

Сведения о ходе выполнения проекта

«Разработка и создание нового класса высокопрочных и высокомодульных конструкционных композиционных материалов с высоким сопротивлением статическим, повторно-статическим, динамическим и радиационным нагрузкам»

Руководитель проекта младший научный сотрудник Покровская Л.А.

В ходе выполнения проекта по Соглашению о предоставлении субсидии от 26 сентября 2017 г. № 14.575.21.0123 с Минобрнауки России в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» на этапе № 2 в период с 01.01.2018 г. по 31.12.2018 г. выполнены следующие работы:

1. Разработана лабораторная методика синтеза фосфата кальция (гидроксиапатита) при СВЧ воздействии.
2. Разработана методика синтеза сополимера PLGA лактида (l- или dl-формы) и гликолида с заданными свойствами.
3. Разработана лабораторная методика изготовления суспензии, содержащей факторы роста клеточного происхождения.
4. Исследованы возможности насыщения экспериментального образца композитной матрицы (скаффолда-носителя) клеточным материалом.
5. Проведено исследование цитотоксичности материалов *in vitro*.
6. Разработана методика изготовления экспериментального образца композитной матрицы скаффолда-носителя аутологичных стволовых клеток.
7. Разработана программа исследования токсичности композитной матрицы (скаффолда-носителя), полимерных капсул и суспензии, содержащей факторы роста клеточного происхождения.
8. Разработана программа исследования *in vivo* и/или *in vitro* остеоиндуктивных свойств экспериментального образца суспензии, содержащей факторы роста клеточного происхождения.
9. Разработана программа исследования *in vivo* и/или *in vitro* остеоиндуктивных и остеокондуктивных свойств композитной матрицы скаффолда-носителя, обогащенной аутологичными стволовыми клетками.
10. Проведено исследование *in vivo* и/или *in vitro* остеоиндуктивных и остеокондуктивных свойств композитной матрицы скаффолда-носителя, обогащенной аутологичными стволовыми клетками.
11. Проведены исследования *in vivo* и/или *in vitro* остеоиндуктивных свойств экспериментального образца суспензии, содержащей факторы роста клеточного происхождения.
12. Получен экспериментальный образец – суспензии, содержащей факторы роста клеточного происхождения.
13. Получен экспериментальный образец композитной матрицы скаффолда-носителя аутологичных стволовых клеток.

14. Получен экспериментальный образец фосфата кальция (ГАП) при СВЧ воздействии.
15. Получен экспериментальный образец сополимера PLGA лактида (l- или dl-формы) и гликолида с заданными свойствами.
16. Проведено исследование суспензии, содержащей факторы роста клеточного происхождения физико-химическими и/или биологическими методами, микробиологическое исследование.
17. Разработана программа исследования композитной матрицы (скаффолда-носителя) аутологичных стволовых клеток на биосовместимость в опыте *in vivo* и биодegradацию в опыте *in vitro*.
18. Разработана программа исследования полимерных капсул на биодegradацию в опытах *in vitro*.
19. Проведены физико-химические исследования опытных образцов сополимера PLGA и фосфата кальция (ГАП) в соответствии с программой исследования.
20. Исследованы полимерные капсулы на биодegradацию в опытах *in vitro*.
21. Изучены физико-химические свойства и структуры композитной матрицы (скаффолда-носителя).

Основные результаты проекта

Разработана лабораторная методика получения ФК (ГАП). Одностадийный синтез двухфазного порошка фосфаты кальция – СВЧ в гидротермальных условиях является новым и экономически целесообразным, позволяет получать чистый продукт для медицинского применения: отсутствуют соли тяжелых металлов, оксид кальция, другие фазы фосфатов кальция. Целевым продуктом являлся двухфазный порошок фосфатов кальция (ФК): β -ТКФ/ГА, далее ФК (ГАП) с преимущественным содержанием первого. β -ТКФ/ГА, далее ФК (ГАП) - один из компонентов композитной матрицы (саффолда) для регенерации костной ткани. Продукт с высоким содержанием фазы β -ТКФ имеющего более высокую скорость биорезорбции по сравнению с ГАП, обеспечивает пассивную остеоиндукцию, что необходимо для целевого продукта композитной матрицы для дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в остеогенном направлении.

Разработана лабораторная методика синтеза PLGA из мономеров, без использования тяжелых металлов, запрещенных FDA и способ очистки лактида как промежуточного продукта синтеза. Данный способ может использоваться для очистки лактида химического и микробиологического происхождения, что расширяет сферу применения данной технологии.

Наработаны образцы по разработанным методикам PLGA (dl- и l-лактида и гликолида) соотношение 80/20 и 50/50 мол.% для изготовления экспериментальных образцов композитной матрицы скаффолда-носителя и полимерных капсул, а также исследований цитотоксичности материалов. Проведено исследование по изучению цитотоксического действия материалов *in vitro* по рекомендациям ГОСТа ISO 10993-5-2011.

Полученные на основе ФК/ГАП и PLGA композитные матрицы используются в качестве носителя МСК (мезенхимальных стволовых клеток) и показали остеоиндуктивные свойства и пригодность для культивирования МСК, создания скаффолдов для замещения малых костных дефектов, поскольку активизируют механизм остеогенной дифференцировки (исследования *in vivo* и *in vitro*).

Разрабатывается молекулярно-генетическая система тестирования, основанная на оценке уровня экспрессии генов *Osterix*, *Runx2* и *YAP* с помощью ПЦР в режиме реального времени совместно с ЦКП «Медицинская геномика». Выявлена экспрессия факторов транскрипции *Runx2*, *Osterix* и *YAP1* в цитоплазме *FetMSC* при росте на поверхности композитных матриц на основе PLGA. Остеоиндуктивные свойства были подтверждены в исследовании *in vivo*. В тесте ИКТ (индуктивность костной ткани) составляет 10 % и более в сравнении с негативным контролем.

Два вида композитной матрицы скаффолда-носителя, обогащенной АСК, способствовали (в сравнении с PLGA контролем) новообразованию костных структур (остеокондукции).

Суспензия, содержащая факторы роста клеточного происхождения, получена по оригинальной методике и исследована на остеоиндуктивную активность на клеточном и молекулярном уровне (экспрессия гена *YAP1*, *RUNX2*).

Изучены физико-химические свойства и структура композитной матрицы (скаффолда-носителя), которые позволяют понять свойства наиболее важные для адгезии и пролиферации МСК. Разрабатывается методический подход для исследования скаффолдов из новых композитов.

Исследование *in vitro* влияния образца суспензии, содержащей факторы роста клеточного происхождения, на способность к остеогенной дифференцировке МСК человека выявило, что при росте клеток линии *FetMSC* в присутствии данной суспензии в ростовой среде, наблюдалось проявление признаков, на уровне, сравнимом с положительным контролем (стандартного набора индукторов дифференцировки):

- экспрессия белков-факторов транскрипции *Runx2*, *Osterix* и *YAP1* (методом флуоресцентного анализа),
- экспрессия щелочной фосфатазы,
- накопление ионов кальция в цитоплазме,
- экспрессия генов-факторов транскрипции *Runx2* и *YAP1* (метод полимеразная цепная реакция в реальном времени) – была выше в 2-4 раза, чем в положительном контроле на всех исследованных сроках (3, 7 и 14 сут).

Работы, предусмотренные Техническим заданием и План-графиком, в отчетном периоде выполнены в полном объеме.