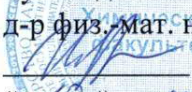


Министерство образования и науки Российской Федерации  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)  
Химический факультет  
Кафедра высокомолекулярных соединений и нефтехимии

ДОПУСТИТЬ К ПРЕДСТАВЛЕНИЮ  
ГЭК

Руководитель ООП  
д-р физ.-мат. наук, доцент  
 И.А. Курзина  
« 10 » мая 2019 г.


**НАУЧНЫЙ ДОКЛАД**

об основных результатах подготовленной научно – квалификационной работы  
(диссертации)

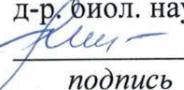
Получение и исследование иммунного ответа *in vitro* композиционных материалов на  
основе полилактида и гидроксиапатита

по основной образовательной программе подготовки научно-педагогических кадров в  
аспирантуре  
направление подготовки **04.06.01** – Химические науки


Шаповалова Елена

Научный руководитель  
д-р. ф-м. наук, профессор  
 И.А. Курзина  
подпись

« 10 » мая 2019 г.

Научный консультант  
д-р. биол. наук, профессор  
 Ю.Г. Кжышковска  
подпись

« 10 » мая 2019 г.

Автор работы  
аспирант  
 Е. Шаповалова  
подпись

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

**Актуальность работы.** Разработка и изготовление материалов для тканевой инженерии и регенеративной медицине являются одними из основных направлений современных биомедицинских исследований [1]. Имплантированные материалы воспринимаются организмом как инородные тела и их применение, в большинстве случаев, сопровождается развитием иммуновоспалительных реакций и впоследствии отторжением. Это нередко требует проведения повторных операций, лечения сильнодействующими антибиотиками, что наносит существенный вред организму человека. Полимерные материалы играют уникальную роль в регенерации и восстановлении тканей, но любое вмешательство в живой организм инициирует каскад событий, известный под названием реакции организма на инородное тело, или тканевой реакцией. В последние годы существенное значение приобретают изучение клеточных популяций в зоне протезирования, разработка методов и подходов к блокированию чрезмерной воспалительной реакции с исходом в фиброз и стимуляция репаративной регенерации в месте имплантации различных материалов. Несмотря на широкий круг материалов, для которых исследована воспалительная реакция, вопросы, связанные с механизмами программирования макрофагов, остаются открытыми. Понимание механизма программирования макрофагов позволит разработать новые иммунотолерантные биоматериалы.

Исследования и разработка иммунотолерантных материалов для имплантатов являются чрезвычайно актуальными [2, 3]. Наибольший интерес представляют материалы, способные резорбироваться при их вживлении в организм человека [4, 5]. Вопрос подбора персонализированных материалов остается нерешенным. Каждый класс имеет свои преимущества и недостатки, но зачастую использование биосовместимых биоразлагаемых композиционных материалов на основе полиэфиров молочной кислоты и гидроксиапатита [6, 7] позволяет нивелировать недостатки уже используемых материалов [8].

**Цель работы.** Получение и исследование иммунного ответа *in vitro* композиционных материалов на основе полилактида и гидроксиапатита

**Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:**

1. Получить композиционные материалы на основе полилактида и гидроксиапатита с разным массовым соотношением компонентов. Исследовать химический и элементный составы, структурно-фазовое состояние композиционных материалов на основе полилактида и гидроксиапатита.

2. Определить поверхностные физико-химические характеристики (смачиваемость, шероховатость, морфология поверхности) композиционных материалов. Выявить зависимость скорости формирования кальций-фосфатного слоя на поверхности композиционных материалов от состава образцов.

3. Разработать тест-систему и определить ключевые параметры для исследования влияния природы биоматериалов на активацию макрофагов человека. Установить влияние ряда полимерных материалов на клеточно-опосредованный иммунный ответ (активацию и дифференциацию макрофагов) и жизнеспособность макрофагов в условиях *in vitro*.

4. Выявить особенности процесса деградации полимерной матрицы в условиях *in vitro*.

**Научная новизна работы заключается в следующем.**

1. Впервые установлено влияние неорганической компоненты и поверхностных характеристик композиционных материалов на полимерной основе на процесс формирования кальций-фосфатного слоя на поверхности композиционных материалов.

2. Впервые выявлены зависимости поверхностной энергии и ее составляющих (полярной и дисперсионной компонент) от химического состава и шероховатости поверхности композиционного биоматериала.

3. Впервые исследованы процессы деградации полилактида в составе композиционных материалов *in vitro*

4. Впервые установлено влияние природы полимера на активацию и жизнеспособность макрофагов.

**Практическая значимость работы** определяется следующим:

Полученные экспериментальные данные могут быть успешно реализованы при получении биоактивных, биосовместимых композиционных материалов на основе полилактида и гидроксиапатита с последующим применением при создании материалов для имплантации.

**Апробация работы.**

Основные результаты работы были представлены на 6<sup>th</sup> International Scientific Conference «New Operational Technologies» (Tomsk, 2017), The 22<sup>nd</sup> International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research: Proceedings of the International Symposium (Томск, 2015), 7<sup>th</sup> International Conference “Nanoparticles, nanostructured coatings and microcontainers: technology, properties, application” (Томск, 2016), Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (Фрайбург, Германия, 2015), XII, XIII, XIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2015, 2016, 2017).

Исследования по диссертации выполнены в рамках проектов: ВИУ НУ 8.2.16.2015 Л Молекулярные механизмы хронического воспаления в прогрессии злокачественных новообразований, сердечно-сосудистых заболеваний: роль в патогенезе и определение мишеней для иммуномодулирующей терапии; ВИУ НУ 8.1.16.2017 Л Молекулярные механизмы хронического воспаления в прогрессии злокачественных новообразований, сердечно-сосудистых заболеваний и импланталогии; ФЦП «Приоритетные 2014-2020» Исследование адгезии, пролиферации, механизмов направленной дифференцировки созревания аутологичных стволовых клеток в условиях трехмерного культивирования на композитных матрицах, обогащенных аутологичными факторами. Соглашение №

14.575.21.0164, идентификатор RFMEFI57517X0164; РНФ «Разработка и моделирование гибридных биodeградируемых скаффолдов с прогнозируемыми физико-химическими и иммуномодулирующими свойствами для тканеинженерных конструкций», Соглашение № 16-13-10239.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 23 работы, в том числе 3 охранных документа (ноу-хау), 4 статьи в журналах, 3 из которых индексируются в базах Scopus и Web of Science, а также 16 тезисов и материалов международных и всероссийских конференций.

#### **Основное содержание работы:**

**Во введении** обоснована актуальность темы научно-квалификационной работы, характеризуется новизна исследований, указывается научная и практическая значимость результатов, приведены основные положения, выносимые на защиту, сформулирована цель и задачи исследования.

**Первая глава** представляет собой обзор литературных данных по теме научно-квалификационной работы. В первой части литературного обзора дается представление об объектах исследования – биосовместимых материалах на основе полилактида (ПЛ) и гидроксиапатита (ГА). Во второй части анализируются физические и химические подходы к получению композиционных материалов, анализируются достоинства и недостатки различных методов. Обоснован выбор условий получения и состава композиционных материалов. В третьей части представлен анализ литературных данных исследований биосовместимости материалов на основе полилактида и гидроксиапатита в условиях *in vitro* и *in vivo*, обоснован выбор макрофагальной тест-системы, выбор основных параметров при исследовании влияния материалов на активацию макрофагов, про- и противовоспалительный ответ *in vitro*. По результатам критического анализа литературных данных сформулированы цель и задачи исследования.

**Во второй главе** дано описание материалов (ПЛ, ГА, поликапролактона, сополимера лактида и гликолида) и их основных физико-химических свойств, описаны используемые установки и приборы, пробоподготовка образцов и методы исследования.

**В третьей главе** изложены результаты исследования влияния состава композиционных материалов на основе полилактида и гидроксиапатита на их поверхностные характеристики. Рассмотрено влияние материалов на клеточный иммунный ответ, жизнеспособность макрофагов в условиях *in vitro*.

**В четвертой главе** рассмотрены результаты исследования влияния скаффолдов на основе поликапролактона на активацию и жизнеспособность макрофагов.

**В пятой главе** установлено влияние материалов на основе СЛГ и ГА на про- и противовоспалительный ответ макрофагов, а также рассмотрены особенности процесса деградации полимерной матрицы при длительной культивации макрофагов на поверхности материалов.

## **ВЫВОДЫ**

1. Разработан метод получения композиционных материалов на основе полилактида и гидроксиапатита. Установлено, что при формировании композиционных материалов сохраняется химическая идентичность компонентов с одновременным синергетическим эффектом компонентов, снижающим провоспалительный ответ макрофагов.

2. Установлено, что существует оптимальный интервал соотношения полимерной и неорганической компонентов, при котором материал характеризуется повышенной поверхностной энергией, необходимой для адсорбции клеток и биосовместимости материала. Композиционный материал ПЛ/ГА 70/30 по сравнению с другими композитами обладает наиболее высоким значением поверхностной энергии и  $R_a$ , но при этом значение Ca/P для ГА в составе материалов самое низкое в ряду

композиционных материалов, и не оказывают негативного воздействия на жизнеспособность макрофагов.

3. Установлено, что скорость процесса формирования кальций-фосфатного слоя на поверхности чистого ГА выше, чем на поверхности композитов, в ряду композиционных материалов максимальной скоростью накопления ионов кальция и магния на своей поверхности обладает ПЛ/ГА 70/30.

4. Установлено, что при длительном культивировании макрофагов происходят процессы деструкции полимерной матрицы в составе композитов. Выявлено, что молекулярная масса чистого ПЛ снижается значительно больше по сравнению с исходной. У всех материалов наблюдается тенденция к более медленной деградации образцов в присутствии M0 (нестимулированных) макрофагов по сравнению с про- и противовоспалительно активированными клетками, наименьшее изменение ММ полимера наблюдается в составе композита ПЛ/ГА 70/30.

5. Показано, что при длительном культивировании макрофагов материалы на основе ПЛ и ГА не вызывают дальнейшего развития острого воспаления. Чистый полилактид вызывает наименьший воспалительный ответ, как в условиях первичной воспалительной реакции, так и в процессе заживляющей фазы.

6. Установлено, что при культивации на поверхности скаффолдов на основе поликапролактона макрофаги являются клетками M2 фенотипа (исключением является лишь группа с образцами ПКЛ-30). Макрофаги M2 фенотипа участвуют в прекращении воспалений, заживлении ран, фенотип M2 считается благоприятным для поддержания функций имплантата, поэтому можно предположить, что скаффолды будут оказывать противовоспалительное и заживляющее действие.

7. Установлено, что при культивировании первичных макрофагов на поверхности композита СЛГ/ГА материал не вызывает хронического воспалительного ответа.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

*В изданиях, рекомендованных ВАК:*

1. Shapovalova Ye., Lytkina D.N., Rasskazova L.A., Zhuk I.V., Gudima Alexandru, Filimoshkin A.G., Korotchenko N.M., Kurzina I.A., Kzhy'shkovska Y.G. Preparation of Biocompatible Composites based on Poly-L-lactide/Hydroxyapatite and Investigation of their Anti-Inflammatory Activity //Key Engineering Materials. 2016. Vol. 683. P. 475-480.

2. Rasskazova L. A., Lytkina D. N., Shapovalova E. G., Botvin V. V., Filimoshkin A. G., Korotchenko N. M. Bioactive Composites Produced in situ on the Basis of Calcium Phosphates and Lactic Acid Oligomers //Russian Journal of Applied Chemistry. 2015. Vol. 88, № 4. P. 669-675.

3. V. A. Syusyukina, Ye. Shapovalova, N.M. Korotchenko, I. A. Kurzina. Structural-phase state and surface properties of composite materials based on polylactide and hydroxyapatite //Russian Journal of Applied Chemistry. 2017. Vol. 90, № 1. P. 106-112.

*В изданиях, индексируемых SCOPUS:*

1. Rasskazova L. A., Shapovalova E., Lytkina D.N., Filimoshkin A.G., Kurzina I. A. Formation of Calcium Phosphate Layers on Nanodimension Hydroxyapatite Particles incorporated in Poly-L-lactide Fibers //BioNanoMat. 2015. Vol. 16, № 2-3. P. 243.

2. Y. Shapovalova, V. Syussyukina, I. Kurzina. Preparation of biocompatibility polymer composites and investigation of their surfaces properties //BioNanoMat. 2016. Vol. 17, № S1. P. 130.

3. Shapovalova Y., Lytkina D., Rasskazova L., Gudima A., Ryabov V., Filimoshkin A., Kurzina I., Kzhyshkowska J. Bioresorbable composites based on hydroxyapatite dispersed in poly-L-lactide matrix //EJC Supplements. 2015. Vol. 13, № 1. P. 49-50.

*Охранные документы:*



1. Документ № 995/ОД. Методика исследования влияния моноцитарных макрофагов человека на процесс деградации биосовместимых скаффолдов, вклад 40 %.

2. Документ № 1040/ОД. Способ выделения CD14 положительных моноцитов из лейкоцитарной пленки индивидуального донора, вклад 25 %.

3. Документ № 1222/ОД. Способ исследования влияния моноцитарных макрофагов на процесс биodeградации полимерных материалов, используемых в медицине, вклад 40 %.

*В изданиях, индексируемых РИНЦ:*

1. Ye. Shapovalova, E.G. Churina, Yu.G. Kzhyshkowska Effect of biodegradable scaffolds for targeted immunotherapy on differentiation of macrophages // The 22nd International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research: Proceedings of the International Symposium. Tomsk, 17–19 Sep. 2018 [Electronic resource] / Ed. E. L. Choynzonov et al. – Tomsk: Publishing house of Tomsk University, 2018. – pp.95-97.

2. Шляхтун А.С., Митрофанова И.В., Шаповалова Е.Г. Оптимизация метода получения моноцитов для культивирования и программирования *in vitro* //Перспективы развития фундаментальных наук [Электронный ресурс] : сб. науч. тр. XIV Междунар. конф. студентов, аспирантов и мол. ученых Россия, Томск, 25–28 апреля 2017 г. Т. 4. Биология и фундаментальная медицина. Томск: Изд-во ТПУ, 2017. С. 181-183.

3. V. A. Syusyukina, I. A. Popova, Y. Shapovalova, I. A. Kurzina. Materials based on polylactide and hydroxyapatite for medical application //Новые оперативные технологии 2017 (НОТ-2017): сборник трудов 6-ой Международной научной конференции. Томск: ТГУ, 2017. Р. 64-65.

4. Сюсюкина В.А., Шаповалова Е.Г. Получение и свойства биоразлагаемых композиционных материалов на основе поли-L-лактида и гидроксиапатита //Перспективы развития фундаментальных наук [Электронный ресурс]: сборник трудов XIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. Россия, Томск, 26-29 апреля 2016.

Том 2. Химия. Изд-во - Национальный Исследовательский Томский политехнический университет, 2016. С. 422-424.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

---

- 1 R. Langer and J. P. Vacanti, "Tissue engineering," *Science*, vol. 260, no. 5110, pp. 920–926, 1993.
- 2 Kasuga T. Preparation and mechanical properties of polylactic acid composites containing hydroxyapatite fibers / T. Kasuga, Y. Ota // *Biomaterials*. – 2001. – № 22. – P. 19–23.
- 3 Yu Q. Fabrication and formation mechanism of poly(L-lactic acid) ultrafine multi-porous hollow fiber by electrospinning / Q. Yu, Qin Y. // *eXPRESS Polymer Letters*. – 2013. – № 1. – P. 55–62.
- 4 Севастьянов В. И. Биосовместимые материалы / В. И. Севастьянов, М. П. Кирпичников. – М. : МИА, 2011. – 569 с.
- 5 Дженкинс М. Полимеры в биологии и медицине : пер. с англ. под ред. О. И. Киселевой. – М. : Научный мир, 2011. – 256 с.
- 6 Хэнч Л. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / Л. Хэнч, Р. Джонс. – М. : Техносфера, 2007. – 304 с.
- 7 Синтез нанопорошков гидроксиапатита для медицинских применений / А. С. Фомин [и др.] // *Перспективные материалы*. – 2006. – № 2. – С. 51–54.
- 8 Путляев В. И. Современные биокерамические материалы // *Соросовский образовательный журнал*. – 2004. – Т.8. – №1. – С. 44–50.

В соответствии с п. 3.2 «*Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеке ТГУ*» выпускная квалификационная работа аспиранта» Научный доклад об основных результатах подготовленной научно-квалификационной работы (диссертации) «Получение и исследование иммунного ответа *in vitro* композиционных материалов на основе полилактида и гидроксиапатита» Шаповаловой Елены размещается в репозитории с изъятием некоторых разделов с решением правообладателя.

Руководитель ООП



И.А. Курзина

# Отчет о проверке на заимствования №1



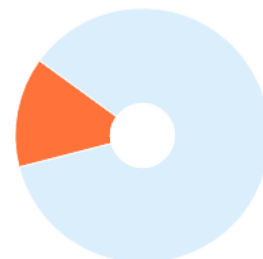
Автор: Шаповалова Елена [elenas6691@gmail.com](mailto:elenas6691@gmail.com) / ID: 6693923  
 Проверяющий: Шаповалова Елена ([elenas6691@gmail.com](mailto:elenas6691@gmail.com) / ID: 6693923)  
 Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат»- <http://users.antiplagiat.ru>

## ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 1  
 Начало загрузки: 17.05.2019 17:45:36  
 Длительность загрузки: 00:00:03  
 Имя исходного файла: Научный доклад Шаповалова  
 Размер текста: 1102 кБ  
 Символов в тексте: 34403  
 Слов в тексте: 4068  
 Число предложений: 262

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)  
 Начало проверки: 17.05.2019 17:45:40  
 Длительность проверки: 00:00:03  
 Комментарии: не указано  
 Модули поиска: Модуль поиска Интернет



ЗАИМСТВОВАНИЯ	ЦИТИРОВАНИЯ	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ
13,81% 	0% 	86,19% 

Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.  
 Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.

Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.

Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.

Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.

Заимствования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска
[01]	4,77%	<a href="https://esu.citis.ru/dissertation/1RwFG00KXZtZ15JHls2cLb00">https://esu.citis.ru/dissertation/1RwFG00KXZtZ15JHls2cLb00</a>	<a href="https://esu.citis.ru">https://esu.citis.ru</a>	20 Мар 2018	Модуль поиска Интернет
[02]	2,06%	Макрофаги: разнообразие фенотипов и функций, взаимодействие с чуж...	<a href="https://cyberleninka.ru">https://cyberleninka.ru</a>	27 Окт 2018	Модуль поиска Интернет
[03]	1,64%	Novel bioactive materials with different mechanical properties	<a href="https://doi.org">https://doi.org</a>	11 Мая 2018	Модуль поиска Интернет

Еще источников: 12  
 Еще заимствований: 5,35%