

# Влияние обработки $H_2O_2$ - плазмой на свойства клеточных носителей из резорбируемых полиэфиров «Биопластотан»

Е.Д. Николаева<sup>1</sup>, Д.Б. Гончаров<sup>2</sup>, Е.И. Шишацкая<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Институт биофизики СО РАН, Красноярск

<sup>2</sup>Сибирский федеральный университет, Красноярск

## Effects of $H_2O_2$ -plasma processing on properties of cellular scaffolds made of «Bioplastotan» resorbing polyesters

E.D. Nikolaeva<sup>1</sup>, D.B. Goncharov<sup>2</sup>, E.I. Shishatskaya<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biophysics, Siberian branch of the RAS, Krasnoyarsk

<sup>2</sup>Siberian Federal university, Krasnoyarsk

В работе охарактеризованы носители для культивирования клеток в виде пленок, прессованных объемных форм и нетканого полотна, сформированного ультратонкими волокнами, полученные из резорбируемых полиэфиров «Биопластотан» (линейные полиэфиры гидроксипроизводных алкановых кислот). Исследованы два типа полимеров – гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты и сополимер, образованный мономерами 3-гидроксимасляной и 3-гидроксивалериановой кислоты. Проведено сопоставление свойств поверхности разработанных полимерных носителей, стерилизованных автоклавированием и обработкой  $H_2O_2$ -плазмой, и показано положительное влияние плазмы, снижающее величину контактного краевого угла смачивания водой и повышающее гидрофильность поверхности. На примере культуры фибробластов линии NIH 3T3 показано благоприятное влияние обработки поверхности носителей  $H_2O_2$ -плазмой на адгезию и жизнеспособность культивируемых клеток по сравнению со стерилизацией автоклавированием.

**Ключевые слова:** носитель, резорбируемые полиэфиры «Биопластотан», обработка  $H_2O_2$ -плазмой, адгезия, жизнеспособность клеток.

Использование потенциала клеточных технологий в реконструктивных целях реализуется с использованием нескольких подходов. В одном из вариантов суспензию клеток необходимого фенотипа, культивированных *in vitro*, вводят в поврежденные ткани органов или в кровоток. В другом, технологически более сложном, клетки инкубируют вне организма на подложке или носителе (scaffold) и далее биоинженерную конструкцию или тканеинженерный эквивалент трансплантируют реципиенту. Успех второго направления зависит во многом от свойств материалов, используемых для получения носителей клеток [1–2]. Материалы, применяемые для изготовления тканеинженерных конструкций, должны обладать спектром специальных свойств. В настоящее время для клеточных технологий применяют и исследуют широкий спектр материалов, среди которых – металлы, керамики, полимерные и композитные материалы. Особо перспективны полимерные материалы, способные к биорезорбции *in vivo*. Такие материалы по мере формирования регенерата в месте введения должны с адекватной скоростью разрушаться без образования токсичных продуктов обмена и, в конечном счете, – полностью исчезнуть при закрытии тканевого дефекта. Применяемые носители на основе природных резорбируемых мате-

риалов типа коллагена, желатина и композиций их с кальций-фосфатами имеют ограничения, так как достаточно быстро подвергаются гидролитической деструкции в жидких средах, поэтому не пригодны для длительно текущих регенеративных процессов. Среди активно изучаемых материалов – полимеры монокарбоновых кислот: молочной, гликолиевой, алкановых (масляной, валериановой и др.) [3]. Полимеры алкановых кислот – полигидроксиалканоаты (ПГА) (polyhydroxyalkanoates, PHA) – это термопластичные линейные полиэфиры, обладающие способностью разрушаться в биологических средах, высокой биосовместимостью и механической прочностью. Сферы применения этих полимеров в реконструктивной медицине потенциально широки, включая клеточную и тканевую инженерию [4]. Работами Института биофизики СО РАН показана возможность получения из ПГА различных носителей (в виде пленок и мембран, объемных трехмерных конструкций, микро- и нановолокон, микрочастиц и др.) [5–8], пригодных для культивирования клеток [9–11]; зарегистрирована марка материала и изделий – «Биопластотан» [12].

**Key words:** scaffold, resorbing polyesters «Bioplastotan»,  $H_2O_2$ -plasma processing, adhesion, cell viability.

риалов типа коллагена, желатина и композиций их с кальций-фосфатами имеют ограничения, так как достаточно быстро подвергаются гидролитической деструкции в жидких средах, поэтому не пригодны для длительно текущих регенеративных процессов. Среди активно изучаемых материалов – полимеры монокарбоновых кислот: молочной, гликолиевой, алкановых (масляной, валериановой и др.) [3]. Полимеры алкановых кислот – полигидроксиалканоаты (ПГА) (polyhydroxyalkanoates, PHA) – это термопластичные линейные полиэфиры, обладающие способностью разрушаться в биологических средах, высокой биосовместимостью и механической прочностью. Сферы применения этих полимеров в реконструктивной медицине потенциально широки, включая клеточную и тканевую инженерию [4]. Работами Института биофизики СО РАН показана возможность получения из ПГА различных носителей (в виде пленок и мембран, объемных трехмерных конструкций, микро- и нановолокон, микрочастиц и др.) [5–8], пригодных для культивирования клеток [9–11]; зарегистрирована марка материала и изделий – «Биопластотан» [12].

Общеизвестно, что свойства поверхности опорных носителей играют большую роль для адгезии и пролиферации клеток. В этой связи, нельзя не отметить, что изделия из ПГА гидрофобны, поэтому для

повышения адгезионных свойств поверхности изделий из этих полимеров необходимы дополнительные усилия. Попытки введения в состав ПГА пластифицирующих агентов типа поливинилового спирта или полиэтиленгликоля (ПЭГ), за исключением шероховатости, кардинально не влияли на структуру и свойства поверхности [13]. Более результативными оказались иммобилизация на поверхности пленок и мембран коллагена [14], прививание полисахаридов или гиалуроновой кислоты [15], акриловой кислоты с последующим гамма-облучением [16], а также лазерная резка, оптимизированный режим которой позволил снизить величину краевого угла смачивания водой с 76 до 50°, то есть существенно повысить гидрофильность без разрушения структуры материала; прикрепляемость фибробластов и остеобластов на таких конструкциях была на 18–25% выше по сравнению с исходными [17].

Один из современных подходов, применяемых для модификации поверхности клеточных носителей, заключается в обработке газовой плазмой. Имеются данные о положительном влиянии обработки плазмой водорода, кислорода или азота на поверхность ПГА: после такой обработки отмечалось изменение гидрофильности и шероховатости поверхности, что сопровождалось увеличением количества адгезированных клеток [18]. Плазменная обработка представляет интерес не только как средство модификации свойств поверхности материалов, но также и как стерилизующий агент. Необходимо отметить, что отношение материалов и носителей из них к методам стерилизации является важным аспектом применения. Дело в том, что использование общепринятых методов стерилизации материалов и изделий может сопровождаться негативными последствиями. Так, термолабильные материалы и изделия из них деформируются при сухо-жарочной обработке и автоклавировании, применение дезинфицирующих химических реагентов требует их полного удаления, так как при остаточном содержании в материале возможны острые воспалительные реакции; ионизирующее излучение (УФ- и  $\gamma$ -радиация) разрушает структуру многих полимерных материалов.

Возможность обработки материалов плазмой паров перекиси водорода как средство стерилизации изделий и также модификации их поверхности представляет существенный интерес. При этом методе после впрыскивания раствора перекиси водорода в стерилизационную камеру включается источник электромагнитного излучения, под воздействием которого одновременно происходит деление одной части молекул  $H_2O_2$  на две группы (ОН-), а другой части — на одну гидропероксильную группу (ООН-) и один атом водорода, сопровождающееся выделением видимого и ультрафиолетового излучения. В результате в камере создается биоцидная среда, состоящая из молекул перекиси водорода, свободных радикалов и ультрафиолетового излучения. При отключении электромагнитного поля свободные радикалы преобразуются в молекулы воды и кислорода, не оставляя никаких токсичных отходов. Стерилизация реализуется при температуре 55°C, что исключает термическое повреждение полимерных материалов. Данный способ находит все более широкое применение для стерилизации металлических, пластиковых и резиновых изделий, предназначенных для контакта с внутренней средой организма.

Цель настоящей работы — конструирование из ПГА носителей для культивирования клеток разных типов и исследование влияния обработки  $H_2O_2$ -плазмой на свойства поверхности этих материалов и пролиферативный потенциал клеток, адгезированных к ней.

### Материал и методы

Исследованы образцы ПГА, полученные в Институте биофизики СО РАН: высококристаллический полимер  $\beta$ -гидроксимасляной кислоты (полигидроксibuтират, 3-ПГБ) молекулярная масса 1 302 500 Да, кристалличность 72%, температура плавления 170°C [19] и более технологичный сополимер 3-гидроксibuтирата и 3-гидроксивалерата, 3-ПГБ/3-ПГВ (включение 3-гидроксивалерата 9,9 мол%), молекулярная масса 1 476 000 Да, кристалличность 50%, температура плавления 162°C [20]. Химическую структуру образцов ПГА определяли после предварительного метанолиза проб по метиловым эфирам жирных кислот на хроматомасс-спектрометре GCD plus (Hewlett Packard, США).

Объемные носители (диаметр 10 мм, толщина 2 мм) получены методом прямого холодного прессования порошка полимера на автоматическом прессе Carver® (США) под давлением 120 кгс/см<sup>2</sup>, как описано ранее [21]; двумерные изделия в виде пленок — методом полива разогретого до 35°C 1,5% раствора полимеров в дихлорметане на обезжиренную поверхность предварительно нагретых до такой же температуры чашек Петри [10]. Высушивали пленки в беспылевом боксе при комнатной температуре в течение 48 ч. Для сравнения получены и исследованы мембраны, изготовленные из ПГА с добавками ПЭГ (молекулярный вес 40 000 Да) в концентрации 10% по массе. ПЭГ по мере гидролитического распада в жидкостях может формировать в полимерном носителе систему развитых и сообщающихся пор и каналов [22], что благотворно сказывается на состоянии и росте клеток. Нетканое волокно получено из ультратонких волокон (диаметром 2–3 мкм) методом электростатического формования растворов полимера в сильном электрическом поле при 25 кВ, как описано нами ранее [7].

С использованием специальной формы из полимерных пленок и нетканого полотна нарезали диски диаметром 10 мм ( $S$  носителя = 0,8 см<sup>2</sup>), толщину которых измеряли микрометром. В зависимости от плотности полимерных растворов она составила 0,05–0,08 мм. Полученные материалы были стерилизованы в автоклаве (1 атм, 120°C в течение 2 ч) и  $H_2O_2$ -плазмой в стерилизаторе Sterrad NX (Джонсон & Джонсон, США), после чего их помещали на дно 24-луночных планшетов из полистирола (Orange Scientific), которые также служили в качестве контроля.

Микроструктуру поверхности носителей анализировали растровой электронной микроскопией (РЭМ) (микроскоп Quanta 200, FEI Company, США). Свойства поверхности до и после стерилизации рассчитывали на базе измерения контактного краевого угла смачивания водой ( $\theta$ , град), используя известные уравнения Де Жена [23], находили свободную поверхностную энергию ( $\gamma_s$ ), свободную энергию межфазовой поверхности ( $\gamma_{sl}$ ) и величину сил сцепления ( $W_{sl}$ ) (эрг/см<sup>2</sup>).

Для оценки адгезионных свойств материалов и их способности поддерживать пролиферативный потенциал клеток была взята минимально трансформированная линия фибробластов мыши NIH 3T3, кото-

рыми засеивали носители из расчета  $6,5 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup>, размещенные в 24-луночных планшетах. Культивирование фибробластов проводили по стандартной методике в среде ДМЕМ с 10% эмбриональной телячьей сывороткой и раствором антибиотиков (стрептомицин 100 мкг/мл, пенициллин 100 ЕД/мл, Gibco, Invitrogen) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 5% атмосфере CO<sub>2</sub> при 37°C. Замену среды производили раз в три дня.

Адгезию клеток определяли подсчетом клеток, снятых с полимерных носителей трипсином, через 3 ч после засева (микроскоп Биолам П2-1, ув.  $\times 300$ ).

Жизнеспособность клеток, культивируемых на полимерных носителях разных типов, стерилизованных автоклавированием и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-плазмой, изучали в реакции с МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол бромидом) («Sigma», США). Морфологию культивируемых клеток регистрировали с использованием РЭМ. Для этого носители с клетками промывали от питательной среды фосфатным буфером и фиксировали формалином в течение 24 ч при комнатной температуре. Далее образцы промывали этанолом с увеличивающейся концентрацией; на конечном этапе образцы трижды обрабатывали абсолютным этанолом и лиофильно высушивали. РЭМ снимки клеток получены с использованием электронного микроскопа ТМ-1000 (Hitachi, Япония).

Статистическую обработку результатов осуществляли общепринятыми методами с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel. Результаты представлены как средние арифметические со стандартным отклонением. Достоверность результатов определяли по критерию Стьюдента (уровень значимости  $P = 0,05$ ).

**Результаты и обсуждение**

Внешний вид исходных (не подвергнутых стерилизации) носителей разных типов, полученных из ПГА, представлен на рис.1. На поверхности пленок из 3-ПГБ видны микропоры размером до 1 мкм. Более эластичные пленки из сополимерного ПГА (3-ПГБ/3-ПГВ) имели более выраженную ламинарную структуру, по сравнению с пленками из 3-ПГБ. Добавление ПЭГ к раствору полимера увеличило структурированность и пористость поверхности пленок. Для прессованных объемных материалов характерна монолитная структура поверхности с наличием единичных трещин и неровностей. Носители из нетканого волокна, образованного ультратонкими волокнами, имели наиболее рыхлую структуру.

Результаты измерения контактного краевого угла смачивания водой, характеризующие гидрофильность поверхности, представлены на рис. 2. Показано, что эта величина существенно зависит от техники изготовления и типа полимерного носителя. Самый низкий показатель ( $62,66 \pm 0,80^\circ$ ) зарегистрирован у материалов, сформированных из ультратонких волокон; самый высокий – у объемных прессованных форм ( $70,88 \pm 1,71^\circ$ ). Пленочные носители, независимо от типа использованного полимера, имели сходные значения от  $65,71 \pm 0,55$  до  $68,02 \pm 0,36^\circ$ , в среднем порядка  $66,77^\circ$ , что практически соответствовало показателю контроля (полистирол, контактный краевой угол смачивания  $67,12^\circ$ ). Добавление к полимеру ПЭГ на величину угла достоверно не влияло. По изученным параметрам поверхность носителей из ПГА – гидрофобна и аналогична свойствам

поверхности носителей из синтетических полимеров (полиэтилентерефталата, полиметилметакрилата, поливинилхлорида и полиэтилена).

Автоклавирование и обработка полимерных материалов H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-плазмой по-разному влияли на величину контактного краевого угла смачивания водой поверхностей (см. рис. 2). Независимо от типа носителя, после стерилизации с применением H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-плазмы краевой угол достоверно снижался; при этом наиболее значительно – у материалов из нетканого волокна (до  $36,43^\circ$ ).

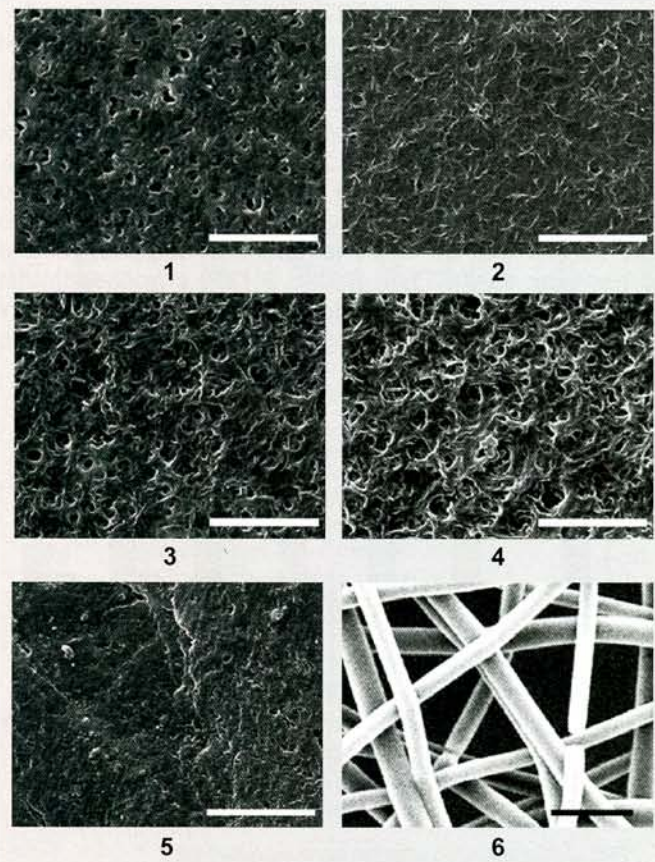


Рис. 1. Клеточные носители, изготовленные из «Биопластотана»: 1 – пленка 3-ПГБ; 2 – пленка 3-ПГБ/3-ПГВ; 3 – пленка 3-ПГБ+ПЭГ; 4 – пленка 3-ПГБ/3-ПГВ+ПЭГ; 5 – прессованный образец 3-ПГБ; 6 – нетканое волокно 3-ПГБ. Маркер – 10 мкм. РЭМ

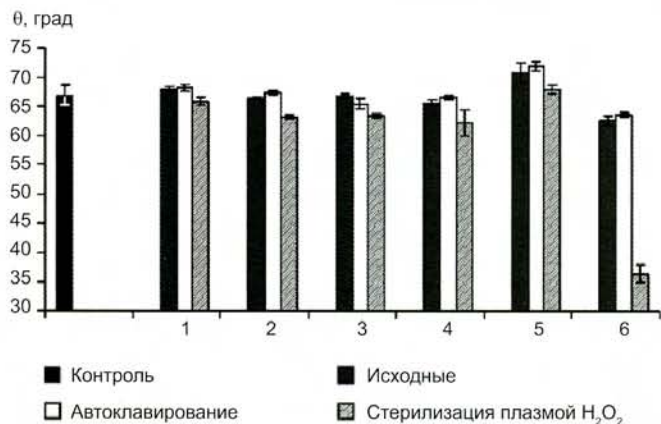


Рис. 2. Величины контактных краевых углов смачивания водой поверхности носителей после стерилизации автоклавированием и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-плазмой (нумерация аналогична рис. 1). Контроль – полистирол

В других вариантах снижение показателя было выражено в меньшей степени — на 4–8%. Для всех носителей, обработанных  $H_2O_2$ -плазмой, зарегистрировано снижение свободной межфазовой поверхности и увеличение сил сцепления и поверхностного натяжения. При этом достоверного влияния автоклавирования на величину краевого угла не обнаружено. Это согласуется с результатами, полученными нами ранее в ходе сравнительной оценки влияния на свойства пленок из 3-ПГБ и 3-ПГБ/3-ПГВ автоклавирования, сухо-жарочной обработки,  $\gamma$ -облучения [10].

Стерильные носители были населены фибробластами мыши линии NIH 3T3. Через 3 ч после совмещения материала и клеточной культуры производили подсчет адгезированных фибробластов, который показал, что на носителях, стерилизованных плазмой, количество клеток было сопоставимо с контролем и выше, чем на автоклавированных, причем наибольшее влияние плазменной обработки было заметно на пленочных материалах. Наибольшее количество клеток (до 28–29 в поле зрения) зафиксировано на пленках из 3-ПГБ и 3-ПГБ/3-ПГВ с добавлением ПЭГ. Это выше, чем на носителях, стерилизованных автоклавированием, на 40 и 25% соответственно (рис. 3).

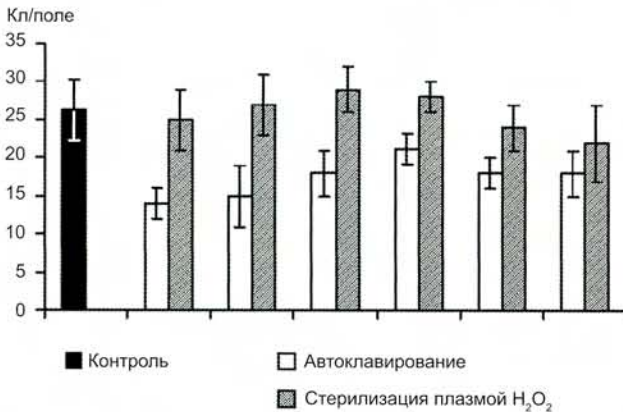


Рис. 3. Количество клеток, адгезированных к поверхности носителей через 3 ч после совмещения (нумерация аналогична рис.1). Контроль — полистирол

Наименьшее влияние обработки плазмой получено для нетканого полотна из ультратонких волокон, где количество клеток было выше на 18%, по сравнению с показателем на материалах, подвергнутых автоклавированию. Положительное влияние  $H_2O_2$ -плазмы на адгезионные свойства поверхности носителей из ПГА, полученное нами, согласуется с данными работы, авторы которой показали, что при обработке пленок из ПГА аммониевой плазмой в течение 10 мин происходило включение в структуру пленки до 8% азота, что сократило контактные краевые углы на 20–30°, сделав поверхность более гидрофильной [24]. Эти изменения, вероятно, можно объяснить с позиций существующего представления о том, что в областях полимерных изделий, обработанных физическими методами (лазерной резкой или плазмой) увеличивается прочность адгезионного шва между фазами, возрастает гидрофильность и, следовательно, повышаются адгезионные свойства поверхности.

Морфология фибробластов, пролиферирующих на разработанных носителях разных типов, стерилизованных с применением автоклавирования и  $H_2O_2$ -плазмы, представлены на рис. 4.

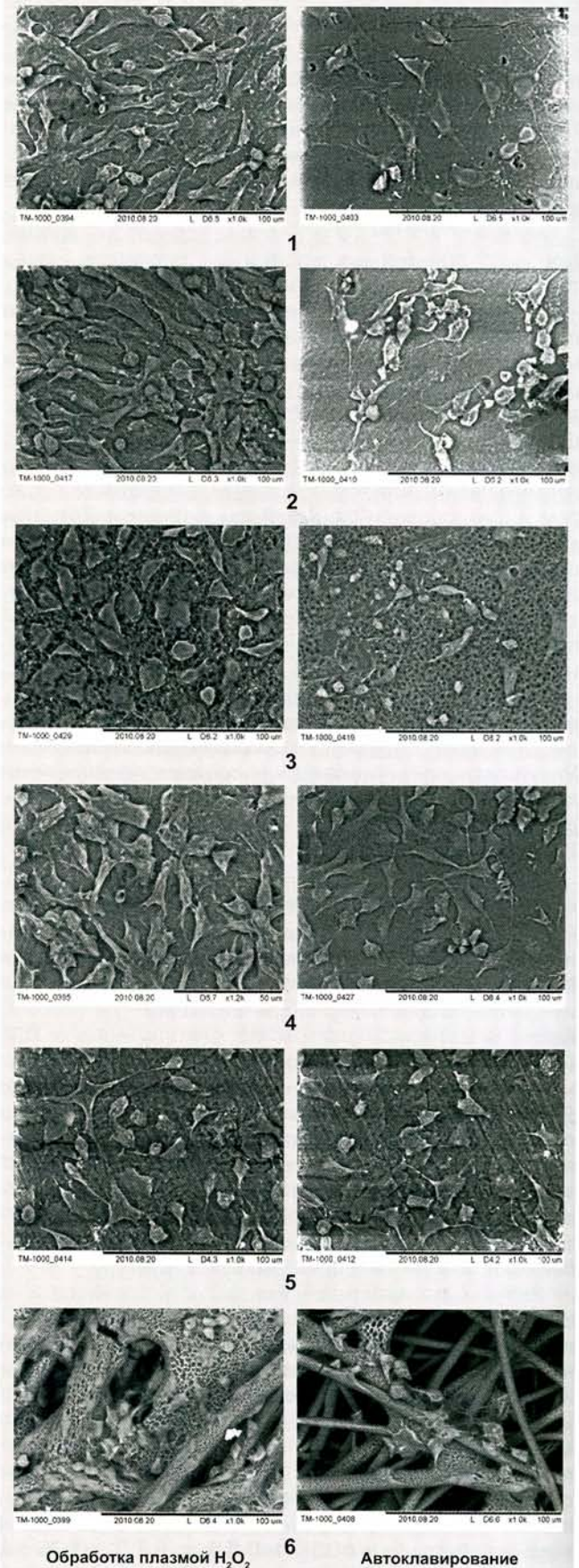


Рис. 4. Фибробласты мыши линии NIH 3T3 на поверхности носителей разных типов, стерилизованных автоклавированием и  $H_2O_2$ -плазмой, через 7 сут. после совмещения (нумерация аналогична рис.1). РЭМ

На пленках, изготовленных из 3-ПГБ и сополимера 3-ПГБ/3-ПГВ, а также на пленках, изготовленных с добавлением ПЭГ, стерилизованных плазменной обработкой, клетки были хорошо распластаны, формировали монослой, среди них преобладали клетки веретенообразной формы. На аналогичных изделиях из ПГА, но стерилизованных с применением автоклавирования, клеток было в 2–3 раза меньше, и они характеризовались неправильной формой. На нетканом полотне, сформированном ультратонкими волокнами, морфология клеток в наибольшей степени соответствовала морфологии клеток в контроле; при этом преобладали фибробласты активной звездчатой формы. Клетки также проникли во внутренние слои носителя, их рост сопровождался образованием межклеточного вещества, более выраженным на изделиях, обработанных  $H_2O_2$ -плазмой. Среди немногочисленных клеток, совмещенных с прессованными материалами, наблюдались клетки неправильной формы, что было более характерно в случае применения автоклавирования.

Результаты МТТ-теста показали отсутствие цитотоксического эффекта изделий из ПГА, стерилизованных с применением автоклавирования и  $H_2O_2$ -плазмой. Количество жизнеспособных клеток, адгезированных к поверхности носителей, стерилизованных  $H_2O_2$ -плазмой, по сравнению с автоклавированными, во всех вариантах и контроле было выше (рис. 5). По результатам МТТ-теста лучшие результаты зарегистрированы для клеток, культивируемых на поверхности пленочных носителей из ПГА без добавления ПЭГ и на нетканом волокне из ультратонкого волокна, на которых количество клеток было достоверно выше, чем при применении автоклавированных носителей. На нетканом волокне из ультратонких волокон, обработанном  $H_2O_2$ -плазмой, зафиксировано наибольшее количество клеток. Наименьшее количество жизнеспособных клеток определялось на прессованных объемных формах.

Таким образом, клеточные носители разных типов, полученные из резорбируемого полиэфира «Биопла-

стотан», характеризуются различной структурой поверхности, свойства которой по-разному изменяются при стерилизации автоклавированием и обработкой  $H_2O_2$ -плазмой. Обработка полимерных материалов  $H_2O_2$ -плазмой оказывает положительное влияние на свойства поверхности, в особенности, пленочных образцов, снижая контактные краевые углы смачивания водой. Это сопровождается повышением адгезионных свойств поверхности и способствует более активному росту фибробластов на носителях из резорбируемого «Биопластотана».

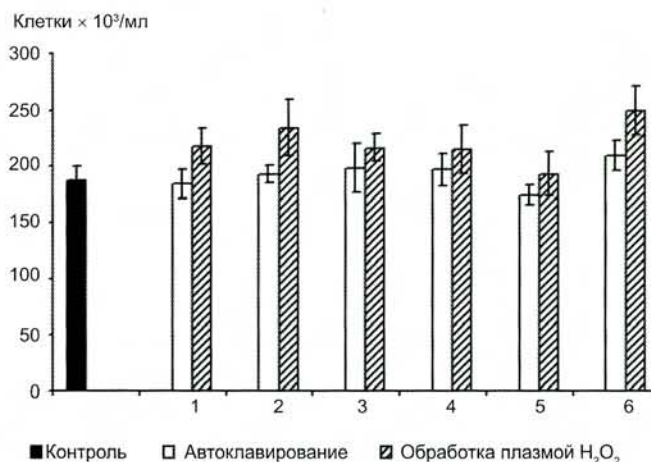


Рис. 5. Количество жизнеспособных клеток через 7 сут. после совмещения с носителями по результатам МТТ-теста (нумерация аналогична рис. 1). Контроль – полистирол

Работа выполнена по проекту согласно постановлению 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).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Wang M., Chen L.J., Weng J. et al. Manufacture and evaluation of bioactive and biodegradable materials and scaffolds for tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2002; 12: 856–60.
2. Хенч Л., Джонс Д. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей. М.: Техносфера; 2007.
3. Штильман М.И. Полимеры медико-биологического назначения. М.: Академкнига; 2006.
4. Волова Т.Г., Севастьянов В.И., Шишацкая Е.И. Полиоксидантоаты – биоразрушаемые полимеры для медицины. Красноярск: Платина; 2006.
5. Волова Т.Г., Некрасов Ю.П., Шишацкая Е.И. и др. Характеристика изделий на основе полиоксидантоатов – разрушаемых природных полиэфиров. *Пластические массы* 2003; 3: 6–8.
6. Volova T.G., Shishatskaya E.I., Sevastianov V.I. et al. Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers. *Biochemical Eng. J.* 2003; 16: 125–33.
7. Волова Т.Г., Шишацкая Е.И., Гордеев С.А. Характеристика ультратонких волокон, полученных электростатическим формированием термолластичного полиэфира [поли(гидроксибутирата/гидроксиуалерата)]. *Перспективные материалы* 2006; 3: 25–9.
8. Шишацкая Е.И., Горева А. Микрочастицы из биоразрушаемого полиоксидантоата в качестве матрикса для депонирования рубомицина. *Перспективные материалы* 2006; 4: 65–70.
9. Шишацкая Е.И., Еремеев А.В., Гительзон И.И. и др. Исследование цитотоксичности полиоксидантоатов в культуре животных клеток. *Доклады РАН* 2000; 374: 561–4.
10. 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: 915–23.

11. Shishatskaya E.I., Chlusov I.A., Volova T.G. A hybrid PHA-hydroxyapatite composite for biomedical application: production and investigation. *J. Biomat. Sci. Polymer. Edn.* 2006; 17: 481–3.
12. Торговая марка «БИОПЛАСТОТАН». Регистрационное свидетельство № 315652 Федерального института патентной экспертизы. 2006 Фев 15.
13. Севастьянов В.И., Егорова В.А., Немец Е.А. и др. Биодegradуемый биополимерный материал ЭластоПОБ™ для клеточной трансплантации. *Перспективные материалы* 2004; 3: 35–41.
14. Tesema Y., Raghavan D., Stubbs J. Bone cell viability on collagen immobilized poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) membrane effect of surface chemistry. *J. Appl. Polymer Sci.* 2004; 93: 2445–53.
15. Hu S.G., Jou C.H., Yang M.C. Protein adsorption, fibroblast activity and antibacterial properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate acid) grafted with chitosan and chitoooligosaccharide after immobilized with hyaluronic acid. *Biomaterials* 2003; 24: 2685–93.
16. Grondahl L., Chandler-Temple A., Trau M. Polymeric grafting of acrylic acid onto poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate): surface functionalization for tissue engineering application. *Biomacromol.* 2005; 6: 2197–203.
17. Slabko V.V., Volova T.G., Shoshatskaya E.I. et al. Surface modification of bioresorbable polymer scaffolds by laser treatment. *Biophysics.* 2010; 55: 234–8.
18. Qu X.H., Wu Q., Liang J., et al. Enhanced vascular-related cellular affinity on surface modified copolyester of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyhexanoate (PHBHx). *Biomaterials* 2005; 26: 6991–7001.

19. Волова Т.Г., Калачева Г.С. Способ получения полимера  $\beta$ -оксимасляной кислоты. Патент РФ 2051967. 1996 Янв 10.

20. Волова Т.Г., Калачева Г.С., Константинова В.М. Способ получения гетерополимера  $\beta$ -оксимасляной и  $\beta$ -оксивалериановой кислот. Патент РФ 2051968. 1996 Янв 10.

21. Шишацкая Е.И. Биосовместимые и функциональные свойства гибридного композита полигидроксибутират/гидроксиапатит. Вестник Института трансплантологии и искусственных органов 2006; 3: 34–8.

22. Cheng G., Cai Z., Wang L. Biocompatibility and biodegradability of poly(hydroxybutyrate)/(poly(ethylene glycol) blend films. J. Mater. Sci. Mater. Med. 2003; 14: 1073–8.

23. Де Жен П.Ж. Смачивание: Статика и динамика. Успехи физических наук 1987; 151: 619–81

24. Nitschke M., Schmack G., Janke A. et al. Low pressure plasma treatment of poly(3-hydroxybutyrate): toward tailored polymer surfaces for tissue engineering scaffolds. J. Biomed. Mater. Res. 2001; 59: 632–8.

*Поступила 23.03.2011*