; квартиль **Q1**; (0,9/0,6).
 44. Volkov A.V., Muraev A.A., Zharkova I.I., Voinova V.V., Akoulina E.A., Zhuikov V.A., Khaydapova D.D., Chesnokova D.V., Menshikh K.A., Dudun A.A., Makhina T.K., Bonartseva G.A., Asfarov T.F., Stamboliev I.A., Gazhva Y.V., Ryabova V.M., Zlatev L.H., Ivanov S.Y., Shaitan K.V., **Bonartsev A.P.** Poly(3-hydroxybutyrate)/hydroxyapatite/alginate scaffolds seeded with mesenchymal stem cells enhance the regeneration of critical-sized bone defect // Materials Science and Engineering: C, Materials for biological application. – 2020. – V. 114. – P. 110991. DOI: 10.1016/j.msec.2020.110991; Scopus SJR = 1.234; WoS IF: **7.328**; квартиль **Q1**; (0,9/0,5).
 45. Петронюк Ю.С., Храмцова Е.А., Левин В.М., **Бонарцев А.П.**, Воинова В.В., Бонарцева Г.А., Мураев А.А., Асфаров Т.Ф., Гусейнов Н.А. Развитие методов акустической микроскопии для наблюдения процессов остеогенеза в регенеративной медицине // Известия Российской академии наук. Серия физическая. – 2020. – Т. 84. – №. 6. – С. 799–802. [Petronyuk Yu.S., Khramtsova E.A., Levin V.M., **Bonartsev A.P.**, Voinova V.I., Bonartseva G.A., Muraev A.A., Asfarov T.F., Guseynov N.A. Developing techniques of acoustic microscopy for monitoring processes of osteogenesis in regenerative medicine // Bulletin of the

- Russian Academy of Sciences: Physics. – 2020. – P. 84. – P. 653–656] DOI: 10.31857/S0367676520060204; IF RSCI (РИНЦ): 0.668; Scopus SJR = 0.226; WoS IF: 0.560; квартиль Q3; (0,8/0,6).
46. Zhuikov V.A., Akoulina E.A., Chesnokova D.V., Wenhao Y., Makhina T.K., Demyanova I.V., Zhuikova Y.V., Voinova V.V., Belishev N.V., Surmenev R.A., Surmeneva M.A., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., **Bonartsev A.P.** The growth of 3T3 fibroblasts on PHB, PLA and PHB/PLA blend films at different stages of their biodegradation *in vitro* // Polymers. – 2021. – V. 13. N 1. – P. 108. DOI: 10.3390/polym13010108; Scopus SJR = 0.77; WoS IF: **4.329**; квартиль **Q1**; (1,4/1,0).
 47. Ким Э.В., Петронюк Ю.С., Гусейнов Н.А., Терещук С.В., Попов А.А., Волков А.В., Горшенев В.Н., Ольхов А.А., Левин В.М., Дымников А.Б., Родионов В.Э., Туманян Г.А., Ивашкевич С.Г., **Бонарцев А.П.**, Бороздкин Л.Л. Биосовместимость и скорость резорбции тканевых мембран из полилактида и полигликолида, изготовленных методом 3D-печати // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2020. – Т. 170. – №. 9. – С. 352–356. [Kim E.V., Petronyuk Y.S., Guseynov N.A., Tereshchuk S.V., Popov A.A., Volkov A.V., Gorshenev V.N., Olkhov A.A., Levin V.M., Dymnikov A.B., Rodionov V.E., Tumanyan G.A., Ivashkevich S.G., **Bonartsev A.P.**, Borozdkin L.L. Biocompatibility and bioresorption of 3D-printed polylactide and polyglycolide tissue membranes // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2021. – V. 170. – P. 356–359] DOI: 10.1007/s10517-021-05066-x; IF RSCI (РИНЦ): 0.624; Scopus SJR = 0.288; WoS IF: 0.804; квартиль Q3; (0,3/0,1).
 48. **Бонарцев А.П.**, Ольхов А.А., Хан О.И., Кучеренко Е.Л., Филатова А.Г., Зернова Ю.Н., Иорданский А.Л. Матрицы для тканевой инженерии на основе ультратонких волокон и микрочастиц полигидроксibuтирата // Материаловедение. – 2020. – N 11. – С. 31–36. [**Bonartsev A.P.**, Ol'khov A.A., Khan O.I., Kucherenko E.L., Filatova A.G., Zernova Yu.N., Iordanskii A.L. Matrices for Tissue Engineering Based on Ultrafine Fibers and Microparticles of Poly(hydroxybutyrate). Inorganic Materials: Applied Research. – 2021. – V. 12. – P. 974–979]; DOI: 10.1134/S2075113321040080; IF RSCI (РИНЦ): 0.867; Scopus SJR = 0.268; квартиль Q2; (0,4/0,1).
 49. Акулина Е.А., Демьянова И.В., Жаркова И.И., Воинова В.В., Жуйков В.А., Хайдапова Д.Д., Чеснокова Д.В., Меньших К.А., Дудун А.А., Махина Т.К., Бонарцева Г.А., Волков А.В., Асфаров Т.Ф., Иванов С.Ю., Шайтан К.В., **Бонарцев А.П.** Рост мезенхимных стволовых клеток на матрицах на основе поли-3-оксибутирата, загруженных симвастатином // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2021. Т. 171. – №. 1. – С. 70–76. [Akoulina E.A., Demianova I.V., Zharkova I.I., Voinova V.V., Zhuikov V.A., Khaydapova D.D., Chesnokova D.V., Mensikh K.A., Dudun A.A., Makhina T.K., Bonartseva G.A., Volkov A.V., Asfarov T.F., Ivanov S.Y., Shaitan K.V., **Bonartsev A.P.** Growth of mesenchymal stem cells on poly(3-hydroxybutyrate) scaffolds loaded with simvastatin. Bull. Exp. Biol. Med. – 2021. – V. 171. N 1. – P. 172–177]; DOI: 10.47056/1814-3490-2021-1-70-76; IF RSCI (РИНЦ): 0.624; Scopus SJR = 0.288; WoS IF: 0.804; квартиль Q3; (0,4/0,2).
 50. 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. – Т. 58. – №. 5. – С. 579–591. IF RSCI (РИНЦ): 1.377. [Zharkova I.I., Bonartsev A.P., Boskhomdzhiyev A.P., Efremov Iu.M., Bagrov D.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Voinova V.V., Iakovlev S.G., Filatova E.V., Zernov A.L., Andreeva N.V., Ivanov E.A., Bonartseva G.A., Shaitan K.V. The effect of poly(3-hydroxybutyrate) modification by poly(ethylene glycol) on the viability of cells grown on the polymer films. Biomeditsinskaya Khimiya. Experimental/Clinical Study. 2012. V. 58. N 5. P. 579–591. DOI: 10.18097/pbmc20125805579]
 51. Иванов С.Ю., **Бонарцев А.П.**, Гажва Ю.В., Жаркова И.И., Мухаметшин Р.Ф., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Бонарцева Г.А., Андреева Н.В., Акулина Е.А., Харитоновна Е.С.,

Шайтан К.В., Мураев А.А. Разработка и доклинические исследования изолирующей мембраны на основе сополимера поли-3-оксибутирата-со-3-оксивалерата для направленной костной регенерации // Биомедицинская химия. – 2015, – Т. 61. – №. 6. – С. 717–723. IF RSCI (РИНЦ): 1.377.

Статьи в журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК:

52. Иванов С.Ю., Гажва Ю.В., Мураев А.А., Бонарцев А.П. Использование мембранной техники для направленной регенерации костной ткани при хирургических стоматологических вмешательствах // Современные проблемы науки и образования (медицинские науки). – 2012, – №. 3. – С. 74. IF RSCI (РИНЦ): 0.519.
53. Иванов С.Ю., Мухаметшин Р.Ф., Мураев А.А., Бонарцев А.П., Рябова В.М. Синтетические материалы, используемые в стоматологии для замещения дефектов костной ткани // Современные проблемы науки и образования (медицинские науки). – 2013. – №. 1. – С. 60. IF RSCI (РИНЦ): 0.519.

Главы в книгах:

54. **Bonartsev A.P.**, Myshkina V.L., Nikolaeva D.A., Furina E.K., Makhina T.A., Livshits V.A., Boskhomdzhiyev A.P., Ivanov E.A., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A. Biosynthesis, biodegradation, and application of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers - natural polyesters produced by diazotrophic bacteria. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, Ed: A. Méndez-Vilas, Formatex, Spain. – 2007. – V. 1. – P. 295–307.
55. **Bonartsev A.P.** Poly(3-hydroxybutyrate): applications. // In: Encyclopedia of Polymer Applications. Mishra, M. (Ed.). CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton. – 2019. – P. 2061-2076 (глава в книге); DOI: 10.1201/9781351019422-140000085.

Зарегистрированные патенты:

56. **Бонарцев А.П.**, Воинова В.В., Бонарцева Г.А. Биоинженерная конструкция на основе бактериального альгината и пробиотических бактерий и способ ее получения // Патент РФ №2740380 С1 от 13.01.2021 г.
57. Воинова В.В., **Бонарцев А.П.**, Шайтан К.В. Пористые биополимерные микросферы для контролируемого высвобождения положительно заряженных белков и способ получения микросфер // Патент РФ № 2692768 С1 от 27.06.2019 г.
58. **Бонарцев А.П.**, Бонарцева Г.А., Яковлев С.Г., Шайтан К.В. Фармацевтическая композиция из полимерных микрочастиц с модифицированной кинетикой высвобождения плохорастворимых лекарственных веществ // Патент РФ на изобретение № 2530577 С2 от 10.10.2014 г.
59. Бонарцева Г.А., **Бонарцев А.П.**, Иорданский А.Л., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Попов В.О. "Штамм бактерий *Azotobacter chroococcum* 12А – продуцент поли-3-оксибутирата и сополимера 3-оксибутирата с 3-оксивалератом" // Патент РФ на изобретение № 2307159 С1 от 06.05.2006.
60. Прудскова Т.Н., Кириллович В.И., Заковряшина Н.А., Ермилина Н.И., Андреева Т.И., Бонарцева Г.А., **Бонарцев А.П.**, Иорданский А.Л., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Попов В.О. Способ выделения полигидроксибутирата из сухой биомассы микроорганизма // Патент РФ на изобретение №2333962 С2 от 20.09.2008.

61. Бонарцева Г.А., **Бонарцев А.П.**, Иорданский А.Л., Махина Т.К., Мышкина В.Л. Сетчатый эндопротез для восстановительной хирургии // Патент РФ на изобретение № 2316290 С2 от 10.02.2008.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность своей матери и отцу, которые для меня не только родители, но и научные наставники и своей супруге, которая всегда поддерживает меня во всех начинаниях, моя соратница и коллега в науке. Своему научному консультанту Шайтану Константину Вольдемаровичу за всестороннюю поддержку во всех начинаниях; всем сотрудникам, аспирантам и студентам моей научной группы «Биомедицинские полимеры» (кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ и лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН): Мышкиной В.Л., Махиной Т.К., Яковлеву С.Г., Зернову А.Л., Жарковой И.И., Акулиной Е.А., Жуйкову В.А., Дудуну А.А., Чесноковой Д.В. также за участие в работе, всем сотрудникам кафедры биоинженерии и лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота за помощь в работе Мышкиной В.Л. за проведение экспериментов по биосинтезу полимеров; Махиной Т.К.; общефакультетской лаборатории электронной микроскопии в лице Давидовича Н.Д. за помощь в исследованиях методами сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии и за содействие в этой работе проф. Соколовой О.С., проф. Феофанову А.В. и Кудряшовой К.С. за помощь в работе с использованием метода конфокальной микроскопии, вед.науч.сотр. Багрову Д. В. за помощь в исследовании методом атомно-силовой микроскопии; ст.науч.сотр. кафедры биофизики Паршиной Е.Ю. за помощь в исследовании микро- и наночастиц методом динамического светорассеивания; ст.науч.сотр. кафедры клеточной биологии и гистологии Поташникову Д.М. за помощь в исследовании с использованием проточного цитометра FACSAria SORP, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета; Мойсеновичу М.М. за любезно предоставленную клеточную культуру фибробластов 3Т3. термический анализ образцов методом дифференциальной сканирующей калориметрией проведен н.с. лаборатории химической термодинамики Химического факультета МГУ Быкову М.А за исследования полимеров методом ДСК. Лаборатории физики и технологии почв кафедры физики и мелиорации почв факультета почвоведения МГУ в лице ст.науч.сотр. Быкова Г.С., доцента Милановский Е.Ю., ст.науч.сотр. Тюгай З.Н. за исследование по измерению контактных углов смачивания водой полимеров. Центру общего пользования ФИЦ «Биотехнологии» РАН в лице Шубина В.В. за помощь в спектроскопических методах исследования, а также исследованиях методом кругового дихроизма. Вед. науч. сотр. Института нефтехимического синтеза им. А.В.Топчиева РАН. Реброву А.В. за исследование полимеров методом рентгеноструктурного анализа. Сотруднице ОАО «Института пластмасс» С. Г. Алексеевой за измерение молекулярной массы полимеров. Ст.н.сотр. Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства Подгорскому В.В. за исследование мономерного состава полимеров методом ЯМР-спектроскопии. Профессору Института нефтехимического синтеза им. А.В.Топчиева РАН Бондаренко Г.Н. за исследование полимеров методом ИК-спектроскопии. Ст. науч. сотр. ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова» МЗ РФ Волкову А.В. за исследования с помощью гистологических методов, прежде всего, костной ткани. Доценту ФГАОУВО «Российский университет дружбы народов» МЗ РФ Мураевым А.А. за помощь в операциях на крысах, особенно, за проведение экспериментального моделирования критического костного дефекта. Профессору Новиковой С.П. и сотрудникам Лаборатории химии и технологии материалов для сердечно-сосудистой хирургии Национального медицинского исследовательского центра сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева МЗ РФ, которую она возглавляет. Научной группе Отдела исследования физико-механических свойств ФГБНУ ТИСНУМ (г. Троицк) в лице руководителей в.н.с., к.ф.-м.н. В.Н. Решетова и

в.н.с., к.ф.-м.н. А.С. Усеинова. Научной группе под руководством проф., д.м.н. Бухмана В.М. и научной группе под руководством проф., д.м.н. Трещалиной Е.М. Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина.

Работы, описанные в диссертации, были поддержаны рядом российских грантов, в том числе, грантами Российского Научного Фонда №№ 15-15-10014 и 17-74-20104, Российского Фонда Фундаментальных исследований №№ 15-29-04856 и 20-54-00021, ГК №№ 16.512.11.2019, 14.740.11.1077 и 16.740.11.0652 Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» и ГК № 12411.1008799.13.148 Министерства промышленности и торговли РФ в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу». Электронная микроскопия была выполнена на уникальном оборудовании «3D-EMS» МГУ, в работе использовано оборудование ЦКП «Электронная микроскопия в науках о жизни» МГУ им. М. В. Ломоносова. В работе было использовано оборудование Центров коллективного пользования МГУ имени М.В.Ломоносова (в т.ч. в рамках Программы развития МГУ имени М.В.Ломоносова до 2020 года) и Института биохимии им. А.Н.Баха РАН.

Бонарцев Антон Павлович

БИОИНЖЕНЕРИЯ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА, ПОЛУЧАЕМОГО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМ
ПУТЕМ: КОНТРОЛИРУЕМЫЙ БИОСИНТЕЗ ЕГО СОПОЛИМЕРОВ, СВОЙСТВА IN VITRO
И ПРИМЕНЕНИЕ НА МОДЕЛЯХ ЗАБОЛЕВАНИЙ IN VIVO

Автореф. дис. на соискание ученой степени докт. биол. наук

Подписано в печать . . . Заказ №

Формат 60×90/16. Авт. печ. л. 2. Тираж 100 экз.

Типография.....