

Культивирование мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга на носителях из резорбируемого Биопластотана

Е.И. Шишацкая^{1,2}, Е.Д. Николаева¹, А.А. Шумилова², А.В. Шабанов³, Т.Г. Волова^{1,2}

¹ Институт биофизики СО РАН, Красноярск

² Сибирский Федеральный университет, Красноярск

³ Институт физики им. Л.В. Киренского СО РАН, Красноярск

Cultivation of multipotent mesenchymal bone marrow cells on matrixes made of resorbable Bioplastotan

E.I. Shishatskaya^{1,2}, E.D. Nikolaeva¹, A.A. Shumilova², A.V. Shabanov³, T.G. Volova^{1,2}

¹ Institute of Biophysics, Siberian Branch of RAS, Krasnoyarsk

² Siberian Federal University, Krasnoyarsk

³ L.V. Kirensky Institute of Physics, Siberian Branch of RAS, Krasnoyarsk

В работе охарактеризовано «семейство» клеточных носителей из резорбируемого полиэфира Биопластотан, представляющего собой сополимер 3- и 4-гидроксипроизводных масляной кислоты. С применением различных технологий сконструированы пленочные и 3D носители, а также наноматрикс, образованные ультратонкими волокнами, полученные методом электростатического формирования. Все типы носителей обеспечивают адгезию мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга и пригодны для культивирования и дифференцировки мультипотентных мезенхимных стромальных клеток в клетки остеобластического ряда. Последнее подтверждено детектированием в культуре клеток внеклеточных преципитатов кальция, активности щелочной фосфатазы и продукции остеопонтина.

Ключевые слова: резорбируемый Биопластотан, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, дифференцировка, щелочная фосфатаза, остеопонтин, внеклеточные преципитаты кальция.

Реконструктивная хирургия испытывает острую потребность в биосовместимых материалах, необходимых для восполнения дефектов тканей и органов. Наиболее проблематичным является замещение крупных дефектов, в частности, костных, обусловленных травмами, различными заболеваниями, а также их радикальным лечением. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки костного мозга (ММСК-КМ) способны к дифференцировке в остеобластическом направлении, поэтому перспективны для клеточной терапии пациентов с костными дефектами, что может быть реализовано как локальным введением суспензий клеток, так и применением их в комбинации с носителями, что более эффективно [1–3].

В качестве носителей для клеток в настоящее время исследуются многочисленные материалы, разнообразие которых отчасти характеризует прогресс тканеинженерного направления биотехнологий. В отечественной литературе описаны различные варианты носителей, изготовленные из биоматериалов природного и синтетического происхождения, включая полиакрил [4], хитин [5], полилактид [6–7], политетрафторэтилен [8], биокерамика [9], поликапролактон [10], полипептиды [11], альгинат [12] и др.

Series of cell carriers made of resorbable polyester Bioplastotan, which is a copolymer of 3- and 4-hydroxybutyric acid, are characterized in this work. With use of various technologies membranes, 3D scaffolds, and nanomatrixes formed by ultrafine fibers produced with electrostatic spinning were constructed. All types of scaffolds provide adhesion of multipotent mesenchymal stromal cells and are suitable for the cultivation and differentiation of cells in the osteoblastes, that confirmed by detection of extracellular calcium precipitates, alkaline phosphatase activity and osteopontin production in cell culture.

Key words: resorbable Bioplastotan, multipotent mesenchymal stromal cells, differentiation, alkaline phosphatase, osteopontin, extracellular calcium precipitates.

Наиболее востребованы в настоящее время биосовместимые материалы, способные к резорбции in vivo без образования токсичных продуктов, изделия из которых, постепенно разрушаясь, замещаются новыми тканями, не вызывая грубых морфологических изменений. Среди биodeградирующих полимеров наиболее освоены полиэферы монокарбоновых кислот, полилактиды (ПМК) и полигликолиды (ПГК), с 1970 г. разрешенные FDA (United States Food and Drug Administration) для использования в клинической практике на территории США. В другом месте по значимости — полигидроксиполаноаты (ПГА), которые по сравнению с ПМК, термопластичны, имеют меньшее воздействие на pH тканей и более длительные сроки резорбции in vivo [13]. ПГА исследуются сравнительно недавно, с конца 80-х — начала 90-х гг. XX столетия, наиболее активно — с 2000 годов. Несомненным достижением последних лет (2010–2011 гг.) стало решение FDA о допуске ряда изделий фирмы «Terha» для применения в клинической практике.

Исследованиями, выполненными в Институте биофизики СО РАН и Сибирском Федеральном университете, установлена возможность получения из ПГА изделий в виде пленок и мембран, объемных

e-mail: volova45@mail.ru

трехмерных конструкций, микрочастиц и ультратонких волокон, пригодных для культивирования клеток [14–18]. Уделено внимание закономерностям био-разрушения ПГА *in vivo* и установлено, что полимеры этого класса в виде мономеров не разрушаются при длительной экспозиции (до 180 сут.) в фосфатном буфере. В крови и сыворотке потеря массы образцов не превышала 30% от исходной; нити, имплантированные внутримышечно лабораторным животным, сохраняли 60% механической прочности в течение года [19]. ПГА в виде микрочастиц диаметром от 5 до 50 мкм разрушились на 60–70% за 120 сут. при внутримышечной имплантации [20]. В эти же сроки частицы диаметром 4–5 мкм, введенные в кровоток, разрушились на 90% при депонировании во внутренних органах, главным образом — в селезенке и печени [21]. Остаточная масса плечных образцов ПГА различного химического состава, имплантированных подкожно, за 180 сут. составила от 25 до 56% от исходной. Наиболее активно разрушались пленки, изготовленные из сополимерных ПГА, содержащих мономеры 4-гидроксипропаната и 3-гидроксигексаноата [22]. Таким образом, показано, что процесс биодеградации ПГА в целом длителен, а его течение зависит от типа полимерного изделия и места имплантации.

Работами нашего коллектива показано, что ПГА в композиции с гидроксиапатитом обладает выраженными остеопластическими свойствами, медленно резорбируется *in vivo*, обеспечивая нормальное протекание репаративного остеогенеза [23, 24]. Зарегистрированная торговая марка материала и изделий — «Биопластотан» [25].

Цель настоящей работы — исследование роста и дифференцировки ММСК-КМ на носителях из Биопластотана, полученных различными методами.

Материал и методы

Для конструирования тканеинженерных носителей использовали высокоочищенные образцы сополимера 3-гидроксимасляной и 4-гидроксимасляной кислот (ПЗГБ/4ГБ), наиболее перспективного, но мало изученного и трудно синтезируемого представителя семейства ПГА. Образцы сополимеров синтезированы в Институте биофизики СО РАН с использованием штамма-продуцента *Cupriavidus eutrophus* B-10646 по запатентованной технологии [26]. Сополимеры ПЗГБ/4ГБ имеют самые низкие значения степени кристалличности (Сх) (20–40%) из всех известных типов ПГА, обладают свойствами эластомеров, поэтому наиболее перспективны для получения биомедицинских изделий [27, 28].

Двухмерные носители в виде пленок получали методом полива разогретого до 35°C полимерного раствора на обезжиренную поверхность (полированный металл), предварительно нагретую до такой же температуры. Высушивали пленки в беспылевом боксе-ламине (Labconco, США) при комнатной температуре в течение нескольких суток. Нетканые наноматриксы, сформированные ультратонкими волокнами, были получены методом электростатического формования (ЭСФ) на автоматической установке Nanop 01A (MECC Inc., Япония).

Для получения пористых 3D носителей использованы две технологии. По первому варианту образцы получали с использованием техники выщелачивания. Кусочки сахарозы, предварительно

спрессованные, размером (1×1×1 см), пропитывали раствором полимера в хлороформе, далее высушивали при температуре 30°C. После испарения растворителя образцы промывали в дистиллированной воде до полного удаления сахарозы. Из полученной объемной пористой формы вырезали фрагменты необходимых размеров. Второй метод изготовления объемных пористых носителей реализован с использованием лиофилизации. Раствор полимера помещали в форму и замораживали при -80°C в морозильнике-кельвинаторе, далее замороженные образцы лиофилизировали в установке для вакуумной сушки ALPHA 1-2/LD (Martin Christ GmbH, Германия).

ММСК были получены из бедренных костей крыс линии Вистар, выведенных передозировкой эфирным наркозом. Содержание и использование лабораторных животных соответствовало правилам, принятым в Российской Федерации, рекомендациям локального этического комитета и национальным законам [29].

Для получения ММСК использовали ранее описанную методику [30], в ходе которой костный мозг выделяли в асептических условиях после удаления шейки кости; в открытый костномозговой канал с помощью шприца вводили 1 мл среды α -MEM с добавлением 20% телячьей сыворотки и 50 ЕД гепарина, костный мозг вымывали и тщательно суспендировали. Клетки дважды отмывали питательной средой при центрифугировании. Суспензию клеток переносили в чашку Петри диаметром 90 мм и помещали в CO₂-инкубатор. Через 24 ч среду заменяли свежей, удаляя при этом неприкрепившиеся клетки, что позволяет избавиться практически от всех клеток гемопоэтического происхождения и получить популяцию мезенхимных клеток чистотой до 90%. Для дальнейших исследований использованы клетки после 3–4 пассажей.

Для индукции дифференцировки ММСК в остеобласты использована среда DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, раствора антибиотиков, 0,15 мМ аскорбиновой кислоты, 10 нМ дексаметазона и 10 мМ β -глицерофосфата. Культивирование проводили в течение 21 сут. с заменой среды на каждый третий день.

Морфологию клеток изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии. Использовали растровый микроскоп HITACHI TM-3000 с системой микроанализа BRUKER XFlash 430 N (Япония). Клетки предварительно фиксировали 4% раствором формалина, затем трижды отмывали этанолом и лиофильно высушивали. Далее производили напыление золотом (10 мА, 40 с) с помощью установки вакуумного напыления Emitech K575X (Quorum Technologies Ltd., Великобритания), съемку производили при напряжении 5 и 15 кВ.

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста. Для этого в лунку с каждым типом носителя было добавлено по 50 мкл раствора МТТ (5%) и 950 мкл полной питательной среды. Через 3,5 ч культивирования среду с раствором МТТ заменяли ДМСО для растворения образовавшихся кристаллов МТТ-формаза. Через 30 мин супернатант переносили в 96-луночный планшет и проводили измерение оптической плотности при длине волны 540 нм на микропланшетном фотометре Bio-Rad 680 (Bio-Rad

LABORATORIES Inc.). Количество живых, метаболически активных клеток оценивали по калибровочному графику.

Для подтверждения дифференцировки ММСК-КМ в остеобласты использовали следующие рекомендуемые маркерные показатели: активность щелочной фосфатазы, продукцию остеопонтин и наличие внеклеточных преципитатов кальция [31]. Активность щелочной фосфатазы культивируемых клеток регистрировали с использованием набора «Alkaline Phosphatase Detection Kit» (Sigma). Предварительно образцы с клетками помещали в лизисный буфер (NaCl 250 мМ, 0,1 % Triton-X 100, Hepes 50 мМ, pH 7,5) и подвергали 3 циклам замораживания и оттаивания для полного разрушения клеток. В 96-луночный планшет переносили по 20 мкл полученного клеточного лизата каждого образца, инкубировали 20 мин. при 65°C, охлаждали и в каждую лунку добавляли по 20 мкл буфера разведения и 160 мкл флуоресцентного буфера, входящих в состав набора. Затем добавляли по 1 мкл субстрата и измеряли интенсивность флуоресценции на мульти-модальном микропланшетном люминометре Mithras LB 940 (BERTHOLD TECHNOLOGIES, Германия) при λ_{ex} 360 нм и λ_{em} 440 нм. Активность ЩФ оценивали по заранее приготовленному калибровочному графику.

Синтез остеопонтин детектировали иммунохимически. Для этого клетки фиксировали 4% раствором формальдегида, затем дважды промывали фосфатно-солевым буфером, обрабатывали 1% раствором Triton X-100 в фосфатно-солевом буфере в течение 5 мин и 1% раствором альбумина в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем добавляли первичные антитела, меченные FITC, в разведении 1:100 (Anti-Osteopontin IgG, Abcam, США) и инкубировали 45 мин при комнатной температуре. Далее полученные образцы трижды промывали фосфатно-солевым буфером и исследовали с помощью микроскопа Leica DM 6000 (Германия).

Внеклеточные преципитаты продуцируемых клетками солей кальция и фосфатов анализировали с помощью системы микроанализа BRUKER XFlash 430 N, входящей в состав растрового микроскопа HITACHI TM-3000 (Япония). Результаты рентгено-спектрального анализа обрабатывали с помощью программы QUANTAX 70.

Состояние полимерных носителей оценивали, помимо электронной микроскопии, взвешиванием образцов в конце эксперимента на весах 4 класса точности (Adventurer RV 214, Ohaus, Япония) и определением молекулярно-массовых характеристики полимера в качестве показателей биоразрушения. Для этого с использованием ВЭЖХ («Agilent Technologies» 1260 Infinity, USA) измеряли значения средневесовой (M_w) и среднечисловой (M_n) молекулярной массы и величину полидисперсности (ПД) относительно полистироловых стандартов («Fluka», Германия).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel. Оценивали средние значения и ошибки среднего. Статистическую значимость различий показателей контрольных и экспериментальных групп проверяли в зависимости от соответствия закону нормального распределения по U-критерию Манна – Уитни и t-критерию Стьюдента (уровни значимости: 0,05 и 0,01).

Результаты и обсуждение

Для культивирования ММСК исследована линия сконструированных полимерных носителей (рис. 1), среди которых гладкие пленочные носители (краевой угол смачивания водой 65°, шероховатость 113 нм); носители, сформированные ультратонкими волокнами диаметром 1,5 мкм; 3D пористые носители (пористость 88 %) с размером пор 100–120 мкм и образцы, полученные лиофилизацией (пористость 82%) с размером пор 40–60 мкм.

Все носители были совмещены с ММСК-КМ с добавлением факторов остеогенной дифференцировки. По результатам МТТ-теста (рис. 2), проведенного на 3, 7 и 14 сут., наибольшее количество клеток на крайнем сроке зарегистрировано на наноматриксах из ультратонких волокон и 3D носителях, полученных методом выщелачивания ($2,0\text{--}2,3 \times 10^5$ кл/мл); достоверно меньшее количество клеток определялось на пленках и 3D носителях, полученных в результате лиофильного высушивания полимерного раствора ($1,3\text{--}1,6 \times 10^5$ кл/мл). Есть данные, что для развития остеобластов наиболее пригодными являются пористые носители с крупными порами, диаметром от 100 до 300 мкм [32]. Этим параметрам отвечают исследуемые в настоящей работе носители из ультратонких волокон и 3D носители, полученные с применением техники выщелачивания, в то время, как носители, сформированные методом лиофильного высушивания полимерного раствора, имели поры меньшего размера (40–60 мкм), что, по всей видимости, повлияло на прикрепляемость и последующее развитие клеток.

Результаты определения активности щелочной фосфатазы (маркера остеобластической дифференцировки) согласуются с результатами МТТ-теста (рис. 3). На 21 сут. культивирования ММСК в среде с остеогенными факторами активность фермента составила: $4,023 \text{ ммоль/мин} \times 10^5$ клеток в случае носителей, полученных методом ЭСФ; $3,908 \text{ ммоль/мин} \times 10^5$ клеток на носителях, сформированных выщелачиванием; в то время как в группе носителей, полученных лиофилизацией, составляла $3,0 \text{ ммоль/мин} \times 10^5$ клеток.

Реакция на остеопонтин на 21 сут. культивирования подтвердила синтез белка клетками на всех исследованных носителях (рис. 4). На поверхности пленок клетки были круглой формы, на наноматриксах — располагались вдоль ультратонких волокон, образующих носитель. На объемных носителях визуально клеток было меньше, скорее всего, из-за проникновения последних через поры в толщу образцов.

При адекватных условиях адгезия и пролиферация остеогенных клеток может сопровождаться формированием костной ткани. Остеобласты синтезируют белки, экскретируемые в межклеточное пространство, в результате этого формируется органический матрикс костной ткани, который далее минерализуется посредством выделения клетками солей кальция. На РЭМ-снимках видно, что клетки, расположенные на поверхности исследуемых полимерных носителей, продуцировали соли, которые минерализовали внеклеточный матрикс и откладывались на поверхностях клеток в виде преципитатов (рис. 5). Аналогичную морфологию остеобластов, продуцирующих кальций-фосфаты, с кристаллами преципитатов солей на поверхности, наблюдали авторы других работ [33–35].

Было показано, что наиболее активно процесс минерализации проявляется на носителях из ультратонких волокон и 3D носителях с крупными порами. Самое низкое содержание минеральных кристаллов характерно для 3D носителей, полученных выщелачиванием

чиванием, что коррелирует с адгезией меньшего количества клеток к этому типу носителей. Результаты количественного определения состава минеральных веществ, продуцируемых остеобластами, представлены на рис. 6 и в таблице.

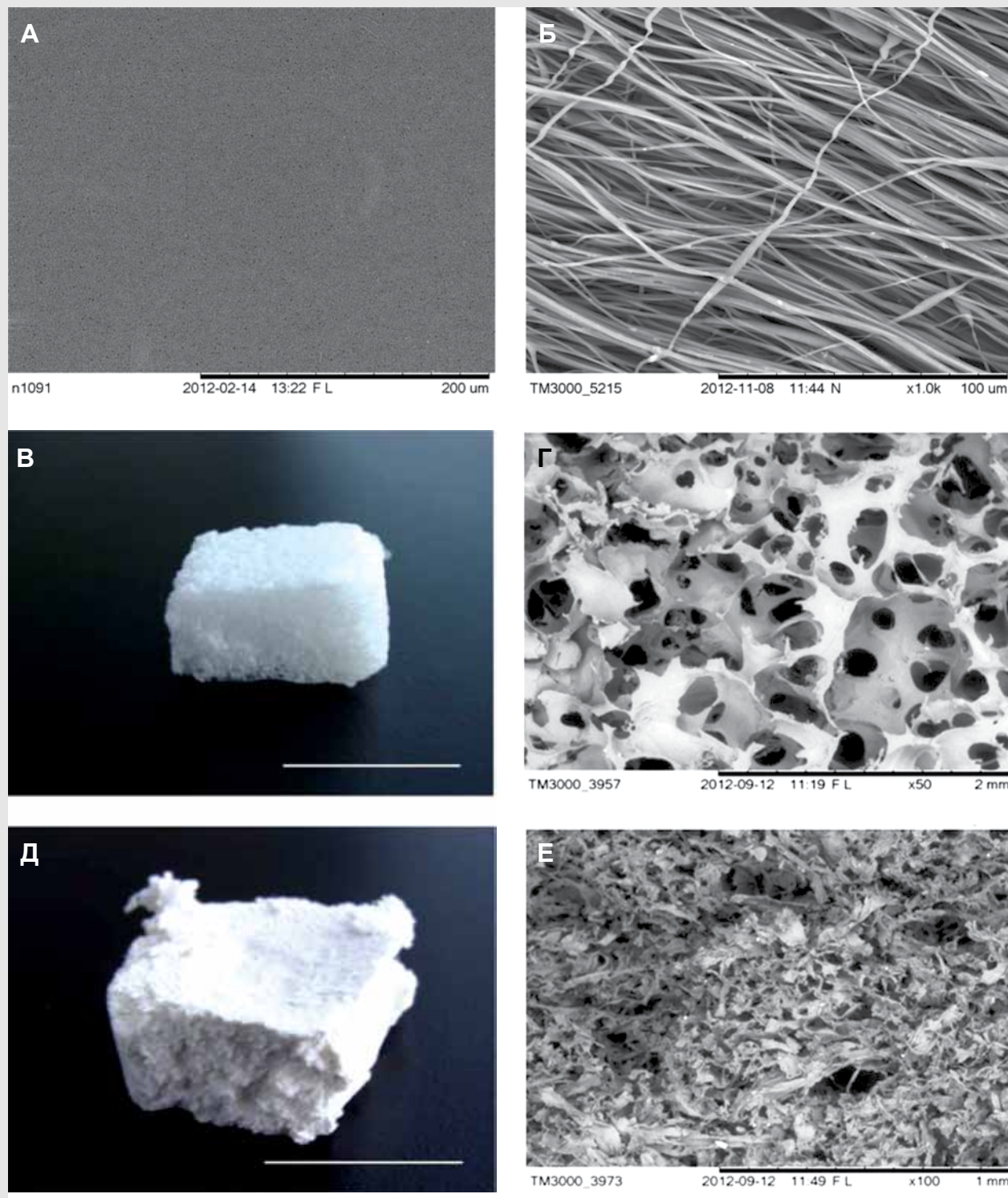


Рис. 1. Полимерные носители, полученные из резорбируемого Биопластотана:
А – пленочный носитель; Б – носитель из ультратонких волокон; В, Г – 3D носитель, полученный выщелачиванием сахарозы;
Д, Е – 3D носитель, полученный лиофильным высушиванием раствора; Б, Г, Е – сканирующая электронная микроскопия

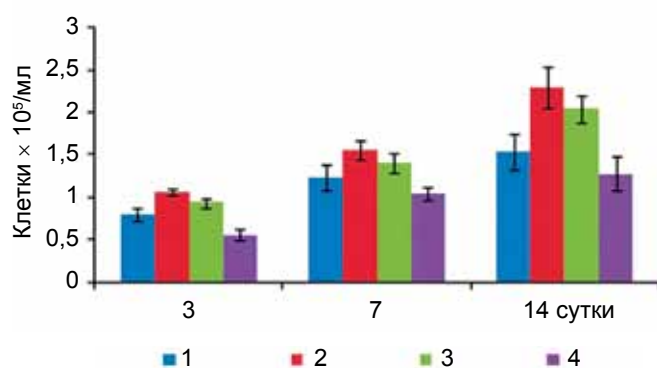


Рис. 2. Количество ММСК на носителях, изготовленных из Биопластотана, при культивировании в остеогенной среде:

1 – наливные пленки;
2 – носители из ультратонких волокон;
3 – 3D носители, полученные методом выщелачивания;
4 – 3D носители, изготовленные в результате лиофильного высушивания

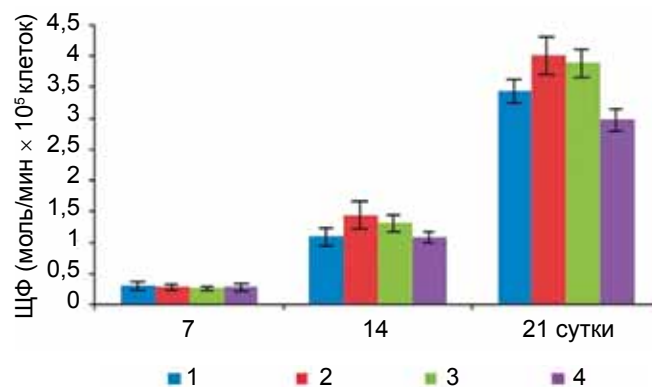


Рис. 3. Активность щелочной фосфатазы в культуре клеток на ПГА-носителях разных типов после индукции остеогенной дифференцировки:

1 – наливные пленки;
2 – носители из ультратонких волокон;
3 – 3D носители, полученные методом выщелачивания;
4 – 3D носители, изготовленные в результате лиофильного высушивания

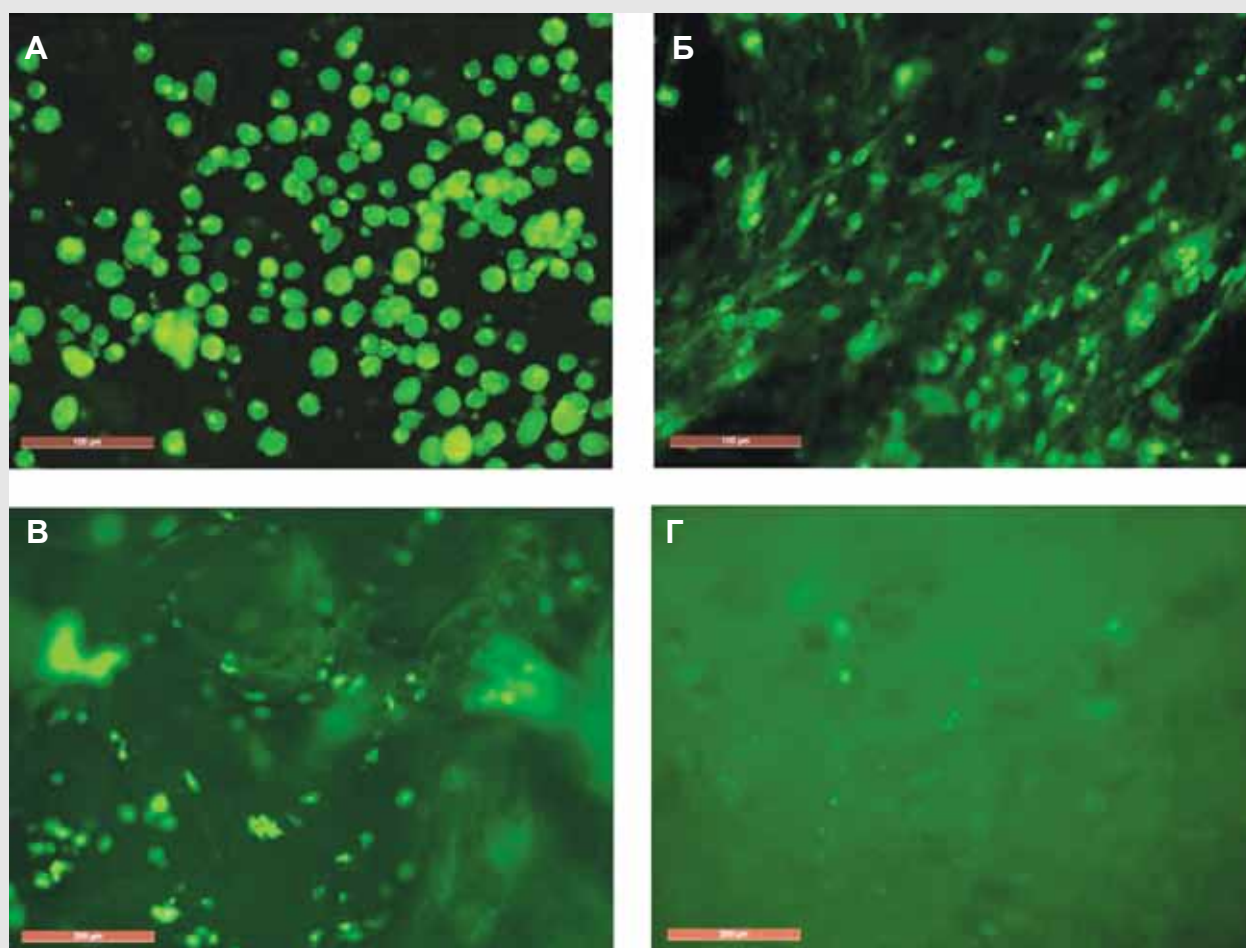


Рис. 4. Остеобласты на разных типах носителей, полученных из Биопластотана:

А – наливные пленки;
Б – носители из ультратонких волокон;
В – 3D носители, полученные методом выщелачивания;
Г – 3D носители, изготовленные в результате лиофильного высушивания.
Иммуноцитохимическая реакция с антителами к остеопонтину. Флуоресцентная микроскопия.
Маркер 100 мкм

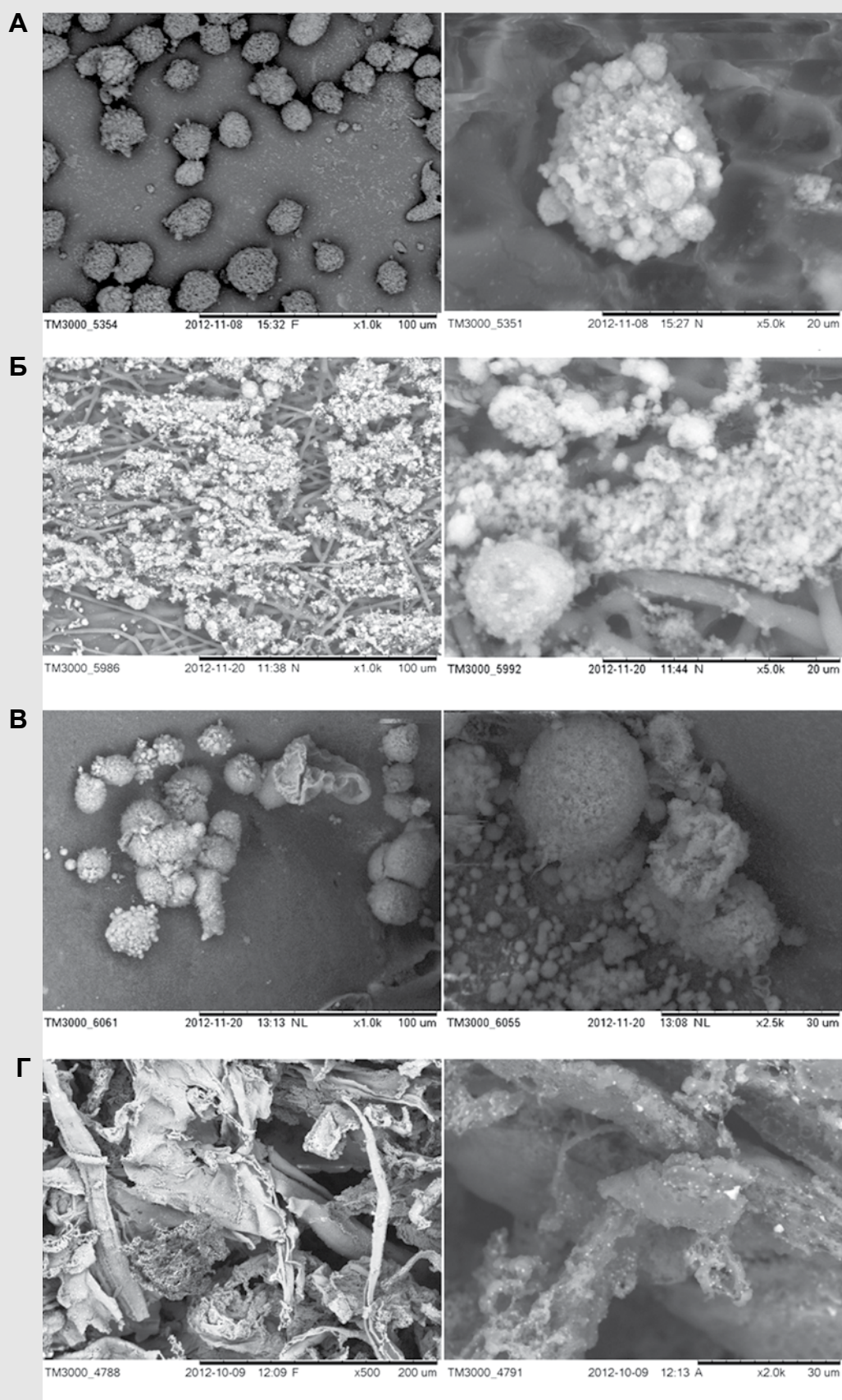


Рис. 5. Дифференцировка ММСК-КМ, культивированных на разных типах носителей:

А – наливные пленки;

Б – носители из ультратонких волокон;

В – 3D носители, полученные методом выщелачивания;

Г – 3D носители, изготовленные в результате лиофильного высушивания

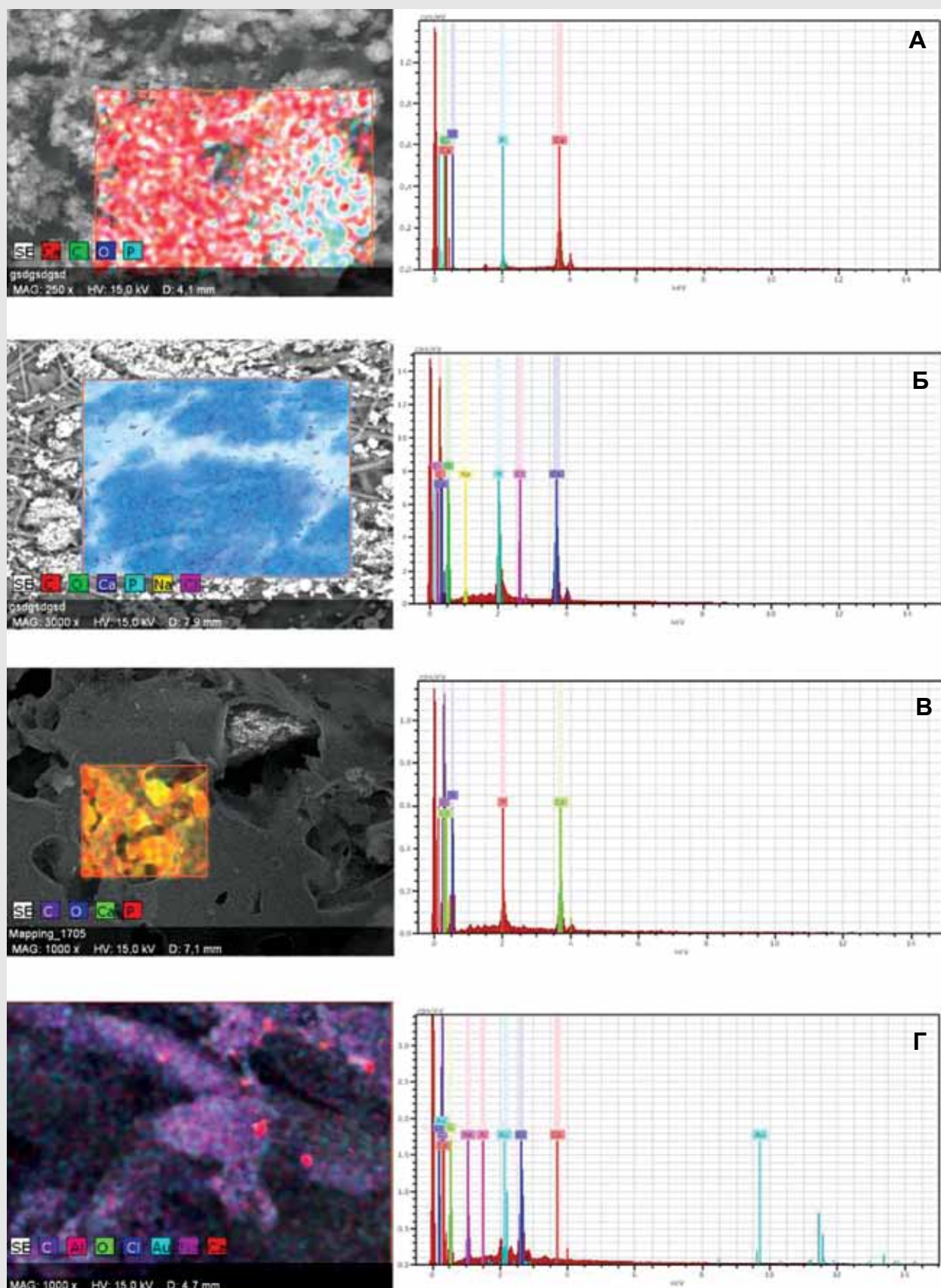


Рис. 6. Элементный состав минеральных преципитатов, продуцируемых клетками, культивируемыми на разных полимерных носителях:

А – наливные пленки;

Б – носители из ультратонких волокон;

В – 3D носители, полученные методом выщелачивания;

Г – 3D носители, изготовленные в результате лиофильного высушивания

Спектральный анализ минеральных преципитатов, продуцируемых остеобластами, полученными из ММСК-КМ при культивировании на полимерных носителях из Биопластотана разных типов

Тип носителя	Содержание элементов, % по массе			
	С	О	Са	Р
Пленка	50,5	37,4	8,9	3,2
Носитель из ультратонких волокон (ЭСФ)	34,1	37,4	20,2	8,2
3D (выщелачивание)	50	36,46	10,3	3,3
3D (лиофилизация)	55,7	39,4	3,2	1,7

Спектральный анализ показал наличие преципитатов фосфатов кальция на всех типах носителей, сконструированных из Биопластотана. Самое высокое содержание Са и Р зарегистрировано на носителях из ультратонких волокон и 3D носителях с крупными порами, полученными выщелачиванием частиц сахарозы, в 2,0–2,5 раза выше, чем на пленочных носителях; самое низкое — на лиофилизированных матриксах (см. табл.). Соотношение Са/Р при этом было различным и составило 1,88 на лиофильном 3D носителе; 2,46 на носителе, сформированном ультратонкими волокнами; 2,78 на пленках и 3,12 на 3D образцах с крупными порами, изготовленными выщелачиванием.

Результаты взвешивания очищенных и тщательно отмытых носителей в конце эксперимента, а также исследование молекулярно-массовых характеристик собственно сополимера не зафиксировали количественных изменений, что свидетельствует об отсутствии процесса разрушения всех типов изделий в эти сроки *in vitro*.

В целом, показано, что все типы носителей, сконструированные из резорбируемого Биопластотана, представляющего собой сополимер мономеров 3- и 4-гидроксипроизводных масляной кислоты, пригодны для культивирования ММСК костного мозга и не препятствуют их дифференцировке в клетки остеобластического ряда под действием индуцирующих факторов.

Благодарности

Работа выполнена в рамках мега-проекта по поставлению Правительства РФ № 220 от 09.04.2010 для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих учёных в Российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования (договор № 11.G34.31.0013) и Программы Президента РФ поддержки молодых ученых докторов наук (грант № МД-3112.2012.4.)

ЛИТЕРАТУРА:

- Деев Р.В., Исаев А.А., Кочиш А.Ю. и др. Клеточные технологии и в травматологии и ортопедии: пути развития. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2007; II (4): 18–30.
- Uemura T., Dong Y., Wang Y. et al. Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques. Biomaterials 2003; 24: 2277–86.
- Хенч Л., Джонс Д. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей. Серия «Мир биологии и медицины». Москва: Техносфера; 2007.
- Фомина Г.А., Масгутов Р.Ф., Штырлин В.Г. и др. Гидрогелевый матрикс на основе биосовместимых карбомеров для восполнения дефектов нервной ткани. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2007; II (4): 63–7.
- Панарин Е.Ф., Нудьга Л.А., Петрова В.А. и др. Матрицы для культивирования клеток кожи человека на основе природных полисахаридов — хитина и хитозана. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2009; IV (3): 42–6.
- Швед Ю.А., Кухарева Л.В., Зорин И.М. и др. Разработка трехмерной подложки для культивирования фибробластов кожи человека. Цитология 2006; 48 (2): 161–8.
- Бухарова Т.Б., Антонов Е.Н., Попов В.К. и др. Биосовместимость тканеинженерных конструкций на основе пористых полилактидных носителей, полученных методом селективного лазерного спекания, и мультипотентных стромальных клеток костного мозга. Клеточные технологии в биологии и медицине 2010; 1: 40–6.
- Григорьян А.С., Киселёва Е.В., Штанский Д.В. и др. Новый тип тканеинженерной конструкции на основе политетрафторэтилена с наноструктурированным многофункциональным биосовместимым нерезорбируемым покрытием. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2010; V (3): 71–6.
- Мелихова В.С., Сабурина И.Н., Орлов А.А. и др. Моделирование функционального остеогенеза с использованием биodeградируемого матрикса и аутогенных стромальных клеток подкожной жировой ткани. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2009; IV (1): 59–68.
- Севостьянова В.В., Elgudin Y.L., Wnek G.E. и др. Свойства тканеинженерных матриц из поликапролактона, импрегнированных

ростовыми факторами VEGF и bFGF. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2012; VII (4): 62–7.

11. Бармашева А. А., Шарутина И. А., Николаенко Н.С. и др. Культивирование стромальных клеток костного мозга крысы на коллагене I типа разного происхождения. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2009; IV (4): 41–7.

12. Петренко Ю.А., Иванов Р.В., Лозинский В.И. и др. Сравнительное исследование методов заселения широкопористых носителей на основе альгинатного криогеля мезенхимальными стромальными клетками костного мозга человека. Клеточные технологии в биологии и медицине 2010; 4: 225–8.

13. Волова Т.Г., Шишацкая Е.И. Биоразрушаемые полимеры: синтез, свойства, применение. Красноярск: Красноярский писатель; 2011.

14. Shishatskaya E.I., Volova T.G. A comparative investigation of biodegradable polyhydroxyalkanoate films as matrices for *in vitro* cell cultures. J. Mater Sci: Mater. Med. 2004; 15 (8): 915–23.

15. Shishatskaya E.I., Voinova O.N., Goreva A.V. et al. Biocompatibility of polyhydroxybutyrate microspheres: *in vitro* and *in vivo* evaluation. J. Mater Sci: Mater. Med. 2008; 19(6): 2493–502.

16. Shishatskaya E.I., Goreva A.V., Kalacheva G.S. et al. Biocompatibility and resorption of intravenously administered polymer microparticles in tissue of internal organs of laboratory animals. J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 2011; 22: 2185–203.

17. Shishatskaya E.I. Biomedical investigation, application of PHA. Macromol. Symposia 2008; July 4; 269: 65–81.

18. Шишацкая Е.И., Николаева Е.Д., Горева А.В. и др. Исследование пленочных матриц из резорбируемых полигидроксиканоатов различного химического состава *in vivo*: реакция тканей и кинетика биоразрушения. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2012; VII (1): 73–80.

19. Shishatskaya E.I., Volova T.G., Gordeev S.A. et al. Degradation of P(3HB) and P(3HB-co-3HV) in biological media. J. Biomater. Sci. Polymer. Edn. 2005; 15 (5): 643–57.

20. Shishatskaya E.I., Voinova O.N., Goreva A.V. et al. Biocompatibility of polyhydroxybutyrate microspheres: *in vitro* and *in vivo* evaluation. J. Mater Sci: Mater. Med. 2008; 19 (6): 2493–502.

21. Shishatskaya E.I., Goreva A.V., Kalacheva G.S. et al. Biocompatibility and resorption of intravenously administered polymer microparticles in tissue of internal organs of laboratory animals. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2011; 22: 2185–203.
22. Шишацкая Е.И., Николаева Е.Д., Горева А.В. и др. Исследование пленочных матриц из резорбируемых полигидроксиалканоев различного химического состава *in vivo*: реакция тканей и кинетика биоразрушения. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2012; VII (1): 73–80.
23. Shishatskaya E.I., Chlusov I.A., Volova T.G. A hybrid PHA-hydroxyapatite composite for biomedical application: production and investigation. *J. Biomater. Sci. Polymer. Edn.* 2006; 17(5): 481–98.
24. Шишацкая Е.И., Камендов И.В., Старосветский С.И. и др. Исследование остеопластических свойств матриц из резорбируемого полиэфира гидроксимасляной кислоты. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2008; III (4): 41–7.
25. Торговая марка «БИОПЛАСТОТАН™». Регистрационное свидетельство № 315652 Федерального института патентной экспертизы. 2006 Фев 15.
26. Волова Т.Г., Шишацкая Е.И. Штамм бактерий *Cupriavidus eutrophus* ВКПМ В-10646 – продуцент полигидроксиалканоев и способ их получения. РФ Патент № 2439143. 11 Ноябрь 2010.
27. Volova T.G., Shishatskaya E.I., Zhila N.O. et al. Fundamental basis of production and application of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. Siberian Federal University* 2012; 5(3): 88–131.
28. Rai R., Keshavarz T., Roether J.A. et al. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *J. Mat. Scien. And Engin. R.* 2011; 72: 29–47.
29. Генин А.М., Капланский А.С. Биоэтические правила проведения исследований на человеке и животных в авиационной, космической и морской медицине. *Авиационная и экологическая медицина* 2001; 4: 14–20.
30. Шахов В.П., Хлусов И.А., Дамбаев Г.Ц. и др. Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей. В: В.В. Новицкий, В.П. Шахов, И.А. Хлусов, Г.Ц. Дамбаев, редакторы. Томск: STT; 2004: 141–2.
31. Sarraf C.E., Otto W.R., Eastwood M. In vitro mesenchymal stem cell differentiation after mechanical stimulation. *Cell Prolif.* 2011; 44(1): 99–108.
32. Karageorgiou V., Kaplan D. Porosity of 3-D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005; 26: 5474–91.
33. Wang Y.-W., Wu Q., Chen G.-Q. Attachment, proliferation and differentiation of osteoblasts on random biopolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds. *Biomaterials* 2004; 25 (4): 669–75.
34. Li Z., Ramay H. R., Hauch K. D. et al. Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2005; 26 (18): 3919–28.
35. Bakar Z. A., Hussein B. F., Mustapha N. M. Cockle Shell-Based Biocomposite Scaffold for Bone Tissue Engineering. In: D. Eberli, editor. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering – Cells and Biomaterials*. InTech; 2011: 365–90.

Поступила 06.03.2013