На правах рукописи

Шумилова Анна Алексеевна

ПОТЕНЦИАЛ БИОРАЗРУШАЕМЫХ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ В КАЧЕСТВЕ КОСТНОПЛАСТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехологии)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Красноярск – 2015

Работа выполнена на базовой кафедре биотехнологии Института фундаментальной биологии и биотехнологии, Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Сибирский Федеральный университет»

Научный руководитель: **Шишацкая Екатерина Игоревна,** доктор биологических наук

Официальные оппоненты: **Трубников Вадим Игоревич,** доктор медицинских наук, ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого», кафедра травматологии, ортопедии имени профессора Л.Л. Роднянского, заведующий

Надеждин Сергей Викторович, кандидат биологических наук, ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», кафедра экологии, физиологии и биологической эволюции, доцент

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», г. Новосибирск

Защита состоится « » _____ 2015 года в __ часов на заседании диссертационного совета Д 003.007.01 при Институте биофизики СО РАН по адресу: 660036, г. Красноярск, Академгородок, д. 50, стр. 50, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН ИБФ СО РАН.

Автореферат разослан «_____» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
канд. биол. наук Зотина Т.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Многообразие микроорганизмов, характеризующихся богатством ассортимента ферментов и вариабельностью метаболизма, обеспечивает синтез широкого спектра соединений различной структуры и сложности технического, пищевого и медицинского назначения.

К ценным продуктам биотехнологии относятся полигидроксиалканоаты (ПГА) – полимеры гидроксипроизводных алкановых кислот, которые являются резервными макромолекулами прокариот и синтезируются в специфических условиях несбалансированного роста [Steinbüchel 2001; Laycock, 2013; Волова, 2010].

Совокупность свойств ПГА, включающих биологическую совместимость и биоразрушаемость, выдвигает эти полимеры в разряд высокотехнологичных материалов XXI века. Особенно перспективными областями применения ПГА являются биомедицинские технологии, связанные с разработкой материалов и устройств для реконструктивной хирургии [Sudesh 2004; Волова, Шишацкая, 2009, 2011].

ПГА, характеризующиеся высокой механической прочностью, медленной биоразрушаемостью *in vivo* и термопластичностью, представляют интерес в качестве костнопластического материала для актуальной и остро стоящей проблемы повышения эффективности реконструктивного остеогенеза в травматологии и ортопедии, челюстно-лицевой хирургии и стоматологии. Повышение частоты повреждений костных органов обусловлено увеличением уровня травматизма, количества антропогенных катастроф, непрекращающимися вооруженными конфликтами [Белевитин и др., 2011]. Особенности строения костной ткани, заключающиеся в плотной упаковке высокоминерализованного волокнистого матрикса, придающего высокую механическую прочность костям, приводят к особому виду повреждений, возникающих в результате приложения к костному органу силы, превышающей его механическую прочность. Несмотря на достаточно активную способность к репарации, костная ткань бывает не в состоянии полностью устранить дефицит тканей, появившийся вследствие действия повреждающего фактора. Это приводит к резкому снижению собственных регенераторных возможностей костной ткани и формированию состояния «остеогенной недостаточности», что требует выполнения костной пластики с привлечением специализированных материалов [Гололобов и др., 2004]. По современным представлениям, костнопластический материал должен обладать биосовместимостью, остеогенностью (содержать клеточные источники); остеоиндукцией (запускать остеогенез); остеокондукцией (служить матрицей для образования новой кости); остеопротекцией (заменять кость по механическим свойствам) [Baino, 2011]. Несмотря на широкий ассортимент современных материалов (металлы, керамики, природные материалы типа коллагена и хитозана; композиты керамик с природными и синтетическими полимерами), ни один из них не отвечает в полной мере всем требованиям. Поэтому актуальны поиск, изучение и освоение новых костнопластических материалов и устройств на их основе.

Относительно ПГА известно, что эти полимеры самостоятельно и в композиции с керамиками обладают остеокондуктивными и остеоиндуктивными свойствами [Misra et al., 2010; Wang et al., 2008; Шишацкая и др., 2008; 2013]. Однако потенциал ПГА для восстановительной хирургии костных тканей к настоящему времени в полной мере не раскрыт. Мало данных о способах переработки этих полимеров в специализированные костнопластические материалы и изделия. Весьма ограниченна информация, свидетельствующая о результативности применения изделий из ПГА *in vivo* для восстановления дефектов костной ткани. Это определило направление исследований настоящей работы, ориентированной на изучение полигидроксиалканоатов в качестве нового костнопластического материала.

Цель и задачи. Цель работы – применение полигидроксиалканоатов (ПГА) для конструирования костнопластического материала и имплантатов, в том числе в сочетании с антибактериальными препаратами и клетками, исследование эффективности для восстановления модельных дефектов костной ткани. Для достижения цели сформулированы следующие взаимосвязанные задачи:

1. Синтезировать образцы ПГА различного химического состава и исследовать физико-химические свойства; получить полимерные системы в виде порошков и растворов для переработки в специализированные изделия.
2. С применением различных технологий сконструировать семейство полимерных изделий разной геометрии; исследовать структуру и физико-механические свойства.
3. Изучить возможность модификации поверхности прессованных 3D-форм из ПГА обработкой CO_2-лазером.
4. Исследовать адгезионные свойства пористых 3D-имплантатов из ПГА и способность поддерживать дифференцировку мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток в остеобластическом направлении для конструирования гибридных тканеинженерных систем.
5. Исследовать остеопластические свойства собственно полимерных 3D-имплантатов и пломбировочного материала, а также в сочетании с клетками и антибактериальными лекарственными препаратами в экспериментах на лабораторных животных с модельными дефектами плоских костей черепа и трубчатой кости, в том числе осложненных инфекцией.

Научная новизна. С применением образцов ПГА различного химического состава исследованы и найдены условия для конструирования семейства пионерных имплантатов в виде пленок и нетканых мембран, плотных и пористых 3D-форм, пломбировочного материала. Установлено влияние состава полимеров и способов переработки на свойства и структуру поверхности, физико-механические характеристики полученных изделий. Показана возможность модификации поверхности 3D-имплантатов обработкой CO_2-лазером, которая увеличивает прочностные характеристики изделий и положительно влияет на адгезионные свойства полимерных носителей. Установлено, что изделия из ПГА обеспечивают дифференцировку

мультипотентных мезенхимных стволовых клеток жировой ткани и костного мозга в остеобласты. Впервые исследовано течение репаративного остеогенеза плоских костей черепа с применением 3D-имплантатов из ПГА и в сочетании с остеобластами, и трубчатых костей, осложненных инфекцией после имплантации полимерного пломбировочного материала.

Практическая значимость. Сконструировано пионерное семейство изделий из ПГА в виде пленок и нетканых мембран, сформированных ультратонкими волокнами, плотных и пористых 3D-форм; гибридных имплантатов из ПГА и дифференцированных остеобластов; пломбировочного материала, нагруженного антибактериальным препаратом. На лабораторных животных с модельными дефектами костной ткани показана эффективность применения разработанных имплантатов и пломбировочного материала для восстановления плоских костей черепа и костных полостей, инфицированных *Staphylococcus aureus.*

Положения, выносимые на защиту

1. Сконструированное и охарактеризованное семейство имплантатов разной геометрии на основе ПГА различного химического состава: П(3ГБ), П(3ГБ/3ГВ), П(3ГБ/4ГБ).

2. Серия гибридных тканеинженерных систем (графтов) на основе ПГА, способных поддерживать направленную дифференцировку стволовых клеток в клетки остеобластического ряда.

3. Эффективность ПГА в экспериментах на лабораторных животных с модельными дефектами плоских костей черепа и трубчатой кости, в том числе осложненных инфекцией *in vivo*.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (г. Москва, 2012; 2013; 2014); IV, V, VI International Conference "Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues (Greece, 2013, 2014, 2015), International Symposium on Biopolymers (Santos, Brazil, 2014); XIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов–2013» (г. Москва, 2013); 17-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых (г. Пущино, 2013); Научной сессии молодых ученых и аспирантов Института биофизики СО РАН (г. Красноярск, 2013, 2015).

Работа выполнена в рамках: мегагранта по Постановлению Правительства РФ № 220 «Биотехнология новых биоматериалов» (2010–2014 гг.); гранта CRDF «Construction of biodegradable polyhydroxyalkanoates based matrixes for tissue engineering» (2012 г.); гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (2012–2013 гг.); гранта Красноярского краевого фонда науки «Биомедицинские изделия на основе полимеров биологического происхождения для оптимизации процессов восстановления костной ткани»; гранта Фонда содействия развития малых форм предприятия в научно-технической сфере «УМНИК» «Биополимеры для восстановления костной ткани» (2013 г.).

Вклад автора. Планирование и проведение всех экспериментов (синтез образцов ПГА различного химического состава, конструирование и исследование имплантатов), обработка и анализ полученных результатов, написание публикаций.

Публикации. По результатам работы опубликованы 18 печатных работ, из них 7 статей в российских и международных журналах из списка ВАК.

Структура работы. Диссертация изложена на 145 страницах машинописного текста и содержит 13 таблиц и 46 рисунков; включает обзор литературы, описание объектов и методов исследования, результатов и их обсуждения (3 главы), заключение и выводы. Список цитируемой литературы включает 218 источников, в т. ч. 160 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение. Во введении обоснована актуальность работы, необходимость поиска и исследования новых материалов и имплантатов для реконструкции дефектов костной ткани.

Аналитический обзор посвящен анализу литературы по современным материалам и изделиям для реконструктивной хирургии костной ткани; включает описание технологий получения и применения конструкций и имплантатов, требований к ним; дает представление о состоянии исследований ПГА в качестве костнопластического материала.

Материалы и методы исследования. Экспериментальные образцы полигидроксиалканоатов (ПГА) синтезированы с использованием штамма-продуцента *Wautersia eutropha* B5786. Состав и свойства полимеров определяли с применением хроматографии и масс-спектрометрии *«Agilent Technologies» 7890A (США),* гель-проникающей хроматографии *«Agilent Technologies2 1260 Infinity (США),* дифференциально-термического анализа *DSC-1 METTLER TOLEDO (Швейцария),* рентгеноструктурного анализа *D8 ADVANCE «Bruker» (Германия)*.

С помощью ультрацентробежной лабораторной мельницы *ZM 200 («Retsch», Германия)* из образцов ПГА получали измельченный размалыванием порошок. Фракционный состав полимера исследовали с помощью просеивающей машины *Control 200*, измерение насыпной плотности полученных фракций проводили с применением тестера плотности утряски *PT-TD200* (*«PHARMATEST», Германия*). Растворы полимеров различной плотности (2, 3, 4 и 10 %) исследовали с помощью вискозиметра Гепплера HAAKE тип C с падающим шариком (*Thermo Scientific, Германия*).

Методами холодного прессования, испарения растворителя, элекстростатического формования, выщелачивания, лиофилизации из порошков и растворов ПГА разработаны изделия разной геометрии в виде пленок и нетканых мембран, образованных ультратонкими волокнами, плотных и пористых 3D-форм, пломбировочного материала.

Свойства поверхности имплантатов изучены с применением сканирующей электронной микроскопии (*HITACHI TM-3000*) и прибора для измерения краевых углов DSA-25E (*Krüss*, Германия), распределение пор по размерам – с использованием жидкостного экструзионного порозиметра (*Liquid Extrusion Porosimeter LEP*), физико-механические характеристики образцов – с применением универсальной тестовой разрывной машины *Instron 5565,5 KN*. Испытания на твердость проводили на твердомере ZHU 250.

Оценку адгезивных свойств изделий из ПГА проводили в культуре мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток крыс: костного мозга (ММСК-КМ) и жировой ткани (ММСК-ЖТ), дифференцированных в клетки остеобластического ряда, с регистрацией морфологии, адгезии и роста жизнеспособных клеток (МТТ-тест, РЭМ (*HITACHI TM-3000*)). Дифференцировка клеток в остеобластоподобные клетки подтверждена измерениями активности щелочной фосфатазы, внеклеточными преципитатами солей Са и Р, экспрессией генов к маркеру BGP, окрашиванием по *Von Kossa (Sigma)*.

Остеопластические свойства разработанных имплантатов и материалов изучены на моделях костного дефекта черепа крыс (120 дней, 48 животных), костного дефекта бедренной кости диафизарной зоны кроликов (90 дней, 12 животных), хронического остеомиелита длинных трубчатых костей кроликов (90 дней, 60 животных). Исследовали состояние животных, показатели крови, реакцию тканей на имплантацию ПГА гистологической техникой (*Leica MDE*), течение репаративного остеогенеза с применением R-рентгенографии и компьютерной томографии. Эксперименты проведены в соответствии с Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (разрешение от комиссии СФУ по биоэтике).

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием стандартного пакета прикладных программ Microsoft Excel.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

1 Свойства образцов ПГА различного химического состава

Получена серия образцов ПГА различного химического состава: гомогенный полимер 3-гидроксимасляной кислоты П(3ГБ) и двухкомпонентные сополимеры 3-гидроксибутирата и 3-гидроксивалерата П(3ГБ/3ГВ) с включением 3ГВ 10,1 мол.%, 3-гидроксибутирата и 4-гидроксибутирата П(3ГБ/4ГБ) с включением 4ГБ 10 мол.% (таблица 1).

Наиболее высокие значения Мв (723 кДа) и Мч (1200 кДа) были характерны для гомополимера П(3ГБ) на фоне самого низкого значения полидисперсности (1,66) и высокой степени кристалличности C_x (76 %). Для сополимерных образцов зарегистрированы более низкие значения молекулярной массы (300–477 кДа), в 1,5–1,8 раз ниже гомополимера и кристалличности C_x 43 и 58 % для П(3ГБ/4ГБ) и П(3ГБ/3ГВ) соответственно. Соотношение кристаллической и аморфной фаз в сополимерных образцах иное,

поэтому им свойственно явление амморфизации вследствие включения в С-цепь 3-гидроксибутирата мономеров 3ГВ и, в особенности, 4ГБ и выравнивания соотношение фаз. Температуры плавления и термической деградации сополимерных образцов составили $T_{пл}$ 170 ºС, $T_{дегр}$ 268 ºС, гомополимера $T_{пл}$ 179,7 ºС, $T_{дегр}$ 273 ºС соответственно.

Таблица 1 – Физико-химические свойства ПГА различного химического состава

Состав полимеров, мол.%	$M_ч$, кДа	$M_в$, кДа	ПД	$C_х$, %	$T_{пл}$, °С	$T_{дегр}$, °С
П(3ГБ) 100	723 ± 6,0	1200 ± 14,8	1,66 ± 0,04	76 ± 1,2	179,7 ± 0,5	273,0 ± 0,5
П(3ГБ/3ГВ) 89,9/10,1	300 ± 4,7	980 ± 20,0	3,26 ± 0,05	58 ± 1,0	169,0 ± 0,5	270,0 ± 0,5
П(3ГБ/4ГБ) 90,0/10,0	477 ± 4,0	1100 ± 11,0	2,32 ± 0,03	43 ± 0,5	170,0 ± 0,5	268,0 ± 0,5

С использованием образцов ПГА получены и исследованы полимерные растворы в хлороформе различной вязкости от 16,24 до 132.10 сП. Из исходного хлопьевидного полимера при измельчении на ультрацентробежной лабораторной мельнице ZM 200, получен порошок с фракционным составом частиц размером от 40 мкм до 1 мм. Охарактеризованные системы в виде растворов и порошка были использованы для конструирования изделий разной геометрии.

2 Исследование и отработка условий конструирования имплантатов из ПГА

Пломбировочный материал на основе П(3ГБ)

Получен порошкообразный пломбировочный материал из П(3ГБ), представленный частицами анизадиаметрической формы, в виде несимметричных и разноостных пластинок размером от 10 до 600 мкм, насыпной плотностью (0,057 ± 0,001) г/мл.

Способность порошка к поглощению водяного пара из воздуха (гигроскопичность) определена на уровне (0,8 ± 0,006) %. К серии образцов порошка П(3ГБ) были добавлены антибиотики тиенам и цефтриаксон в следующих соотношениях «полимер:антибиотик»: 85:15; 90:10; 95:5.

Конструирование имплантатов разной геометрии

Получены и исследованы полимерные 2D- и 3D-имплантаты на основе П(3ГБ/4ГБ) (рисунок 1): гладкие пленки (краевой угол смачивания водой 56,3º); нетканые мембраны, сформированные ультратонкими волокнами диаметром 1,7 мкм; пористые 3D-имплантаты, полученные техникой выщелачивания и лиофилизации.

Для получения пленок использовали ПГА следующего состава: гомополимер П(3ГБ) и сополимеры П(3ГБ/3ГВ) с включением 3ГВ 10,1 мол. %,

П(3ГБ/4ГБ) с включением 4ГБ 10 мол.%. Топография поверхности пленок из П(3ГБ) и П(3ГБ/3ГВ) имела минимальную рельефность, достаточно плотную структуру. На развитой поверхности сополимерной пленки П(3ГБ/4ГБ) отмечены многочисленные неровности и множественные поры размером до 10 мкм. Величина краевого угла смачиваемости водой поверхности пленки из сополимера П(3ГБ/4ГБ) достоверно ниже, чем у пленки из П(3ГБ) (73,5 ± 1,39)º, и составила (56,3 ± 1,12)º; у П(3ГБ/3ГВ) – (64,3 ± 1,7)º. По данным физико-механических исследований установлено, что модуль Юнга в 1,5 раза был выше у пленок из гомополимера П(3ГБ) (1602,15 ± 12,45 МПа), по сравнению с сополимерными пленками из П(3ГБ/4ГБ) (1380 ± 11,7 МПа).

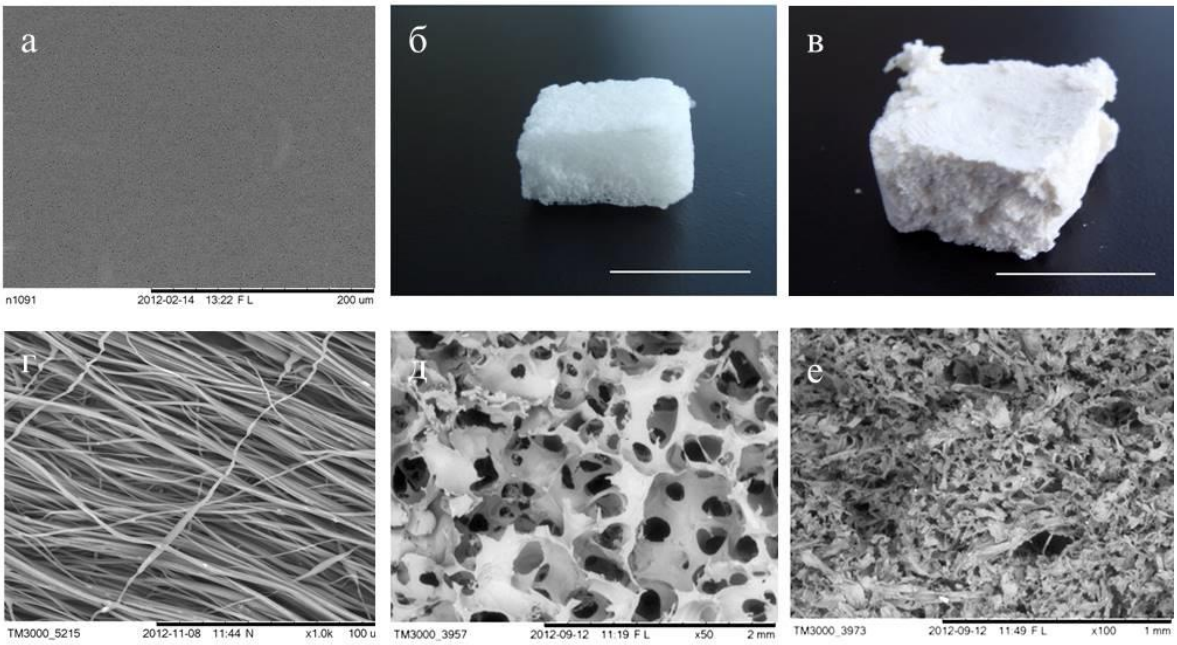

Рисунок 1 – Изделия разной геометрии: а – пленка; б, д – 3D-имплантат, полученный выщелачиванием сахарозы; в, е – 3D-имплантат, полученный лиофильным высушиванием растворов; г – нетканая мембрана, полученная ЭСФ (б, в – фотографии, маркер 1 см)

Нетканые мембраны, различающиеся структурой и диаметром ультратонких волокон, получены методом электростатического формования (ЭСФ) из П(3ГБ) и сополимера П(3ГБ/4ГБ) с включением 4ГБ 10 мол.%. Средний диаметр волокон из П(3ГБ/4ГБ) был достоверно ниже (1,7 мкм) полученных из гомополимера П(3ГБ) (2,9 мкм). Мембраны из гомополимера имели более высокие прочностные характеристики, определяемые по величине модуля Юнга (543,03 МПа) и напряжению при разрыве (11,17 МПа).

Пористые 3D-имплантаты из П(3ГБ) получены техникой выщелачивания сахарозы и лиофилизации замороженных растворов полимера. Суммарная площадь всех выделенных пор исследуемых 3D-имплантатов, составила 88 %. При этом крупные поры размером 110–120 мкм составляли до 90 %; 10 % приходились на поры размером 5,7–10 мкм. Влагопоглощение составило 2,6 см^3/г, модуль Юнга – 3,23 МПа, напряжение 0,20, деформация 27,7 %.

Суммарная пористость образцов, полученных методом лиофилизации, составила порядка 80–82 %. Наибольшее количество пор (80 %) имели размеры от 40 до 60 мкм; до 15 % приходилось на более мелкие поры (10–30 мкм), влагопоглощение 3,9 $см^3$/г.

Из порошков с разным диаметром частиц методом прямого холодного прессования получена серия плотных 3D-имплантатов (рисунок 2).

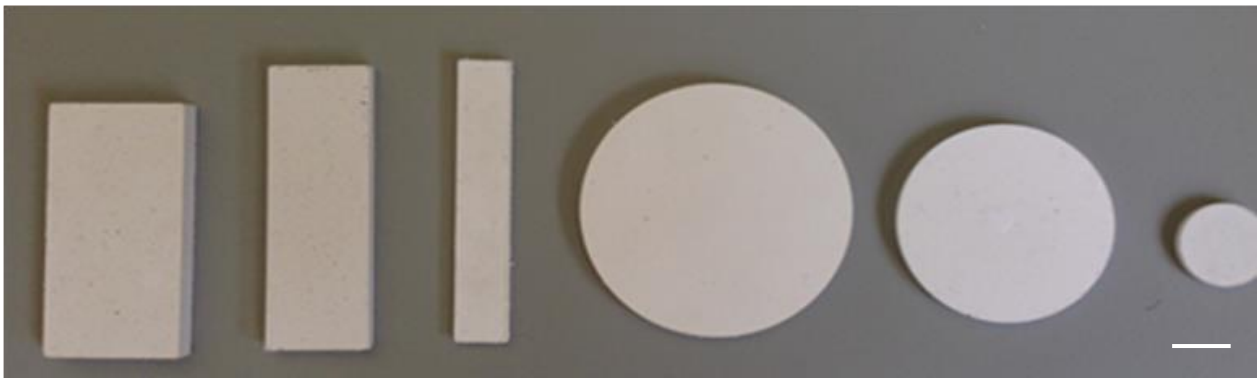

Рисунок 2 –Экспериментальные образцы прессованных форм разной геометрии, изготовленные из П(3ГБ). Маркер 1 см

Установлены параметры фракционного состава порошка для процесса прессования: размер частиц от 0,45 до 500 мкм; насыпная плотность 0,076 г/мл; сила прессования 14 000 F; твердость 55 $Н/мм^2$. Эти условия обеспечивают получение изделий со следующими физико-механическими характеристиками: модуль Юнга – 2614,31 МПа; нагрузка при разрушении – 12,03 N; напряжение при разрушении – (18,8 ± 0,63) МПа. Значения соответствуют характеристикам прочности губчатой кости.

3 Исследование модификации поверхности прессованных 3D-форм обработкой CO_2-лазером

Имплантаты с гладкой и плотной поверхностью, лишенные перфораций зачастую не обеспечивают активной пролиферации остеобластов и оптимальных сроков формирования костной ткани *de nova* в силу низких адгезионных свойств поверхности. Для устранения этих ограничений исследовано влияние режимов CO_2-лазера (диаметр луча (D) от 0,05 до 0,1 мм и высота луча (h) от 0,25 до 1,0 мм) на структуру и физико-механические свойства прессованных 3D-имплантатов из П(3ГБ) (рисунок 3).

Лазерная обработка полимерных изделий в исследованных режимах сопровождалась формирование сквозных перфораций по всей поверхности 3D-форм.

В зависимости от диаметра и высоты лазерного луча диаметра пор и расстояние между ними варьировали: при D = 0,05 мм, h = 1,0 мм расстояние между порами составило 600 мкм, а при D = 0,05 мм, h = 0,25 мм значительно меньше (100 мкм). Самые мелкие поры (100 мкм) получены при обработке лучом D = 0,05 мм, h = 0,25 мм; самые крупные (300 мкм) – при D = 0,05 мм,

h = 1,0 мм. Формирование пористости 3D-имплантатов сопровождалось изменением физико-механических свойств. Образцы, обработанные лазером с параметрами луча D = 0,05 мм, h = 0,25 мм, имели наибольшие показатели модуля Юнга (2,24 ГПа) и механической прочности: напряжения при изломе (11,6 МПа).

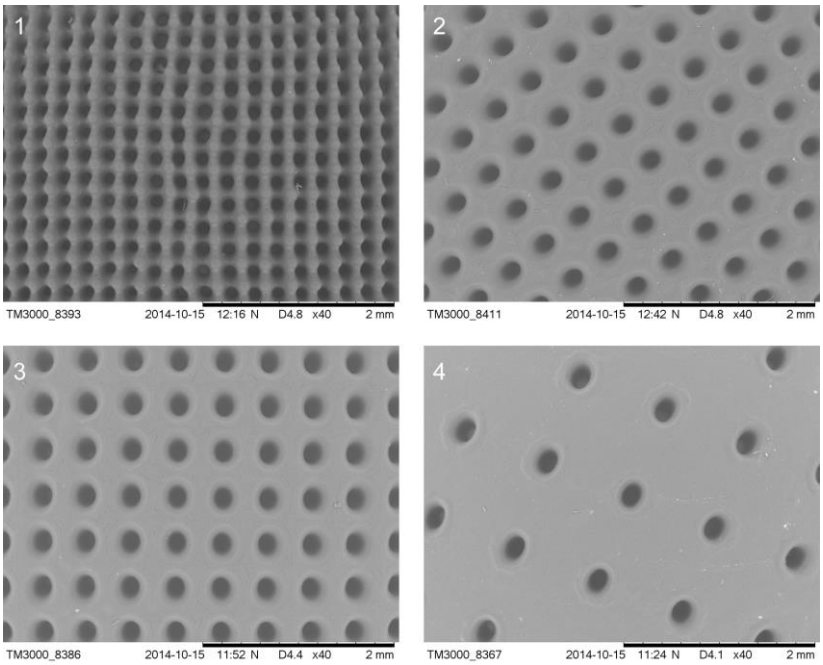

Рисунок 3 – РЭМ снимки 3D-имплантатов из П(3ГБ), обработанных CO_2-лазером в различных режимах в зависимости от диаметра (D) и высоты (h) луча: 1- D=0,05 мм, h=0,25 мм; 2 – D=0,1 мм, h=0,5 мм; 3 – D=0,05 мм, h=0,5 мм; 4 – D=0,05 мм, h=1,0 мм. Маркер 2 мм

Таким образом, показано, что применение лазерной обработки 3D-имплантатов позволяет влиять на структуру и свойства поверхности изделий и физико-механические характеристики.

4 Исследование имплантатов ПГА в культурах клеток *in vitro*

Адгезивные свойства опорных клеточных носителей из ПГА в культуре ММСК костного мозга

Полимерные наливные гладкие пленки, нетканые мембраны, 3D-имплантаты, полученные техникой выщелачивания и лиофилизации П(3ГБ/4ГБ), исследованы в качестве опорных клеточных носителей в культуре ММСК-КМ в ростовой среде, содержащей факторы остеогенной дифференцировки (0,15 мМ аскорбиновой кислоты, 10 нМ дексаметазона и 10 мМ β-глицерофосфата). Клетки, адгезированные на поверхности имплантатов, имели округлую форму и были равномерно распределены по поверхности всех типов носителей (рисунок 4).

Наибольшее количество жизнеспособных клеток по результатам МТТ-теста на 14 сутки культивирования отмечено на нетканых мембранах и пористых 3D-имплантатах (2-2,3 × 10^5 клеток/мл), полученных методом выщелачивания. Меньшее количество клеток (1,2-1,5 × 10^5 клеток/мл) зарегистрировано на образцах, полученных в результате лиофильного высушивания замороженного полимерного раствора, имеющих меньший размер пор (40-60 мкм). Данные МТТ-теста согласуются с результатами измерения активности щелочной фосфатазы (ЩФ) (маркера дифференцировки

остеобластов), которые показали, что наиболее высокая активность фермента была в культуре клеток, растущих на носителях, полученных методом ЭСФ, и 3D-носителях, полученных методом выщелачивания (4,023 и 3,908 ммоль/минуту × 10^5 клеток соответственно).

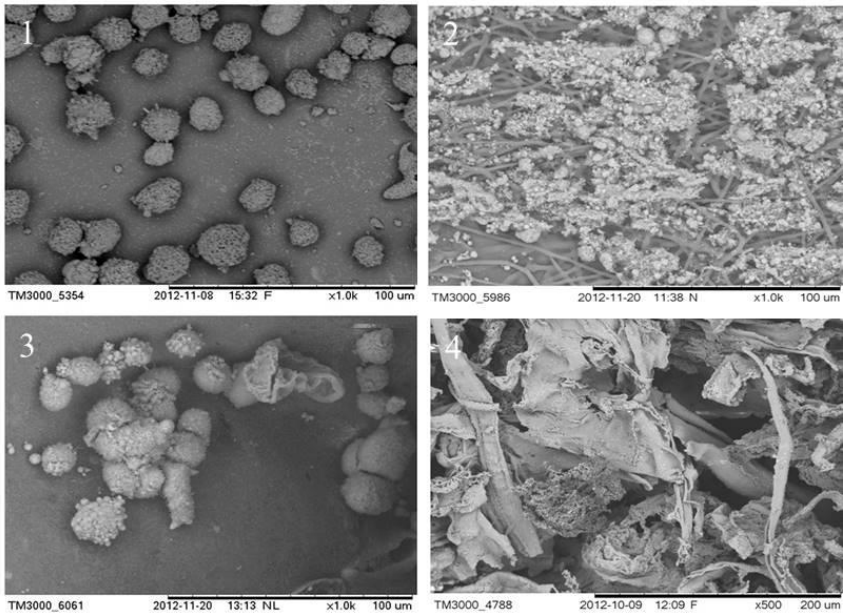

Рисунок 4 – РЭМ-снимки остеобластов, полученных из ММСК-КМ, культивируемых на разных типах носителей:1 – пленка; 2 – мембрана; 3 – 3D-носитель, полученный техникой выщелачивания; 4 – 3D-носитель, полученный лиофилизацией

Соотношение солей Ca/P в составе внеклеточных преципитатов было различным и составило 1,88 на лиофильном 3D-носителе; 2,46 на нетканой мембране; 2,78 на пленках и 3,12 на 3D-носителе, изготовленном техникой выщелачивания, имеющем самые крупные поры (110-120 мкм).

Высокопористые изделия не всегда соответствуют прочностным характеристикам костной ткани, а плотные 3D-имплантаты имеют слабые адгезивные свойства. Поэтому следующим этапом стало исследование 3D-имплантатов, обработанных CO_2-лазером (рисунок 5). Адгезивные свойства поверхности, обработанной лазерной резкой, 3D-пластин исследованы в культуре ММСК-КМ, дифференцированных в остеобластоподобные клетки. По данным МТТ-теста после 10 дней культивирования ММСК наибольшее количество жизнеспособных клеток 1,2 × 10^5 кл/см^2 зарегистрировано на пластинах, обработанных CO_2-лазером при параметрах луча D = 0,05 мм, h = 0,25 мм, это в три раза больше количества клеток на пластинах, обработанных при следующих параметрах: D = 0,05 мм, h = 0,5 мм и D = 0,05 мм, h = 1 мм соответственно. На пластинах с перфорациями небольшого диаметра (100 мкм) и высокой плотностью пор (72/мм^2) клетки располагались как на поверхности стыков между порами, так и в самих порах (рисунок 5). При меньшей плотности пор (5/мм^2) и большем диаметре пор (300 мкм) клетки преимущественно располагались внутри пор, локализуясь возле микротрещин и неровностей, обусловленных микродефектами после обработки. Лазерная обработка улучшает свойства поверхности плотных прессованных 3D-носителей из П(3ГБ) и делает их пригодными для культивирования клеток.

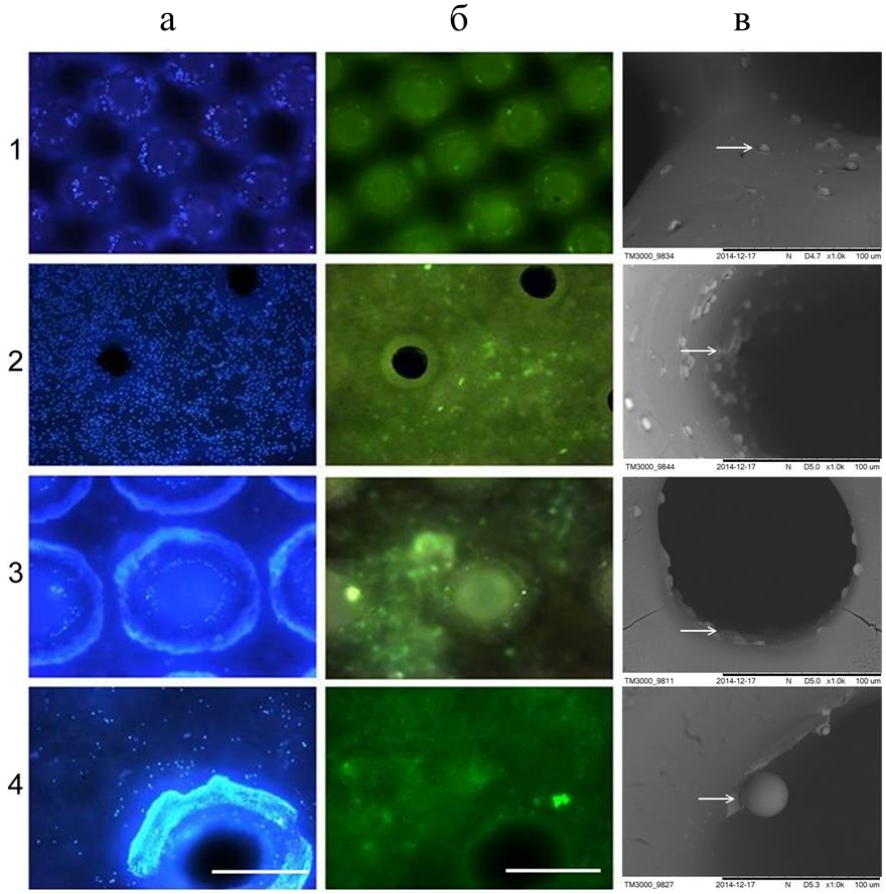

Рисунок 5 – Флуоресцентная микроскопия дифференцированных ММСК-КМ костного мозга: окрашивание DAPI (а) и FITC (б), увеличение × 1000; РЭМ-снимки (в), маркер 100 мкм на пластинах из П(3ГБ), после обработки CO_2-лазером*: 1 – D = 0,05 мм, h = 0,25 мм; 2 – D = 0,10 мм, h = 0,50 мм; 3 – D = 0,05 мм, h = 0,5 мм; 4 – D = 0,05 мм, h = 1 мм (D – диаметр луча, h – высота луча)*

Показано, что все типы сконструированных носителей из ПГА, полученных различными технологиями, пригодны для культивирования клеток ММСК-КМ.

Сравнительное исследование роста и дифференцировки ММСК, выделенных из различных источников, на носителях из ПГА

Помимо ММСК, получаемых из костного мозга, перспективным источником получения клеток является жировая ткань. В отличие от клеток-предшественников, выделяемых из костного мозга, стромальные клетки жировой ткани (ММСК-ЖТ) более доступны, их можно выделять в большем количестве и дифференцировать в том числе в остеогенном направлении, при этом возраст донора не играет большой роли.

Исследована способность имплантатов из ПГА поддерживать пролиферацию и направленную дифференцировку ММСК из костного мозга и жировой ткани половозрелых крыс линии Вистар в остеобластическом направлении. В качестве опорных клеточных носителей были исследованы

3D-имплантаты из П(3ГБ) размером 5×5 мм^2, полученные техникой выщелачивания. По результатам МТТ-теста максимальное количество жизнеспособных клеток было зарегистрировано на клеточных носителях с дифференцированными клетками ММСК-ЖТ (2,3 × 10^5 клеток/см^2) на 21 сутки культивирования. Данные МТТ-теста согласуются с измерением активности щелочной фосфатазы, в культуре остеобластов из ММСК-ЖТ этот показатель был в 1,5 раза выше (3,6 моль/мин × 10^5 клеток на 21 сутки), чем для остеобластов из ММСК-КМ (2,55 моль/мин × 10^5 клеток) (рисунок 6).

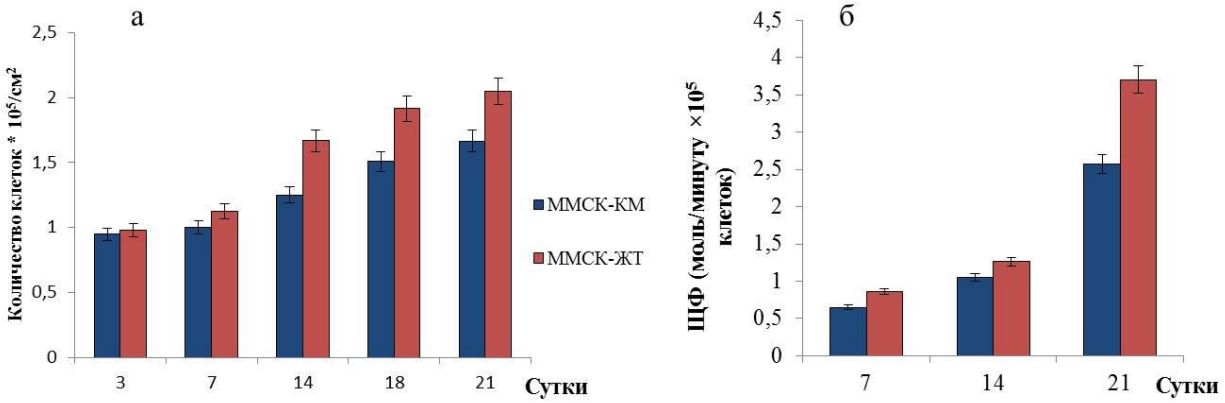

Рисунок 6 – Количество жизнеспособных клеток (МТТ-тест) (а) и активность щелочной фосфатазы (ЩФ) (б) остеобластов, дифференцированных из ММСК-КМ и ММСК-ЖТ, культивируемых на полимерных пористых 3D-носителях из П(3ГБ)

Остеогенная дифференцировка ММСК-КМ и ММСК-ЖТ в остеобласты подтверждена количественной оценкой экспрессии генов к маркеру BGP. На 21 сутки культивирования соотношение копий кДНК у клеток из ММСК-КМ сменилось значительным падением уровня экспрессии (до 85 тыс.) по сравнению с дифференцированными клетками из ММСК-ЖТ (126 тыс.). Продукция солей кальция и фосфатов остеобластами, дифференцированными из ММСК-ЖТ и ММСК-КМ, качественно подтверждена окрашиванием по Von Kossa (рисунок 7).

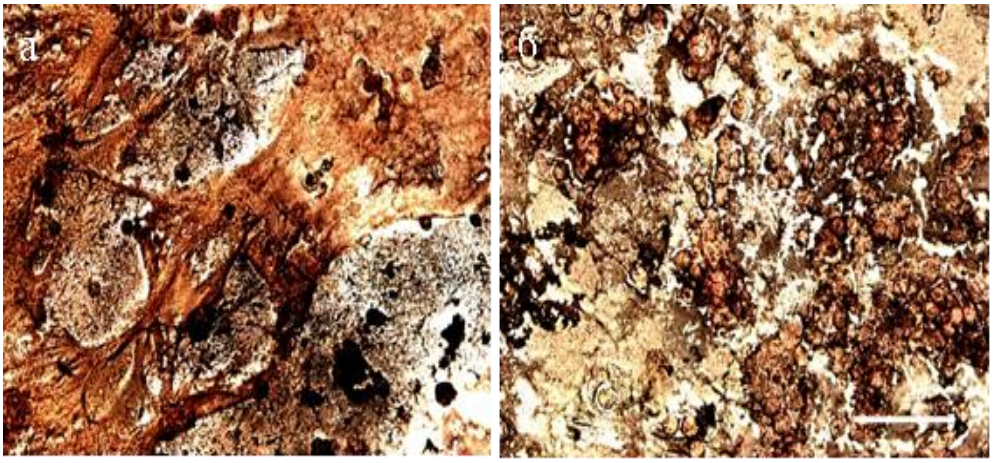

Рисунок 7 – Окрашивание клеток Von Kossa: а – остеобласты из ММСК-КМ; б – остеобласты из МСК-ЖТ. Маркер 100 мкм

Результаты позволили сконструировать 3D-имплантаты с дифференцированными остеобластами для проведения исследований на лабораторных животных *in vivo*.

5 Исследование остеопластических свойств ПГА *in vivo*

Исследование 3D-имплантатов из П(3ГБ) для регенерации модельного дефекта костей черепа лабораторных животных

Эксперимент проведен на самках крыс линии Вистар (масса 200–250 г), которым, соблюдая правила гуманного обращения с животными, под общим наркозом «Золетил 100» (0,2 мл) при помощи бормашины формировали дефект (диаметр 5–6 мм, без повреждения твердой мозговой оболочки), куда имплантировали заготовленные заранее имплантаты. Животных разделили на 4 группы (n = 48): группа 1 – контроль (–), восстановление дефекта под кровяным сгустком; группа 2 – сравнения, коммерческий препарат «Коллапол»; экспериментальные: группа 3 – экспериментальная, пористые 3D-имплантаты из П(3ГБ); группа 4 – пористые 3D-имплантаты из П(3ГБ) с остеобластами (тканеинженерные графты). Все животные удовлетворительно перенесли оперативное вмешательство; значимых осложнений не выявлено. По данным гистологических исследований, динамика регенерации модельного дефекта черепа имела отличия между группами (рисунок 8).

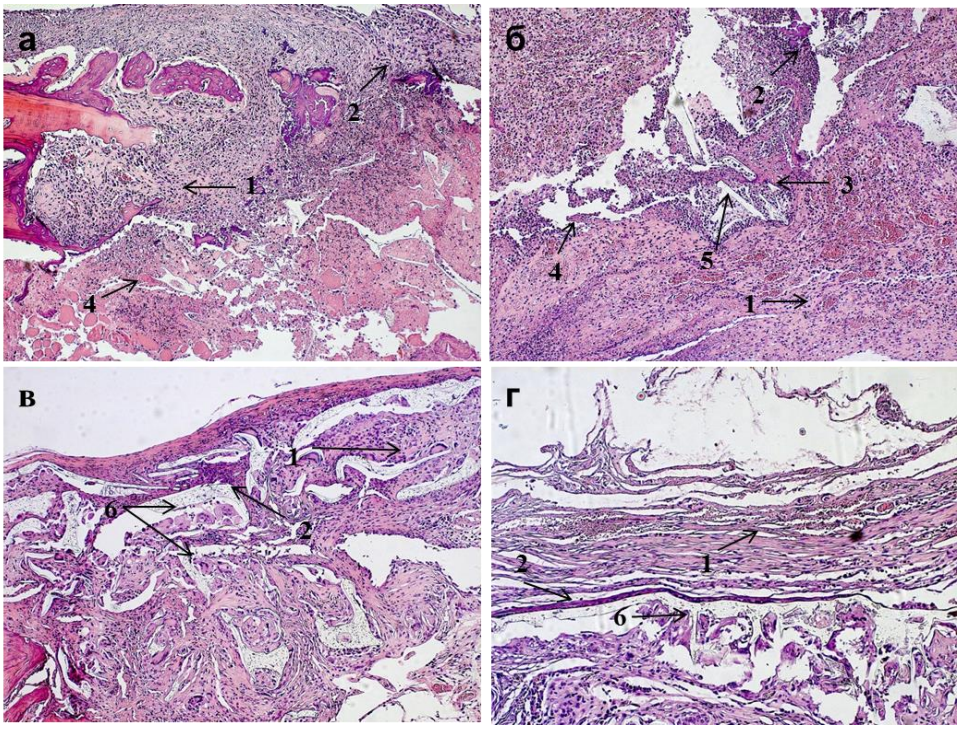

Рисунок 8 – Гистологические исследования фрагментов костных регенератов после 30 суток имплантации: а – контрольная группа; б – «Коллапол»; в – пористый 3D-имплантат П(3ГБ); г – пористый 3D-имплантат П(3ГБ) с остеобластами. Стрелками обозначены: 1 - фиброзная ткань; 2 – лейкоцитарная инфильтрация; 3 – плазматические клетки; 4 – лейкоциты; 5 – «Коллапол»; 6 – пористый имплантат П(3ГБ). Увеличение х 100

На 30 сутки в контрольной группе и группе сравнения определялся дефект, частично заполненный некротическими массами и фиброзной тканью, с обильной лейкоцитарной инфильтрацией. В эти же сроки после имплантации пористого матрикса П(3ГБ) и в композиции с остеобластами, дефект кости был заполнен фиброзной тканью различной степени плотности, однако, по сравнению с коммерческим препаратом, воспалительная инфильтрация фиброзной ткани была выражена в меньшей степени. На 90 сутки эксперимента в контрольной группе в центральных участках дефекта наблюдали активное формирование грубоволокнистой ткани, в группе сравнения центральная часть дефекта так же была заполнена грубоволокнистой тканью, содержащей очаговые воспалительные инфильтраты. В экспериментальных, в отличие от предыдущих групп, зона дефекта было заметно меньших размеров, заполнена хорошо васкуляризованной соединительнотканной мозолью.

Через 120 суток при имплантации тканеинженерного имплантата отмечено полное завершение картины репаративного остеогенеза; вновь сформированы костномозговые полости с достаточным количеством типичного костного мозга без реактивных изменений, с высоким содержанием адипоцитов. Близкая картина получена в группе с 3D-имплантатом из П(3ГБ) (рисунок 9).

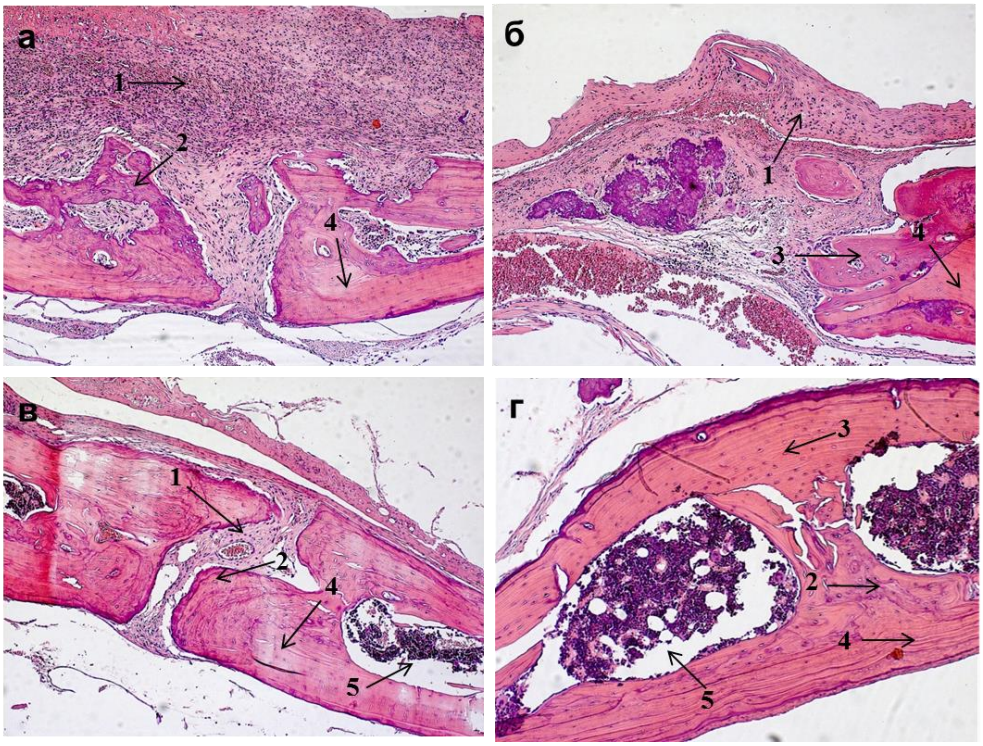

Рисунок 5.7 – Гистологические исследования фрагментов костных регенератов после 120 суток имплантации: а – контрольная группа; б – группа сравнения («Коллапол»); в – пористый 3D-имплантат П(3ГБ); г – пористый 3D-имплантат П(3ГБ) с остеобластами. Стрелками обозначены: 1 - фиброзная ткань; 2 - новообразованная костная ткань; 3 -остеоциты; 4 - пластинчатая костная ткань; 5 - костный мозг. Увеличение х 100костная ткань; 5 – костный мозг. Увеличение ×100

Гистологические исследования были подтверждены компьютерной томографией (рисунок 10), которая показала, что дефект на 100 % регенерировал при заполнении его гибридным имплантатом с остеобластами, на 90% после имплантации П(3ГБ). В группе отрицательного контроля и группе сравнения размер дефекта сократился на 75–79 %.

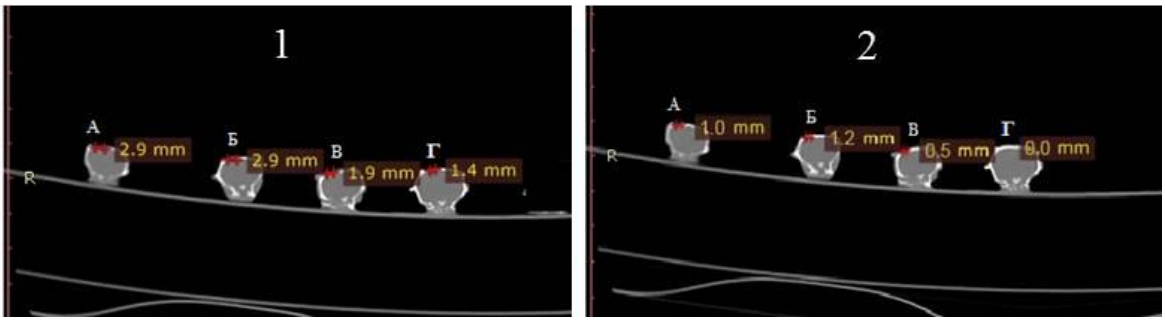

Рисунок 10 – Компьютерная томография (фронтальная плоскость) восстановления костного дефекта черепа крыс через 90 (1) и 120 (2) суток после операции: А – контроль ; Б – группа сравнения; экспериментальные группы, В –пористый 3D-имплантат П(3ГБ); Г –пористый 3D-имплантат П(3ГБ) в композиции с остеобластами (область дефекта обозначена красным цветом)

Выполненные исследования показали эффективность использования полимерных и гибридных 3D-имплантатов из П(3ГБ) для устранения дефектов костей черепа.

Исследование 3D-имплантатов из П3(ГБ) в эксперименте с модельным дефектом трубчатой кости кролика

Остеопластические свойства П(3ГБ) исследованы на модели костного дефекта бедренной кости диафизарной зоны у кроликов-самцов породы шиншилла 4-5 месячного возраста. Под ксилазиновым наркозом, после обработки операционного поля по переднемедиальной поверхности бедра животным проводили разрез кожи длиной 5 см, мышцы тупым способом разводили и фиксировали: с помощью остеотома моделировали костный дефект размером 4 мм. Костный дефект в экспериментальной группе закрывали пористым матриксом на основе П(3ГБ), в группе сравнения – композитным материалом «Коллапол» («Полистом», Москва), в контрольной группе заполняли крошкой аутокости. Восстановление аппетита и двигательной активности ноги произошло на 3–5 сутки, на 7–9 сутки у животных группы сравнения появлялся отек мягких тканей в области операции. В среднем на 10,5 ± 1,2 сутки отек и гиперемия купировались.

Через 30 суток в зоне дефекта при имплантации пористого 3D-имплантата П(3ГБ) отмечена незначительная перифокальная воспалительная реакция, в группе сравнения в эти сроки наблюдали выраженную воспалительную инфильтрацию по типу лейкоцитарного вала. В контрольной

группе после оперативного вмешательства дефект в центре был заполнен грубоволокнистой тканью (рисунок 11).

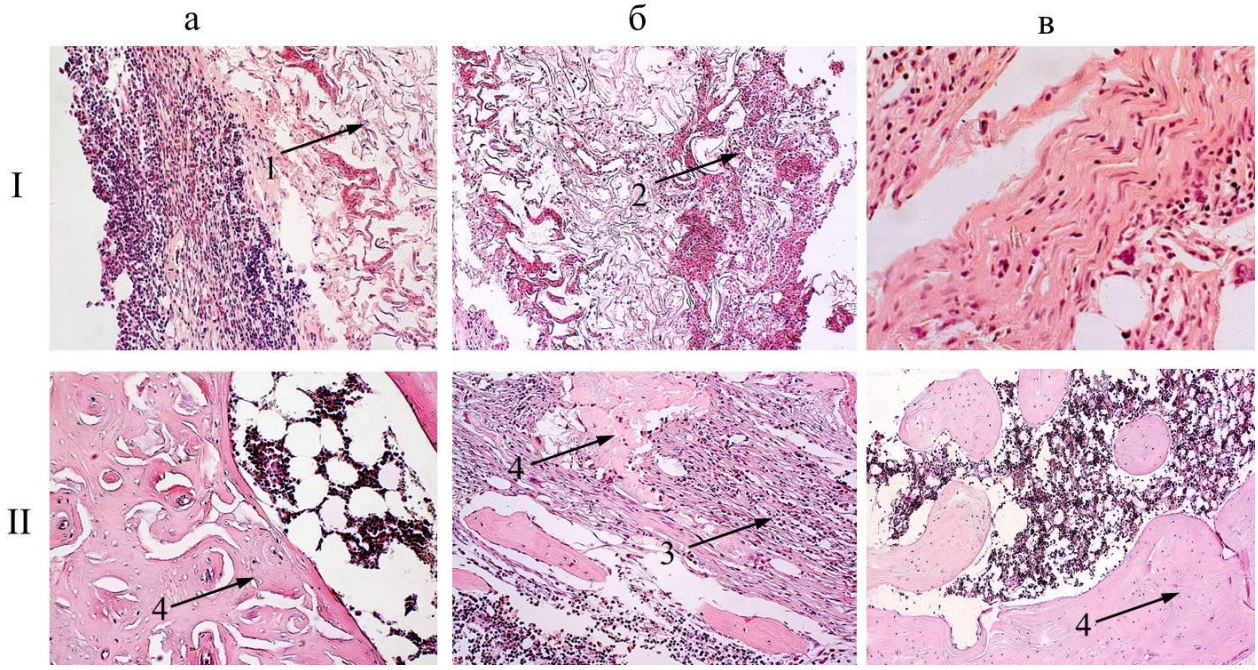

Рисунок 11 – Гистологические исследования фрагментов костных регенератов после имплантации (I – 30, II – 90 суток): а – экспериментальная группа, пористый 3D-имплантат из П(3ГБ); б – группа сравнения, коммерческий препарат «Коллапол»; в – контрольная группа, крошка аутокости. Стрелками указаны: 1 – 3D-имплантат из П(3ГБ); 2 – «Коллапол»; 3 – волокнистая соединительная ткань; 4 – новообразованная костная ткань. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение ×100

К окончанию эксперимента (90 суток) в зоне имплантации П(3ГБ) отмечено активное формирование новообразованной кости пластинчатого строения и формирование остеонов, костномозговой канал был заполнен костным мозгом. При имплантации «Коллапола» морфологические признаки репаративного остеогенеза костной ткани выражены слабее. В центре дефекта сохранялись прослойки плотной неоформленной соединительной ткани. В контрольной группе преобладала костная ткань с малочисленными остеонами, межклеточное вещество рыхлое. Костномозговой канал резко сужен, не закрыт замыкательной пластинкой.

Показано, что при имплантации пористого 3D-имплантата из П(3ГБ) процесс регенерации костной ткани происходит быстрее, чем в группах контрольной и сравнения, с менее выраженным воспалительным процессом и активным формированием новообразованной кости, имеющей зрелый характер.

Исследование пломбировочного материала из П(3ГБ)
на модели хронического остеомиелита

На самцах кроликов породы шиншилла исследовали регенерацию модельного дефекта длинной трубчатых кости, осложненного остеомиелитом. Под калипсол-дроперидоловым наркозом проводили пластику костных дефектов, вскрывали гнойные затеки, удаляли некротические ткани. В процессе операции отбирали пробы для определения возбудителя и чувствительности к антибиотикам. Образовавшуюся костную полость тщательно обрабатывали ложкой Фолькмана, промывали антисептиками (раствор хлоргексидина, пливасепт). Использовали 60 животных (три группы по 20 животных): две экспериментальные (пломбировочный материал П(3ГБ) и П(3ГБ)/тиенам) и контрольная группы (материал аллокости).

При замещении костных полостей экспериментального остеомиелита пломбировочным материалом на основе П(3ГБ) наблюдали достоверно более быстрое заживление послеоперационных кожных ран и восстановление опорных свойств оперированной конечности, по сравнению с контрольной группой.

При исследовании микробного профиля контрольной группы на 30 и 90 сутки высевались ассоциации микроорганизмов, среди которых доминировали (48,2 %) *Staphilococcus aureus*. В экспериментальной группе с использованием П(3ГБ) на 30 сутки высевались ассоциации микробов преимущественно 55,9 % ассоциации грамположительных, грамотрицательных анаэробных микроорганизмов, *Escherichia coli*, на 90 сутки бактериоскопические посевы были отрицательными. В группе животных с использованием П(3ГБ)/тиенам пробы биоматериалов при бактериоскопическом исследовании показали отсутствии роста микроорганизмов на более ранних сроках.

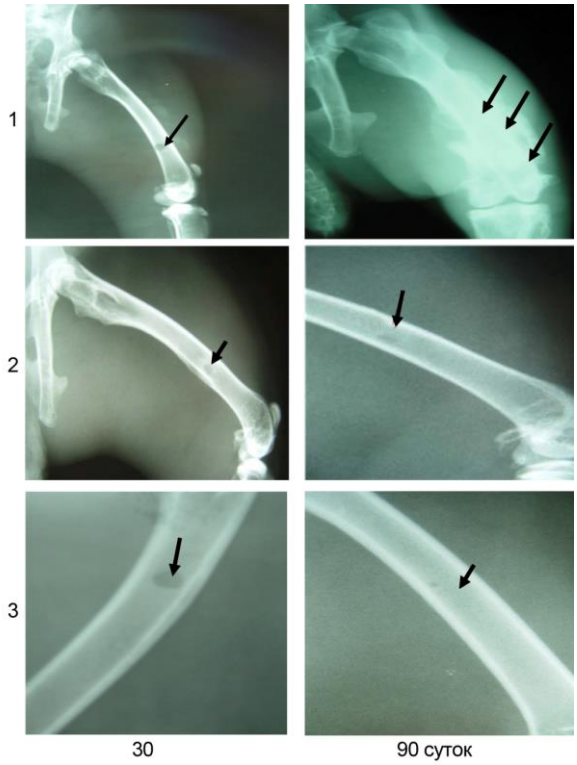

Рисунок 12 – Данные рентгенологических исследований динамики восстановления дефектов костной ткани, инфицированных Staphilococcus aureus, при использовании различных имплантатов:
1 – контрольная группа (материал аллокости);
2 – экспериментальная группа, пломбировочный материал П(3ГБ),
3 – экспериментальная группа, пломбировочный материал П(3ГБ) в сочетании с тиенамом

Анализ рентгенографических данных оперированных конечностей животных (рисунок 12) выявил следующее: на 30 сутки после

применения для пластики дефекта П(3ГБ) и композита П(3ГБ)/тиеанам в проекции костного дефекта определены участки просветления округлой формы с четкими границами с облачковидным затемнением в центре.

На 90 сутки у всех экспериментальных животных рентгенологически подтверждено восстановление анатомической структуры кости. В контрольной группе животных в эти сроки сохранялась неоднородность структуры регенерата и утолщение надкостницы.

Следовательно, при использовании пломбировочного материала П(3ГБ) и П(3ГБ)/тиеанам для пластики костного дефекта, осложненного хроническим остеомиелитом, купирование воспалительного процесса, реконструкция костных дефектов и восстановление функциональных свойств оперированных конечностей происходило значительно эффективнее, чем в контрольной группе животных (использован материал аллокости).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы и охарактеризованы образцы ПГА различного химического строения и исследованы методы переработки полимеров в специализированные изделия, обеспечивающие получение семейства изделий предназначенных для устранения костных дефектов на которые получены сертификаты соответствия в ФБУ «Государственный региональный центр стандартизации, метрологии и испытаний в Красноярском крае». Опытные образцы переданы для проведения экспериментально-клинических исследований в Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого.

ВЫВОДЫ

1. Синтезированы и исследованы образцы ПГА различного химического состава: поли-3-гидроксибутират [П(3ГБ)], сополимеры 3-гидроксибутирата с 4-гидроксибутиратом [П(3ГБ/4ГБ)] и 3-гидрокисвалератом [П(3ГБ/3ГВ)], различающиеся степенью кристалличности (от 43 до 76 %) и молекулярной массой (от 477 до 723 кДа); получены полимерные порошки, образованные частицами размером от 40 мкм до 1 мм в различном соотношении, и растворы различной вязкости (от 16,24 до 132,10 сП).

2. Техникой контактного холодного прессования, выщелачивания, лиофилизации, испарения растворителя, электростатического формования сконструировано семейство полимерных пленок, нетканых матриксов и 3D-имплантатов, различающихся структурой поверхности по величине краевого угла (от 54,3º до 71,1º), поверхностной энергией (от 38,9 до 56,1 мН/м), пористостью (80–89 %) и механической прочностью (Модуль Юнга от 1,06 ГПа до 2,2 ГПа, предел прочности и деформация при разрушении от 1,16 до 10,8 %).

3. Исследовано влияние CO_2-лазера (Laser Pro Spirit) в режиме растровой и векторной гравировки, при варьировании параметра луча, на свойства поверхности 3D-имплантатов из П(3ГБ) и определены режимы, обеспечивающие повышение пористости (от 5/мм^2 до 72/мм^2) и Модуля Юнга (от 1,8 МПа до 2,2 МПа), что положительно влияет на адгезию и пролиферацию мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (ММСК).

4. Все типы разработанных имплантатов не проявляют цитотоксичности в культуре клеток и обеспечивают направленную дифференцировку ММСК костного мозга и жировой ткани в клетки остеобластического ряда, что подтверждено определением активности щелочной фосфатазы, внеклеточных преципитатов солей кальция и фосфора, окрашиванием на остеопонтин, экспрессией генов костного белка BGP.

5. Пористые 3D-имплантаты из П(3ГБ) и в сочетании с остеобластами, дифференцированными из ММСК жировой ткани, обладают выраженными остеопластическими свойствами, медленно деградируют *in vivo*, обеспечивая закрытие модельного дефекта плоских костей черепа лабораторных животных за 120 суток на 90 и 100 % соответственно.

6. Доказано, что пористые 3D-имплантаты из П(3ГБ) и пломбировочный материал в сочетании с тиенамом обеспечивают в течение 90 дней закрытие дефектов трубчатых костей лабораторных животных, в том числе осложненных инфекцией *Staphylococcus aureus*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Шумилова А.А.** Остеопластические свойства макропористых имплантатов на основе поли-3-гидроксибутирата в регенерации костного дефекта трубчатой кости кролика / А.А. Шумилова, Е.И. Шишацкая, Н.М. Маркелова, Ю.С. Винник, А.П. Зуев, А.К. Кириченко, Н.С. Соловьева // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 7. – С. 697–706.

2. **Шумилова А.А.** Материалы для восстановления костной ткани / А.А. Шумилова, Е.И. Шишацкая // Журнал Сибирского федерального университета. Серия «Биология». – 2014. – Т. 7. – № 2. – С. 209–221.

3. Shishatskaya E.I. An in vivo study of osteoplastic properties of resorbable poly-3-hydroxybutyrate in models of segmental osteotomy and chronic osteomyelitis/ E.I. Shishatskaya, I.V. Kamendov, S.I. Starosvetsky, Y.S. Vinnik, N.M. Markelova, A.A. Shageev, V.A. Khorzhevsky, O.V. Peryanova, **A.A. Shumilova** // Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. – 2014. – Vol. 40. – P. 344–355.

4. Volova T.G. Laser processing of polymer constructs from poly(3-hydroxybutyrate) / T.G. Volova, A.A. Tarasevicha, A.I. Golubev, A.N. Boyandin, **A.A. Shumilova**, E.D. Nikolaeva, E.I. Shishatskay // J Biomater Sci Polym Ed. – 2015.– Vol. 14. – P. 1–19.

5. Шишацкая Е.И. Культивирование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на носителях из резорбируемого Биопластотана // Е.И. Шишацкая, Е.Д. Николаева, **А.А. Шумилова**, А.В. Шабанов, Т.Г. Волова // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т. 8. – №1. – С. 57–65.

6. Шишацкая Е.И. Исследование остеопластических свойств резорбируемого поли-3-гидроксибутирата *in vivo* на моделях хронического остеомиелита / Е.И. Шишацкая, Ю.С. Винник, Н.Н. Маркелова, А.А. Шагеев, И.В. Камендов, С.И. Старосветский, В.А. Хоржевский, О.В. Перьянова, **А.А. Шумилова**, Р.А. Пахомова // Врач-аспирант. – 2013. – № 1.1 (56). – С. 127–132.

7. Шишацкая Е.И. Исследование остеопластических свойств резорбируемого поли-3-гидроксибутирата in vivo на моделях сегментарной остеотомии / Е.И. Шишацкая, Ю.С. Винник, Н.М. Маркелова, А.А. Шагеев, И.В. Камендов, С.И. Старосветский, В.А. Хоржевский, О.В. Перьянова, **А.А. Шумилова**, Р.А. Пахомова // Креативная хирургия и онкология. – 2012. – № 4. – С. 48–52.

Тезисы докладов и материалов конференций:

8. **Шумилова А.А.** Получение биомедицинских конструкций в виде матриксов из ПГА для задач клеточной и тканевой инженерии / А.А. Шумилова, Е.И. Шишацкая // Материалы международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии». – М., 2012. – С. 144–145.

9. **Шумилова А.А.** Получение биомедицинских конструкций в виде матриксов из ПГА для задач клеточной и тканевой инженерии / А.А. Шумилова, Е. Д. Николаева // Тезисы докладов Международной научно-практической конференции «Инновационные биотехнологии в странах ЕВРАЗЭС». Санкт-Петербург. – 2012. – С. 130.

10. **Shumilova A.A.** Biomedical constructions in the form of scaffolds of the PHA for cell and tissue engineering / A. A. Shumilova, E. I. Shishatskaya // 3 rd Russian-Hellenic symposium with international participation and young scientists school. Greece, Heraklion, Crete. – 2012. – P. 47.

11. **Шумилова А.А.** Трехмерные матриксы на основе ПГА для задач клеточной и тканевой инженерии / А.А. Шумилова, Е. Д. Николаева // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ–2013» [Электронный ресурс] — М.: МАКС Пресс. – 2013. – С. 162–163.

12. **Шумилова А.А.** Получение композитных матриксов из ПГА для культивирования клеток/ А.А. Шумилова, Е.И. Шишацкая // Материалы 17 Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых. Пущино. – 2013. – С. 471.

13. **Shumilova A.A.** Osteoplastic properties of resorbable poly-3-hydroxybutyrate in models of segmental osteotomy and chronic osteomyelitis / A. A. Shumilova, E. I. Shishatskaya// 4 International Conference «Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues». – 2013. – P. 36.

14. **Шумилова А.А.** Исследование роста и дифференцировки ММСК КМ на носителях из БИОПЛАСТОТАНА, полученных различными методами / А.А. Шумилова, Е. Д. Николаева, Е.И. Шишацкая // Материалы международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни». Москва. –2014. – С. 103–104.

15. **Shumilova A.A.** Opportunities of polyhydroxyalkanoates for reconstructive surgery / A. A. Shumilova, E. D. Nikolaeva , E. I. Shishatskaya // Book of Abstracts of the International Symposium on Biopolymers 2014. Brazil. – 2014. – Vol. 51–52.

16. **Shumilova A.A.** Osteogenic potential of polymeric scaffolds based on polyhydroxyalkanoates for regeneration of bone defect of rat's cranium / A.A. Shumilova, E. D. Nikolaeva , E. I. Shishatskaya // 6th International Conference «Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues». Greece, Heraklion, Crete. – 2015. – P. 21