

Министерство образования и науки Российской Федерации
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Институт: Физико-технический
Направление подготовки: Техническая физика
Кафедра: Экспериментальной физики

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

Тема работы
ЭЛЕКТРОФОРМОВАНИЕ ТРЕХМЕРНЫХ МАТРИКСОВ С ДОБАВЛЕНИЕМ НАНОЧАСТИЦ МОДИФИЦИРОВАННОГО ГИДРОКСИАПАТИТА ДЛЯ БИОМЕДИЦИНЫ

УДК 538.9:661.882:617-74

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
0Д31	Звягин Андрей Сергеевич		

Руководитель

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент кафедры ЭФ	Сурменев Р.А.	к.ф.-м.н.		

КОНСУЛЬТАНТЫ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент кафедры менеджмента	Верховская М.В.	к.э.н.		

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Ассистент кафедры ПФ	Гоголева Т.С.	к.ф.-м.н.		

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Зав. кафедрой	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
ЭФ ФТИ	Кривобоков В.П.	д.ф.-м.н., профессор		

Томск – 2017 г.

**Результаты обучения бакалавров
направления 16.03.01 «Техническая физика»
(профиль «Пучковые и плазменные технологии»)**

Код результата	Результат обучения (выпускник должен быть готов)	Требования ФГОС, критериев и/или заинтересованных сторон
<i>Профессиональные компетенции</i>		
Р1	Использовать фундаментальные законы природы и естественнонаучных дисциплин, физико-математический аппарат, методы математического анализа, моделирования, оптимизации и статистики для решения задач в различных отраслях технической физики.	Требования ФГОС (ПК-2, 3). Критерий 5 АИОР, согласованный с требованиями международных стандартов EUR-ACE и FEANI
Р2	Участвовать в теоретических и экспериментальных исследованиях в различных отраслях технической физики, связанных с современными высокотехнологическими способами обработки материалов, основанными на использовании радиационных и плазменных потоков; самостоятельно осваивать современную физическую аналитическую и технологическую аппаратуру, применять современные методы исследования свойств материалов и различных структур, проводить стандартные и сертификационные испытания технологических процессов, оборудования и изделий, изучать научно-техническую информацию, разрабатывать адекватные физические и математические модели изучаемых объектов.	Требования ФГОС (ПК-4, 10, 11, 12, 13). Критерий 5 АИОР, согласованный с требованиями международных стандартов EUR-ACE и FEANI
Р3	Владеть основными методами работы с информацией, самостоятельно работать на компьютере в средах современных операционных систем и наиболее распространенных прикладных программ и программ компьютерной графики, применять современные образовательные и информационные технологии.	Требования ФГОС (ПК-5, 6, 7). Критерий 5 АИОР, согласованный с требованиями международных стандартов EUR-ACE и FEANI
Р4	Знать иностранный язык на уровне, позволяющем работать с научно-технической литературой и участвовать в международном сотрудничестве в области технической физики.	Требования ФГОС (ПК-8). Критерий 5 АИОР, согласованный с требованиями международных стандартов EUR-ACE и FEANI
Р5	Участвовать в производственно-технологической деятельности, определять основные параметры технологических процессов, анализировать свойства физико-технических объектов, изделий и материалов, применять современные информационные технологии, пакеты прикладных программ для расчета технологических параметров, обосновывать принятие конкретного технического решения при разработке технологических процессов и изделий.	Требования ФГОС (ПК-14, 15, 17). Критерий 5 АИОР, согласованный с требованиями международных стандартов EUR-ACE и FEANI
Р6	Использовать нормативные документы по качеству, стандартизации и сертификации изделий, элементы экономического анализа производственно-технологических циклов, знать и выполнять правила техники безопасности, производственной санитарии, пожарной безопасности и нормы охраны труда.	Требования ФГОС (ПК-16, 18). Критерий 5 АИОР, согласованный с требованиями международных стандартов EUR-ACE и FEANI

Код результата	Результат обучения (выпускник должен быть готов)	Требования ФГОС, критериев и/или заинтересованных сторон
Р7	Участвовать в проектно-конструкторской деятельности, разрабатывать функциональные и структурные схемы элементов и узлов экспериментальных и промышленных электрофизических установок, реализующих современные пучковые и плазменные технологии, проектировать технологические процессы и оборудование с использованием современных информационных технологий.	Требования ФГОС (ПК-19, 20). Критерий 5 АИОР, согласованный с требованиями международных стандартов EUR-ACE и FEANI
Р8	Участвовать в организационно-управленческой деятельности, уметь работать в команде и организовывать работу исполнителей, находить и принимать управленческие решения.	Требования ФГОС (ОК-3, ПК-21, 22, 23). Критерий 5 АИОР, согласованный с требованиями международных стандартов EUR-ACE и FEANI
Р9	Внедрять и коммерциализировать результаты исследований и проектно-конструкторских разработок, уметь оценивать инновационный потенциал новой продукции в области современных технологий, основанных на использовании радиационных и плазменных потоков.	Требования ФГОС (ПК-21, 22, 23, 24). Критерий 5 АИОР, согласованный с требованиями международных стандартов EUR-ACE и FEANI
<i>Универсальные компетенции</i>		
Р10	Осознавать социальную значимость своей профессии, развивать свой интеллектуальный и общекультурный уровень, в течение всей жизни самостоятельно обучаться новым методам исследований, пополнять свои знания в области современной технической физики и смежных наук, расширять и углублять свое научное мировоззрение, повышать свою квалификацию и мастерство, поддерживать здоровый образ жизни	Требования ФГОС (ОК-1, 2, 6, ПК-1). Критерий 5 АИОР, согласованный с требованиями международных стандартов EUR-ACE и FEANI
Р11	Свободно и грамотно пользоваться русским и иностранными языками как средством делового и профессионального общения, владеть навыками публичной дискуссии, создавать и редактировать тексты профессионального назначения.	Требования ФГОС (ОК-2). Критерий 5 АИОР, согласованный с требованиями международных стандартов EUR-ACE и FEANI
Р12	Уметь критически переосмысливать свой накопленный социальный и профессиональный опыт, изменять при необходимости профиль своей профессиональной деятельности, следовать этическим и правовым нормам и нести ответственность за последствия своей профессиональной деятельности	Требования ФГОС (ОК-5, 7, ПК-3). Критерий 5 АИОР, согласованный с требованиями международных стандартов EUR-ACE и FEANI

Министерство образования и науки Российской Федерации
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Институт: Физико-технический
Направление подготовки: Техническая физика
Кафедра: Экспериментальной физики

УТВЕРЖДАЮ:
Зав. кафедрой ВЭПТ
_____ Кривобоков В.П.
(Подпись) (Дата) (Ф.И.О.)

ЗАДАНИЕ
на выполнение выпускной квалификационной работы

В форме:

Бакалаврской диссертации

Студенту:

Группа	ФИО
ОД31	Звягину Андрею Сергеевичу

Тема работы:

Электроформование трехмерных матриц с добавлением наночастиц модифицированного гидроксиапатита для биомедицины	
Утверждена приказом директора (дата, номер)	
Срок сдачи студентом выполненной работы:	

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

Исходные данные к работе	<ol style="list-style-type: none">1. Установка для электроформования.2. Сканирующий электронный микроскоп MIRA II LMU device (Tescan, Чехия) и Tescan Vega II (Tescan, Чехия).3. Измерение смачиваемости DataPhysics OCA – Series.4. Фотометр планшетный BIO-RAD 680 (BIO-RAD, США).5. Флуоресцентный микроскоп Axiovert 200 (Германия).6. ИК-спектрометр с преобразованием Фурье EQUINOX 55 Bruker.
---------------------------------	---

	<ol style="list-style-type: none"> 7. Рамановский спектрометр. 8. Система полимеразной цепной реакции в реальном времени ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, США).
<p>Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Формирование гибридных полимерных 3-Д матриц различной структуры. 2. Исследование морфологии поверхности гибридных полимерных 3-Д матриц. 3. Исследование контактного угла смачиваемости гибридных полимерных 3-Д матриц. 4. Исследование химического состава гибридных полимерных 3-Д матриц. 5. Исследование цитотоксичности гибридных полимерных 3-Д матриц. 6. Исследование жизнеспособности, адгезии и пролиферации МСК человека. 7. Исследование экспрессии генов-маркеров отображающих процессы пролиферации, дифференцировки, поддержания стволовости, проапоптоза и некроза при культивировании МСК человека на поверхности гибридных полимерных 3-Д матриц.
<p>Перечень графического материала</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Титульный лист 2. 3-Д матрицы в костной имплантологии 3. Цель и задачи 4. Метод электроформования и материалы 5. Методы исследования 6. Морфология полимерных 3-Д матриц 7. Морфология полимерных 3-Д матриц 8. Контактный угол смачивания 9. Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье 10. Рамановская спектроскопия 11. МТТ-тест 12. Пролиферативная активность клеток на поверхности матриц 13. Жизнеспособность и адгезионная активность клеток на поверхности 3-Д матриц 14. Жизнеспособность, адгезионная и пролиферативная активность клеток на поверхности 3-Д матриц 15. Исследование экспрессии генов МСК человека при культивировании на поверхности 3-Д матриц 16. Заключение 17. Список публикаций 18. Благодарности

Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы	
Раздел	Консультант
Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	доцент кафедры менеджмента ИСГТ, к.э.н. Верховская М.В.
Социальная ответственность	ассистент кафедры ПФ ФТИ, к.ф.-м.н. Гоголева Т.С.

Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику	
---	--

Задание выдал руководитель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
доцент кафедры ЭФ	Сурменев Р.А.	к.ф.-м.н., доцент		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
ОД31	Звягин Андрей Сергеевич		

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА
«ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И
РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ»**

Студенту:

Группа	ФИО
ОД31	Звягину Андрею Сергеевичу

Институт	ФТИ	Кафедра	ЭФ
Уровень образования	Бакалавр	Направление/специальность	16.03.01 Техническая физика/Пучковые и плазменные технологии

Исходные данные к разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»:

<p>1. <i>Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих</i></p> <p>2. <i>Нормы и нормативы расходования ресурсов</i></p> <p>3. <i>Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования.</i></p>	<p>Использование информации, представленной в российских и иностранных научных публикациях, аналитических материалах и изданиях, нормативно-правовых документах, а именно:</p> <p>1.«Налоговый кодекс Российской Федерации (часть первая)» от 31.07.1998 № 146-ФЗ (ред. От 30.11.2016) (с изм. и доп., вступ. В силу с 01.01.2017)</p> <p>2.«Налоговый кодекс Российской Федерации (часть вторая)» от 05.08.2000 № 147-ФЗ.</p> <p>3.ГОСТ 14.322-83 Нормирование расхода материалов. Основные положения</p> <p>4.ГОСТ Р 51750-2001 Энергосбережение. Методика определения энергоемкости при производстве продукции и оказании услуг в технологических энергетических системах. Общие положения</p> <p>5.ГОСТ Р 54097-2010 Ресурсосбережение. Наилучшие доступные технологии. Методология идентификации.</p>
--	--

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

<p>1. <i>Оценка коммерческого потенциала, перспективности и альтернатив проведения НИ с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения</i></p> <p>2. <i>Определение возможных альтернатив проведения научных исследований</i></p> <p>3. <i>Планирование процесса управления НИИ: структура и график проведения, бюджет, риски.</i></p>	<p>1. Потенциальные потребители результатов исследования</p> <p>2. Анализ конкурентных технических решений</p> <p>3. SWOT-анализ.</p> <p>1.Определение трудоемкости выполнения работ</p> <p>2. Разработка графика проведения научного исследования</p> <p>3. Бюджет научно – технического исследования (НИИ)</p> <p>3.1. Расчет материальных затрат НИИ</p> <p>3.2. Расчет затрат на специальное оборудование для научных работ</p> <p>3.3. Основная заработная плата исполнителей темы</p> <p>3.4. Отчисления на социальные нужды</p> <p>3.5. Накладные расходы</p>
--	--

	3.6. Формирование бюджета затрат научно – исследовательского проекта
4. <i>Определение ресурсной, финансовой, экономической эффективности.</i>	Проведение оценки экономической эффективности исследования.

Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей):

1. *Оценочная карта для сравнения конкурентных технических решений (разработок)*
2. *Матрица SWOT*
3. *Оценка готовности проекта к коммерциализации*
4. *Календарный план-графики бюджет НИИ*
5. *Оценка ресурсной, финансовой и экономической эффективности НИИ*
6. *Сравнительная эффективность разработки*

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	
---	--

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Верховская Марина Витальевна	К.Э.Н		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
ОД31	Звягин Андрей Сергеевич		

ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»

Студенту:

Группа	ФИО
ОД31	Звягину Андрею Сергеевичу

Институт	ФТИ	Кафедра	ЭФ
Уровень образования	Бакалавр	Направление/специальность	16.03.01 Техническая физика/Пучковые и плазменные технологии

Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:

<p>1. Описание рабочего места (рабочей зоны, технологического процесса, механического оборудования) на предмет возникновения:</p>	<ul style="list-style-type: none"> – вредных проявлений факторов производственной среды (метеоусловия, вредные вещества, освещение, шумы, вибрации, электромагнитные поля, ионизирующие излучения); – опасных проявлений факторов производственной среды (электрической, пожарной и взрывной природы).
<p>2. Знакомство и отбор законодательных и нормативных документов по теме</p>	<ul style="list-style-type: none"> – требования охраны труда при работе на ПЭВМ (при эксплуатации электроустановок); – безопасность при эксплуатации установки; – электробезопасность; – пожаровзрывобезопасность; – химическая безопасность.

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

<p>1. Анализ выявленных вредных факторов проектируемой производственной среды в следующей последовательности:</p>	<ul style="list-style-type: none"> – действие фактора на организм человека; – приведение допустимых норм с необходимой размерностью (со ссылкой на соответствующий нормативно-технический документ); – предлагаемые средства защиты (коллективные и индивидуальные защитные средства)
<p>2. Анализ выявленных опасных факторов проектируемой производственной среды в следующей последовательности:</p>	<ul style="list-style-type: none"> – электробезопасность (в т.ч. статическое электричество, средства защиты); – пожаровзрывобезопасность (причины, профилактические мероприятия, первичные средства пожаротушения).

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	
--	--

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Ассистент каф. ПФ	Гоголева Т.С.	к.ф.-м.н.		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
0Д31	Звягин Андрей Сергеевич		

Реферат

Выпускная квалификационная работа 119 с., 20 рисунков, 23 таблицы, 65 источников, 1 приложение, 18 л. графич. материала.

Ключевые слова: электроформование, биodeградируемый полимер, поликапролактон, гидроксиапатит, смачиваемость поверхности, химический анализ, жизнеспособность МСК человека, адгезия и пролиферация МСК человека, МТТ-тест, ПЦР-РВ.

Объектом исследования является полимерные 3-Д матриксы перекрестной и выровненной структуры, модифицированные наночастицами гидроксиапатита (ГА), кремний-замещенного гидроксиапатита (SiГА) и стронций-замещенного гидроксиапатита (SrГА).

Цель работы: выявить влияние структуры и наличия наночастиц ГА, SiГА и SrГА в составе полимерных 3-Д матриксов на жизнеспособность, адгезию, пролиферацию и дифференцировку клеток.

В процессе работы проводились:

1. Получение полимерных 3-Д матриксов различной структуры с наночастицами ГА, SiГА и SrГА.
2. Исследование морфологии, химического состава, смачиваемости и биологических свойств гибридных полимерных 3-Д матриксов.

В результате исследований установлено:

- При добавлении наночастиц изменяется морфология волокон – увеличивается их диаметр до $5,8 \pm 13,8$ мкм и образуются агломераты частиц размером до 100 мкм.
- Все полученные образцы обладают гидрофобной поверхностью с контактным углом смачиваемости около 130° для чистого матрикса с перекрестной структурой и 110° для матриксов с выровненной структурой. Для гибридных

матрицков наблюдается уменьшение контактного угла смачивания до 110° для перекрестной структуры.

- Добавление наночастиц ГА, SiГА, SrГА в полимерные матрицы значительно увеличивает метаболическую активность клеток.
- При культивировании клеток на поверхности матрицков с выровненной структурой, клетки преимущественно растут в направлении волокон и образуют более плотные клеточные слои.
- Добавление наночастиц способствует адгезии, распластыванию и пролиферации клеток, особенно на матриксах с наночастицами SiГА и SrГА.
- Наличие наночастиц в матриксах приводит к увеличению экспрессии генов, ответственных за стволовость, пролиферацию и дифференцировку. Наибольшее увеличение экспрессии генов наблюдается у матрикса с 15% SiГА.

Оглавление

1. Способы получения и свойства волокнистых полимерных матрицков на основе ПКЛ с добавлением кальций-фосфатных частиц	19
1.1 Способы получения полимерных матрицков	19
1.2 Биологические свойства полимерных матрицков на основе ПКЛ.....	23
1.3 Кальций-фосфаты в организме человека.....	25
2. Методы исследования свойств 3-Д матрицков	29
2.1 Сканирующая электронная микроскопия.....	29
2.2 ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье	31
2.3 Рамановская спектроскопия.....	33
2.4 Смачиваемость и поверхностная энергия	34
2.5 Колориметрический МТТ-тест в биологических исследованиях.....	35
2.6 Культивирование фибробластов линии NCTC L929 и мезенхимальных стволовых клеток на поверхности гибридных полимерных матрицков	38
2.7 Метод полимеразной цепной реакции в реальном времени	40
3. Результаты и обсуждения.....	44
3.1 Материалы и исследование морфологии полимерных 3-Д матрицков	44
3.2 Смачиваемость полимерных 3-Д матрицков.....	48
3.3 ИК спектроскопия с преобразованием Фурье полимерных 3-Д матрицков ...	50
3.4 Рамановская спектроскопия полимерных 3-Д матрицков	51
3.5 Исследование цитотоксичности полимерных 3-Д матрицков.....	53
3.6 Исследование жизнеспособности, адгезионной и пролиферативной активности МСК человека при культивировании на поверхности гибридных полимерных 3-Д матрицков	55
3.7 Определение фенотипического профиля мезенхимальных стволовых клеток человека при культивировании их на поверхности гибридных полимерных 3-Д	

матрицков по уровню экспрессии мРНК с использованием метода ПЦР в реальном времени.....	58
4. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение.....	63
4.1 Предпроектный анализ.....	63
4.1.1. Потенциальные потребители результатов исследования.....	63
4.1.2 Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения.....	64
4.1.2 SWOT-анализ.....	67
4.2 План проекта.....	70
4.3 Бюджет научного исследования.....	73
4.3.1 Сырье, материалы, покупные изделия и полуфабрикаты (за вычетом отходов).....	73
4.3.2 Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ....	74
4.3.3 Основная заработная плата.....	75
4.3.4 Дополнительная заработная плата научно-производственного персонала.....	77
4.3.5 Отчисления во внебюджетные фонды.....	78
4.3.6 Накладные расходы.....	78
4.3.7 Формирование бюджета затрат научно-исследовательского проекта.....	79
4.4 Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования.....	79
5. Социальная ответственность.....	83
5.1 Анализ опасных и вредных производственных факторов.....	83
5.2 Обоснование и разработка мероприятий по снижению уровней опасного и вредного воздействия и устранению их влияния при работе на ПЭВМ, установке для электроформования и с химическими веществами.....	84
5.2.1 Организационные мероприятия.....	85
5.2.2 Организация рабочего места оператора ПЭВМ.....	86

5.2.3 Условия безопасной работы	88
5.3 Химическая безопасность	90
5.4 Электробезопасность	93
5.5 Пожарная и взрывная безопасность.....	96
Заключение	99
Список публикаций.....	101
Список использованных источников	102
Приложение А	110

Введение

Миллионы людей по всему миру страдают от травм, опухолей или костных заболеваний, связанных с возникновением костных дефектов. С давних пор и по настоящее время для замещения костных дефектов используются в основном имплантаты из металлов, но не один металл не может обеспечить весь ряд предъявляемых к имплантату характеристик, таких как: прочность, жесткость, модуль упругости, гидрофильность, биосовместимость, биodeградируемость и другие. Поэтому заполнение и восстановление больших костных дефектов все еще является актуальной задачей.

Новейшей идеей по воспроизведению объемной костной структуры в костной имплантологии является изготовление трехмерных (3-Д) матриц на основе биodeградируемых полимеров. Такой материал позволяет восстанавливать крупные костные дефекты и к тому же, постепенно растворяясь в организме, он не требует дальнейшего удаления. Одним из активно развивающихся методов получения полимерных матриц является метод электроформования, так как он относительно прост в эксплуатации и позволяет варьировать конечные характеристики получаемого материала, изменяя рабочие параметры в процессе формирования. Материал, получаемый при электроформовании, обладает волокнистой структурой, что в свою очередь приводит к высокой поверхностной площади и пористости. Высокая поверхностная площадь и пористость матриц способствует клеточной адгезии, пролиферации и миграции. Эти свойства являются крайне важными в тканевой инженерии. Поры обеспечивают пространство для прорастания сосудов, необходимых для питания новообразованной костной ткани и удаления продуктов жизнедеятельности клеток [1].

В качестве материала для производства матриц особый интерес представляют биосовместимые и биodeградируемые материалы. Биodeградируемость является крайне полезным свойством, так как имплантат,

изготовленный из биodeградируемого полимера, в процессе эксплуатации постепенно растворяется и заменяется растущей костной тканью. Данное свойство позволяет снять потребность повторного хирургического вмешательства. Одним из таких материалов, обладающих биосовместимостью и биodeградируемостью является поликапролактон (ПКЛ). Кроме того, ПКЛ обладает высокими механическими характеристиками, по сравнению с другими полимерами, используемыми в имплантологии [2]. Тем не менее в медицине поликапролактон применяют в очень ограниченном количестве из-за его синтетической природы происхождения и биоинертности. Для улучшения биосовместимости материала, которое проявляется в увеличении взаимодействия растущих клеток тканей с матриксом, активно исследуется добавление частиц, схожих по составу с костной тканью, таких как гидроксиапатит (ГА), частицы которого являются центрами агломерации костных клеток [3, 4]. Кроме чистого ГА возможно использование ГА с содержанием кремния, стронция и других элементов. Известно, что кремнийсодержащий ГА обладает высокой скоростью резорбции, содержит большое количество активных групп, к которым прикрепляются остеогенные клетки, что позволяет увеличить скорость восстановления костной ткани [5].

Поэтому цель данной работы заключается выявлении влияния структуры и наличия наночастиц ГА, кремний-замещенного ГА (SiГА) и стронций-замещенного ГА (SrГА) в составе полимерных 3-Д матриксов на жизнеспособность, адгезию, пролиферацию и дифференцировку клеток.

В задачи работы входило:

1. Получить гибридные полимерные 3-Д матриксы на основе ПКЛ с добавлением наночастиц ГА, Si-ГА и Sr-ГА методом электроформования;
2. Исследовать морфологию гибридных полимерных 3-Д матриксов на сканирующем электронном микроскопе;
3. Исследовать химический состав гибридных полимерных 3-Д матриксов с помощью инфракрасной и рамановской спектроскопии;

4. Исследовать цитотоксическое воздействие полимерных 3-Д матриц на субстратзависимые клетки млекопитающих;
5. Исследовать жизнеспособность, адгезионную и пролиферативную активность мезенхимальных стволовых клеток человека при культивировании на поверхности гибридных матриц методами флуоресцентной и сканирующей электронной микроскопии;
6. Определить фенотипический профиль мезенхимальных стволовых клеток человека при культивировании их на поверхности гибридных матриц с использованием метода полимеразной цепной реакции в реальном времени.

1. Способы получения и свойства волокнистых полимерных матриц на основе ПКЛ с добавлением кальций-фосфатных частиц

Под полимерным матриксом понимается основа для внеклеточной структуры ткани, которая обеспечивает механическую поддержку клеток. Являясь высокопористым материалом с волокнистой структурой, полимерный матрикс способствует регенерации ткани [6]. Наличие большого количества пор позволяет более эффективно доставлять питательные вещества клеткам, по сравнению с монолитными материалами, а волокна являются каркасом для адгезии и пролиферации клеток. На рисунке 1 приведена схема функционирования биорезорбируемого полимерного 3-Д матрикса.



Рисунок 1 – Схема функционирования полимерного 3-Д матрикса

Полимерный матрикс служит каркасом для роста клеток, прорастания их внутрь матрикса (пролиферация) и образования новой ткани с постепенным его растворением в организме человека.

1.1 Способы получения полимерных матриц

В настоящее время существует несколько методов формирования полимерных материалов, самыми распространенными из них являются следующие: вытягивание, темплатный синтез, электроформование (в иностранной литературе этот метод известен под названием *electrospinning*, электроспиннинг) [7].

Метод вытягивания состоит в том, что тонкое остриё слегка погружается при помощи микроманипулятора в каплю полимерного раствора (расплава) вблизи контактной границы (рисунок 2). Затем остриё извлекается из капли со скоростью $\sim 10^{-4} \text{ м} \cdot \text{с}^{-1}$ вытягивая за собой нановолокно.

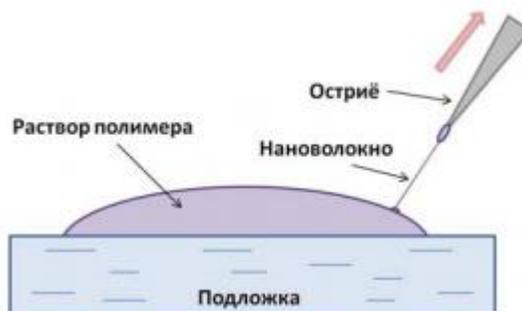


Рисунок 2 – Схематическое представление получения нановолокон полимеров методом вытягивания [7]

Этим методом могут быть получены нановолокна полимеров, выдерживающих большие деформации, находясь в вязко-текучем состоянии. Длина получаемых волокон определяется скоростью отверждения волокна за счет испарения растворителя (при формировании раствора полимера) или стеклования расплава (при формировании расплава полимера). Основным недостатком данного метода является крайне низкая скорость получения волокон [7].

Темплатный метод или метод нанопильер заключается в том, что темплатная подложка, т.е. подложка с ориентированными нанопорами, определяет направление продавливания раствора полимера (рисунок 3). Раствор полимера продавливается через нанопористую мембрану за счет создаваемого гидростатического давления, и сформированные нановолокна попадают в коагуляционный раствор, который состоит из: полимеризационноспособных соединений, диметилацетамида и воды.

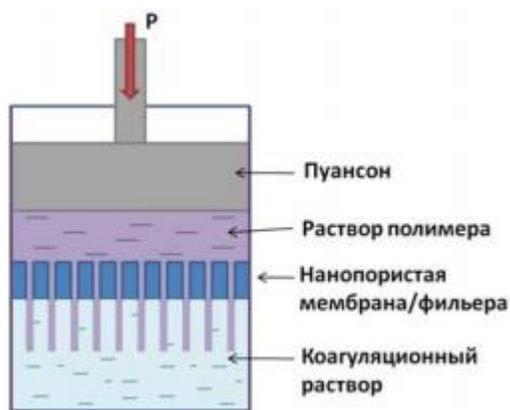


Рисунок 3 – Схема получения нановолокон полимеров темплатным методом [7]

Диаметр нановолокон определяется диаметром нанопор. В качестве нанопористой мембраны используются пористые оксиды, например, анодированный оксид алюминия, или металлические фильеры с нанопорами, сформированными лазерным сверлением. Недостатком метода является высокая сложность получения волокон желаемого диаметра [7, 8].

Метод электроформования (ЭФ) занимает особое место среди известных методов формирования полимерных волокон, отличаясь аппаратурной простотой, высокой энергетической эффективностью, гибкостью технологического процесса и разнообразием продукции. По своему аппаратурному оформлению и характеру ЭФ является сухим бесфильерным методом, в котором деформация исходного раствора, последующий транспорт отверждаемых при испарении растворителя волокон и формирование волокнистого слоя осуществляется исключительно электрическими силами и в едином рабочем пространстве. В качестве раствора могут использоваться: биodeградируемые полимеры (полигликолиевая кислота, полимолочная кислота, оксид полиэтилена, поливиниловый спирт), небиodeградируемые полимеры (полиэтилентерефталат, полибетилентерефталат, полистирол, полиуретан), натуральные полимеры (коллаген, желатин, хитозан, полигидроксibuтират, протеин шелка, целлюлоза) и, композиты (полимер с

добавлением гидроксиапатита) [9, 10]. На рисунке 4 представлена схема получения волокон методом электроформования.



Рисунок 4 – Схема получения волокон полимеров методом электроформования [7]

Электрическое напряжение, которое варьируется в очень широких пределах, от единиц до сотен киловольт (обычно: 10-60 кВ) прикладывается к капилляру, через который при помощи дозатора подается раствор полимера. Высокое напряжение, приложенное к капилляру и осадительному электроду, индуцирует в растворе полимера одноименные электрические заряды, которые, в результате кулоновского электростатического взаимодействия, приводят к вытягиванию раствора полимера в тонкую струю. В процессе вытягивания полимерной струи под действием электростатических сил она может претерпевать ряд последовательных расщеплений на более тонкие струи при определенном соотношении значений вязкости, поверхностного натяжения и плотности электрических зарядов (или напряженности электростатического поля) в волокне. Отверждение полученных струй происходит за счет испарения растворителя или в результате охлаждения. Струи, превращаясь в волокна, под действием электростатических сил дрейфуют к осадительному электроду, имеющему противоположное значение электрического потенциала. Стоит отметить, что полярность электродов при процессе

электроформования может быть и обратной, когда капилляр заземлен, а на осадительный электрод подается высокое напряжение.

Принципиальная схема процесса ЭФ одинакова для любого процесса и любой установки ЭФ. Тем не менее, конкретная техническая реализация этой схемы определяют вид и, в большой мере, качество получаемых изделий. Так геометрия электродов, их взаимное расположение, скорость перемещения электродов, число капилляров определяют ориентацию волокон в изделии, их длину, а также размеры самого изделия (лист, или непрерывная лента и т.п.). В настоящее время интенсивно разрабатываются различные схемы процесса ЭФ, позволяющие получать высоко ориентированные нановолокна ограниченной длины, или длинномерные жгуты, состоящие из нановолокон, непрерывные ленты, состоящие из волокон с преимущественной ориентацией [11, 12].

1.2 Биологические свойства полимерных матриц на основе ПКЛ

Полимерный матрикс, который будет контактировать с живыми тканями организма должен отвечать ряду требований.

Во-первых, полимер вживляемый в организм должен быть биосовместимым. Биосовместимые полимеры – это такие полимеры, которые при контакте или внутри живого тела не вызывают серьезных заболеваний или осложнений. Их можно классифицировать на биоинертные и биоактивные.

Как правило, биосовместимые полимеры с высоким молекулярным весом являются неразрушаемыми и классифицируются как биоинертные.

Биоактивные полимеры – это такие полимеры, которые оказывают воздействие на биологические объекты, с целью регулирования жизнедеятельности объекта, реализуемого посредством, стимуляции, развития или угнетения тех или иных признаков [13].

Кроме того, полимеры бывают биорезорбируемыми (биodeградируемыми) и бионерезорбируемыми (небиodeградируемыми). Когда некоторые полимеры подвергаются действию жидкостей, в частности жидкостей организма, они могут разбухать или растворяться. Молекулы жидкости могут диффундировать в полимер, раздвигая цепи и увеличивая объем. Это может возникать главным образом в местах трещин на поверхности, приводя к созданию локального растягивающего напряжения, что в свою очередь вызывает образование микротрещин или растрескивание под действием окружающей среды. Разрушение можно рассматривать в качестве крайнего случая вышеуказанного [14].

Биорезорбируемый полимер должен разрушаться в организме после выполнения своей функции. Полезные материалы часто разрушаются, образуя нетоксичные для организма вещества. Примером таких полимеров являются: полилактид, полигликолид, поли-3-гидроксibuтират, поликапролактон и многие другие [11].

Биорезорбируемые полимеры часто являются основой матрикса для инжиниринга тканей. Инжиниринг тканей – это выращивание тканей *in vitro*, часто путем посева клеток на матрикс (каркас), который направляет рост тканей.

Поликапролактон является биорезорбируемым полимером и имеет следующую химическую формулу: $[-(\text{CH}_2)_5\text{-CO}_2\text{-O-}]_n$. ПКЛ разлагается в два этапа. Сначала постепенно уменьшается молекулярная масса поликапролактона без деформации тканеинженерной конструкции. По мере уменьшения молекулярной массы ПКЛ начинает расщепляться на фрагменты, затем следует абсорбция и выведение. В естественных условиях деградация ПКЛ происходит главным образом гидролитическим процессом в течение 2-3 лет с образованием таких продуктов деградации, как вода, углекислый газ и капроевая кислота. Причем чем ниже молекулярный вес поликапролактона, тем короче сроки деградации. Капроевая кислота – это жирная кислота с водной растворимостью 9,72 мг/мл, присутствующая в различных животных жирах и нефти. Кроме того, она

содержится в биологических жидкостях человека (крови, спинномозговой жидкости, моче) [15, 16]. Производные средних триглицеридов, к которым относится капроевая кислота, широко используют для парентерального питания, в пищевых продуктах, косметической и лекарственной индустрии. Все это лишний раз подтверждает, что продукты деградации поликапролактона оказывают минимальное токсическое воздействие на ткани организма.

В ряде работ [17-19] доказана высокая биологическая совместимость ПКЛ. Полимер обладает хорошими адгезивными свойствами по отношению к мезенхимальным стволовым клеткам и низкой цитотоксичностью [20, 21]. В условиях *in vivo* волокна поликапролактона деградируют, создавая при этом хорошую основу для роста клеток, которые могут сформировать ткань [19, 22]. Однако, по данным ряда авторов, адгезия и рост различных популяций клеток на чистом ПКЛ не так благоприятны, как на сополимерных конструкциях.

Выраженная гидрофобность поликапролактона затрудняет адгезию и пролиферацию клеток на поверхности матриксов, изготовленных из чистого ПКЛ. Поэтому зачастую поликапролактон используется в смесях с другими веществами в целях улучшения свойств полимера. Поликапролактон не является биоактивным полимером, что замедляет рост клеток и тканей. Одним из способов придания ПКЛ биоактивности является добавление кальций-фосфатных частиц в полимер.

1.3 Кальций-фосфаты в организме человека

В 1929 г. химическими и рентгенодифракционными методами было доказано, что неорганическая часть костной ткани имеет в своем составе до 90 % различных гидратированных фосфатов кальция с преобладанием гидроксилапатита [23] Они придают тканям и органам стабильность, твердость и функциональность. В организме фосфаты кальция почти всегда встречаются в виде нанокристаллов [24].

Большой процент присутствия фосфатов кальция в теле является причиной

того, что многие биоматериалы с большой совместимостью основаны на этих материалах. При комбинации кальция с фосфатом, а при случае и водой, возникает ряд различных фосфатов кальция, почти все из которых применяются в биомедицине. Все фосфаты кальция являются в чистом состоянии белыми, твердыми веществами. Большинство фосфатов кальция мало растворяются в воде, но все они растворяются в кислотах. Решающими параметрами при их классификации является молярное Са/Р-отношение и растворимость в воде. Для стехиометрических фаз Са/Р-отношение варьируется от 0,5 до 2,0. Считается, что малое отношение Са/Р приводит к фосфату кальция с более высокой растворимостью в воде [24]. Химический состав кальций-фосфатов, содержащихся в тканях и органах человека, представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Фосфаты кальция в биологических системах человека [23]

Фосфаты кальция	Химическая формула	Отношение Са/Р	Распространение
Апатит	$(Ca,Z)_{10}(PO_4,Y)_6(OH,X)_2$	1,67	Эмаль, дентин, кость
Гидроксиапатит, ГА	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	1,67	Костная ткань
Октакальций фосфат, ОКФ	$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$	1,33	Зубной и мочевого камни
Витлокит, трикальций фосфат, β-ТКФ, α-ТКФ	$Ca_3(PO_4)_2$ $(Ca,Mg)_9(PO_4)_6$	1,50	Зубной и мочевого камни, зубной кариес
Аморфные фосфаты кальция, АФК	$(Ca,Mg)_m(PO_4,Y')_n$	–	Кальцинирование мягких тканей
Дигидрат пирофосфага кальция, ДПК	$Ca_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$	1,00	Псевдоподагрические отложения в синовиальных жидкостях
Пирофосфат кальция	$Ca_2P_2O_7$	1,00	–

Примечание: Z – Na, Mg, K, Sr; Y – CO₃, HPO₄; X – Cl, F; Y' – P₂O₇, CO₃.

Гидроксиапатит (гидроксилапатит) – основной минерал естественной кости, имеет химический состав, выражаемый формулой $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ со стехиометрическим отношением Са/Р равным 1,67. Гидроксиапатит является

самым стабильным и менее всего растворимым фосфатом кальция. Химически чистый гидроксиапатит кристаллизуется в моноклинную фазу и при 250° превращается в гексагональную фазу [25].

Гидроксиапатит является примером твердого тела, которое не склонно к стехиометрии, то есть может иметь отклонения от заданной формулы. Это позволяет, во-первых, встроить в решетку гидрогенфосфат H_3PO_4 и этим формально заменить кальций – катионы. Во-вторых, структура в местах ионов (кальций, фосфат, гидроксид) такая гибкая, что некоторое количество других ионов могут легко встроиться в решетку. Он может содержать в себе, например, Na, K, Mg, Si и Sr вместо Ca, карбонат вместо фосфата, а также фторид, хлорид, и карбонат вместо гидроксида. Замещение может быть от доли процента до 100% [24].

Химическое и структурное сходство с биологической твердой тканью является основанием для разнообразного применения гидроксиапатита и других фосфатов кальция как для замены костей, так и в качестве покрытий или добавок улучшающих биоактивность имплантата.

Несмотря на то, что костная ткань по большей части состоит из кальций-фосфатов, она также содержит высокие концентрации других веществ, которые могут замещаться на разнообразные катионы и анионы, присутствующие в гидроксиапатитовой структуре. Тип и количество ионов замещения варьируется в широких пределах: от единиц массовых процентов (CO_3^{2-}) до тысячных долей процента (Mg^{2+} и Sr^{2+}). Эти ионные замещения приводят к формированию сложных структур на кристаллохимическом уровне и оказывают важное влияние на скорость растворения и биологическую активность костной ткани [26].

Исследование роли кремния в костной ткани ведется с начала 1970-х годов. Известно, что кремний (~5 % масс.) содержится в активных зонах роста, таких как остеиды молодых костей мышей и крыс, а дефицит кремния приводит к деформации черепа и аномальному развитию скелета. Также существует прямая зависимость между долей кремния и минерализацией кости. На физиологическом

уровне кремний играет положительную роль в кальцификации костей и обмене веществ, поэтому предполагается, что включение сопоставимых количеств силикатных ионов в структуру ГА может также повысить биоактивность материала. Кроме того, сорбционная способность тоже является важной характеристикой для биоматериалов [27].

Наличие стронция в костной ткани увеличивает ее прочность, снижает риск перелома кости. Кроме того, стронций увеличивает скорость формирования и снижает скорость разрушения костной ткани [28].

2. Методы исследования свойств 3-Д матриксов

2.1 Сканирующая электронная микроскопия

В настоящее время трудно представить исследование новых материалов без использования техники микроскопического анализа. Сканирующая электронная микроскопия является едва ли не основным инструментом получения фундаментальных знаний в разделе наук о материалах, превратившись в достаточно привычный атрибут современных лабораторий. Уже невозможно представить себе быстрое и точное решение ряда задач без использования сканирующей электронной микроскопии. Широта применения этого метода обусловлена его высокой информативностью и универсальностью, а также простотой и удобством управления современным оборудованием.

Сканирующая электронная микроскопия обладает рядом преимуществ по сравнению с другими методами. Например, по сравнению с традиционной световой микроскопией она отличается значительно большими разрешающей способностью и глубиной резкости; относительной легкостью в интерпретации полученных изображений благодаря их трёхмерному представлению; возможностью подключения дополнительных приборов для анализа в микродиапазоне при достаточной простоте в адаптации и управлении этими приборами. Также необходимо отметить сравнительно низкие требования к пробоподготовке. По сравнению со сканирующей зондовой сканирующая электронная микроскопия позволяет исследовать существенно большие участки поверхности; работать с сильно рельефными поверхностями; использовать значительно более широкий диапазон увеличений; получать информацию не только о поверхности, но и о прилегающих к поверхности «подповерхностных» слоях [29].

В любом микроскопе информация об объекте представляется в форме изображения. В сканирующем электронном микроскопе построение изображения ведется последовательным способом. Данный способ заключается в поочередном

воздействии пучка ускоренных электронов на точки объекта, путем сканирования и последующей регистрацией сигнала с помощью детектора, возникающего в результате взаимодействия электронов с веществом.

Основной характеристикой микроскопа является разрешение. Под физическим разрешением микроскопа подразумевается минимальное расстояние между двумя объектами, при котором они различимы на изображении. Если расстояние между объектами меньше, чем разрешение микроскопа, то объекты сливаются в один. Современные сканирующие электронный микроскопы позволяют получать изображения объекта с разрешением до 0,4 нм.

Принципиальная схема сканирующего электронного микроскопа (рисунок 5) включает в себя источник электронов, оптическую систему для фокусировки электронов и сканирования электронную колонну, камеру с образцом и детекторы для регистрации сигнала, а также систему откачки, необходимую для создания вакуума в микроскопе.

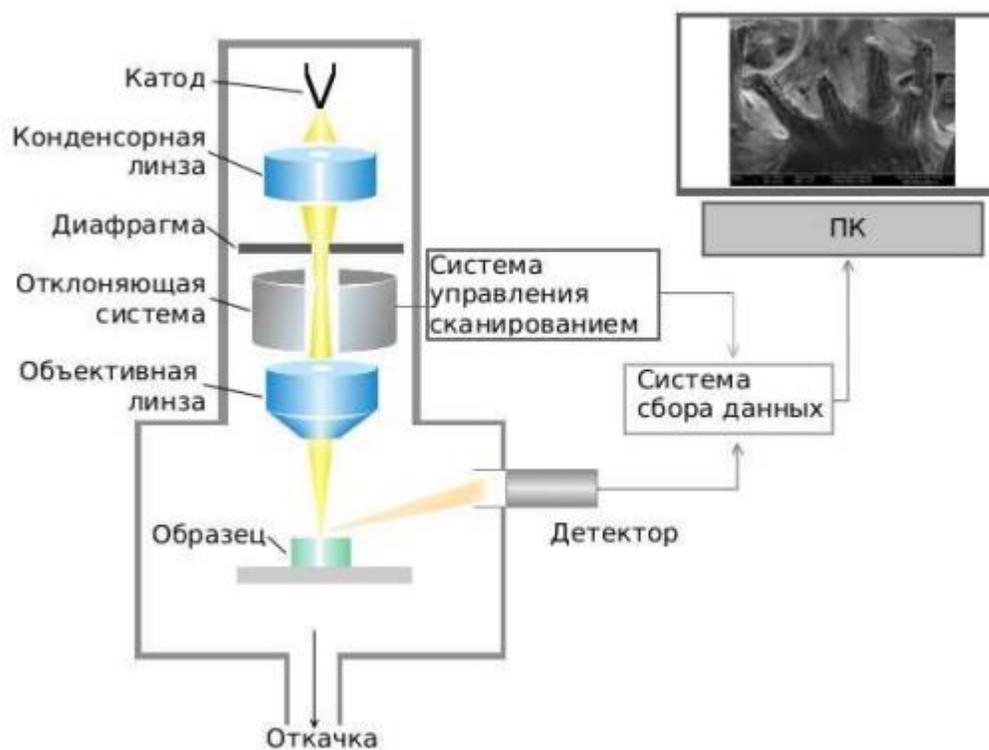


Рисунок 5 – Принципиальная схема сканирующего электронного микроскопа [29]

Испускаемые катодом электроны, проходя через систему электронной оптики, фокусируются и ускоряются в направлении образца. В процессе сканирования сфокусированным пучком по поверхности образца происходит эмиссия вторичных электронов, которые регистрируются детектором. Таким образом, на систему сбора данных поступает информация о координатах пучка на образце и величине сигнала с детектора. При построении изображения каждой точке образца приписывается яркость пропорциональная величине сигнала, измеренного в момент, когда пучок находился в этой точке [30].

2.2 ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье

Инфракрасная (ИК)-спектроскопия с преобразованием Фурье – это широко известная и проверенная технология анализа для идентификации неизвестных химических веществ. Метод основан на взаимодействии инфракрасного света с химическим веществом посредством процесса поглощения фотонов, в результате которого образуется набор диапазонов излучения вещества, называемый спектром.

Любая молекула имеет свой, только ей присущий колебательный спектр, состоящий из набора полос разной частоты и интенсивности. Поэтому колебательный спектр вещества является его индивидуальной характеристикой и может использоваться для идентификации вещества [31].

Достоинством методов колебательной спектроскопии является то, что они допускают исследование практически любого неорганического или органического вещества в любом агрегатном состоянии – газе, жидкости, растворах, кристаллах или аморфной фазе.

В основе действия Фурье-спектрометров лежит явление интерференции электромагнитного излучения. Для изготовления этих приборов используют интерферометры нескольких типов. Наибольшее распространение получил

интерферометр Майкельсона. На рисунке 6 представлена принципиальная оптическая схема Фурье-спектрометра, построенного по принципу Майкельсона.

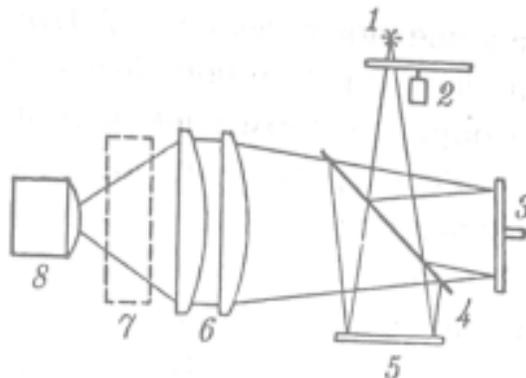


Рисунок 6 – Принципиальная оптическая схема интерферометра Майкельсона [32]

Поток ИК-излучения от источника 1, модулированный прерывателем 2, делится светоделителем 4 на два пучка. Один из них направляется на зеркало 3, которое связано микрометрической передачей с двигателем и может поступательно перемещаться с определенной длиной пробега и возвращаться в исходное положение. Отраженный от этого зеркала пучок интерферирует, имея заданную зеркалом 3 разность хода, с пучком, отраженным от закрепленного зеркала 5. Дальше излучение фокусируется линзами 6 на приемнике 8, проходя через исследуемый образец, помещенный в кюветное отделение 7. При движении зеркала 3 и интерференции пучков с изменяющейся разностью хода происходит сканирование в определенном спектральном диапазоне. Усиленный сигнал поступает на вход компьютера, который осуществляет Фурье-преобразование интерферограммы и получение спектра поглощения исследуемого образца [32].

Стоит отметить, что не все молекулы способны поглощать инфракрасное излучение. Молекулы, имеющие центр симметрии, например, молекулы типа H_2 , Cl_2 , O_2 и им подобные, лишены дипольного момента и не приобретают его в процессе колебания и, следовательно, в инфракрасном спектре не активны [33].

ИК-спектроскопия также позволяет определить и изучить межмолекулярные и внутримолекулярные водородные связи, т.к. их образование приводит либо к сдвигу полосы в сторону меньших частот, либо к уширению и увеличению интенсивности полосы, отвечающей валентному колебанию группы, участвующей в образовании водородных связей [34].

2.3 Рамановская спектроскопия

Рамановская спектроскопия – это неразрушающий метод изучения молекулярной структуры веществ. При падении монохроматического пучка света на образец возникают различные колебательные переходы молекул, с поглощением и рассеиванием падающего света: Релеевское – без потери энергии и Рамановское (комбинационное) – с потерей энергии. Комбинационное рассеяние обусловлено неупругими столкновениями фотонов с молекулами (или ионами), в ходе которых они обмениваются энергией.

Комбинационное рассеяние света – рассеяние в газах, жидкостях и кристаллах, сопровождающееся заметным изменением частоты. В отличие от рэлеевского рассеяния света, при комбинационном рассеянии света в спектре рассеянного излучения наблюдаются спектральные линии, отсутствующие в линейчатом спектре первичного (возбуждающего) света. Число и расположение появляющихся линий (называемых комбинационными линиями или спутниками) определяется молекулярным строением вещества. Спектры комбинационного рассеивания – это линии, соответствующие частоте колебания молекул, сопровождаемого изменением их поляризуемости (мера изменения их электронного состояния). Рамановские частоты не зависят от выбранной длины волны возбуждающей линии света и характеризуют частоты колебаний полиатомных структур образца; это относительные волновые значения (см^{-1}), непосредственно считываемые с наблюдаемого спектра. Сдвиг частот

характеризует меру энергии, необходимую для возникновения колебательного и вращательного состояния молекул вещества. Для измерений, как правило, используется лазерное излучение с длиной волны 514,5 нм (линия ионизированных атомов аргона) и мощностью не более 50–100 мВт [35, 36].

2.4 Смачиваемость и поверхностная энергия

Как правило, под понятиями гидрофильность и гидрофобность поверхности, подразумевают ее хорошую и плохую смачиваемость, соответственно. Если молекулы вещества сильно взаимодействуют с водой, например, образуя водородные связи, то говорят о его гидрофильности, а при слабом взаимодействии молекул говорят о гидрофобности. Гидрофильность присуща веществам, близким по химическому строению с водой, и, наоборот, гидрофобными свойствами обладают вещества, очень далекие от воды по своей химической структуре.

Мерой интенсивности межмолекулярного взаимодействия является поверхностное натяжение на границе раздела вещества и воды. Чем больше гидрофильность вещества, тем ниже поверхностное натяжение. Гидрофильность и гидрофобность поверхности количественно оцениваются краевым углом смачиваемости θ . Этот угол измеряется между поверхностью твердого тела и водой внутри воды (рис. 7).

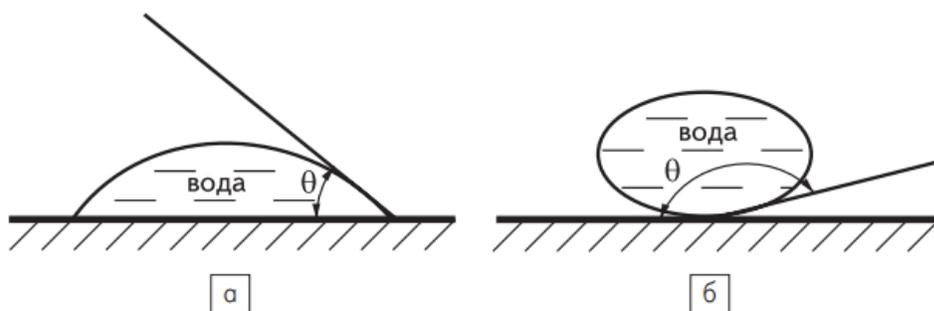


Рисунок 7 – Смачивание поверхности. а) смачивание водой гидрофильной поверхности; б) смачивание водой гидрофобной поверхности [37]

Если $\theta < 90^\circ$ (рис. 8а), то поверхность гидрофильная. При этом поверхностное натяжение на границе раздела твердого тела с водой меньше, чем на границе раздела твердого тела с воздухом. Чем ниже краевой угол смачивания, тем более гидрофильная поверхность. На предельно гидрофильных поверхностях происходит растекание воды. В случае, если $\theta > 90^\circ$, то поверхность является гидрофобной, и вода на таких поверхностях собирается в капли.

Смачивание можно рассматривать как процесс, при котором в системе из трех соприкасающихся фаз происходит уменьшение свободной поверхностной энергии [38, 39].

2.5 Колориметрический МТТ-тест в биологических исследованиях

Под воздействием физиологически активных веществ (которые представляют органические вещества, обладающие активностью в очень малых концентрациях) клетки могут претерпевать изменения в морфологии, скорости клеточного роста, времени гибели и степени дезинтеграции, поэтому для каждого вещества, являющегося потенциальным фармакологическим агентом, необходимо выполнять оценку влияния на выживаемость клеток. Существуют различные методы определения цитотоксичности (способности химических веществ повреждать клетки тканей) продуктов органического синтеза, природных соединений и экстрактов. Один из методов основан на измерении митохондриальной активности (активность постоянной компоненты клетки, необходимой для окисления органических соединений и использование освобождающейся при их распаде энергии для генерации электрического потенциала, синтеза аденозинтрифосфата и термогенеза) клеток. Метод особенно популярен в экспериментальных фармакологических исследованиях. Определение изменений в митохондриальной

активности может быть определено с использованием МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) [40].

Метод МТТ широко используется для измерения выживаемости клеток и включен в большинство протоколов методов молекулярной биологии и медицины [41, 42]. МТТ-тест основан на способности митохондриальных дегидрогеназ (ферментов, отщепляющих водород от органических веществ) конвертировать водорастворимый МТТ в формазан, который кристаллизуется внутри клетки. Только клетки с живыми митохондриями могут осуществлять эту реакцию, следовательно, интенсивность окраски прямо связана со степенью неповрежденности митохондрий. Этот тест полезен для обнаружения общих цитотоксических соединений, а также агентов, для которых митохондрии являются специфическими мишенями. Метод определения цитотоксичности с помощью Недостатком МТТ-теста является сложная реализуемость при использовании суспензионных культур (культура клеток, не прикрепленных к подложке, растущих в жидкой среде), так как подразумевает полное удаление среды культивирования на стадии растворения кристаллов формазана. Однако преимуществами данного метода является экономичность и отличная воспроизводимость результатов.

Исследование цитотоксичности материалов проводилось с использованием вытяжек и самих материалов согласно требованиям ГОСТ Р ИСО 10993-12-2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 12. Приготовление проб и контрольные образцы» и ГОСТ Р ИСО 10993-5-2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*». В качестве модельной среды для приготовления вытяжек была использована культуральная среда ДМЕМ/F12 с добавлением 100 Ед/мл пенициллин/стрептомицина. Культуральная среда ДМЕМ/F12 представляет собой растворенную в очищенной воде смесь неорганических солей, аминокислот, витаминов, глюкозы и используется для культивирования широкого спектра клеток животных и человека.

Приготовление вытяжек проводилось с соблюдением асептики в течение 3 суток при 37°C, на каждый образец была сделана одна проба. Для МТТ-теста использовались первые и вторые вытяжки. Соотношение массы материала и объема модельной среды составляло 1:10. Вытяжки приготавливались из 100-120 мг материала. В эксперименте использовались фибробласты мыши линии NCTC L929. Клетки высевали в лунки 96-луночного планшета, посевная плотность клеток составляла 40 тыс/см² (12 тыс. клеток на 100 мкл), концентрация эмбриональной телячьей сыворотки в среде культивирования составляла 5%. Через 3,5 часа после посева клеток среду замещали эквивалентными количествами вытяжек, по десять лунок на каждую пробу с последующим культивированием при 37°C в течение 24 часов. В качестве контроля вместо вытяжки вносились среду ДМЕМ/F12, выдержанную в течение 3 суток при 37°C.

Оценка жизнеспособности клеток проводилась с помощью колориметрического МТТ-теста, основанного на восстановлении бесцветной соли тетразолия (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид, МТТ) митохондриальными и цитоплазматическими дегидрогеназами живых метаболически активных клеток с образованием голубых кристаллов формазана. В качестве контроля фона использовалась культуральная среда, подвергшаяся воздействию условий и процедур исследования. Спустя сутки после начала культивирования культуральную среду удаляли и в каждую лунку вносили по 100 мкл раствора МТТ 0,5 мг/мл в культуральной среде ДМЕМ/F12 без сыворотки. После выдерживания в течение 3,5 часов при 37°C в увлажненной атмосфере 5% CO₂ жидкость удалялась, вносилось по 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) и, при встряхивании планшетов при комнатной температуре в течение 10 мин, растворялись образовавшиеся соли формазана. Развитие окраски регистрировалось путем измерения оптической плотности при длине волны 540 нм в лунках 96 луночного планшета с помощью фотометра (модель 680 BIO-RAD, США). Количество восстановленного формазана измерялось на фотометре модели 680

(BIO-RAD, США) при длине волны 540 нм. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы Origin, за ошибку принималось среднеквадратичное отклонение от среднего значения, за достоверные принимали различия по U-критерию Манна – Уитни (Mann – Whitney U-test) при $p < 0,05$, который используется для оценки различий между двумя независимыми выборками по уровню какого-либо признака, измеренного количественно.

2.6 Культивирование фибробластов линии NCTC L929 и мезенхимальных стволовых клеток на поверхности гибридных полимерных матриц

Культивирование клеток на поверхности матриц было проведено с целью изучения адгезивных характеристик материалов и определения их цитотоксичности методом прямого контакта. При проведении данного исследования использовались фибробласты линии NCTC L929 и мезенхимальные стволовые клетки (МСК) человека. МСК выделялись из зачатка третьего моляра, извлеченного по ортодонтическим показаниям у здорового пациента 16 лет, который был получен из лицензированного МЗ РФ учреждения, действующего в рамках законодательства РФ. Клетки получены ферментативной дезагрегацией тканей по следующей методике. Асептически отобранные ткани промывались средой культивирования DMEM/F12, измельчались до фрагментов порядка одного миллиметра и подвергались обработке 0,25% раствором трипсина в течении 30 минут при 37°C. Выделенные клетки собирались центрифугированием в течение 2 минут при 1500 об/мин и культивировали в среде DMEM/F-12 (1:1, “Life technologies”, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, ПанЭко, Россия), 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки субкультивировали с интервалом от 3 до 7 дней, отмечая

количество пассажиров, пройденных каждой культурой. Для проведения исследований была использована культура МСК на 4 пассаже.

Посев клеток на поверхность осуществлялся в ячейки 24-х луночного планшета в концентрации 36,8 тыс.кл/см² (среда DMEM/F12 + 10% FBS). В качестве контроля использовались покровные стекла того же размера.

После окончания культивирования проводилась оценка жизнеспособности клеток, культивируемых на поверхности полимерных гибридных матриц, с использованием флуоресцентного микроскопа Axiovert 200. Для проведения анализа использовался метод флуоресцентного окрашивания клеток красителями SYTO 9 и иодидом пропидия. Флуоресцентный краситель SYTO 9 в режиме исследования $\lambda_{\text{возб}}=450-490$ нм, $\lambda_{\text{эмисс}}=515-565$ нм окрашивает в зеленый цвет ДНК и РНК живых и мертвых клеток. Интеркалирующий реагент иодид пропидия в режиме исследования $\lambda_{\text{возб}}=546$ нм, $\lambda_{\text{эмисс}}=575-640$ нм окрашивает в красный цвет ядра погибших клеток.

По завершении культивирования проводилась подготовка образцов для исследования методом сканирующей электронной микроскопии. Образцы промывались в 0,1 М фосфатно-солевом буфере (рН 7.4) и фиксировались 12 часов при температуре 5°C в 2,5% забуференном растворе глутарового альдегида. После фиксации образцы промывались водой и дегидратировались в батарее водного раствора этанола возрастающей концентрации: 50%, 75%, 80%, 90% и в абсолютном этаноле на заключительном этапе. На каждой стадии образцы дважды погружались на 5 минут в соответствующий раствор этилового спирта. Для удаления спирта образцы переносили на 30 минут в гексаметилдисилазан (HMDS), после чего высушивались на воздухе.

2.7 Метод полимеразной цепной реакции в реальном времени

В настоящее время одним из наиболее перспективных подходов к молекулярной диагностике различных болезней человека, животных и растений, и к анализу различных биологических объектов является использование амплификационной технологии специфической детекции ДНК или РНК.

В рамках данной технологии наиболее современным методом детекции нуклеиновых кислот является полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ). Одним из основных достоинств ПЦР-РВ является возможность получения информации о наличии, количестве и возможных изменениях в последовательности нуклеиновых кислот непосредственно в ходе реакции, что существенно упрощает, укорачивает и удешевляет ПЦР-анализ. Кроме того, количественные измерения, проводимые с помощью ПЦР-РВ, отличаются рекордно низким коэффициентом вариации и наиболее широким линейным диапазоном, что позволяет рассматривать данный метод в качестве приоритетного метода определения концентрации ДНК/РНК в исследуемых пробах.

ПЦР-РВ может применяться для выявления генов, которые показывают состояние клетки, ее способность к росту и делению, разрастанию ткани и переходу клетки к новому фенотипу (пролиферации и дифференцировке) и многие другие свойства, за которые отвечают определенные гены.

Для реализации условий полимеразной цепной реакции анализируемые образцы смешиваются в пробирках с реакционной смесью, в состав которой входят:

- праймеры – искусственно синтезированные олигонуклеотиды, которые обеспечивают специфичность реакции;
- ДНК-полимераза – термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК;
- смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов, используемых ДНК-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК;

- интеркалирующий краситель или специфические зонды;
- буфер – смесь катионов и анионов, обеспечивающих оптимальные условия для реакции.

Для ПЦР-РВ используются одноразовые полипропиленовые пробирки с герметичными крышками. Пробирки устанавливаются в термостат, работающий в циклическом температурном режиме. При нагревании пробирок до 95°C молекулы анализируемых образцов ДНК расплетаются с образованием двух одноцепочечных молекул. Праймеры присоединяются к одноцепочечной ДНК-мишени и ограничивают искомый фрагмент. При температуре порядка 60°C ДНК-полимераза достраивает вторую цепь ДНК с 3'-конца праймера.

При малой концентрации анализируемых образцов температурный цикл амплификации повторяется до 50 раз. Реактивы обеспечивают избирательность полимеразной цепной реакции и позволяют выделить искомую ДНК на фоне других. При каждом цикле амплификации синтезированные ранее фрагменты вновь копируются ДНК-полимеразой. При этом происходит экспоненциальное увеличение количества копий фрагмента исходной ДНК. Концентрация исходных специфических фрагментов ДНК увеличивается приблизительно как 2^N , где N – количество циклов [43].

В работе метод ПЦР-РВ использовался для исследования экспрессии генов-маркеров, отображающих процессы пролиферации и дифференцировки, поддержания стволовости, апоптоза и некроза. Маркерные гены были взяты из баз данных для ПЦР профилирования Qiagen (<http://www.sabiosciences.com>). Праймеры для каждого маркерного гена подбирались с помощью программы PrimerEpress (Applied Biosystems).

Таблица 2 – Функциональные группы генов, экспрессия которых оценивалась в работе

Ген	Функции	Ген	Функции	Ген	Функции
KAT2A	Модуляторы хроматина и хромосом	HSPA9	Маркеры самообновления	FOXA2	Маркеры уменьшения стволовости
RB1		SOX1		PTCH1	

				CD34	
TERT		BMP7		AXL	Маркеры миграции клеток
DHH	Регуляторы симметричности деления клеток	DNMT1		IL8	
NUMB		APC	Поддержание стволовости (Wnt сигналинг)	SNAI1	
PARD6A		AXIN		TWIST1	
HDAC2	Поддержание стволовости (Notch сигналинг)	MSX1		ZEB1	Маркеры плюрипотентности
JAG1		CCND1	Маркеры пролиферации	KLF4	
NOTCH1		CDK4		MYC	
NOTCH2		CDC6		NANOG	
ALPL		WEE1		POU5F1	
BGLAP	CCNA2	SOX2			
BMP1	AURKB	NOS2		Антиапоптотические маркеры	
BMPR1A	CCNB2	BCL2			
COL1A1	CUL1	BIRC3			
COL3A1	SKP2	MCL1			
EGFR	CCNB1	TRAF2		Маркеры аутофагии	
FGF-2	CDK7	ATG3			
FGFR1	CDKN1B	ATG12			
IGF1	CDKN2A	NFKB1			
IGFR1	CDKN2B	RPS6KB1			
RUNX2	TP53	CCDC103	Маркеры некроза		
SMAD2	MCM2	FOXI1			
SMAD4	LIN28B	JPH3			
SMAD5	FOXP1	RAB25	Проапоптотические маркеры		
SPP1	SIRT1	BAX			
TGFBR1	WNT1	CD40			
TNF	ALDH1A	CFLAR			
VDR	CD44	FAS	Маркеры стволовости		
	GATA3	TNFRSF10A			
	ITGA6				
	ITGB1				

Для выделения общей матричной РНК из клеток использовали набор «Выделение полноразмерной поли (А) мРНК на магнитных частицах» (Силекс

(Москва)), Полученную мРНК использовали для синтеза комплементарной ДНК, с помощью набора «Синтез первой цепи кДНК (олиго(дТ)15)» фирмы Силекс. кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени, который проводили на приборе ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems), используя набор фирмы Синтол, содержащий интеркалирующий краситель SybrGreen и референсный краситель ROX.

Концентрация праймеров в реакциях по оптимизации составляла 0,05 пмоль/мкл, концентрация ионов Mg^{2+} составляла от 1,5 мМ, концентрация фермента от 0,2 ед на 20 мкл реакции. Длина праймеров составляла в среднем 24 нуклеотида. Температура отжига $60^{\circ}C$, длина амплифицируемого фрагмента 94-100 пар нуклеотидов. Реакцию проводили по следующей схеме: 1 цикл $95^{\circ}C$ – 5 мин; 2 - 40 циклов $95^{\circ}C$ – 30 сек, $60^{\circ}C$ – 40 сек; 1 цикл (стадия диссоциации) $95^{\circ}C$ – 15 сек, $60^{\circ}C$ – 1 мин, $95^{\circ}C$ – 15 сек.

Для проверки специфичности реакции продукты амплификации проверялись электрофорезом в 2% агарозе. Также специфичность реакции проверялась на кривых температурной диссоциации полученных ампликонов. Анализ данных, полученных с помощью ПЦР в реальном времени, производили по пороговой флуоресценции методом $\Delta C(T)$.

3. Результаты и обсуждения

3.1 Материалы и исследование морфологии полимерных 3-Д матриц

В ходе работы были получены образцы полимерных 3-Д матриц на основе ПКЛ с добавлением наночастиц ГА, кремний-замещенного гидроксиапатита (SiГА) и стронций-замещенного гидроксиапатита (SrГА), методом электроформования.

Первая часть процесса электроформования заключается в приготовлении полимерного раствора. В данной работе для синтеза 3-Д матриц использовался 9% раствор поликапролактона массой 80 000 а.е.м. марки SIGMA ALDRICH. В качестве растворителя выступал хлороформ ($CHCl_3$) плотностью 1,49 г/см³. Расчет массы полимера в растворе производился по формуле:

$$X[mg] = \frac{9\% * V[ml - CHCl_3] * \rho[CHCl_3] * 1000}{100 - 9\%} \quad (1),$$

где X – масса полимера, V – объем растворителя, ρ – плотность растворителя.

Размешивание раствора происходило с помощью мешалки ELMi Intelli Mixer RM-1L со скоростью 16 об/мин в течение 2-3 часов. Действие этого прибора основано на принципе вращения, что позволяет перемешивать пробирки с химическими реактивами. После раствор помещался в шприц, шприц размещался в помпе, соединялся с иглой и запускался процесс формирования волокон.

В данной работе определяемыми параметрами были, напряжение, расстояние от иглы до коллектора, скорость подачи полимера и скорость вращения вала (рис. 8). Для получения матриц с разной структурой волокон проводилось варьирование скорости вращения вала 600 об/мин для получения перекрестной структуры и 1000 об/мин для выравненной.

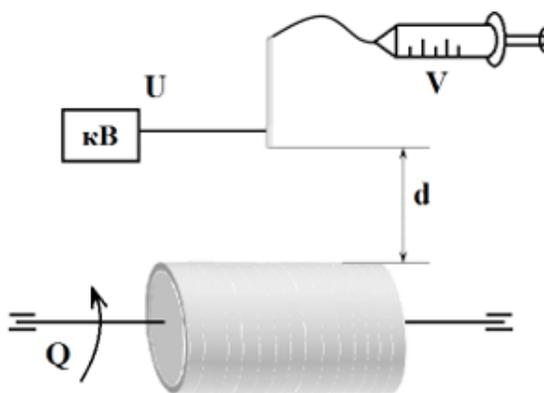


Рисунок 8 – Основные параметры установки: d - расстояние между иглой и коллектором; U - подаваемое напряжение; V - скорость подачи полимера; Q - скорость вращения вала

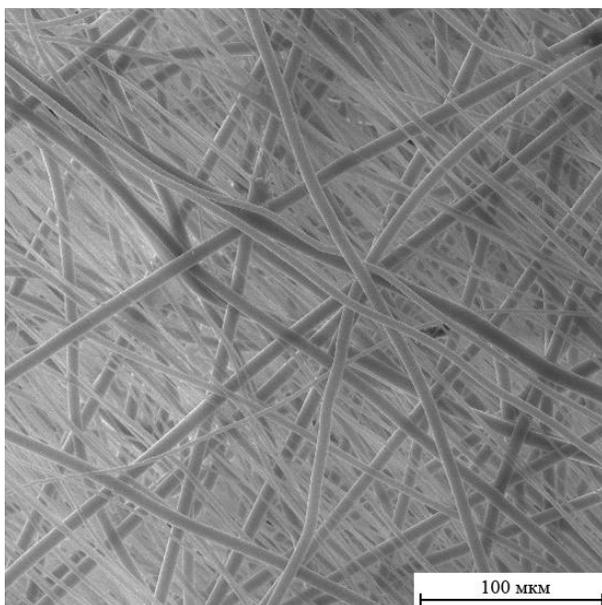
Таблица 3 – Рабочие параметры процесса электроформования

Расстояние между иглой и валом, см	Напряжение, кВ	Скорость подачи полимера, мл/ч	Скорость вращения вала, об/мин	Время формирования, мин
8	8	3,6	600	60
8	8	3,6	1000	60

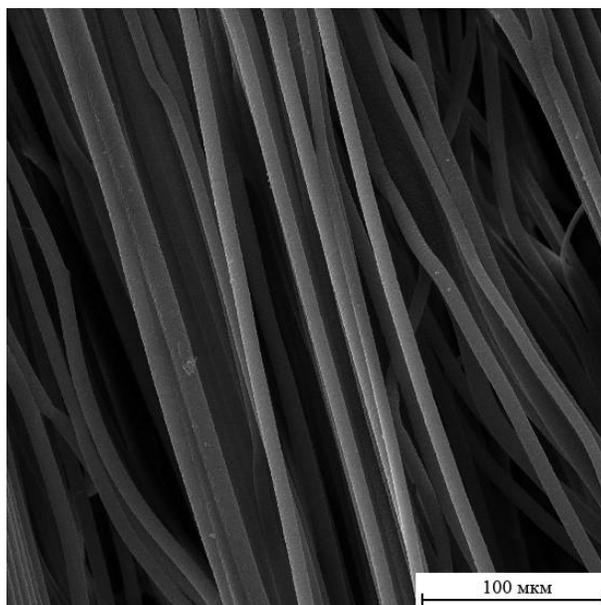
Получение гибридных полимерных 3-Д матриц происходило путем добавления наночастиц ГА, SiГА или SrГА в полимерный раствор на этапе его приготовления. Концентрация наночастиц составляла 10% и 15% от массовой доли полимера. Перемешивание производилось с помощью мешалки ELMi Intelli Mixer RM-1 и ультразвуковой ванны (УЗВ-0,8 Сапфир) для предотвращения образования больших агломератов частиц. Процесс электроформования 3-Д гибридных матриц проводился при рабочих параметрах, представленных в таблице 3.

Морфология полимерных 3-Д матриц была исследована на сканирующем электронном микроскопе MIRA II LMU device (TESCAN, Чехия) при ускоряющем напряжении 30 кВ.

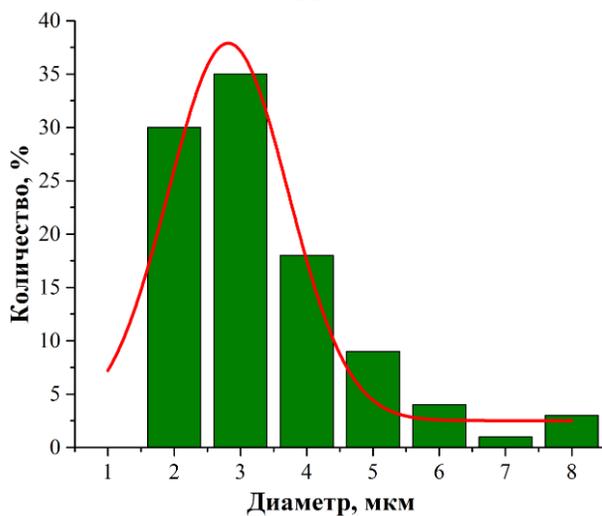
Для определения распределения волокон по диаметрам была сделана выборка 100 волокон на каждом образце и измерен их диаметр. Результаты представлены на рисунках 9-10.



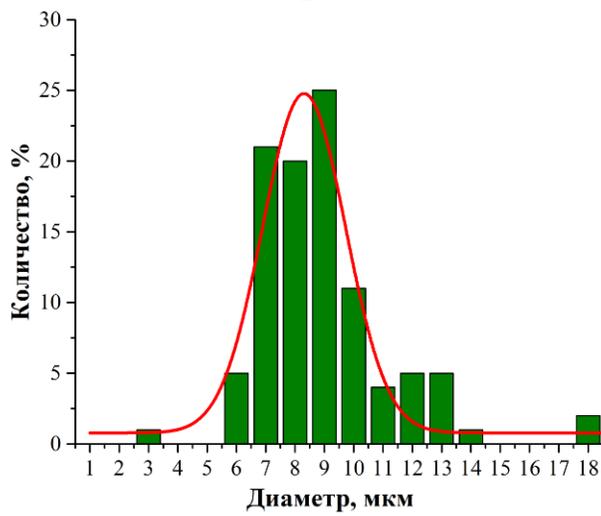
А



Б



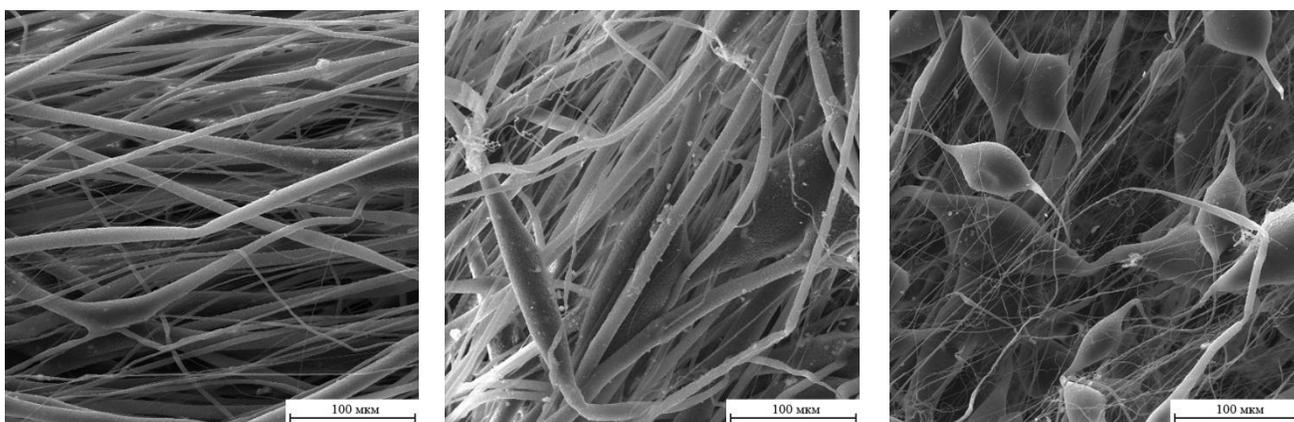
В



Г

Рисунок 9 – СЭМ изображения полимерных 3-Д матриц с перекрестной (А) и выровненной (Б) структурами волокон. В, Г – распределения диаметра волокон для соответствующих матриц

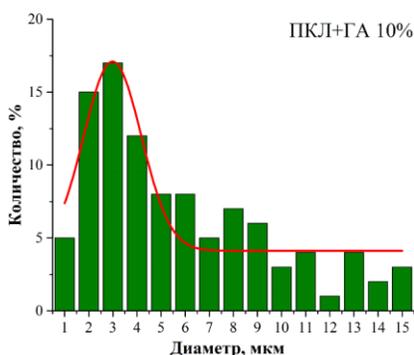
Средние значения диаметра волокон для перекрестной и выровненной структуры составили $3,4 \pm 1,9$ мкм и $9,0 \pm 5,3$ мкм.



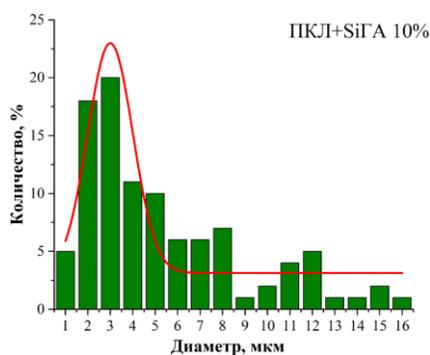
А

Б

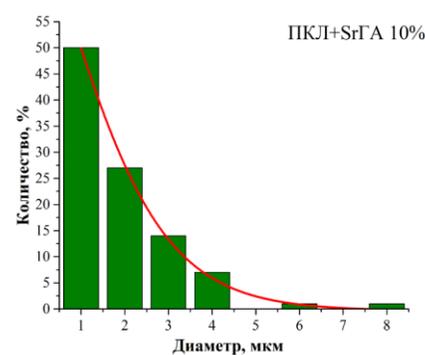
В



Г



Д



Е

Рисунок 10 – СЭМ изображения полимерных 3-Д матриц с 10% содержанием наночастиц ГА (А), SiGA (Б) и SrGA (В). Г, Д, Е - распределения диаметра волокон для соответствующих матриц

Добавление наночастиц в раствор полимера приводит к увеличению его вязкости, что в свою очередь влияет на диаметр образующейся струи в процессе электроформования и как следствие, на диаметр самого волокна. При добавлении 10% ГА, SiGA и SrGA среднее значение диаметра волокон полимерных 3-Д матриц составило $5,8 \pm 13,8$ мкм, $5,3 \pm 13,7$ мкм и $1,8 \pm 1,7$ мкм, соответственно. На образцах с наночастицами наблюдаются агломерации частиц размером от единиц, до ста микрометров. При большом количестве крупных агломератов изменяется морфология всего матрикса. Так в матриксе с 10% содержанием SrGA наблюдается значительное уменьшение диаметра волокон. Морфология матриц с 15% содержанием наночастиц схожа с матриксами в состав которых входит 10%

наночастиц. Кроме того, добавление наночастиц приводит к увеличению шероховатости волокна, что благоприятно сказывается на адгезии клеток [3].

Морфология поверхности и размер волокон оказывают сильное влияние на поведение клеток. Клетки растут преимущественно вдоль волокон, поэтому выровненная структура полимерных матриц способствует направленному росту клеток [44]. Для всех представленных образцов полимерных 3-Д матриц диаметр волокон составляет единицы микрометров. При таком диаметре волокон клетки растут значительно быстрее, чем на волокнах с диаметром меньше 1 мкм, что наблюдается в работе [45]. Высокая пористость полимерных матриц способствует пролиферации клеток внутрь матрикса (инфильтрации). Наиболее сильная инфильтрация клеток наблюдается на матриксах с перекрестной структурой волокон. На матриксах с выровненной структурой происходит снижение инфильтрации из-за меньшей пористости матрикса [46].

3.2 Смачиваемость полимерных 3-Д матриц

Определение смачиваемости поверхности полимеров происходило путем измерения контактного угла на приборе DataPhysics OCA – Series (Германия). Расчет проводился по модели лежащей капли (Water (Strom)), которая наносилась на поверхность образца с помощью микрошприца объемом 2 мкл. Для измерения поверхностной энергии использовались две жидкости: вода и глицерин, расчет проводился по модели ОВРК.

Результаты измерения контактного угла смачиваемости 3-Д матриц с перекрестной структурой в зависимости от химического состава представлены на рисунке 11.

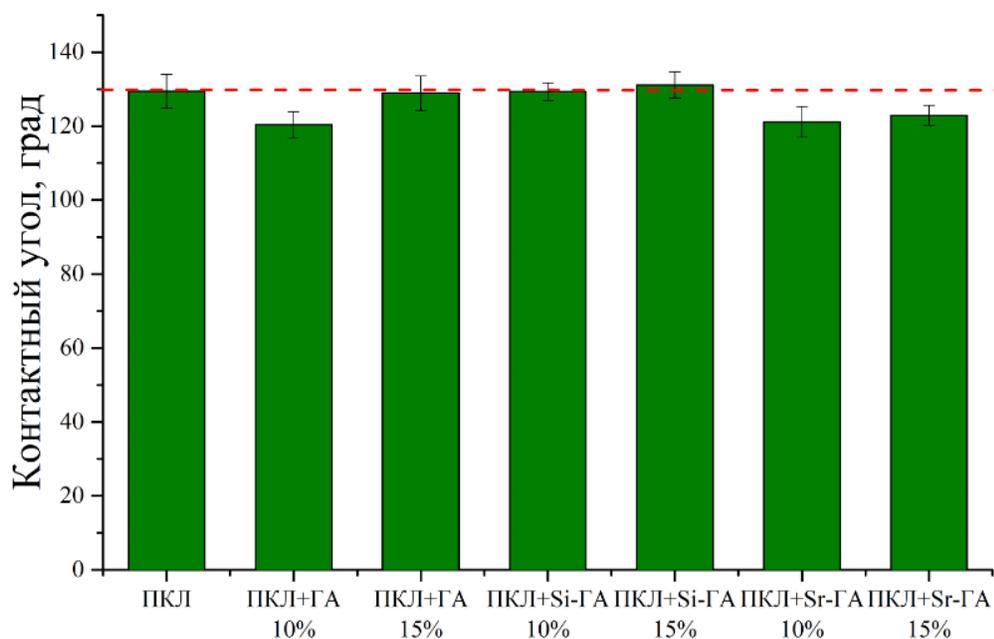


Рисунок 11 – Контактный угол смачивания перекрестных 3-Д матриц

3-Д матрицы всех составов имеют гидрофобную природу. Контактный угол воды для матриц с перекрестной структурой на основе чистого полимера составляет $129,45^{\circ} \pm 4,49^{\circ}$. Для полимерных 3-Д матриц с выравненной структурой значения контактного угла смачивания принимают схожие значения, поэтому они не приведены на рисунке. Исследование смачиваемости поверхности гибридных полимерных 3-Д матриц показало, что на матрицах с выровненной структурой волокон контактный угол смачивания уменьшается приблизительно на 20° .

Незначительное уменьшение контактного угла, по сравнению с матрицами из чистого ПКЛ, наблюдается у матриц с добавлением наночастиц. При добавлении наночастиц контактный угол смачиванию уменьшается на 20° для матриц с 10% содержанием ГА и для матриц с наночастицами SrГА. Данный эффект объясняется влиянием двух факторов. Во-первых, изменение морфологии поверхности приводит к изменению контактного угла смачивания и во-вторых, уменьшение контактного угла смачивания объясняется тем, что наночастицы имеют гидрофильную природу и часть наночастиц находится на поверхности

волокон, что придает поверхности матриксов гидрофильные свойства, тем самым уменьшая контактный угол смачивания [47].

3.3 ИК спектроскопия с преобразованием Фурье полимерных 3-Д матриксов

ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье проводилась в области волнового числа от 750 до 4000 см^{-1} . ИК спектр 3-Д матрикса из ПКЛ представлен на рисунке 12.

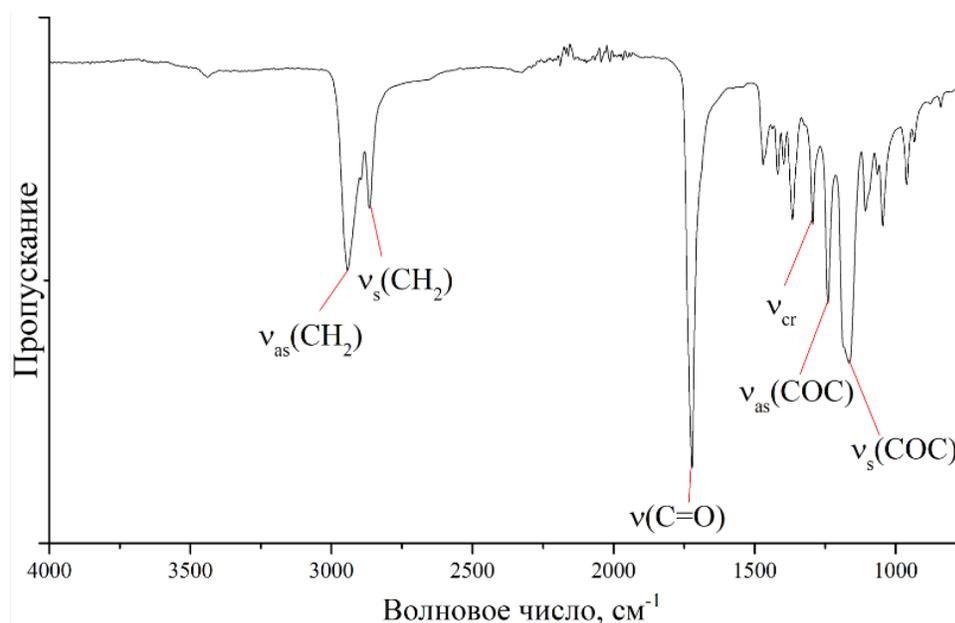


Рисунок 12 – ИК спектр 3-Д матрикса из ПКЛ

Спектр показал все основные связи присущие ПКЛ, а именно: асимметричные CH_2 (2943 см^{-1}), симметричные CH_2 (2865 см^{-1}), карбоксильные ($\text{C}=\text{O}$) (1722 см^{-1}), $\text{C}-\text{O}$ и $\text{C}-\text{C}$ в кристаллической фазе (1293 см^{-1}), асимметричные COC (1240 см^{-1}) и симметричные COC (1164 см^{-1}) колебания связей [48, 49].

На спектре полимерных 3-Д матриксов с наночастицами (рис. 13) был обнаружен максимум поглощения на 1090 см^{-1} , который отвечает за колебания

связи PO_4^{3-} из ГА. При увеличении концентрации наночастиц в матриксе наблюдается увеличение интенсивности поглощения [50].

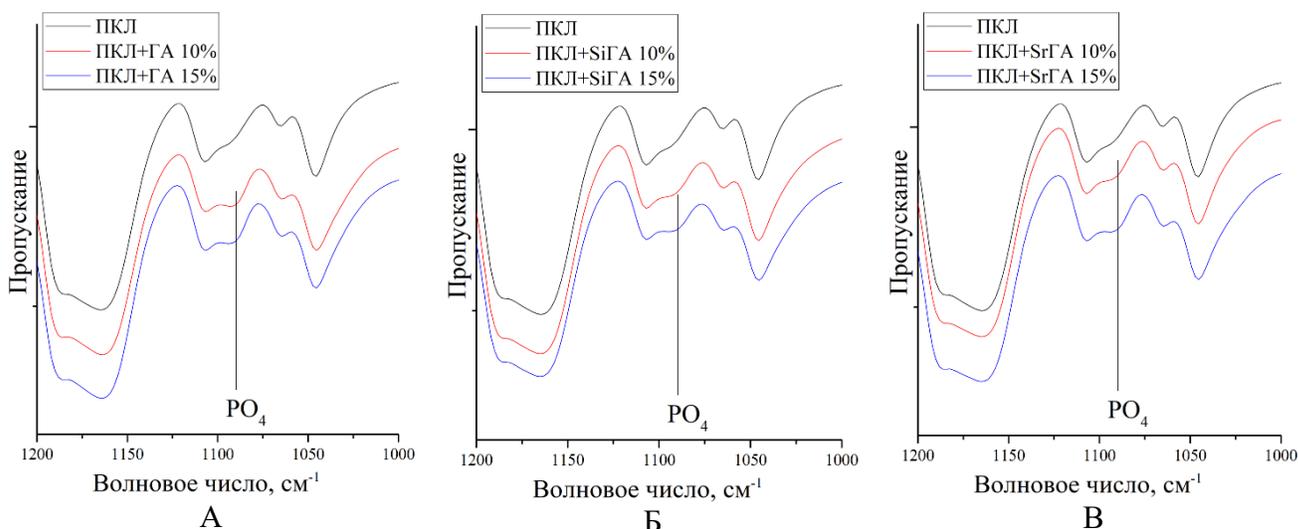


Рисунок 13 – ИК спектр полимерных 3-Д матриксов с наночастицами ГА (А), SiГА (Б) и SrГА (В)

Спектры материалов с содержанием SiГА не показали наличие пиков, характерных для Si-O, в связи с малой итоговой концентрацией в полимерном 3-Д матриксе, на что указывают и другие авторы [51].

3.4 Рамановская спектроскопия полимерных 3-Д матриксов

Для обнаружения кремния и стронция в структуре ГА, которые не были обнаружены при проведении ИК-спектроскопии была проведена рамановская спектроскопия нанопорошков ГА, SiГА и SrГА (рис. 14), а также полимерных 3-Д матриксов. Рамановская спектроскопия проводилась в области волнового числа от 600 до 3200 см^{-1} .

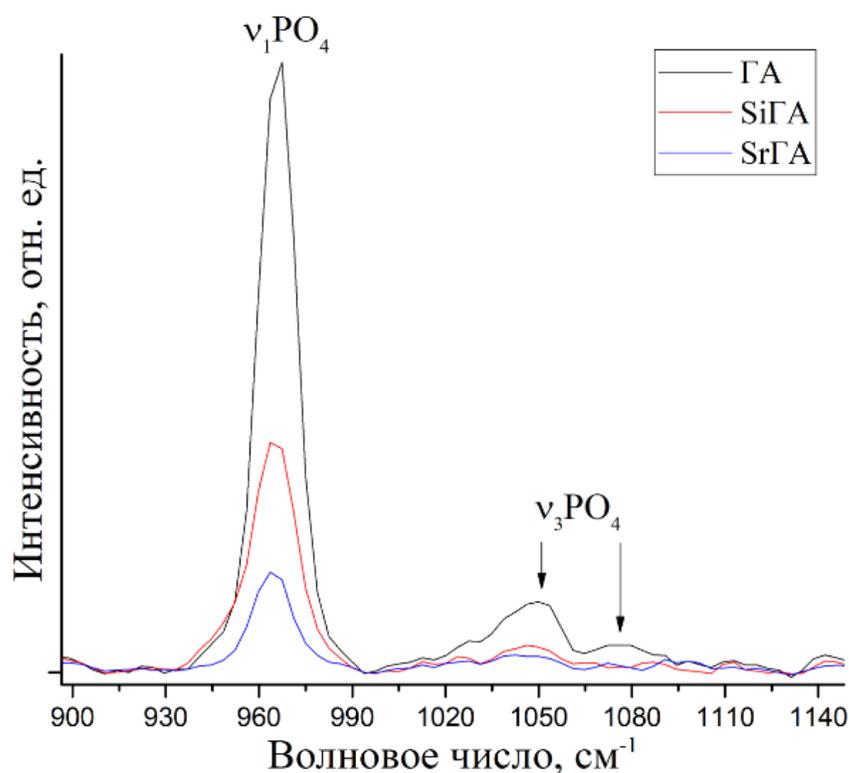


Рисунок 14 – Спектр нанопорошков ГА, SiГА и SrГА

О присутствии кремния и стронция в структуре ГА говорит смещение пиков PO_4^{3-} связи. Поскольку положение пика зависит от частоты колебаний кристаллической решетки, массы присутствующих атомов и силы взаимодействия между ними, то при встраивании Si и Sr в структуру ГА происходит смещение пиков. Так, для ГА пик $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ связи принимает значение 967 см^{-1} , а для SiГА и SrГА соответствующий пик принимает значение 964 см^{-1} , что соотносится с литературными данными [52, 53].

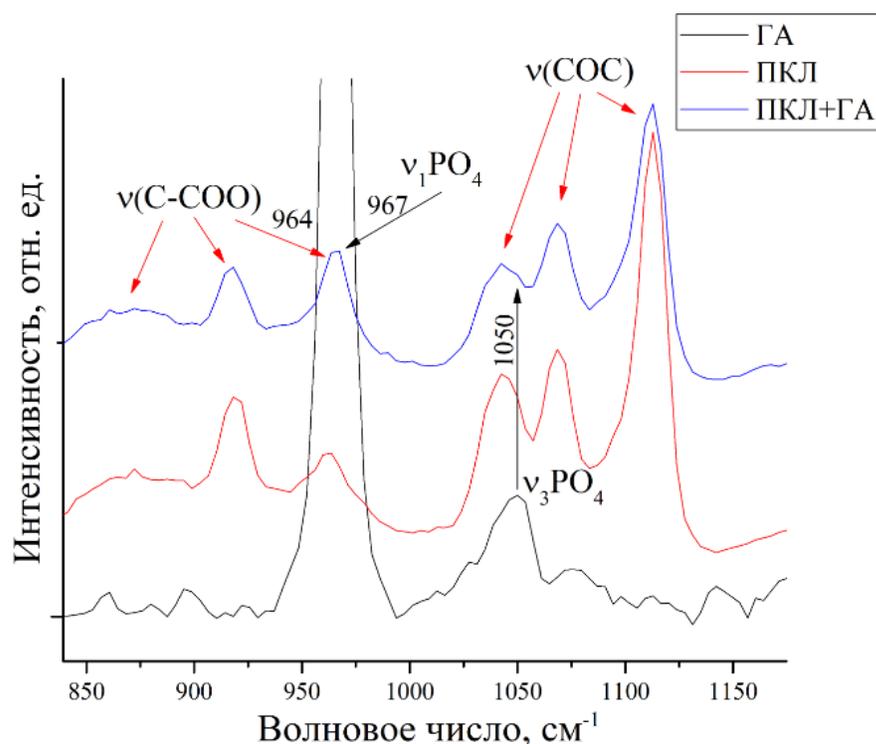


Рисунок 15 – Спектр нанопорошка ГА и матриц из ПКЛ и ПКЛ+ГА

Как видно из рисунка 15, результаты рамановской спектроскопии показали присутствие ГА в полимерном 3-Д матриксе. На спектре матрикса с наночастицами ГА видны пики $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ и $\nu_2\text{PO}_4^{3-}$ при частоте 964 см^{-1} и 1050 см^{-1} соответственно.

Спектры матриц с содержанием наночастиц SiГА и SrГА не показали значимых различий по сравнению с матриксами с наночастицами ГА.

3.5 Исследование цитотоксичности полимерных 3-Д матриц

Исследование метаболической активности клеток NCTC L929 в присутствии вытяжек из исследуемых полимерных 3-Д матриц было проведено с использованием МТТ-теста. Результаты исследования метаболической активности клеток представлены на рисунке 16.

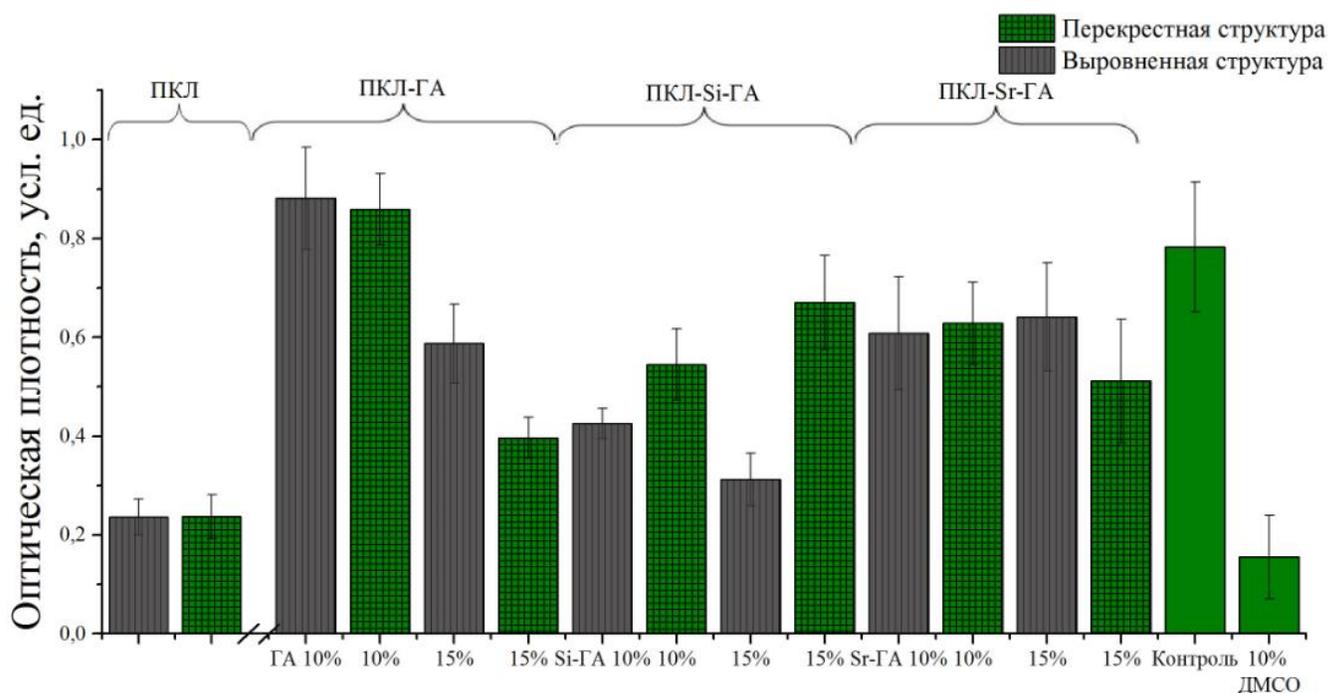


Рисунок 16 – Метаболическая активность клеток NCTC L929 по результатам МТТ-теста при инкубации 24 ч с 3-суточными вытяжками из материалов, 19-контроль, 20 – 10% ДМСО

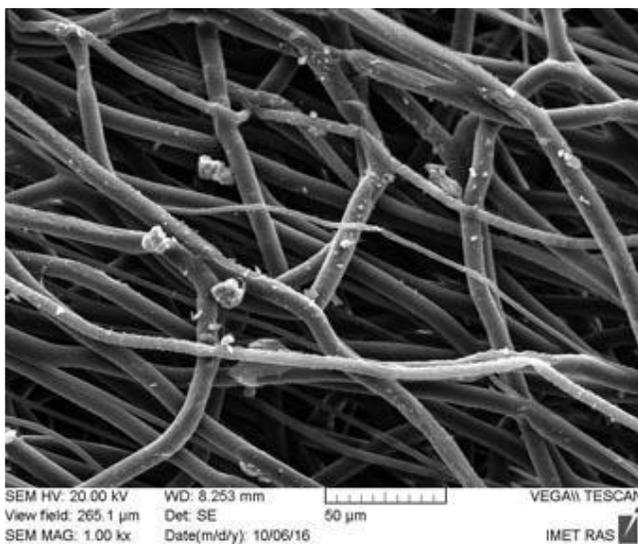
Исследование метаболической активности клеток NCTC L929 с использованием МТТ-теста показало наличие значимых различий между опытом и контролем у всех исследованных матриксов, за исключением матриксов с 10% содержанием ГА, свидетельствующее о отсутствии в исследованных вытяжках водорастворимых компонентов, оказывающих цитотоксическое или угнетающее действие на клетки. Матриксы из чистого ПКЛ показали высокую цитотоксичность, что говорит о неблагоприятной среде для роста клеток, на что указывают и другие авторы [54]. В целом, матриксы с добавлением наночастиц показали более высокую выживаемость клеток по сравнению с матриксами из чистого ПКЛ. Из рисунка видно, что концентрация частиц влияет на выживаемость клеток и при концентрации частиц в 15% выживаемость клеток преимущественно ниже по сравнению с концентрацией в 10%, особенно выражено данная зависимость наблюдается у матриксов с добавлением наночастиц ГА. Влияние концентрации частиц на выживание клеток наблюдается и в других работах [49]. Преимущества

SiГА и SrГА, которые основываются на высокой скорости резорбции проверить не удалось, так как данное свойство проявляется в динамике [55, 56].

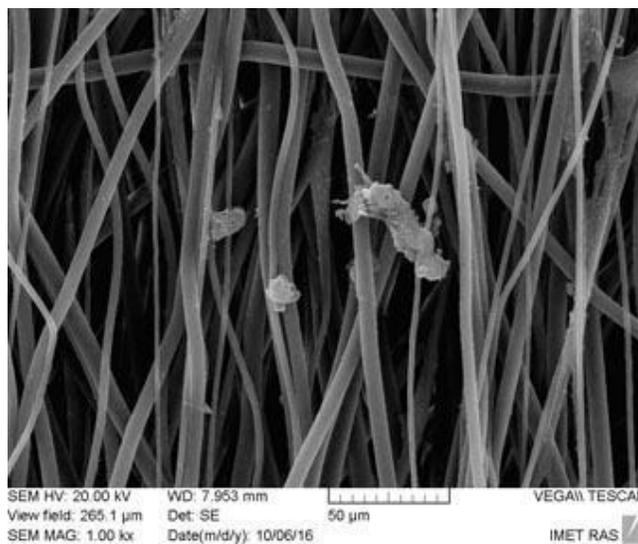
3.6 Исследование жизнеспособности, адгезионной и пролиферативной активности МСК человека при культивировании на поверхности гибридных полимерных 3-Д матриц

Исследование жизнеспособности, адгезионной и пролиферативной активности МСК человека при культивировании на поверхности гибридных полимерных 3-Д матриц было проведено методами флуоресцентной и сканирующей электронной микроскопии. Время культивирования на поверхности матриц составило 7, 14, 21 день.

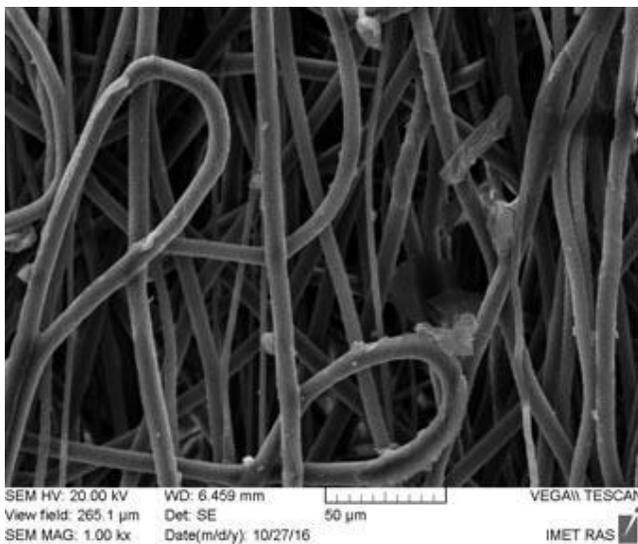
Проведенное исследование показало, что данные образцы биоматериалов являются биосовместимыми и не оказывают цитотоксического воздействия на клетки млекопитающих. Исследованные матрицы обладают способностью поддерживать адгезию, распластывание и пролиферативную активность мезенхимальных стволовых клеток человека. Выровненная структура волокон у матриц создает лучшие условия для роста субстратзависимых клеток и позволяет им создавать на поверхности данных биоматериалов более плотные клеточные слои (рис. 17). Так же из рисунка видно, что матрицы с выравненной структурой способны контролировать ориентацию клеток [57]. Клетки ориентируются и удлиняются параллельно направлению волокон. По сравнению с перекрестной структурой пролиферация клеток на матрицах с выравненной структурой волокон значительно выше.



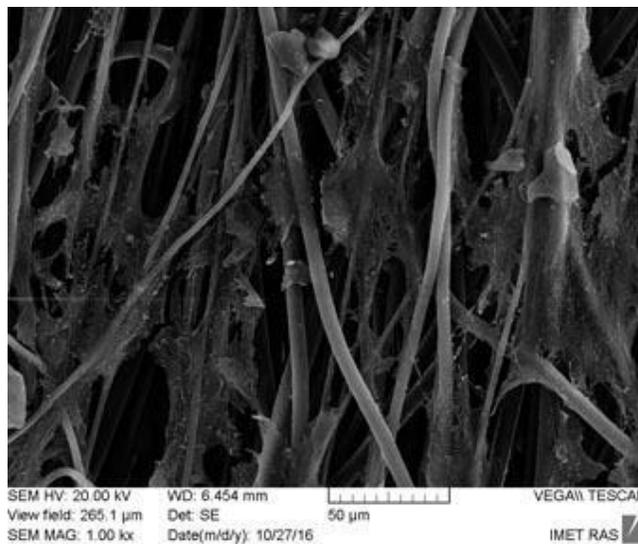
А



Б



В



Г

Рисунок 17 – Изображения клеток при инкубации на поверхности полимерных матриц перекрестной (слева) и выравненной (справа). 14 сутки инкубации (А, Б); 21 сутки инкубации (В, Г)

Добавление наночастиц ГА , SiГА и SrГА модифицирует поверхность матриц, обеспечивая лучшие условия для адгезии и расплывания клеток (рис. 18).

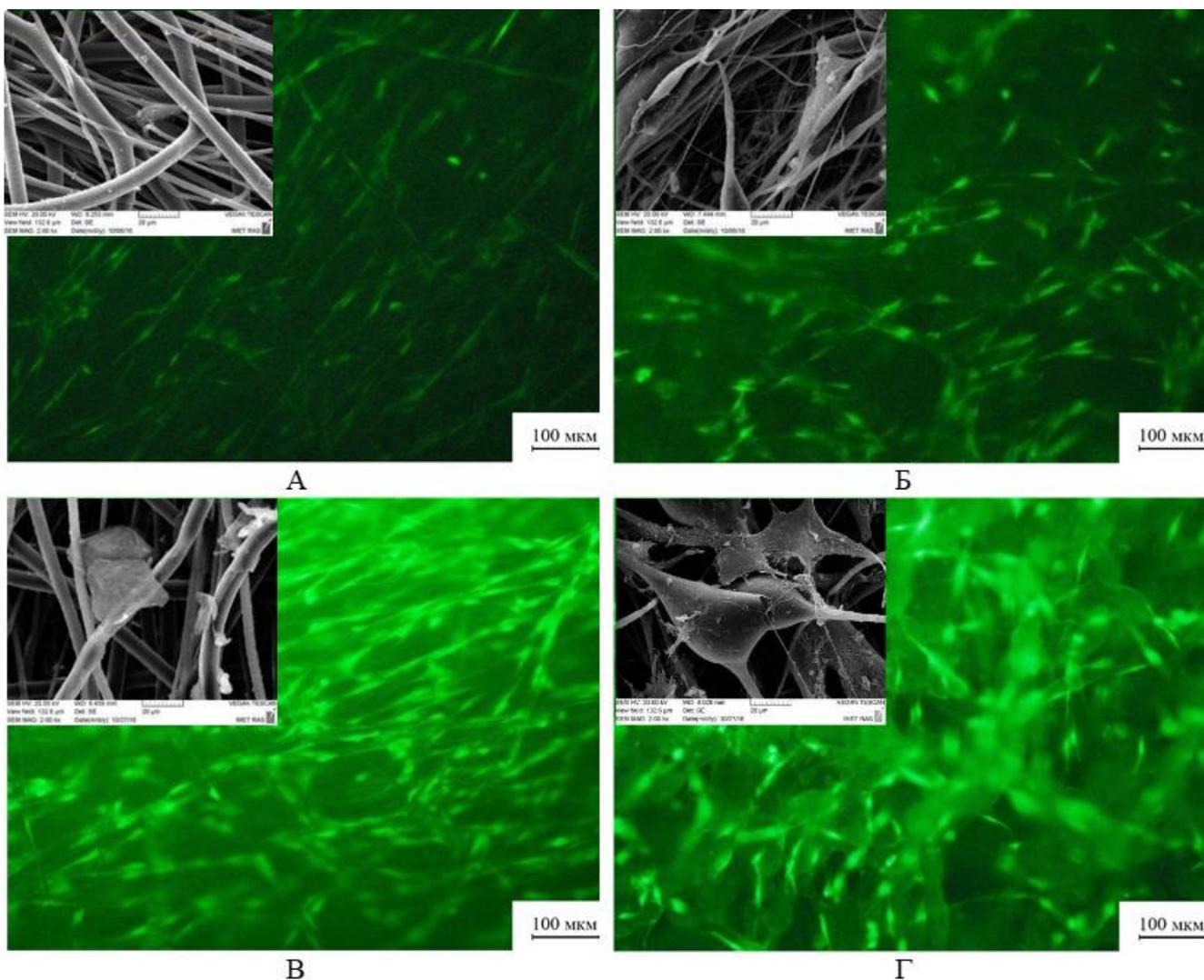


Рисунок 18 – Изображения при инкубации на поверхности матрикса из ПКЛ (слева) и ПКЛ+ГА 15% (справа). 7 сутки инкубации (А, Б); 21 сутки инкубации (В, Г)

Как видно из рисунка 18, на матриксах с наночастицами адгезия клеток выше, чем на матриксах без наночастиц. Наночастицы на поверхности волокна увеличивают его шероховатость, за счет чего клетки более активно прикрепляются к волокну [58]. На матриксах с содержанием наночастиц клетки принимают более распластанную форму по сравнению с матриксами без наночастиц, что говорит более благоприятной поверхности для роста клеток [59, 60].

При культивировании клеток на поверхности матриц с наночастицами SiGA и SrGA было выявлено, что наличие модифицированного ГА приводит к образованию наиболее плотных клеточных структур (рис. 19).

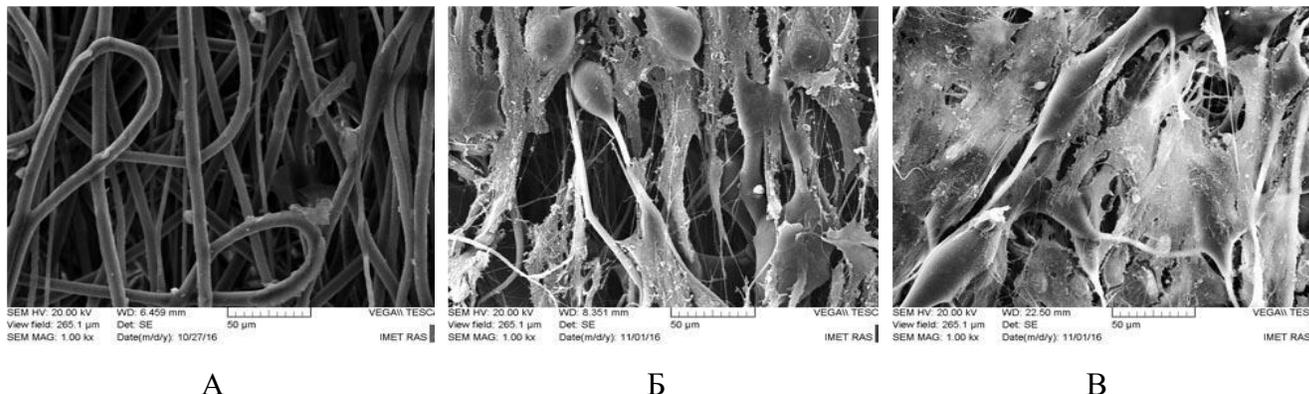


Рисунок 19 - Изображения клеток при инкубации в течении 21 суток на поверхности полимерных матриц из чистого ПКЛ (А), ПКЛ+SiGA 10% (Б) и ПКЛ+SrGA 10% (В)

Влияния концентрации наночастиц в составе полимерных 3-Д матриц на жизнеспособность, адгезию и пролиферацию клеток выявлено не было.

3.7 Определение фенотипического профиля мезенхимальных стволовых клеток человека при культивировании их на поверхности гибридных полимерных 3-Д матриц по уровню экспрессии мРНК с использованием метода ПЦР в реальном времени

Анализ экспрессии генов в клетках на вторую неделю культивирования показывает, при сравнении уровней транскрипции генов при культивировании на стекле и матрицах, в целом на матрицах наблюдается общее снижение транскрипционной активности генов. Для анализа транскрипции генов в клетках, растущих на этих матрицах, были применены методы single cell Real Time PCR. Несмотря на это, при анализе воспроизводимости результатов были выявлены расхождения при анализе экспрессии house keeping генов, что указывало на недостаточное количество материала в виде мРНК. Поэтому для анализа

транскрипции генов в клетках были выбраны образцы матриксов, для которых наблюдалась четкая воспроизводимость отношений пороговых циклов Ct для house keeping генов. Далее производился анализ путем сравнения по структуре материала (выровненная или перекрестная структура), а также сравнения в каждой группе между выровненной и перекрестной структурами.

Сравнение разных матриксов с перекрестной структурой показало, что даже небольшое изменение в составе матрикса способно привести к тому, что в культивируемых на них клетках наблюдаются разные паттерны экспрессии исследуемых генов (Приложение А, таблица 1). Наибольшие изменения транскрипционной активности генов наблюдались в случае роста клеток на модифицированных материалах с внедренными наночастицами.

У клеток, растущих на матриксах ПКЛ+ГА 15%, ПКЛ+SiГА 10% и ПКЛ+SiГА 15%, имеющих перекрестную структуру наблюдалось значительное увеличение экспрессии генов стволовости (TERT, DHH, NUMB, JAG1, NOTCH1, MYC, SOX2, POU5F1, NANOG, SOX1, MSX1 и AXIN), пролиферации (CCNA2, CCNB1, SKP2, CUL1), дифференцировки (ALPL, BMPR1A, IGF1, IGFR1, RUNX2, TNF и TGFBR1). Также происходило значительное увеличение транскрипционной активности генов маркеров некроза (RAB25 и FOXI1), аутофагии (ATG12, NFKB1, RPS6KB1) и проапоптоза (CFLAR и TNFRSF10A). При культивировании клеток на матриксе ПКЛ+SiГА 10% в них наблюдались наиболее значительная стимуляция транскрипции большинства генов маркеров дифференцировки (BMPR1A, COL1A1, COL3A1, EGFR, FGF-2, IGF1, IGFR1, RUNX2, SMAD2, VDR, SMAD5, TGFBR1, TNF и SMAD4), но в целом паттерны транскрипции были схожи с образцами ПКЛ+SiГА 10% и ПКЛ+SiГА 15%. В таблице 4 приведены уровни экспрессии некоторых генов маркеров дифференцировки, которые отвечают за дифференцировку в остеобласты.

Таблица 4 – Экспрессия генов дифференцировки в клетках на 2 неделю культивирования на материалах с перекрестной структурой. (В качестве контроля приведен матрикс ПКЛ. Значения больше 1 – увеличенный уровень экспрессии, меньше – уменьшенный уровень экспрессии. Цветом обозначены значения, $p < 0,05$)

Гены	Образец			
	ПКЛ+ГА 15%	ПКЛ+SiГА 10%	ПКЛ+SiГА 15%	ПКЛ+SrГА 10%
RUNX2	20,393	2,4794	16,7955	5,2746
COL1A1	0,5105	0,3923	1,9257	3,6743
ALPL	114,5632	34,5353	47,6366	29,58

При росте клеток на матриксах с параллельной структурой волокон наблюдались примерно такие же закономерности, что и в случае с перекрестной структурой (Приложение А, таблица 2). Культивирование клеток на матриксах с внедренными наночастицами приводило к более значительным изменениям транскрипции генов, чем на матриксах без частиц. В целом тенденции были сопоставимы с наблюдаемыми ранее, но амплитуда изменений была больше. Материалы ПКЛ+ГА 10%, ПКЛ+ГА 15% и ПКЛ+SiГА 10% похожи по паттернам транскрипции – у них значительно увеличивался уровень экспрессии генов стволовости (DHH, NOTCH1, JAG1, PARD6A, NANOG, POU5F1, SOX2 и ZEB1), пролиферации (CCNA2, CUL1, CDK7, CCNB1, SKP2) и дифференцировки (BMP1, BMPR1A, COL1A1, TNF, IGF1, IGFR1, RUNX2, SMAD2, SMAD5, TGFBR1 и FGF-2). Также, как и при культивировании на матриксах без наночастиц в клетках была увеличена экспрессия некротических маркеров (FOXI1, RAB25, CCDC103), но при этом увеличивалось количество мРНК маркеров проаптоза (FAS, CFLAR и TNFRSF10A). В случае матрикса ПКЛ+SiГА 15% транскрипция многих генов увеличивалась еще более значительно. Так стимуляция наблюдалась практически для всех маркеров дифференцировки, также в отличие от предыдущих матриксов на фоне увеличения экспрессии маркеров некроза и проаптоза наблюдалось увеличение количества мРНК антиапоптотических генов. В таблице 5 приведены

уровни экспрессии некоторых генов маркеров дифференцировки, которые отвечают за дифференцировку в остеобласты.

Таблица 5 – Экспрессия генов дифференцировки в клетках на 2 неделю культивирования на материалах с выровненной структурой. (В качестве контроля приведен матрикс ПКЛ. Значения больше 1 – увеличенный уровень экспрессии, меньше – уменьшенный уровень экспрессии. Цветом обозначены значения, $p < 0,05$)

Гены	Образец			
	ПКЛ+ГА 10%	ПКЛ+ГА 15%	ПКЛ+SiГА 10%	ПКЛ+SiГА 15%
RUNX2	19,9042	15,2422	5,6355	9,8492
COL1A1	1,3996	2,8679	0,5541	3,5064
ALPL	138,6208	0,0172	11,7635	135,2983

Сравнение транскрипции генов в клетках с различной структурой (Приложение А, таблица 3) матриксов без наночастиц не выявило значительных отличий в уровнях мРНК исследуемых генов. На матриксах ПКЛ+ГА 15% и ПКЛ+SiГА 15% наблюдалось увеличение экспрессии небольшого числа генов, преимущественно маркеров дифференцировки и некроза. В клетках также наблюдалось незначительное увеличение транскрипции некоторых генов маркеров дифференцировки, некроза и апоптоза, но в матриксах с выровненной структурой наблюдался также рост количества мРНК генов маркеров антиапоптоза.

На основании исследования транскрипции генов в клетках можно сделать следующие выводы.

1. Наличие наночастиц в матриксах приводит к увеличению транскрипционной активности генов, ответственных за стволовость, пролиферацию и дифференцировку и при этом наблюдалось значительное увеличение экспрессии генов маркеров некроза и проапоптоза. Наибольшая стимуляция экспрессии этих генов наблюдалась на матриксе ПКЛ+Si-ГА 15%.
2. При сравнении экспрессии генов в клетках, растущих на матриксах разных по структуре, но одинаковых по составу не наблюдается таких значительных

изменений транскрипции генов, как при росте на матриксах различных по составу. Таким образом, для данного типа материалов структура мало влияет на транскрипционную активность клеток, тогда как состав материала может значительно влиять на паттерны экспрессии генов в клетках.

4. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение

4.1 Предпроектный анализ

4.1.1. Потенциальные потребители результатов исследования

С целью выявления потребителей результатов исследования необходимо рассмотреть целевой рынок и провести его сегментирование.

Целевой рынок – сегменты рынка, на котором в будущем будет продаваться разработка. В свою очередь, сегмент рынка – это особым образом выделенная часть рынка, группы потребителей, обладающих определенными общими признаками.

Сегментирование – это разделение покупателей на однородные группы, для каждой из которых может потребоваться определенный товар (услуга).

Объектом исследования являются полимерные биodeградируемые 3-Д матрицы из поликапролактона.

Выбор наиболее оптимальных способов модифицирования биodeградируемых полимеров путем добавления наночастиц гидроксиапатита даст возможность получить 3-Д матрицы медицинского назначения, свойства которых будут удовлетворять всем требованиям касательно не только физики и механики, а также мировым стандартам в биологии.

Потенциальными потребителями являются коммерческие и государственные организации, а также физические лица.

К коммерческим и государственным организациям можно отнести все предприятия, которые так или иначе связаны с производством медицинских имплантатов. Эти организации могут являться как прямыми потребителями, так и компаниями-перекупщиками.

К физическим лицам относится население преклонного возраста, а также люди, нуждающиеся в операционном вмешательстве.

4.1.2 Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения

Детальный анализ конкурирующих разработок, существующих на рынке, необходимо проводить систематически, поскольку рынки пребывают в постоянном движении. Такой анализ помогает вносить коррективы в научное исследование, чтобы успешнее противостоять своим соперникам. Важно реалистично оценить сильные и слабые стороны разработок конкурентов.

С этой целью может быть использована вся имеющаяся информация о конкурентных разработках:

- технические характеристики разработки;
- конкурентоспособность разработки;
- уровень завершенности научного исследования (наличие макета, прототипа и т.п.);
- бюджет разработки;
- уровень проникновения на рынок;
- финансовое положение конкурентов, тенденции его изменения и т.д.

Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения позволяет провести оценку сравнительной эффективности научной разработки и определить направления для ее будущего повышения.

Данный анализ был проведен с помощью оценочной карты, приведенной в табл. 4.1. Основными конкурентами полимерных 3-Д матриксов с добавлением наночастиц гидроксиапатита являются полимерные матриксы без частиц и металлические имплантаты, которые в настоящее время широко используются в костной имплантологии.

Критерии для сравнения и оценки ресурсоэффективности и ресурсосбережения, приведенные в табл. 6, подбирались, исходя из выбранных

объектов сравнения с учетом их технических и экономических особенностей разработки, создания и эксплуатации. Основными критериями оценки материалов биомедицинского назначения будут являться: удобство в эксплуатации, безопасность материалов с точки зрения надежности и вероятности отторжения материала организмом, и предоставляемые возможности, которые заключаются в таких свойствах как механические характеристики, биodeградируемость, биоактивность, а также простота изготовления имплантата.

Таблица 6 – Оценочная карта для сравнения конкурентных технических решений (разработок)

Критерии оценки	Вес критерия	Баллы			Конкурентоспособность		
		Б _ф	Б _{к1}	Б _{к2}	К _ф	К _{к1}	К _{к2}
1	2	3	4	5	6	7	8
Технические критерии оценки ресурсоэффективности							
1. Удобство в эксплуатации (соответствует требованиям потребителей)	0,05	5	3	2	0,25	0,15	0,1
2. Безопасность	0,1	5	4	4	0,5	0,4	0,4
3. Биоактивность	0,1	5	3	2	0,5	0,3	0,2
4. Биodeградируемость	0,1	5	5	1	0,5	0,5	0,1
5. Механические свойства	0,1	3	3	4	0,3	0,3	0,4
6. Простота в изготовлении	0,05	4	5	2	0,2	0,25	0,1
Экономические критерии оценки эффективности							
1. Конкурентоспособность продукта	0,15	5	3	4	0,75	0,45	0,45
2. Уровень проникновения на рынок	0,1	3	4	5	0,3	0,4	0,5
3. Цена	0,1	3	4	2	0,3	0,4	0,2
4. Предполагаемый срок эксплуатации	0,05	5	5	5	0,25	0,25	0,25
5. Срок выхода на рынок	0,05	4	4	5	0,2	0,2	0,25
6. Наличие сертификации разработки	0,05	4	1	5	0,2	0,05	0,25
Итого	1	51	44	41	4,25	3,5	2,75

Позиция разработки и конкурентов оценивалась по каждому показателю экспертным путем по пятибалльной шкале, где 1 – наиболее слабая позиция, а 5 –

наиболее сильная. Веса показателей, определяемые экспертным путем, в сумме должны были составлять 1.

Анализ конкурентных технических решений определялся по формуле:

$$K = \sum V \cdot B_i, \quad (2)$$

где K – конкурентоспособность научной разработки или конкурента;

V_i – вес показателя (в долях единицы);

B_i – балл i -го показателя.

Основываясь на знаниях о конкурентах, можно выделить, что уязвимой позицией полимерных матриц и металлических имплантатов является их несоответствие по биологическим показателям, предъявляемым медицинским имплантатам и относительно низкое удобство в использовании. Плохие свойства поверхности полимерных матриц без добавления частиц снижают конкурентоспособные свойства данного материала на рынке. К тому же на рынке уже есть биодegradуемые полимерные матрицы из подобных материалов с похожими свойствами. Представителей медицинских имплантатов из биодegradуемых полимерных матриц с добавлением наночастиц гидроксиапатита, которые позволяют повысить биосовместимость материала, пока на рынке нет. Это дает конкурентное преимущество товару не только в качестве, но и позволяет занять свою нишу на рынке без прямых конкурентов.

Итогом данного анализа является выработка конкурентного преимущества в виде высокого уровня качества медицинских имплантатов из гибридных, биодegradуемых полимерных материалов, удовлетворяющих всем требованиям контроля.

4.1.2 SWOT-анализ

SWOT – Strengths (сильные стороны), Weaknesses (слабые стороны), Opportunities (возможности) и Threats (угрозы) – представляет собой комплексный анализ научно-исследовательского проекта. SWOT-анализ применяют для исследования внешней и внутренней среды проекта.

Целью SWOT-анализа является определение всех сильных и слабых сторон научной разработки, которые рассматриваются как внутренние факторы, а также изучение внешних факторов, каковыми являются рыночные возможности и угрозы, для получения четкого представления основных направлений развития предприятия. На основе такого исследования организация должна максимально использовать свои сильные стороны, попытаться преодолеть слабости, воспользоваться благоприятными возможностями и защититься от потенциальных угроз.

Он проводится в несколько этапов.

Первый этап заключается в описании сильных и слабых сторон проекта, в выявлении возможностей и угроз для реализации проекта, которые проявились или могут появиться в его внешней среде.

Результаты первого этапа SWOT-анализа по выявлению сильных и слабых сторон, а также возможностей и угроз для биodeградируемых полимерных материалов, модифицированных наночастицами гидроксиапатита, представлены в таблице 7.

Таблица 7 – SWOT-анализ

	Сильные стороны научно-исследовательского проекта: С1. Экономичность и энергоэффективность технологии. С2. Экологичность технологии. Комплекс физико-	Слабые стороны научно-исследовательского проекта: Сл1. Длительный период проведения биологических исследований.
--	--	---

	механических и биологических свойств продукта. С3. Квалифицированный персонал. С4. Низкая стоимость производства по сравнению с аналоговыми технологиями.	Сл2. Отсутствие необходимого оборудования для проведения испытаний. Сл3. Недостаток финансовых средств.
Возможности: В1. Использование научно-исследовательских достижений ТПУ и института теоретической и экспериментальной биофизики РАН В2. Повышение стоимости конкурентных разработок.		
Угрозы: У1. Отсутствие спроса на новые технологии производства. У2. Ограничения на экспорт технологии. У3. Несвоевременное финансовое обеспечение научного исследования со стороны государства. У4. Отсутствие инженеринговой компании, способной построить производство под ключ.		

После того как сформулированы четыре области SWOT следует реализация второго этапа.

Второй этап состоит в выявлении соответствия сильных и слабых сторон научно-исследовательского проекта внешним условиям окружающей среды. Это соответствие или несоответствие должны помочь выявить степень необходимости проведения стратегических изменений.

В рамках данного этапа необходимо построить интерактивную матрицу проекта. Ее использование помогает разобраться с различными комбинациями взаимосвязей областей матрицы SWOT. Возможно использование этой матрицы в

качестве одной из основ для оценки вариантов стратегического выбора. Каждый фактор помечается либо знаком «+» (означает сильное соответствие сильных сторон возможностям), либо знаком «-» (что означает слабое соответствие); «0» – если есть сомнения в том, что поставить «+» или «-». Интерактивная матрица проекта представлена в таблице 8.

Таблица 8 – Интерактивная матрица проекта

Сильные стороны проекта				
Возможности проекта		C1	C2	C3
	B1	+	+	+
	B2	+	+	+

Анализ интерактивных таблиц представляется в форме записи сильно коррелирующих сильных сторон и возможностей, или слабых сторон и возможностей и т.д. следующего вида: B1C1C2C3; B2C1C2C3. Каждая из записей представляет собой направление реализации проекта.

В рамках **третьего этапа** составлена итоговая матрица SWOT-анализа (таблица 9).

Таблица 9 – Итоговая матрица SWOT-анализа

	<p>Сильные стороны научно-исследовательского проекта:</p> <p>C1. Экономичность и ресурсоэффективность технологии.</p> <p>C2. Экологичность технологии. Комплекс физико-механических и биологических свойств продукта.</p> <p>C3. Квалифицированный персонал.</p> <p>C4. Низкая стоимость производства по сравнению с аналоговыми технологиями.</p>	<p>Слабые стороны научно-исследовательского проекта:</p> <p>Сл1. Длительный период проведения биологических исследований.</p> <p>Сл2. Отсутствие необходимого оборудования для проведения испытаний.</p> <p>Сл3. Недостаток финансовых средств.</p>
<p>Возможности:</p> <p>B1. Использование научно-исследовательских достижений ТПУ и института теоретической и</p>	<p>• При использовании научно-исследовательских достижений ТПУ и ИТЭБ РАН можно улучшить качество продукции.</p>	<p>• Использование научно-исследовательских достижений ТПУ и ИТЭБ РАН при отсутствии необходимого</p>

экспериментальной биофизики РАН (ИТЭБ РАН). В2. Повышение стоимости конкурентных разработок.	<ul style="list-style-type: none"> • Повышение экономичности и технологичности производства. 	оборудования и недостатке финансирования.
Угрозы: У1. Отсутствие спроса на новые технологии производства. У2. Ограничения на экспорт технологии. У3. Несвоевременное финансовое обеспечение научного исследования со стороны государства.	<ul style="list-style-type: none"> • Экономичность, энергоэффективность и низкая стоимость технологии может повысить спрос. • Низкая стоимость производства позволит вывести технологию на рынок без финансирования со стороны государства. 	<ul style="list-style-type: none"> • Сотрудничество с ИТЭБ РАН и другими институтами позволит в максимально короткие сроки вывести продукт на рынок. • Развитое сотрудничество и перспективность разработки позволит продолжить работу над проектом при недостатке финансовых средств.

Проанализировав характер НТР можно сделать вывод, что наиболее оптимальной стратегией выхода разработки на рынок является стратегия сотрудничества с ИТЭБ РАН и другими институтами, а также проведение совместной предпринимательской деятельности. Совместная предпринимательская деятельность – это стратегия, которая основана на соединении общих усилий фирмы с коммерческими предприятиями партнера для создания производственных и маркетинговых мощностей. Эта стратегия выбрана, так как необходимо найти стабильный рынок заказов и сбыта товара.

Результаты SWOT-анализа учитываются при разработке структуры работ, выполняемых в рамках научно-исследовательского проекта.

4.2 План проекта

В рамках планирования научного проекта необходимо построить календарный и сетевой графики проекта.

Линейный график представляется в виде таблицы 10.

Таблица 10 – Календарный план проекта

Код работы	Название	Длительность, дни	Дата начала работ	Дата окончания работ	Состав участников
1	Разработка технического задания на ВКР	1	9.02.2017	12.02.2017	руководитель
1.1	Составление и утверждение технического задания	1	13.02.2017	20.02.2017	руководитель
2.1	Выбор направления исследования и способов решения задач	2	21.02.2017	23.02.2017	студент
2.2	Сбор и изучение научно-технической литературы	15	24.02.2017	10.03.2017	студент
2.3	Получение биodeградируемых полимерных матриц	15	11.03.2017	26.03.017	студент
3.1	Разработка методики экспериментальных исследований	1/2	27.03.2017	29.03.2017	руководитель/ студент
3.2	Проведение экспериментальных исследований	30	30.03.2017	29.04.2017	студент
3.3	Анализ и обработка полученных результатов	1/14	30.04.2017	14.05.2017	руководитель/ студент
4.1	Оценка эффективности полученных результатов	1/14	15.05.2017	29.05.2017	руководитель/ студент

Диаграмма Ганта – это тип столбчатых диаграмм (гистограмм), который используется для иллюстрации календарного плана проекта, на котором работы по теме представляются протяженными во времени отрезками, характеризующимися датами начала и окончания выполнения данных работ.

График строится в виде таблицы 11 с разбивкой по месяцам и декадам (10 дней) за период времени выполнения научного проекта. При этом работы на графике следует выделить различной штриховкой в зависимости от исполнителей, ответственных за ту или иную работу.

Таблица 11 – Календарный план-график проведения НИОКР по теме: «Электроформование трехмерных матриц с добавлением наночастиц модифицированного гидроксиапатита для биомедицины»

Код работы (из ИСР)	Вид работ	Исполнители	кал, дн.	Продолжительность выполнения работ															
				февраль			март			апрель			май			июнь			
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2		
1	Разработка ТЗ на ВКР	руководитель	1		□														
1.1	Составление технического задания	руководитель	1		□														
2.1	Выбор направления исследования и способов решения задач	студент	2			■													
2.2	Сбор и изучение литературы	студент	15			■	■	■											
2.3	Получение биodeградируемых полимерных матриц	студент	15					■	■	■									
3.1	Разработка методики экспериментальных исследований	руководитель, студент	1, 2																
3.2	Проведение экспериментальных исследований	студент	30							■	■	■	■	■					
3.3	Анализ и обработка полученных результатов	руководитель, студент	1, 14														■	□	
4.1	Оценка эффективности полученных результатов	руководитель, студент	1, 14															■	□
4.2	Составление и оформление пояснительной записки.	студент	1																■
4.3	Подготовка к защите.	студент	14																■

□ - руководитель

■ - студент

4.3 Бюджет научного исследования

При планировании бюджета научного исследования учитывается полное и достоверное отражение всех видов планируемых расходов, необходимых для его выполнения. В процессе формирования бюджета НТИ используется следующая группировка затрат по статьям:

1. материальные затраты НТИ;
2. затраты на специальное оборудование для научных работ
3. основная заработная плата исполнителей темы;
4. дополнительная заработная плата исполнителей темы;
5. отчисления во внебюджетные фонды (страховые отчисления);
6. накладные расходы.

4.3.1 Сырье, материалы, покупные изделия и полуфабрикаты (за вычетом отходов)

В эту статью включаются затраты на приобретение всех видов материалов, комплектующих изделий и полуфабрикатов, необходимых для выполнения работ по данной теме. Количество требуемых материальных ценностей определяется по нормам расхода.

Расчет стоимости материальных затрат производится по действующим прейскурантам или договорным ценам.

Эксперименты проводились 15 дней по 2 часа (30 часов), мощность установки для электроформования полимерных 3-Д матриц составляет 2 кВт/час.

Затраты на электроэнергию рассчитываются по формуле:

$$C_{эл} = C_{эл} \cdot P \cdot F_{об} , \quad (3)$$

где $C_{эл}$ – тариф на промышленную электроэнергию (5,8 руб за 1 кВт/ч); P – мощность оборудования, кВт; $F_{об}$ – время использования оборудования, ч.

$$C_{эл} = 5,8 \cdot 2 \cdot 30 = 348 \text{ руб.}$$

Расчет стоимости материальных затрат на материалы представлен в таблице 12.

Таблица 12 – Сырье, материалы, комплектующие изделия и покупные полуфабрикаты

№	Материал	Единица материала	Цена, руб/ед.	Количество материала	Затраты, руб.
1	Поликапролактон	кг	2400	1	2400
2	Хлороформ	л	360	1	300
3	Ацетон	л	450	1	450
4	Гидроксиапатит	кг	1980	1	1980
Итого					5130

Таблица 13 – Статья на все материальные затраты

Наименование	Сумма, руб.
Затраты на электроэнергию	348
Затраты на сырье, материалы и комплектующие изделия и покупные полуфабрикаты	5130
Итого	5478

4.3.2 Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ

В данную статью включены все затраты, связанные с приобретением специального оборудования (приборов, контрольно-измерительной аппаратуры, стендов, устройств и механизмов), необходимого для проведения работ по данной теме. Определение стоимости спецоборудования производилось по действующим прейскурантам, а в ряде случаев по договорной цене.

Стоимость оборудования, используемого при выполнении конкретного научного проекта, учитывалась в виде амортизационных отчислений. Сумма амортизации за один год рассчитывается по формуле:

$$A_{\text{год}} = \frac{F_{\text{п}} * a}{100\%}, \quad (4)$$

где $F_{\text{п}}$ - первоначальная стоимость оборудования, a – норма амортизации, рассчитываемая по формуле:

$$a = \frac{1}{t} * 100\%. \quad (5)$$

Здесь t – это срок полезного использования установки.

Первоначальную стоимость установки для электроформования можно оценить в 500000 руб, а срок полезного использования 20 лет, тогда годовая сумма амортизационных отчислений – $A_{\text{год}} = \frac{500000 * 5}{100\%} = 25000$ руб. В рамках данного исследования установка использовалась в течение 15 дней, поэтому сумма амортизации за 15 дней составит:

$$A = \frac{25000 * 15}{254} = 1476 \text{ руб.}$$

4.3.3 Основная заработная плата

В настоящую статью включается основная заработная плата научных и инженерно-технических работников, рабочих макетных мастерских и опытных производств, непосредственно участвующих в выполнении работ по данной теме. Величина расходов по заработной плате определяется исходя из трудоемкости выполняемых работ и действующей системы оплаты труда. В состав основной заработной платы включается премия, выплачиваемая ежемесячно из фонда заработной платы (размер определяется Положением об оплате труда). Расчет основной заработной платы сводится в таблице 14.

Таблица 14 – Расчет основной заработной платы

№ п/п	Наименование этапов	Исполнители по категориям	Трудоемкость, чел.-дн.	Зарботная плата, приходящаяся на один чел.-дн., руб.	Всего заработная плата по тарифу

					(окладам), руб.
1		Руководитель	5	-	6000
2		Инженер	107	-	60679
Итого:					66679

$$C_{зп} = Z_{осн} + Z_{доп}, \quad (6)$$

где $Z_{осн}$ – основная заработная плата; $Z_{доп}$ – дополнительная заработная плата.

Основная заработная плата $Z_{осн}$ руководителя рассчитывается по следующей формуле:

$$Z_{осн} = Z_{дн} \times T_{раб} \quad (7)$$

где $T_{раб}$ – продолжительность работ, выполняемых научно-техническим работником, раб.дн.; $Z_{дн}$ – среднедневная заработная плата работника, руб.

Для руководителя, имеющего звание кандидата наук назначается заработная плата в 300 руб/час. На консультацию бакалавра для руководителя приходится по нормам 20 часов, следовательно, заработная плата руководителя составит $C_{зп}=300 \times 20=6000$ руб.

Среднедневная заработная плата инженера рассчитывается по формуле:

$$Z_{дн}=(Z_{м} \times M)/F_{д} \quad (8)$$

где $Z_{м}$ – месячный должностной оклад работника, руб (в качестве месячного оклада инженера выступает заработная плата; M – количество месяцев работы без отпуска в течение года: при отпуске в 48 раб. дней $M=11,2$ месяца, 5-дневная неделя; $F_{д}$ – действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала (в рабочих днях). В 2016 году действительный годовой фонд рабочего времени составлял 254 рабочих дней (остальные выходные и праздничные дни). Баланс рабочего времени представлен в таблице 15.

Таблица 15 – Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководитель	Инженер
Календарное число дней	365	365
Количество нерабочих дней -выходные дни	52	82

-праздничные дни	14	14
Потери рабочего времени -отпуск -невыходы по болезни	45 —	52 —
Действительный годовой фонд рабочего времени	254	217

Месячный должностной оклад инженера:

$$Z_M = Z_{TC} \times k_p \quad (9)$$

где Z_{TC} – заработная плата по тарифной ставке, k_p – районный коэффициент, равный 1,3.

Рассчитаем основную заработную плату инженера:

$$Z_M = 9893 \times 1,3 = 12861 \text{ руб.};$$

$$Z_{дн} = (12861 \times 11,2) / 254 = 567 \text{ руб.};$$

$$Z_{осн} = 766 \times 107 = 60679 \text{ руб.}$$

Результаты расчета основной заработной платы представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Расчёт основной заработной платы

Исполнитель	Z_{TC} , руб.	k_p	Z_M , руб.	$Z_{дн}$, руб.	$T_{раб}$ раб.дн.	$Z_{осн}$, руб.
Инженер	9893	1,3	12861	567	107	60679

4.3.4 Дополнительная заработная плата научно-производственного персонала

Дополнительная заработная плата включает оплату за непроработанное время (очередной и учебный отпуск, выполнение государственных обязанностей, выплата вознаграждений за выслугу лет и т.п.) и рассчитывается исходя из 10-15% от основной заработной платы, работников, непосредственно участвующих в выполнении темы:

$$Z_{\text{доп}} = k_{\text{доп}} \times Z_{\text{осн}} = 6068 \text{ руб.}, \quad (10)$$

где $Z_{\text{доп}}$ – дополнительная заработная плата, руб.; $k_{\text{доп}}$ – коэффициент дополнительной зарплаты ($k_{\text{доп}}=0,1$); $Z_{\text{осн}}$ – основная заработная плата, руб.

В таблице 17 – приведен расчёт основной и дополнительной заработной платы.

Таблица 17 – Заработная плата исполнителей НИР

Заработная плата	Руководитель	Инженер
Основная зарплата	6000	60679
Дополнительная зарплата	-	6068
Зарплата исполнителя	6000	66747
Итого по статье $C_{зп}$, руб	72747	

4.3.5 Отчисления во внебюджетные фонды

Отчисления на социальные нужды (32% от статьи заработной платы) составили 23279 руб.

4.3.6 Накладные расходы

Накладные расходы – это затраты на управление и хозяйственное обслуживание и расходы по содержанию, эксплуатации и ремонту оборудования, производственного инструмента и инвентаря, зданий, сооружений и др, что порядка 16% от рассчитанных выше расходов. Суммарно накладные расходы составляют 15517 руб.

4.3.7 Формирование бюджета затрат научно-исследовательского проекта

В процессе формирования бюджета, планируемые затраты группировались по статьям, представленным в таблице 18.

Таблица 18 – Группировка затрат по статьям

Наименование статьи	Сумма, руб.		
	Разработка	Аналог 1	Аналог 2
Материальные затраты НТИ	5478	3498	20000
Затраты на специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ	1476	1476	2952
Затраты по основной заработной плате	60679	60679	60679
Затраты по дополнительной заработной	6068	6068	6068
Отчисления во внебюджетные фонды	23279	23279	23279
Накладные расходы	15517	15200	18076
Итого плановая себестоимость НИР	112497	110200	131054

В ходе расчетов установлено, что затраты на НИР составили 112497 руб., что незначительно дороже аналога 1 (полимерного 3-Д матрикса без добавления наночастиц гидроксиапатита) и дешевле аналога 2 (имплантаты из металлов)

4.4 Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования

Интегральный показатель финансовой эффективности научного исследования получают в ходе оценки бюджета затрат трех (или более) вариантов исполнения научного исследования. Для этого наибольший интегральный показатель реализации технической задачи принимается за базу расчета (как знаменатель), с которым соотносятся финансовые значения по всем вариантам исполнения.

Интегральный финансовый показатель разработки определяется как:

$$I_{\Phi}^p = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{max}} = \frac{112497}{131054} = 0,86$$

$$I_{\Phi}^{a1} = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{max}} = \frac{110200}{131054} = 0,84$$

$$I_{\Phi}^{a2} = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{max}} = \frac{131054}{131054} = 1$$

где I_{Φ}^p - интегральный финансовый показатель разработки; Φ_{pi} – стоимость i -го варианта исполнения; Φ_{max} – максимальная стоимость исполнения научно-исследовательского проекта (в т.ч. аналог).

Полученная величина интегрального финансового показателя разработки отражает соответствующее численное удешевление стоимости разработки в разы.

Интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов исполнения объекта исследования можно определить следующим образом:

$$I_m^a = \sum_{i=1}^n a_i b_i^a, \quad I_m^p = \sum_{i=1}^n a_i b_i^p, \quad (11)$$

где I_m – интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов; a_i – весовой коэффициент i -го параметра; b_i^a , b_i^p – бальная оценка i -го параметра для аналога и разработки, устанавливается экспертным путем по выбранной шкале оценивания; n – число параметров сравнения.

Расчет интегрального показателя ресурсоэффективности рекомендуется проводить в форме таблицы, пример которой приведен ниже.

Таблица 19 – Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Объект исследования Критерии	Весовой коэффициент параметра	Текущий проект	Аналог 1	Аналог 2
1. Экономичность	0,2	4	5	3
2. Экологичность	0,2	4	4	3

3. Безопасность	0,3	4	4	3
4. Простота эксплуатации	0,3	5	5	4
ИТОГО	1	17	18	13

$$I_m^p = 4 \cdot 0,2 + 4 \cdot 0,2 + 4 \cdot 0,3 + 5 \cdot 0,3 = 4,3$$

$$I_1^{a1} = 5 \cdot 0,2 + 4 \cdot 0,2 + 4 \cdot 0,3 + 5 \cdot 0,3 = 4,5$$

$$I_1^{a2} = 3 \cdot 0,2 + 3 \cdot 0,2 + 3 \cdot 0,3 + 4 \cdot 0,3 = 3,3$$

Интегральный показатель эффективности разработки ($I_{финр}^p$) и аналога ($I_{финр}^a$) определяется на основании интегрального показателя ресурсоэффективности и интегрального финансового показателя по формуле:

$$I_{финр}^p = \frac{I_m^p}{I_\phi^p} = \frac{4,3}{0,86} = 5,0$$

$$I_{финр}^{a1} = \frac{I_m^{a1}}{I_\phi^{a1}} = \frac{4,5}{0,84} = 5,4$$

$$I_{финр}^{a2} = \frac{I_m^{a2}}{I_\phi^{a2}} = \frac{3,3}{1} = 3,3$$

Сравнение интегрального показателя эффективности текущего проекта и аналогов позволит определить сравнительную эффективность проекта. Сравнительная эффективность проекта:

$$\mathcal{E}_{cp} = \frac{I_{финр}^p}{I_{финаi}^{ai}}, \quad (12)$$

где \mathcal{E}_{cp} – сравнительная эффективность проекта; $I_{mэ}^p$ – интегральный показатель разработки; $I_{mэ}^a$ – интегральный технико-экономический показатель аналога.

Таблица 20 – Сравнительная эффективность разработки

№ п/п	Показатели	Разработка	Аналог 1	Аналог 2
-------	------------	------------	----------	----------

1	Интегральный финансовый показатель разработки	0,86	0,84	1
2	Интегральный показатель ресурсоэффективности разработки	4,3	4,5	3,3
3	Интегральный показатель эффективности	5,0	5,4	3,3
4	Сравнительная эффективность вариантов исполнения	1	0,95	1,46

Сравнение значений интегральных показателей эффективности позволяет судить о приемлемости существующего варианта решения поставленной в бакалаврской диссертации технической задачи с позиции финансовой и ресурсной эффективности. Как видно из таблицы 4.15 полимерные 3-Д матриксы с наночастицами гидроксиапатита лишь незначительно уступают матриксам без наночастиц с точки зрения финансовой и ресурсной эффективности.

5. Социальная ответственность

В современных условиях труда для снижения производственного травматизма и профессиональной заболеваемости важным является внедрение системы целенаправленных действий по защите и охране труда на всех стадиях производственного процесса.

В данной работе эксперимент производился на установке для электроформования волокон, в состав которой входит блок питания высокого напряжения и камера для электроформования. Для приготовления раствора использовались химические вещества, такие как хлороформ и ацетон. Кроме того, в ходе работы использовалась ПЭВМ. Следовательно, для внедрения определенных правил и мер предосторожности требуется разработать комплекс мероприятий технического, организационного, режимного и правового характера, минимизирующих негативные последствия.

5.1 Анализ опасных и вредных производственных факторов

Под опасным производственным фактором понимается фактор, воздействие которого на работника может привести к его травме (высота, огонь, электрический ток, движущиеся предметы, взрыв). Вредным производственным фактором является фактор, воздействие которого на работника может привести к его заболеванию (неблагоприятный микроклимат, повышенный уровень шума, вибрации, плохое освещение, неблагоприятный состав воздуха).

Согласно [61] при работе с установкой для электроформования и ПЭВМ на сотрудников могут воздействовать опасные и вредные факторы, приведенные в таблице 21.

Таблица 21 – Основные элементы производственного процесса, формирующие опасные и вредные факторы.

Наименование видов работ	ФАКТОРЫ ГОСТ 12.0.003-74 ССБТ		Нормативные документы
	Вредные	Опасные	
Работа с ПЭВМ, работа на установке для электроформования	Повышенный уровень воздействия электромагнитного излучения		СанПиН 2.2.2.542-96
		Электрический ток	ГОСТ 12.1.038-82 ССБТ. Электробезопасность
	Повышенный уровень шума		ГОСТ 12.1.029-80
	Химические токсические		ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества.
		Пожаровзрывоопасность	ГОСТ 12.1.044-89 (ИСО 4589-84) ССБТ; ПБ 10-115-96; ГОСТ 12.2.085-82

На инженера, работающего с установкой для электроформования и ПЭВМ, воздействуют следующие факторы:

1. физические: температура и влажность воздуха, шум, статическое электричество, вредные химические вещества, освещённость. Воздействие электромагнитного излучения было сведено к минимуму, так как при работе на ПЭВМ использовался жидкокристаллический монитор;
2. психофизиологические: физические перегрузки (статические, динамические), нервно-психические перегрузки (умственное перенапряжение, монотонность труда, эмоциональные перегрузки).

5.2 Обоснование и разработка мероприятий по снижению уровней опасного и вредного воздействия и устранению их влияния при работе на ПЭВМ, установке для электроформования и с химическими веществами.

5.2.1 Организационные мероприятия

Весь персонал обязан знать и строго соблюдать правил техники безопасности. Обучение персонала техник безопасности и производственной санитарии состоит и вводного инструктажа, и инструктажа на рабочем месте ответственным лицом.

Проверка знаний правил техники безопасности проводится квалификационной комиссией после обучения на рабочем месте. Проверяемому, присваивается соответствующая его знаниям и опыту работы квалификационная группа по технике безопасности и выдается специальная удостоверение.

К работе с установкой для электроформования и всеми узлами данной установки допускаются лица не моложе 18 лет, не имеющих медицинских противопоказаний, прошедших вводный инструктаж и инструктаж по безопасности труда на рабочем месте. К самостоятельной работе допускаются работники после специального обучения и проверки знаний правил электробезопасности, приобретенных навыков и безопасных способов выполнения работы с данной установкой, ознакомленные с инструкцией по эксплуатации прибора и имеющие не менее II группы по электробезопасности.

Повторная проверка знаний норм и правил электробезопасности, правил безопасной работы с химическими веществами проводится с работниками не реже 1 раза в 12 месяцев, повторный инструктаж на рабочем месте – не реже 1 раза в 3 месяца.

Проведение всех видов инструктажа должно оформляться в Журнале регистрации инструктажа установленного образца, с обязательными подписями получившего и проводившего инструктаж, с указанием даты проведения инструктажа, наименования и номеров инструкции на виды работ, по которым проводится инструктаж.

При введении в эксплуатацию нового оборудования сотрудники, которые будут работать на нем, должны пройти внеплановый инструктаж по правилам эксплуатации и безопасной работе на данном оборудовании.

5.2.2 Организация рабочего места оператора ПЭВМ

Рациональная планировка рабочего места предусматривает четкий порядок и постоянство размещения предметов, средств труда и документации. То, что требуется для выполнения работ чаще должно располагаться в зоне легкой досягаемости рабочего пространства, как показано на рисунке 20.

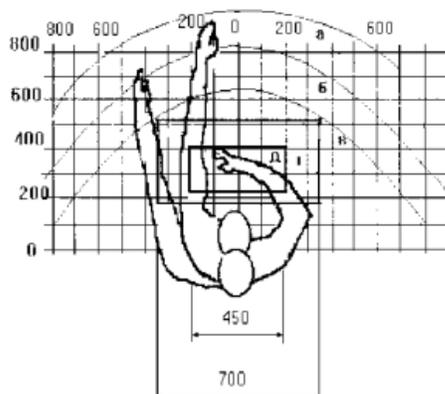


Рисунок 20 – Зоны досягаемости рук в горизонтальной плоскости: а – зона максимальной досягаемости рук; б – зона досягаемости пальцев при вытянутой руке – зона легкой досягаемости ладони; г – оптимальное пространство для грубой ручной работы; д – оптимальное пространство для тонкой ручной работы

Оптимальное размещение предметов труда и документации в зонах досягаемости рук: дисплей размещается в зоне а (в центре); клавиатура – в зоне г/д; системный блок размещается в зоне б (слева); принтер находится в зоне а (справа); документация – в зоне легкой досягаемости ладони – в (слева) – литература и документация, необходимая при работе; в выдвижных ящиках стола – литература, не используемая постоянно.

При проектировании письменного стола должны быть учтены следующие требования. Высота рабочей поверхности стола рекомендуется в пределах 680-800 мм. Высота рабочей поверхности, на которую устанавливается клавиатура, должна быть 650 мм. Рабочий стол должен быть шириной не менее 700 мм и длиной не менее 1400 мм. Должно иметься пространство для ног высотой не менее 600 мм, шириной – не менее 500 мм, глубиной на уровне колен – не менее 450 мм и на уровне вытянутых ног – не менее 650 мм.

Рабочее кресло должно быть подъёмно-поворотным и регулируемым по высоте и углам наклона сиденья и спинки, а также расстоянию спинки до переднего края сиденья. Рекомендуется высота сиденья над уровнем пола 420-550 мм. Конструкция рабочего кресла должна обеспечивать: ширину и глубину поверхности сиденья не менее 400 мм; поверхность сиденья с заглублённым передним краем. Монитор должен быть расположен на уровне глаз оператора на расстоянии 500-600 мм. Согласно нормам, угол наблюдения в горизонтальной плоскости должен быть не более 45 градусов к нормали экрана. Лучше если угол обзора будет составлять 30 градусов. Кроме того, должна быть возможность выбирать уровень контрастности и яркости изображения на экране.

Должна предусматриваться возможность регулирования экрана:

- по высоте +3 см;
- по наклону от 10 до 20 градусов относительно вертикали;
- в левом и правом направлениях.

Клавиатуру следует располагать на поверхности стола на расстоянии 100-300 мм от края. Нормальным положением клавиатуры является её размещение на уровне локтя оператора с углом наклона к горизонтальной плоскости 15 градусов. Более удобно работать с клавишами, имеющими вогнутую поверхность, четырёхугольную форму с закруглёнными углами. Конструкция клавиши должна обеспечивать оператору ощущение щелчка. Цвет клавиш должен контрастировать с цветом панели.

При однообразной умственной работе, требующей значительного нервного напряжения и большого сосредоточения, рекомендуется выбирать неяркие, малоконтрастные цветочные оттенки, которые не рассеивают внимание (малонасыщенные оттенки холодного зеленого или голубого цветов). При работе, требующей интенсивной умственной или физической напряженности, рекомендуются оттенки тёплых тонов, которые возбуждают активность человека.

5.2.3 Условия безопасной работы

Основные параметры, характеризующие условия труда это: микроклимат, шум, вибрация, электромагнитное поле, излучение, освещённость.

Воздух рабочей зоны (микроклимат) производственных помещений определяют следующие параметры: температура, относительная влажность, скорость движения воздуха. Оптимальные и допустимые значения характеристик микроклимата устанавливаются в соответствии со и приведены в таблице 22.

Таблица 22 – Оптимальные и допустимые параметры микроклимата

Период года	Температура, °С	Относительная влажность, %	Скорость движения воздуха, м/с
Холодный и переходный	23-25	40-60	0,1
Тёплый	23-25	40	0,1

К мероприятиям по оздоровлению воздушной среды в производственном помещении относятся: правильная организация вентиляции и кондиционирования воздуха, отопление помещений. Вентиляция может осуществляться естественным и механическим путём. В помещение должны подаваться следующие объёмы наружного воздуха: при объёме помещения до 20 м³ на человека – не менее 30 м³ в

час на человека; при объёме помещения более 40 м³ на человека и отсутствии выделения вредных веществ допускается естественная вентиляция.

Система отопления должна обеспечивать достаточное, постоянное и равномерное нагревание воздуха. В помещениях с повышенными требованиями к чистоте воздуха должно использоваться водяное отопление. Параметры микроклимата в используемой лаборатории регулируются системой центрального отопления, и имеют следующие значения: влажность – 40%, скорость движения воздуха – 0,1 м/с, температура летом -20–25 °С, зимой -13–15 °С. В лаборатории осуществляется естественная вентиляция. Воздух поступает и удаляется через щели, окна, двери. Основной недостаток такой вентиляции в том, что приточный воздух поступает в помещение без предварительной очистки и нагревания.

Шум и вибрация ухудшают условия труда, оказывают вредное воздействие на организм человека, а именно, на органы слуха и на весь организм через центральную нервную систему. В результате этого ослабляется внимание, ухудшается память, снижается реакция, увеличивается число ошибок при работе. Шум может создаваться работающим оборудованием, установками кондиционирования воздуха, осветительными приборами дневного света, а также проникать извне. При выполнении работы на ПЭВМ уровень шума на рабочем месте не должен превышать 50 дБ.

В соответствии с [62] допустимый уровень шума при работе, требующей сосредоточенности, работе с повышенными требованиями к процессам наблюдения и дистанционного управления производственными циклами на рабочих местах в помещениях лабораторий с шумным оборудованием, составляет 75 дБ. Следовательно, средства и методы защиты от шума должны обеспечивать уровень шума на рабочем месте не выше 75 дБ. Зоны с уровнем звука 80 дБ должны быть обозначены знаками безопасности согласно [62, 63].

Снижение шума, воздействующего на человека на рабочих местах до значений, не превышающих допустимые, достигается применением средств и

методов коллективной защиты, применением средств индивидуальной защиты. Работаящих в шумоопасных зонах, администрация снабжает средствами индивидуальной защиты, которыми являются специальные наушники, вкладыши в ушную раковину, противошумовые каски, защитное действие которых основано на изоляции и поглощения звука.

Дисплей ЭВМ являются источником электромагнитного излучения. Так же управление установкой характеризуется монотонностью работы и умственным перенапряжением. Нервно-психические перегрузки приводят к переутомляемости, снижению внимания и могут привести к ухудшению здоровья человека. При регулярной непрерывной работе с компьютером могут возникать заболевания органов зрения, сердечно-сосудистой системы и желудочно-кишечного тракта.

Напряженность электромагнитного поля на расстоянии 50 см вокруг экрана по электрической составляющей должна быть не более:

- в диапазоне частот 5 Гц – 2 кГц – 25 В/м;
- в диапазоне частот 2 кГц – 400 кГц – 2,5 В/м.

Плотность магнитного потока должна быть не более:

- в диапазоне частот 5 Гц – 2 кГц – 250 нТл;
- в диапазоне частот 2 кГц – 400 кГц – 25 нТл.

Утомляемость органов зрения может быть связана как с недостаточной освещенностью, так и с чрезмерной освещенностью, а также с неправильным направлением света.

5.3 Химическая безопасность

Задачей химической безопасности является охрана внутренней среды человека от многочисленных вредных для организма химических агентов, способных проникать в ткани и органы, накапливаться в них и сохраняться длительное время.

Согласно [64] по степени воздействия на организм вредные вещества подразделяют на четыре класса опасности:

- 1-й - вещества чрезвычайно опасные;
- 2-й - вещества высокоопасные;
- 3-й - вещества умеренно опасные;
- 4-й - вещества малоопасные.

Класс опасности вредных веществ устанавливают в зависимости от норм и показателей, указанных в таблице 23.

Таблица 23 – Нормы показателей для определения класса опасности вредного вещества

Наименование показателя	Нормы для класса опасности			
	1-го	2-го	3-го	4-го
Предельно допустимая концентрация (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны, мг/м ³	Менее 0,1	0,1-1,0	1,1-10,0	Более 10,0
Средняя смертельная доза при введении в желудок, мг/кг	Менее 15	15-150	151-5000	Более 5000
Средняя смертельная доза при нанесении на кожу, мг/кг	Менее 100	100-500	501-2500	Более 2500
Средняя смертельная концентрация в воздухе, мг/м ³	Менее 500	500-5000	5001-50000	Более 50000
Коэффициент возможности ингаляционного отравления (КВИО)	Более 300	300-30	29-3	Менее 3
Зона острого действия	Менее 6,0	6,0-18,0	18,1-54,0	Более 54,0
Зона хронического действия	Более 10,0	10,0-5,0	4,9-2,5	Менее 2,5

Отнесение вредного вещества к классу опасности производят по показателю, значение которого соответствует наиболее высокому классу опасности.

В ходе работы использовался хлороформ и ацетон, ПДК которых 20 мг/м³ и 200 мг/м³ соответственно.

При работе в химической лаборатории необходимо соблюдать следующие требования техники безопасности согласно:

- при работе с химическими реактивами в лаборатории должно находиться не менее двух сотрудников;
- приступая к работе, сотрудники обязаны осмотреть и привести в порядок свое рабочее место, освободить его от ненужных для работы предметов;
- перед работой необходимо проверить исправность оборудования, рубильников, наличие заземления и пр;
- работа с едкими и ядовитыми веществами, а также с органическими растворителями проводится только в вытяжных шкафах;
- запрещается набирать реактивы в пипетки ртом, для этой цели следует использовать резиновую грушу или другие устройства;
- при определении запаха химических веществ следует нюхать осторожно, направляя к себе пары или газы движением руки;
- работы, при которых возможно повышение давления, перегрев стеклянного прибора или его поломка с разбрызгиванием горячих или едких продуктов, также выполняются в вытяжных шкафах. Работающий должен надеть защитные очки (маску), перчатки и фартук;
- при работах в вытяжном шкафу створки шкафа следует поднимать на высоту не более 20 - 30 см так, чтобы в шкафу находились только руки, а наблюдение за ходом процесса вести через стекла шкафа;
- при работе с химическими реактивами необходимо включать и выключать вытяжную вентиляцию не менее чем за 30 минут до начала и после окончания работ;
- смешивание или разбавление химических веществ, сопровождающееся выделением тепла, следует проводить в термостойкой или фарфоровой посуде;

- при упаривании в стаканах растворов следует тщательно перемешивать их, так как нижний и верхний слои растворов имеют различную плотность, вследствие чего может произойти выбрасывание жидкости;
- во избежание ожогов, поражений от брызг и выбросов нельзя наклоняться над посудой, в которой кипит какая-либо жидкость;
- нагревание посуды из обычного стекла на открытом огне без асбестированной сетки запрещено;
- при нагревании жидкости в пробирке держать ее следует отверстием в сторону от себя и от остальных сотрудников;
- ни при каких обстоятельствах нельзя допускать нагревание жидкостей в колбах или приборах, не сообщающихся с атмосферой;
- нагретый сосуд нельзя закрывать притертой пробкой до тех пор, пока он не охладится до температуры окружающей среды.

5.4 Электробезопасность

Электробезопасность – это система организационных и технических мероприятий и средств, обеспечивающих защиту людей от вредного и опасного воздействия электрического тока, электрической дуги, электромагнитного поля и статического электричества. Безопасной для человека является величина переменного тока – 10 мА, постоянного – 50 мА, безопасное напряжение 12 В.

В зависимости от условий в помещении опасность поражения человека электрическим током увеличивается или уменьшается. Не следует работать с ПЭВМ или другими электрическими приборами и установками в условиях повышенной влажности (относительная влажность воздуха длительно превышает 75 %), высокой температуры (более 35 °С), наличии токопроводящей пыли, токопроводящих полов и возможности одновременного прикосновения к имеющим

соединение с землёй металлическим элементом и металлическим корпусом электрооборудования.

Характер и последствия поражения зависят от величины, частоты и пути прохождения тока; продолжительности воздействия.

При работе на ПЭВМ существует опасность электропоражения в следующих случаях:

- при непосредственном прикосновении к токоведущим частям во время ремонта электрических приборов;
- при прикосновении к нетоковедущим частям, оказавшимся под напряжением (в случае нарушения изоляции);
- при прикосновении с полом, стенами, оказавшимися под напряжением;
- при коротком замыкании.

Работа установки для электроформования предполагает использование высокого напряжения блока питания (до 15 кВ) и напряжения сети 380\220 В, которое может привести к поражению электрическим током. Источником поражения электрическим током могут быть незащищенные и неизолированные электропровода, поврежденные электродвигатели, открытые коммутаторы, не заземленное оборудование и др.

Проходя через живые ткани, электрический ток оказывает термическое, электролитическое и биологическое воздействия. Это приводит к различным нарушениям в организме, вызывая как местное поражение тканей и органов, так и общее поражение организма [65]. Самый опасный – переменный ток частотой 50 – 60 Гц.

Электрозащитные средства – это переносимые и перевозимые изделия, служащие для защиты людей, работающих с электроустановками, от поражения электрическим током, от воздействия электрической дуги. Эти средства должны обеспечивать высокую степень защиты и удобство при эксплуатации. Их выбирают с учетом требований безопасности для данного вида работ. В первую очередь

безопасность обеспечивается применением средств коллективной защиты, а затем, если она не может быть обеспечена, применяют средства индивидуальной защиты.

К средствам индивидуальной защиты от поражения электрическим током относятся:

– оградительные устройства, которые могут быть стационарными и переносимыми. Ограждения могут быть заблокированы с устройствами, отключающими рабочее напряжение при снятии; – изолирующие устройства и покрытия;

- устройства защитного заземления, зануления и защитного отключения;
- устройства дистанционного управления;
- предохранительные устройства и др.

Для обеспечения электробезопасности обслуживающего персонала необходимо предусмотреть:

- защитное заземление всех металлических нетоковедущих частей электрооборудования $R_3 \leq 4 \text{ Ом}$;
- раздельное размещение аппаратуры с напряжением до 1000 В и свыше 1000 В;
- ограждение электронного источника, исключающее возможность прикосновения к токоведущим частям;
- полное ограждение от прикосновения к аппаратуре с напряжением выше 1000 В;
- отключение всех источников питания установки общим рубильником.

При поражении работника электрическим током необходимо:

1. освободить пострадавшего от действия электрического тока и оценить состояние пострадавшего;
2. вызвать скорую медицинскую помощь или врача, либо принять меры для транспортировки пострадавшего в ближайшее лечебное учреждение;

3. если пострадавший находится в сознании, но до этого был в состоянии обморока или продолжительное время находился под действием тока, ему до прибытия врача необходимо обеспечить полный покой и в дальнейшем медицинское наблюдение в течение 2-3 часов;
4. если пострадавший находится в бессознательном состоянии, но с сохранившимся дыханием, его следует ровно и удобно положить, расстегнуть одежду, создать приток свежего воздуха и обеспечить полный покой, дать понюхать нашатырный спирт. Если пострадавший плохо дышит, необходимо сделать искусственное дыхание и непрямой массаж сердца;
5. при отсутствии признаков жизни (отсутствие дыхания, пульса, реакции зрачка на свет) нельзя считать пострадавшего мертвым. Ему должна быть оказана первая медицинская помощь в виде искусственного дыхания и непрямой массаж сердца. Искусственное дыхание и непрямой массаж сердца следует делать непрерывно до прибытия врача;
6. переносить пострадавшего в другое место следует только в тех случаях, когда ему или лицу, оказывающему помощь, продолжает угрожать опасность или когда оказание помощи на месте невозможно.

5.5 Пожарная и взрывная безопасность

Согласно [66], по взрывопожарной и пожарной опасности помещения подразделяются на категории А, Б, В1-В4, Г и Д, а здания – на категории А, Б, В, Г и Д. Категории помещений и зданий определяются, исходя из вида находящихся в помещениях горючих веществ и материалов, их количества и пожароопасных свойств, а также, исходя из объемно-планировочных решений помещений и характеристик проводимых в них технологических процессов. Помещение, в котором выполняется данная работа, по степени пожаровзрывоопасности относится к категории Г (умеренная пожароопасность), т.е. включает в себя негорючие

вещества и материалы в горячем, раскаленном или расплавленном состоянии, процесс обработки которых сопровождается выделением лучистого тепла, искр и пламени, и (или) горючие газы, жидкости и твердые вещества, которые сжигаются или утилизируются в качестве топлива.

Возможные причины загорания:

- неисправность токоведущих частей установок;
- работа с открытой электроаппаратурой;
- короткие замыкания в блоке питания;
- несоблюдение правил пожарной безопасности;
- наличие горючих компонентов: документы, двери, столы, изоляция кабелей и т.п.

Мероприятия по пожарной профилактике разделяются на: организационные, технические, эксплуатационные и режимные.

Организационные мероприятия предусматривают правильную эксплуатацию оборудования, правильное содержание зданий и территорий, противопожарный инструктаж рабочих и служащих, обучение производственного персонала правилам противопожарной безопасности, издание инструкций, плакатов, наличие плана эвакуации.

К техническим мероприятиям относятся: соблюдение противопожарных правил, норм при проектировании зданий, при устройстве электропроводов и оборудования, отопления, вентиляции, освещения, правильное размещение оборудования.

К режимным мероприятиям относятся, установление правил организации работ, и соблюдение противопожарных мер. Для предупреждения возникновения пожара от коротких замыканий, перегрузок и т. д. необходимо соблюдение следующих правил пожарной безопасности:

- исключение образования горючей среды (герметизация оборудования, контроль воздушной среды, рабочая и аварийная вентиляция);

- применение при строительстве и отделке зданий негорюемых или трудногорюемых материалов;
- правильная эксплуатация оборудования (правильное включение оборудования в сеть электрического питания, контроль нагрева оборудования);
- правильное содержание зданий и территорий (исключение образования источника воспламенения - предупреждение самовозгорания веществ, ограничение огневых работ);
- обучение производственного персонала правилам противопожарной безопасности;
- издание инструкций, плакатов, наличие плана эвакуации;
- соблюдение противопожарных правил, норм при проектировании зданий, при устройстве электропроводов и оборудования, отопления, вентиляции, освещения;
- правильное размещение оборудования;
- своевременный профилактический осмотр, ремонт и испытание оборудования.

При возникновении аварийной ситуации необходимо:

1. Сообщить руководству (дежурному).
2. Позвонить в соответствующую аварийную службу или МЧС – тел. 112.
3. Принять меры по ликвидации аварии в соответствии с инструкцией.

Заключение

В ходе работы были получены полимерные 3-Д матриксы с наночастицами ГА, SiГА и SrГА перекрестной и выровненной структуры. Добавление наночастиц заключается в придании полимерному матриксу биоактивных свойств.

При исследовании гибридных полимерных 3-Д матриксов было выявлено, что средний диаметр волокон для перекрестной структуры матриксов составляет $3,4 \pm 1,9$ мкм, а для выровненной структуры увеличивается до $9,0 \pm 5,3$ мкм. Добавление наночастиц приводит к увеличению диаметра волокон для перекрестной структуры до $5,8 \pm 13,8$ мкм и образованию агломераций частиц. Наибольшие агломерации частиц, размером до 100 мкм наблюдаются на матриксе с наночастицами SrГА, при этом происходит значительное снижение диаметра волокон до $1,8 \pm 1,7$ мкм. Выровненная структура волокон на матриксах с наночастицами искажается и становится похожа на перекрестную структуру.

Исследование смачиваемости поверхности гибридных полимерных 3-Д матриксов показало, что все матриксы обладают гидрофобной поверхностью. Контактный угол смачивания для матриксов с перекрестной структурой составил $129,5^\circ \pm 4,5^\circ$. На выровненной структуре волокон контактный угол смачивания уменьшается приблизительно на 20° . Кроме того, при добавлении наночастиц происходит уменьшение контактного угла смачивания. Для матриксов с 10% содержанием наночастиц ГА и наночастицами SrГА контактный угол смачивания уменьшается на 20° . Для других составов происходит незначительное уменьшение контактного угла смачивания.

Проведение МТТ-теста для оценки жизнеспособности клеток на гибридных полимерных 3-Д матриксах показало, что при добавлении наночастиц происходит значительное увеличение жизнеспособности NCTC L929 клеток. При культивировании МСК человека на поверхности матриксов было выявлено, что на образцах с выровненной структурой волокон образуются более плотные клеточные

слои на 21 день и клетки растут преимущественно вдоль направления волокон. На матриксах с наночастицами клетки приобретают распластанную форму, что говорит о благоприятной поверхности для роста клеток, увеличивается адгезия и пролиферация клеток, особенно на матриксах с наночастицами SiГА и SrГА. Результаты исследования экспрессии генов-маркеров показало, что наличие наночастиц способствует значительному увеличению уровня экспрессии генов, отвечающих за процессы поддержания стволовости, пролиферации и дифференцировки, в то время как на образцах с различной структурой не происходит значительного увеличения уровня экспрессии генов.

Список публикаций

1. Звягин А.С., Городжа С.Н., Сыромотина Д.С. Исследование 3-Д скэффолдов на основе ПГБ-ГВ полимера с частицами Si-ГА // Перспективы развития фундаментальных наук: сборник трудов XII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Томск, 26-29 Апреля 2016. - Томск: ТПУ, 2016 - С. 106-108. – Электронное издание, 3 с.
2. Звягин А.С., Городжа С.Н., Сыромотина Д.С. Исследование структуры, смачиваемости и цитотоксического воздействия 3-Д матриксов на основе полимера ПКЛ с частицами ГА, Si-ГА, Sr-ГА // Высокие технологии в современной науке и технике: сборник научных трудов V Международной научно-технической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов, Томск, 5-7 Декабря 2016. - Томск: ТПУ, 2016 - С. 92-93. – Электронное издание, 2 с.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ki C., Park S., Kim H., Jung H., Woo K., Lee J., Park Y. Development of 3-D nanofibrous fibroin scaffold with high porosity by electrospinning: implications for bone regeneration // *Biotechnology Letters*. – 2008. – V. 30. – I. 3. – P. 405-410.
2. Williamsa J.M., Adewunmib A., Scheka R.M., Flanagan C.L., Krebsbach P.H., Feinberg S.E., Hollister S.J., Das S. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering // *Biomaterials*. – 2005. – V. 26. – I. 23. – P. 4817-4827.
3. Wutticharoenmongkol P., Sanchavanakit N., Pavasant P., Supaphol P. Preparation and characterization of novel bone scaffolds based on electrospun polycaprolactone fibers filled with nanoparticles // *Macromolecular Bioscience*. – 2006. – V. 6. – I. 1. – P. 70-77.
4. Wutticharoenmongko P., Pavasant P., Supaphol P. Osteoblastic phenotype expression of MC3T3-E1 cultured on electrospun polycaprolactone fiber mats filled with hydroxyapatite nanoparticles // *Biomacromolecules*. – 2007. – V. 8. – I. 8. – P. 2602-2610.
5. Шульгина М.В., Свентская Н.В., Сивков С.П., Лукина Ю.С. Гидроксиапатитовые цементы на основе кремний-структурированного α -трехкальциевого фосфата // *Успехи в химии и химической технологии*. – 2014. – Т. 28. – № 8. – С. 106–109.
6. O'Brien F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering // *Materials today*. – 2011. – V. 14. – I. 3. – P. 88-95.
7. Матвеев А.Т., Афанасов И.М. Получение нановолокон методом электроформования: учебное пособие / Москва: Изд-во «Москва», 2010. – 83 с.
8. Мулдер М. Введение в мембранную технологию. Перевод с английского языка под ред. Ю. П. Ямпольского, В. П. Дюбяги. / Москва: Изд-во «Мир», 1999. – 513 с.

9. Pham Q.P., Sharma U., Mikos A.G. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review // *Tissue Engineering*. – 2006. – V.12. – I. 5. – P. 1197-1211.
10. Филатов Ю.Н. Электроформование волокнистых материалов (ЭФВ-процесс) / Москва: Изд-во «Москва», 2001. – 231 с.
11. Burger C., Hsiao B.S., Chu B. Nanofibrous materials and their applications. // *Annu. Rev. Mater. Res.* – 2006. – V.36. – P. 336-368.
12. Teo W.E., Ramakrishna S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. // *Nanotechnology*. – 2006. – V.17. – P. 89-06.
13. Штильман М. И. Технология полимеров медико-биологического назначения. Полимеры природного происхождения: учебное пособие / М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. – 328 с.
14. Хенч Л., Джонс Д. Биоматериалы, искусственные органы, инжиниринг тканей / Москва: Изд-во «Техносфера», 2007. – 304 с.
15. Hoffmann G.F., Meier-Augenstein W., Stockler S., Surtees R., Rating D., Nyhan W.L. Physiology and pathophysiology of organic acids in cerebrospinal fluid // *J. Inherit Metab. Dis.* – 1993. – V. 16. – I. 4. – P. 648-669.
16. Shoemaker J.D., Elliott W.H. Automated screening of urine samples for carbohydrates, organic and amino acids after treatment with urease // *J. Chromatogr.* 1991. – V. 562. – I. 1-2. – P. 125-138
17. Lee S.J., Liu J., Oh S.H., Soker S., Atala A., Yoo J.J. Development of a composite vascular scaffolding system that withstands physiological vascular conditions // *Biomaterials*. – 2009. – V. 29. – I. 19. – P. 2891-2898.
18. Sasmazel H.T. Novel hybrid scaffolds for the cultivation of osteoblast cells // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2011 – V. 49. – I. 4. – P. 838-846.

19. Serrano M.C., Pagani R., Vallet-Regí M., Peñab J., Rámila A., Izquierdo I., Portolés M.T. In vitro biocompatibility assessment of poly(ϵ -caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts // *Biomaterials*. – 2004 – V. 25. – I. 25. – P. 5603-5611.
20. Волков А. В. Синтетические материалы на основе полимеров органических кислот в тканевой инженерии // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. – 2005. – № 2. – С. 43-45.
21. Neuss S., Apel C., Buttler P. et al. Assesment of stem cell/biomaterial combinations for stem cell-based tissue engineering // *Biomaterials*. – 2008. – V. 29. – I. 3. – P. 302-313.
22. Bolgen N., Menciloglu Y.Z., Acatay K. Vargel I, Pişkin E. In vitro and in vivo degradation of non-woven materials made of poly(ϵ caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions // *J. Biomater. Scin. Polym. Ed.* – 2005. – V. 16. – I. 12. – P. 1537-1555.
23. Петровская Т.С. Биоматериалы и имплантаты для травматологии и ортопедии: монография. – Томск: Изд-во ТПУ, 2011. – 307 с.
24. Эппле М. Биоматериалы и биоминерализация. Перевод с немецкого языка под ред. Пичугина В.Ф., Шаркеева Ю. П., Хлусова И. А. / Томск: Изд-во «Ветер», 2007. – 137 с.
25. Вавилов Т.П. Биохимия тканей и жидкостей полостей рта: учебное пособие. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 208 с.
26. Трубицын М.А., Габрук Н.Г., Олейникова И.И., Тхуан Л.В., Доан В.Д., Хоанг В.Х. Исследование биоактивности и сорбционных свойств наноразмерного кремнийсодержащего гидроксиапатита // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 1. – С. 71-75.
27. Лясникова А.В., Маркелова О.А. Электроплазменные покрытия на основе кремнийсодержащего гидроксиапатита: технология получения и исследование свойств // *Журнал технической физики*. – 2016. – № 86. – С. 147-149.

28. Li J. Structural characterisation of apatite-like materials / College of Engineering and Physical Sciences, University of Birmingham, UK, 2009. – 150 p.
29. Криштал М.М., Ясников И.С., Полуниин В.И., Филатов А.М., Ульяненокв А.Г. Сканирующая электронная микроскопия и рентгеноспектральный микроанализ в примерах практического применения / М.: Изд-во Техносфера, 2009. – 208 с.
30. Гоулдстейн Д., Ньюбери Д., Эчлин П., Джой Д., Фиори Ч., Лифшин Ф. Растровая электронная микроскопия и рентгеновский микроанализ: в двух книгах. Пер. с англ. / М.: Изд-во Мир, 1984. – 303 с.
31. Егоров А.С. Инфракрасная Фурье-спектроскопия. Электронное учебно-методическое пособие / Нижний Новгород: Изд-во Нижегородский госуниверситет, 2012. – 40 стр.
32. Колесник И.В., Саполетова Н.А. Инфракрасная спектроскопия. Методическая разработка / Москва: Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, 2011. – 88 стр.
33. Егоров Н.Б., Шагалов В.В. Инфракрасная спектроскопия редких и рассеянных элементов: Учебно-методические указания по курсу «Физико-химические методы анализа» для магистров, обучающихся по программе «Технология материалов современной энергетики» и для студентов специальностей: 240601 «Химическая технология материалов современной энергетики», 240603 «Химическая технология редких элементов и материалов на их основе» / Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2008. – 20 с.
34. Замышляева О.Г. Методы исследования современных полимерных материалов. Учебно-методическое пособие. / Нижний Новгород: Изд-во Нижегородский госуниверситет, 2012. – 90 с.
35. Филипов М.М. Рамановская спектроскопия как метод изучения глубоко углефицированного органического вещества. Часть 1. Основные направления использования // Труды Карельского научного центра РАН. – 2014. - № 1. – С. 115-134.

36. Освоение экспериментальных методов спектроскопии комбинационного рассеяния света. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.avantes.ru/articles/up1/50.php>, свободный. – Загл. с экрана.
37. Уразаев В. Гидрофильность и гидрофобность // Технологии в электронной промышленности. – 2006. – №3. С. 33-36.
38. Вережников В.Н. Избранные главы коллоидной химии / Воронеж: Издательство ИПЦ ВГУ, 2011. – 237с.
39. Методы расчета свободной энергии поверхности (СЭП). [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://tirit.org/articles/surface_theory_energy.php, свободный. – Загл. с экрана.
40. Аникина Л.В., Пухов С.А., Дубровская Е.С., Афанасьева С.В., Клочков С.Г. Сравнительное определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ и ресазурина // Фундаментальные исследования. – 2014. – Т. 12. – № 7. – С. 1423–1427
41. O'Hare E.S., Atterwill C.K. In vitro toxicity testing protocols // Ser. Methods in Molecular Biology. – 1995. – V. 43. – P. 138-149.
42. Langdon S.P., Walker J.M. Cancer cell culture: methods and protocols // Ser. Methods in Molecular Medicine. – 1995. – V. 88. – P. 165–169.
43. Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Варламов Д.А., Коновалов С.В., Курочкин В.Е., Маракушин Н.Ф., Петров А.И., Петряков А.О., Румянцев Д.А., Скоблилов Е.Ю., Соколов В.Н., Фесенко В.А., Чернышев А.В. Приборы для диагностики биологических объектов на основе метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) // Научное приборостроение. – 2006. – Т. 16. – № 3. – С. 132–136.
44. Zong X., Bien H., Chung C.Y., Yin L., Fang D., Hsiao B.S., Chu B., Entcheva E. Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs // Biomaterials. – 2005. – V. 26. – I. 26. – С. 5330-5338.

45. Sisson K., Zhang C., Farach-Carson M.C., Chase D.B., Rabolt J.F. Fiber diameters control osteoblastic cell migration and differentiation in electrospun gelatin // *J Biomed Mater Res A*. – 2010. – V. 94. – I. 4. – C. 1312-1332.
46. Baker B.M., Gee A.O., Metter R.B., Nathan A.S., Marklein R.A., Burdick J.A., Mauck R.L. The potential to improve cell infiltration in composite fiber-aligned electrospun scaffolds by the selective removal of sacrificial fibers // *Biomaterials*. – 2008. – V. 29. – I. 15. – C. 2348-2358.
47. Xu X., Chen X., Liu A., Hong Z., Jing X. Electrospun poly(l-lactide)-grafted hydroxyapatite/poly(l-lactide) nanocomposite fibers // *European Polymer Journal*. – 2007. – V. 43. – I. 8. – C. 3187-3196.
48. Elzein T., Nasser-Eddine M., Delaite C., Bistac S., Dumas P. FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2004. – V. 273. – I. 2. – C. 381-387.
49. Jaiswal A.K., Chhabra H., Kadam S.S., Londhe K., Soni V.P., Bellare J.R. Hardystonite improves biocompatibility and strength of electrospun polycaprolactone nanofibers over hydroxyapatite: A comparative study // *Materials Science and Engineering: C*. – 2013. – V. 33. – I. 5. – C. 2926-2936.
50. Tyagi P., Catledge S.A., Stanishevsky A., Thomas V., Vohra Y.K. Nanomechanical properties of electrospun composite scaffolds based on polycaprolactone and hydroxyapatite // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. – 2009. – V. 9. – I. 8. – C. 4839-4845.
51. Patel N, Best S.M., Bonfield W., Gibson I.R., Hing K.A., Damien E., Revell P.A. A comparative study on the in vivo behavior of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2002. – V. 13. – I. 12. – C. 1199-1206.
52. O'Donnell M.D., Fredholm Y., de Rouffignac A., Hill R.G. Structural analysis of a series of strontium-substituted apatites // *Acta Biomaterialia*. – 2008. – V. 4. – I. 5. – P. 1455-1464.

53. Zou S., Huang J., Best S., Bonfield W. Crystal imperfection studies of pure and silicon substituted hydroxyapatite using Raman and XRD // *J Mater Sci Mater Med.* – 2005. – V. 16. – I. 12. – P. 1143-1151.
54. Pankajakshan D., Krishnan K., Krishnan L.K. Vascular tissue generation in response to signaling molecules integrated with a novel poly(ϵ -caprolactone) – fibrin hybrid scaffold // *Tissue engineering and regenerative medicine.* – 2007. – V. 1. – P. 389-397.
55. Porter A.E., Patel N., Skepper J.N., Best S.M., Bonfield W. Effect of sintered silicate-substituted hydroxyapatite on remodelling processes at the bone –implant interface // *Biomaterials.* – 2004. – V. 25. – I. 16. – P. 3303–3314.
56. Qiu K., Zhao X.J., Wan C.X., Zhao C.S., Chen Y.W. Effect of strontium ions on the growth of ROS17/2.8 cells on porous calcium polyphosphate scaffolds // *Biomaterials.* – 2006. – V. 27. – I. 8. – P. 1277–1286.
57. Ghasemi-Mobarakeh L., Prabhakaran M.P., Morshed M., Nasr-Esfahani M.-H., Ramakrishna S. Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering // *Biomaterials.* – 2008. – V. 29. – I. 34. – P. 4532-4539.
58. Deligianni D.D., Katsala N.D., Koutsoukos P.G., Missirlis Y.F. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength // *Biomaterials.* – 2000. – V. 22. – I. 1. – P. 87-96.
59. Peter M., Ganesh N., Selvamurugan N., Nair S.V., Furuike T., Tamura H., Jayakumar R. Preparation and characterization of chitosan–gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications // *Carbohydrate Polymers.* – 2010. – V. 80. – I. 3. – P. 687-694.
60. Swetha M., Sahithi K., Moorthi A., Srinivasan N., Ramasamy K., Selvamurugan N. Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2010. – V. 47. – I. 1. – P. 1-4.

61. ГОСТ 12.0.003-74 ССБТ. Опасные и вредные производственные факторы. Классификация. – Москва: ИПК Издательство стандартов. – 2004.
62. ГОСТ 12.1.029-80 ССБТ. Средства и методы защиты от шума. – 1988.
63. ГОСТ 12.1.003-83 ССБТ. Шум. Общие требования безопасности. – Москва: Стандартиформ. – 2008.
64. ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. – Москва: Стандартиформ. – 2007.
65. ГОСТ 12.1.019-79 ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты. – Москва: ИПК Издательство стандартов, 2000.
66. НПБ 105-03. Определение категорий помещений, зданий и наружных установок по взрывопожарной и пожарной опасности. – 2003.

Приложение А

Таблица 1 – Экспрессия генов в клетках на 2 неделю культивирования на материалах с перекрестной структурой. (В качестве контроля приведен матрикс ПКЛ. Значения больше 1 – увеличенный уровень экспрессии, меньше – уменьшенный уровень экспрессии. Цветом обозначены значения, $p < 0,05$)

Гены	Образец			
	ПКЛ+ГА 15%	ПКЛ+SiГА 10%	ПКЛ+SiГА 15%	ПКЛ+SrГА 10%
KAT2A	0,3686	0,0324	1,028	0,8824
RB1	0,0015	0,0009	0,89	2,6893
DHH	174,8532	29,2426	138,0742	37,6989
NUMB	5,9794	2,6945	8,9712	1,6351
PARD6A	32,8996	0,003	54,8188	24,8341
HDAC2	0,0147	0,183	0,5999	2,6505
JAG1	44,0173	20,2521	0,3855	7,3419
NOTCH1	60,1295	11,2356	32,9636	15,9099
NOTCH2	0,6552	0,9659	1,3192	2,2594
ALPL	114,5632	34,5353	47,6366	29,58
BGLAP	0,1119	1,3566	0,5986	0,4147
BMP1	0,0005	0,2349	0,001	1,6479
BMPRI1A	17,0299	10,7034	24,7765	6,5028
COL1A1	0,5105	0,3923	1,9257	3,6743
COL3A1	0,2253	0,0748	0,8335	2,8092
EGFR	0,3121	0,2088	0,8495	3,7875
FGF-2	1,7777	1,5911	2,5015	2,7824
FGFR1	0,1303	0,4204	0,6794	1,3875
IGF1	92,4115	2,6574	18,0872	13,2356
IGFR1	3,0525	1,5157	13,215	9,2995
RUNX2	20,393	2,4794	16,7955	5,2746
SMAD2	1,9588	1,7777	4,3169	4,0004
SMAD4	0,4863	1,257	0,7861	4,2288

SMAD5	1,2058	0,7526	1,1254	2,6847
SPP1	0,0393	0,0183	0,0709	0,0171
TGFBR1	9,7136	9,6465	3,5223	6,5912
TNF	9,1896	4,2871	16,5792	4,0046
VDR	0,0155	0,0072	0,028	6,9864
HSPA9	1,5911	0,3253	1,903	2,2251
SOX1	657,1141	207,9366	302,2084	9,896
APC	7,5685	1,6133	5,8324	5,171
AXIN	7,0616	6,8211	3,9537	2,5905
MSX1	2,7702	0,507	2,4485	1,6648
IGF2	0,5664	0,5548	0,6827	1,2678
CCND1	1,0644	1	1,3538	1,9421
CDK4	0,3415	0,6974	0,5748	0,6569
CDC6	1,2746	0,0008	0,0029	1,3394
WEE1	0,0011	0,4601	0,0021	2,6512
CCNA2	2,7511	1,2834	4,9633	1,1988
CCNB2	1,4439	0,7071	364,8855	88,1354
CUL1	7,3107	3,4105	0,8206	1,3656
SKP2	18,2522	7,2602	6,0176	3,3025
CCNB1	2,2501	1,4743	14,8285	10,2799
CDK7	1,0425	1,5052	0,5097	1,6916
CDKN1B	2,9079	5,6962	2,639	2,0449
CDKN2A	2,4967	1,1647	7,6306	3,1395
CDKN2B	6,774	3,2043	4,5043	1,088
TP53	4,6268	3,9724	15,117	2,8067
MCM2	0,6417	0,1397	3,1674	2,542
FOXP1	1,8532	0,3253	9,2811	6,3597
SIRT1	0,001	0,0005	0,0009	4,384
WNT1	202,2506	94,3532	0,0017	3,3041
ALDH1A1	182,2784	69,551	334,4855	37,7172

CD24	7,8899	0,4444	2,0997	1,7317
CD44	0,4931	0,8236	0,7649	0,8199
GATA3	29,446	26,9087	108,8426	13,9728
ITGA6	2,1435	1,1975	2,4913	5,8691
ITGB1	0,5548	0,2466	1,0839	2,6302
CD34	202,2506	94,3532	364,8855	3456,389
FOXA2	101,1253	104,6915	248,035	95,2568
PTCH1	4,8232	2,8679	32,7177	11,766
AXL	0,1058	0,6507	1,0724	1,0564
IL8	0,2253	0,4293	0,5697	1,2608
SNAI1	2,2658	2,7895	5,2416	2,5374
TWIST1	0,0769	0,6329	1,0122	1,7748
ZEB1	1,9588	0,409	2,501	4,3498
KLF4	3,4343	6,8211	3,0005	3,8494
MYC	2,0705	0,4033	1,6514	1,498
NANOG	137,187	52,7098	197,8276	69,5824
POU5F1	36,7583	17,5087	39,9327	23,1726
SOX2	533,7425	206,5003	806,9861	137,2393
LIN28B	202,2506	45,8866	264,9543	52,2062
NOS2	162,0168	64,4452	55,8815	34,7285
BMP7	30,6965	0,0202	9,6847	0,0189
DNMT1	5,5404	1,4743	6,9336	3,9514
BCL2	1,3947	2,9079	8,2638	7,1649
BIRC3	0,0148	0,0052	2,0072	4,8539
MCL1	0,2161	0,0748	0,3674	0,994
TRAF2	0,0036	1,1019	0,0064	1,3604
ATG3	0,7631	0,8766	1,5346	1,437
ATG12	2,0562	1,1019	1,2215	1,5467
NFKB1	2,4116	2,0139	3,6632	7,8841
RPS6KB1	5,6178	1,4948	8,087	6,6385

CCDC103	5,6569	7,1107	32,2226	4,8772
FOXI1	190,019	75,0614	114,0482	114,6466
RAB25	265,0278	79,8932	264,9911	41,6271
BAX	0,5743	1,4439	1,5506	1,1687
CD40	0,0361	0,2017	0,85	1,4087
CFLAR	2,0139	1,6133	10,1015	4,8958
FAS	0,5905	0,1406	0,0091	0,9378
TNFRSF10A	27,0958	21,4068	11,6762	4,0035

Таблица 2 – Экспрессия генов в клетках на 2 неделю культивирования на материалах с выровненной структурой. (В качестве контроля приведен образец 2. Значения больше 1 – увеличенный уровень экспрессии, меньше – уменьшенный уровень экспрессии. Цветом обозначены значения, $p < 0,05$)

Гены	Образцы			
	ПКЛ+ГА 10%	ПКЛ+ГА 15%	ПКЛ+SiГА 10%	ПКЛ+SiГА 15%
KAT2A	0,2423	1,6935	0,2239	2,2658
RB1	0,0003	1,5369	0,4975	2,0139
DHH	22,2387	31,779	4,2092	40,2244
NUMB	4,2723	0,0004	0,5423	7,8354
PARD6A	88,9548	61,8199	18,3938	41,6429
HDAC2	0,7047	0,6285	0,1021	0,551
JAG1	11,353	7,0616	2,7474	46,2057
NOTCH1	52,1646	12,4666	3,5513	33,3589
NOTCH2	3,7451	1,5263	1,121	3,6808
ALPL	138,6208	0,0172	11,7635	135,2983
BGLAP	0,5763	0,8351	0,5146	1,879
BMP1	0,2544	2,3784	0,5266	0,3869
BMPIA	31,233	25,1067	6,3363	20,5348
COL1A1	1,3996	2,8679	0,5541	3,5064
COL3A1	0,3451	1,6472	0,2749	1,7654
EGFR	0,8497	0,0005	0,5098	2,8879

FGF-2	2,7226	3,2043	0,8559	5,4264
FGFR1	0,2357	1,2834	0,4383	1,6245
IGF1	37,923	14,5203	27,2966	88,0347
IGFR1	9,6131	8,2821	2,3514	8,8766
RUNX2	19,9042	15,2422	5,6355	9,8492
SMAD2	3,7451	6,5432	1,0349	2,9282
SMAD4	1,6415	8,2821	2,3675	2,639
SMAD5	2,5403	3,9724	1,3233	3,1167
SPP1	0,0079	0,0146	0,0179	0,009
TGFBR1	5,3703	19,9733	1,5661	6,7272
TNF	37,4009	45,5696	55,899	28,2465
VDR	0,005	0,0092	0,0112	0,0057
HSPA9	1,7963	1,6818	0,6654	2,6027
SOX1	1473,468	96,3358	261,1708	74,5429
APC	4,2723	7,0128	1,1212	6,2767
AXIN	2,4368	6,2767	1,05	9,1261
MSX1	1,0461	0,4796	0,2539	0,6507
IGF2	0,3597	2,8879	0,2796	2,8879
CCND1	0,6092	1,4743	0,7477	1,5583
CDK4	0,3242	0,6156	0,7477	0,4763
CDC6	0,0005	0,0032	0,0011	1,9319
WEE1	0,2983	0,0006	0,7627	4,9933
CCNA2	1,5422	2,8481	3,4937	1,7654
CCNB2	1,0461	0,9013	175,4298	2,1886
CUL1	6,4308	7,1107	0,9755	4,4076
SKP2	14,1723	2,0705	1,2334	13,3614
CCNB1	2,4538	1,3013	4,1651	2,4116
CDK7	2,1962	0,0001	0,8604	4,1411
CDKN1B	1,7471	5,5022	1,7831	5,9381
CDKN2A	0,9428	1,7411	0,8598	1,0792

CDKN2B	3,4702	4,5631	2,1358	5,6962
TP53	16,0555	6,5887	0,8624	6,8685
MCM2	2,5053	0,0028	2,9729	2,7511
FOXP1	0,0002	2,0705	5,4621	1,8661
SIRT1	0,0003	1,181	1,3087	1,0943
WNT1	0,1012	0,1869	0,0007	0,1158
ALDH1A1	148,5701	188,7065	87,2601	152,2185
CD24	1,3519	2,2815	0,2237	1,7171
CD44	0,8858	1,4948	0,4915	1,4241
GATA3	43,5621	76,6386	16,9176	83,8652
ITGA6	2,7606	5,8159	0,3866	5,278
ITGB1	0,1481	0,9526	0,3115	0,8011
CD34	1,2702	2,3457	2,8774	149,0859
FOXA2	45,7278	88,0347	13,6871	60,5477
PTCH1	0,0022	0,0041	1,9551	4,8232
AXL	0,2293	1,8532	0,2467	1,0425
IL8	0,9044	2,1287	0,4336	0,8467
SNAI1	3,5677	2,362	2,2972	3,4581
TWIST1	0,7397	1,3195	0,5336	1,3287
ZEB1	0,7145	2,2658	0,3482	3,8906
KLF4	1,3149	1,014	0,3082	2,6208
MYC	1,6077	2,0139	0,4366	1,9588
NANOG	68,3562	68,1197	56,8721	107,6347
POU5F1	28,5417	17,2677	12,5547	30,91
SOX2	28,3446	120,2589	29,6149	84,4485
LIN28B	193,3405	131,5986	73,1786	120,2589
NOS2	155,9565	0,0182	177,8417	302,3341
BMP7	7,3871	31,779	31,9302	78,7932
DNMT1	1,244	1,4142	1,4857	5,8159
BCL2	2,9588	6,8211	5,625	9,5798

BIRC3	0,0035	3,1821	0,8104	2,9897
MCL1	0,7195	0,7474	0,1682	1,8921
TRAF2	0,0015	2,0849	0,0033	1,1408
ATG3	1,4489	2,3295	0,9404	2,1886
ATG12	2,2894	1,9319	1,7792	2,9897
NFKB1	1,3519	3,0951	1,221	3,3404
RPS6KB1	4,7076	4,6913	2,5478	4,9246
CCDC103	4,5789	9,9177	1,7277	17,6305
FOXI1	103,6086	0,017	37,48	116,1625
RAB25	6,5659	1,9185	18,2048	24,2515
BAX	1,0105	2,0849	1,2707	2,395
CD40	0,0004	0,3276	0,1318	0,6113
CFLAR	4,976	1,007	1,7288	5,8563
FAS	0,0013	3,605	0,3917	0,7631
TNFRSF10A	61,606	22,6274	6,7587	20,5348

Таблица 3 – Попарное сравнение уровня экспрессии генов в клетках при культивировании на материалах с разными структурами (перекрестная и параллельная). (Значения больше 1 – увеличенный уровень экспрессии, меньше – уменьшенный уровень экспрессии. Цветом обозначены значения, $p < 0,05$)

Гены	Образцы		
	ПКЛ	ПКЛ+ГА 15%	ПКЛ+SiГА 15%
KAT2A	1,3149	6,0419	2,8981
RB1	1,459	4,429	3,3015
DHH	1,2269	0,223	0,3574
NUMB	0,7819	0	0,6829
PARD6A	0,375	0,7047	0,2849
HDAC2	2,6299	2,5951	2,4153
JAG1	1,21	0,1941	2,0393
NOTCH1	1,7112	0,3548	1,7317
NOTCH2	0,6092	1,4191	1,6997

ALPL	1,0035	0,0002	2,8501
BGLAP	0,5158	3,8504	1,6192
BMP1	1,1134	6,136	2,8665
BMPR1A	0,8207	1,21	0,6802
COL1A1	0,9965	5,5983	1,8145
COL3A1	1,1447	8,3687	2,4247
EGFR	1,21	0,0019	4,1133
FGF-2	0,6307	1,1368	1,3681
FGFR1	0,9107	8,9693	2,1774
IGF1	0,4813	0,0756	2,3426
IGFR1	0,8094	2,1962	0,5437
ACTIN	0,976	1,5105	1,3222
RUNX2	0,9234	0,6902	0,5415
SMAD2	0,8322	2,7798	0,5645
SMAD4	0,7658	3,0412	2,5708
SMAD5	0,9044	2,9794	2,5046
SPP1	1,6301	0,605	0,2079
TGFBR1	1,2527	2,5758	2,3925
TNF	0,122	0,605	0,2079
VDR	1,0246	0,605	0,2079
HSPA9	1,1368	1,2016	1,5548
SOX1	0,3356	0,0492	0,0828
APC	1,1688	1,083	1,2578
AXIN	1,1447	1,0175	2,6423
MSX1	3,6427	0,6307	0,968
IGF2	0,7873	4,0139	3,3302
RPLP0	1,0246	0,662	0,7563
CCND1	0,7397	1,0246	0,8515
CDK4	0,9107	1,6415	0,7546
CDC6	1,0534	0,0027	2,2087

WEE1	1,2184	0,605	4,761
CCNA2	0,5844	0,605	0,2079
AURKB	0,8556	0,605	0,2079
CCNB2	0,8497	0,5303	2,2662
CUL1	0,976	0,9493	0,7149
SKP2	1,0607	0,1203	0,9557
CCNB1	1,1134	0,6439	5,2685
CDK7	0,7096	0	1,1134
CDKN1B	1,0175	1,9252	0,7918
CDKN2A	0,8675	0,605	0,2079
CDKN2B	2,181	1,4692	0,8218
TP53	0,6713	0,9559	1,4557
MCM2	0,8675	0,0038	0,2572
FOXP1	0,8919	0,9965	3,372
SIRT1	0,9965	3,535	3,2642
ALDH1A1	0,6263	0,6484	0,285
CD24	4,0982	1,1851	3,3515
CD44	0,7145	2,166	1,3302
GATA3	0,6998	1,8213	0,5392
ITGA6	0,8981	2,4368	1,9028
ITGB1	1,1057	1,8987	0,8172
CD34	2,1646	0,605	2,3136
FOXA2	1,7231	1,5	0,4206
PTCH1	1,0389	0,0009	0,1531
AXL	0,8981	5,7251	0,8731
IL8	0,5123	4,84	0,7614
SNAI1	1,4897	1,5529	0,9828
TWIST1	0,9559	6,3929	1,2548
ZEB1	1,5422	1,7839	2,3991
KLF4	1,7231	0,5087	1,505

MYC	1,4093	1,3708	1,6717
NANOG	1,1134	0,5529	0,6058
POU5F1	1,3149	0,6177	1,0178
SOX2	2,1067	0,4747	0,2205
LIN28B	1,1368	0,7397	0,516
NOS2	0,5724	0,0001	3,0966
BMP7	0,201	0,208	1,635
DNMT1	1,1134	0,2842	0,9339
BCL2	0,7145	3,4943	0,8283
BIRC3	0,8039	3,0446	1,1973
MCL1	0,6134	2,1214	3,1593
TRAF2	0,7983	2,263	4,406
ATG3	0,7765	2,3702	1,1073
ATG12	0,7658	0,7195	1,8742
NFKB1	1,1769	1,5105	1,0732
RPS6KB1	0,976	0,8151	0,5944
CCDC103	0,6998	1,2269	0,3829
FOXI1	0,9626	0,0001	0,9804
RAB25	2,4538	0,0178	0,2246
BAX	0,4368	1,5856	0,6746
CD40	1,1134	2,091	0,8008
CFLAR	1,2879	0,6439	0,7466
FAS	0,8556	5,2234	3,6801
TNFRSF10A	1,0607	0,8858	1,8654