

ISSN 1561-8331 (Print)

ISSN 2524-2342 (Online)

ФІЗИЧНАЯ ХІМІЯ
PHYSICAL CHEMISTRY

УДК 544.72.023+547.313

<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2022-58-2-135-148>

Поступила в редакцию 31.03.2022

Received 31.03.2022

**В. И. Куликовская¹, В. В. Николайчук¹, А. П. Бонарцев², И. Г. Чишанков¹,
Е. А. Акулина², И. В. Демьянова², Г. А. Бонарцева³, К. С. Гилевская¹, В. В. Воинова²**

¹*Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь*

²*Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия*

³*ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН, Москва, Россия*

**ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ПЛЕНОК
ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА С РЕГУЛИРУЕМОЙ ТОПОГРАФИЕЙ ПОВЕРХНОСТИ**

Аннотация. Исследована возможность формирования микроструктурированных пленок поли-3-оксибутирата методом «самоорганизации» микрокапель воды с помощью искусственных шаблонов и обратных эмульсий полимера. Установлено, что методом «самоорганизации» можно сформировать упорядоченные микроструктуры поли-3-оксибутирата с гексагональным расположением ячеек регулируемого диаметра от 1 до 4 мкм. Показано, что путем применения обратных эмульсий поли-3-оксибутирата можно получить пористые пленки с заданным размером пор от 0,4 до 3 мкм, при этом структуру пленок и размер пор в них можно регулировать путем изменения концентрации полимера в дисперсионной среде и объемного соотношения фаз. С помощью метода центрифугирования и применения искусственных шаблонов можно создавать точные реплики поли-3-оксибутирата, которые характеризуются высокой степенью однородности по всей площади и отсутствием дефектных областей. Показано, что сформированные микроструктурированные пленки поли-3-оксибутирата с регулируемой топографией поверхности перспективны для использования в качестве скаффолдов для культивирования стволовых клеток.

Ключевые слова: поли-3-оксибутират, пленки, топография, самоорганизация, шаблон, стволовые клетки

Для цитирования. Формирование микроструктурированных пленок поли-3-оксибутирата с регулируемой топографией поверхности / В. И. Куликовская [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2022. – Т. 58, № 2. – С. 135–148. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2022-58-2-135-148>

**V. I. Kulikouskaya¹, V. V. Nikalaichuk¹, A. P. Bonartsev², I. G. Chyshankou¹,
E. A. Akoulina², I. V. Demianova², G. A. Bonartseva³, K. S. Hileuskaya¹, V. V. Voinova²**

¹*Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

²*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

³*Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

**FABRICATION OF MICROSTRUCTURED POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) FILMS WITH
CONTROLLED SURFACE TOPOGRAPHY**

Abstract. The possibility of fabrication of microstructured poly-3-hydroxybutyrate films by self-assembly water microdroplets technique, using artificial templates and polymer inverse emulsions has been studied. It has been established that self-assembly water microdroplets technique allows forming ordered microstructures of poly-3-hydroxybutyrate with a hexagonal arrangement of cells with an adjustable diameter from 1 to 4 μm. It has been shown that application of inverse emulsions of poly-3-hydroxybutyrate allows us to fabricate porous films with a pore size in the range from 0.4 to 3 μm, while the structure of the films and the pore size can be controlled by changing the polymer concentration in the dispersion medium and the volume ratio of the phases. Using spin-coating technique and artificial templates, it is possible to obtain poly-3-hydroxybutyrate microstructured replicas, which are characterized by a high degree of uniformity and the absence of defective areas. It has been shown that the formed microstructured poly-3-hydroxybutyrate films with controlled surface topography are promising for use as scaffolds for stem cells.

Keywords: poly-3-hydroxybutyrate, films, topography, self-organization, template, stem cells

For citation. Kulikouskaya V. I., Nikalaichuk V. V., Bonartsev A. P., Chyshankou I. G., Akoulina E. A., Demianova I. V., Bonartseva G. A., Hileuskaya K. S., Voinova V. V. Fabrication of microstructured poly(3-hydroxybutyrate) films with

controlled surface topography. *Vestsi Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceeding of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2022, vol. 58, no. 2, pp. 135–148 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2022-58-2-135-148>

Введение. В настоящее время одним из активно развивающихся направлений в медицине является применение тканеинженерных конструкций, состоящих из полимерных носителей (скаффолдов) и клеток, для формирования новой ткани [1, 2]. Скаффолд должен быть биосовместимым, биodeградируемым, благоприятствовать прикреплению клеток и их дифференциации, а также обеспечивать растущим тканям временную структурную поддержку. В настоящее время имеется ряд данных, что пролиферация и дифференцировка различных клеток млекопитающих на полимерных поверхностях зависит не только от материала носителя, но и от наличия микро-структуры и ее геометрических характеристик. В связи с этим перспективными материалами для клеточной и тканевой инженерии являются полимерные микроструктурированные пленки, размер пор в которых соизмерим с размером клеток [3, 4]. Изменяя размер пор в таких материалах, можно регулировать как адгезию клеток, так и их функциональное состояние. Например, авторы [5] показали возможность направленной остеогенной или миогенной дифференцировки стволовых клеток в зависимости от размера пор в полимерных пленках на основе полистирола и поли(N-додецилакриламид-со-6-акриламидгексановой кислоты). Имеются данные [6], что фибробласты лучше прикрепляются к пленкам с субмикронным размером пор.

Важно, чтобы скаффолд обладал определенным набором функций: механической прочностью, биосовместимостью и биоразлагаемостью [7]. Чаще всего для получения таких скаффолдов применяются синтетические полимеры и сополимеры. Однако отличной альтернативой синтетическим полимерам для создания биоразлагаемых носителей для клеток является микро-биологический поли-3-оксибутират (ПОБ). ПОБ получают биотехнологическим путем, что позволяет достичь высокой степени чистоты, задавать и контролировать его физико-химические свойства в процессе биосинтеза. Тонкопленочные материалы из поли-3-оксибутирата обладают высокой механической прочностью, являются биосовместимыми, биоразлагаемыми и характеризуются отсутствием цитотоксичности. Более того, имеются данные, что ПОБ может обладать собственной биологической активностью. Так, он стимулирует остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток и обладает остеоиндуктивной активностью *in vivo* [8].

В настоящее время для получения микроструктурированных пленок могут использоваться разные методы, которые условно можно разделить на два основных типа, основанные 1) на использовании шаблонов и 2) на принципах самоорганизации. К первым относятся различные виды литографии, которые заключаются в переносе определенного рисунка с одного носителя на другой с применением фотошаблона либо мастера [9]. Главное преимущество этих методов – высокая точность воспроизведения структуры. Недостатком такого подхода является необходимость в шаблоне с требуемой микроструктурой. Широкое применение данного метода может быть ограничено доступностью шаблона с требуемой морфологией, особенно в случае необходимости получения пористых материалов. Перспективным методом формирования пористых полимерных пленок, базирующимся на принципах самоорганизации, является действие влажного воздуха на жидкую полимерную пленку. Этот подход впервые предложил Б. Франкоис для получения высокоупорядоченных пористых пленок со структурой типа пчелиных сот на основе разветвленных полистиролов [10, 11]. В настоящее время данный подход получил широкое распространение для формирования пленок из разных классов полимеров, так как он не требует сложного и дорогостоящего оборудования, позволяет получать пленки быстро и в мягких условиях (атмосферное давление, невысокие температуры) [12].

Цель данной работы – провести сравнительный анализ возможности применения метода «самоорганизации» микрокапель воды и темплатных подходов для формирования микроструктурированных пленок из биотехнологического ПОБ, а также оценить пригодность полученных материалов для использования в качестве скаффолдов для стволовых клеток.

Экспериментальная часть

Синтез поли-3-оксибутирата. Для получения ПОБ с молекулярной массой 350 кДа использовали метод контролируемого биосинтеза с помощью высокоэффективного штамма-продуцента ПОБ *Azotobacter chroococcum* 7Б. Для этого в культуральную среду добавляли регулятор молекулярной массы – 50 мМ ацетата натрия [13]. Штамм-продуцент культивировали в течение 72 ч. Процесс выделения и очистки полимера из биомассы штамма-продуцента включал экстракцию хлороформом, фильтрование, осаждение изопропиловым спиртом, очистку путем нескольких циклов растворение–осаждение и высушивание.

Формирование микроструктурированных пленок ПОБ методом «самоорганизации» микрокапель воды. При формировании пленок методом «самоорганизации» микрокапель воды заданный объем раствора ПОБ в хлороформе (150–300 мкл) наносили на поверхность кремниевой подложки (2×2 см²). Через 5–10 с на полученную жидкую полимерную пленку действовали потоком воздуха с относительной влажностью 75 % и температурой 37 °С. Необходимую влажность воздуха создавали путем его барботирования через насыщенный водный раствор хлорида натрия, температуру которого регулировали с помощью водяного термостата. Поток воздуха подавался перпендикулярно к поверхности жидкой полимерной пленки со скоростью 5 л/мин. Концентрацию раствора ПОБ, наносимого на подложку, варьировали в диапазоне 1–40 мг/мл.

Получение пористых пленок ПОБ с использованием обратных эмульсий. В качестве дисперсионной среды был взят раствор ПОБ в хлороформе с концентрацией 20 и 40 мг/мл, а дисперсионной фазы – дистиллированная вода. В водную фазу также дополнительно вводили 3 мас. % сахарозы. Объемное соотношение раствор ПОБ:вода в эмульсии составляло 1:1 и 7:3. Для получения пленок аликвоту обратной эмульсии наносили на кремниевую подложку и сушили потоком теплого воздуха.

Получение микроструктурированных пленок ПОБ с использованием искусственных шаблонов. В качестве искусственных шаблонов использовали калибровочные решетки для атомно-силового микроскопа: TGX1 (TipsNano) и TGZ3 (TipsNano). Микроструктурированные пленки ПОБ получали методом центрифугирования (10000 об/мин, высокоскоростная центрифуга ЦВ – 01/1, Беларусь) путем нанесения на шаблоны 30–40 мкл раствора полимера в хлороформе с концентрацией 40–100 мг/мл.

Изучение стабильности пленок ПОБ. Стабильность микроструктурированных пленок ПОБ изучали в стерилизующем растворе (70 %-ный этиловый спирт) и натрий-фосфатном буфере (рН 7,4). Для этого образцы пленок помещали в модельную среду и выдерживали в ней. Через определенные промежутки времени пленки доставали, промывали дистиллированной водой, сушили и оценивали изменение морфологии их поверхности методом сканирующей электронной микроскопии.

Сканирующая электронная микроскопия. Морфологию поверхности полученных пленок ПОБ изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Для этого образцы пленок, нанесенных на подложку, напыляли платиной (Smart Coater) и анализировали на микроскопе JSM-6000Plus (JEOL, Japan) в режиме высокого вакуума при ускоряющем напряжении 5–15 кВ.

Атомно-силовая микроскопия. Атомно-силовые микрофотографии (АСМ) пленок ПОБ получали в контактном режиме на приборе NanoScope III MultiMode (Veeco, США). Условия сканирования: скорость 3–5 Гц, кантилевер с золотым отражающим покрытием и константой жесткости 0,11 Н/м (TipsNano). Полученные АСМ-изображения анализировали с помощью инструментов программного обеспечения NanoScope 5.31r1.

Определение краевого угла смачивания покрытий. Краевой угол смачивания (Θ) микроструктурированных пленок ПОБ определяли методом неподвижной капли по диаметру и высоте капли дистиллированной воды объемом 5 мкл, нанесенной на образец. Изображение капель воды на поверхности исследуемых образцов получали с помощью цифровой оптической камеры «ЛЭМТ» (БелОМО, Беларусь). Полученные изображения анализировали при помощи специали-

зированного программного обеспечения SEM, позволяющего рассчитать углы смачивания поверхности с погрешностью $\pm 0,5^\circ$.

Культивирование клеток на поверхности микроструктурированных пленок. Для исследования возможности использования структурированных пленок в качестве подложки для роста клеток, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) культивировали на выбранных пленках в течение 5 сут. МСК были выделены из 3-дневных крыс линии Вистар по стандартной методике [14]. Полученные клетки культивировали до 3-го пассажа в стандартной среде DMEM с включением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и 1 % антибиотика. После чего МСК помещали на образцы в количестве 3000 клеток на лунку 96-луночной плашки. После культивирования в течение 2 и 5 сут образцы подготавливали к сканирующей электронной микроскопии путем дегидрирования с помощью этилового спирта и ацетона в различной концентрации с последующим высушиванием в гексаметилдисилазане.

Результаты и их обсуждение

Формирование микроструктурированных пленок ПОБ методом «самоорганизации» микрокапель воды. Формирование пористых полимерных пленок методом «самоорганизации» микрокапель воды заключается в том, что на подложку наносят раствор полимера в не смешивающемся с водой органическом растворителе, который должен растечься по поверхности и таким образом сформировать жидкую полимерную пленку. Далее на эту пленку действуют потоком теплого влажного воздуха, являющегося осадителем для полимера, при этом одновременно протекает несколько процессов. Во-первых, в процессе испарения органического растворителя поверхность жидкой полимерной пленки охлаждается, что сопровождается увеличением поверхностной концентрации полимера. Охлаждение поверхности также способствует конденсации на ней микрокапель воды из подаваемого воздуха. Далее эти микрокапли воды погружаются в жидкую полимерную пленку под действием силы тяжести, удерживаясь в ней силами поверхностного натяжения, и в результате термокапиллярной конвекции Бенара–Марангони укладываются в плотную гексагональную упаковку. Такой упаковке соответствует наименьшая площадь межфазной поверхности и, следовательно, наименьшая поверхностная энергия. После полного испарения растворителя на поверхности подложки остается пористая полимерная пленка с гексагональной симметрией ячеек, часто называемая в литературе «сотоподобная» структура. Таким образом, ключевые требования к растворителю – это его летучесть и способность не смешиваться с водой. Для ПОБ хорошими растворителями, удовлетворяющие этим требованиям, являются хлороформ ($t_{\text{кип}} = 61,2^\circ\text{C}$) и дихлорметан ($t_{\text{кип}} = 39,6^\circ\text{C}$). Однако предварительные исследования показали, что использование растворов ПОБ в дихлорметане для получения микроструктур методом «самоорганизации» микрокапель воды приводит к формированию сплошных неструктурированных пленок, по-видимому, из-за его быстрого испарения. Поэтому для изучения влияния параметров процесса на структуру пленок ПОБ в качестве растворителя использовали хлороформ.

Согласно полученным экспериментальным данным, метод «самоорганизации» микрокапель воды позволяет формировать микроструктурированные пленки ПОБ с регулируемой структурой. Как видно на рис. 1, морфология пленок зависит от концентрации ПОБ в растворе. Так, при использовании разбавленных растворов (1 мг/мл) формируются пленки нерегулярной структуры, размер ячеек в которых равен $4,0 \pm 2,1$ мкм (рис. 1, а). При увеличении концентрации ПОБ до 5 мг/мл образуются пленки с однородными порами диаметром $3,6 \pm 0,2$ мкм, при этом для таких образцов характерна доменная структура и в рамках каждого домена наблюдается строгое упорядоченное гексагональное расположение пор (рис. 1, б). При дальнейшем увеличении концентрации ПОБ в растворе сохраняется тенденция к снижению как среднего диаметра пор, так и размера упорядоченных доменов (табл. 1, рис. 1). При содержании ПОБ в растворе 40 мг/мл выраженная доменная структура пленок исчезает (рис. 1, е), а средний размер пор имеет минимальное значение: $1,2 \pm 0,2$ мкм (табл. 1, рис. 1, е). Таким образом, можно сделать вывод, что повышение концентрации ПОБ в растворе способствует снижению среднего диаметра ячеек.

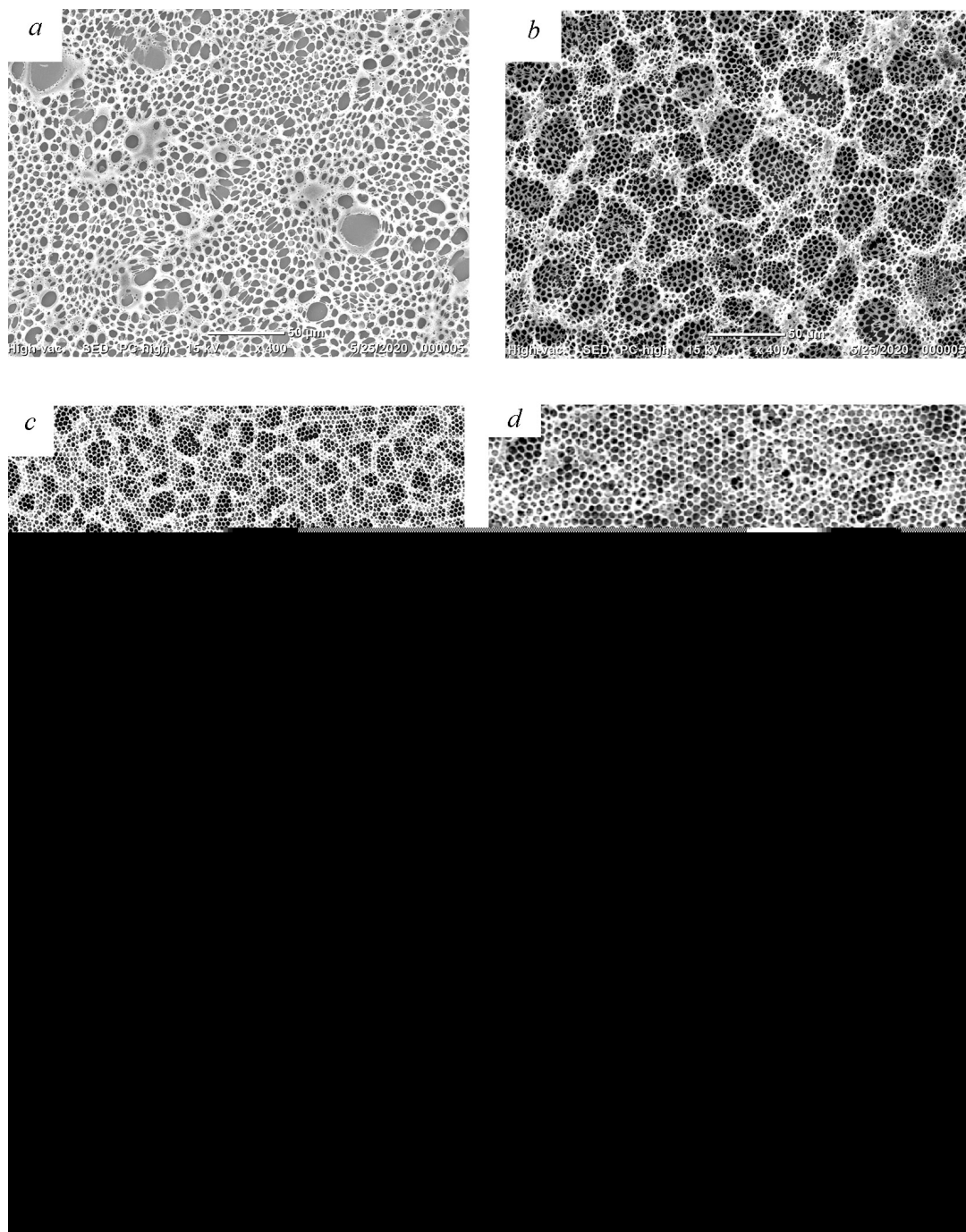


Рис. 1. СЭМ-изображения пленок ПОБ, сформированных из растворов с концентрацией 1 (a), 5 (b), 10 (c), 20 (d) и 40 (e) мг/мл (наносимый объем – 300 мкл)

Fig. 1. SEM images of PHB films formed from solutions with concentrations of 1 (a), 5 (b), 10 (c), 20 (d) and 40 (e) mg/mL (applied volume is of 300 μ L)

Т а б л и ц а 1. Характеристики микроструктурированных пленок ПОБ

Table 1. Characteristics of microstructured PHB films

Показатель	Концентрация ПОБ, мг/мл				
	1	5	10	20	40
Диаметр пор, мкм	4,0 $\pm$ 2,1	3,6 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,8	2,2 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,2
Размер доменов, мкм	—	26,5 $\pm$ 0,2	15,0 $\pm$ 2,1	10,0 $\pm$ 1,8	—

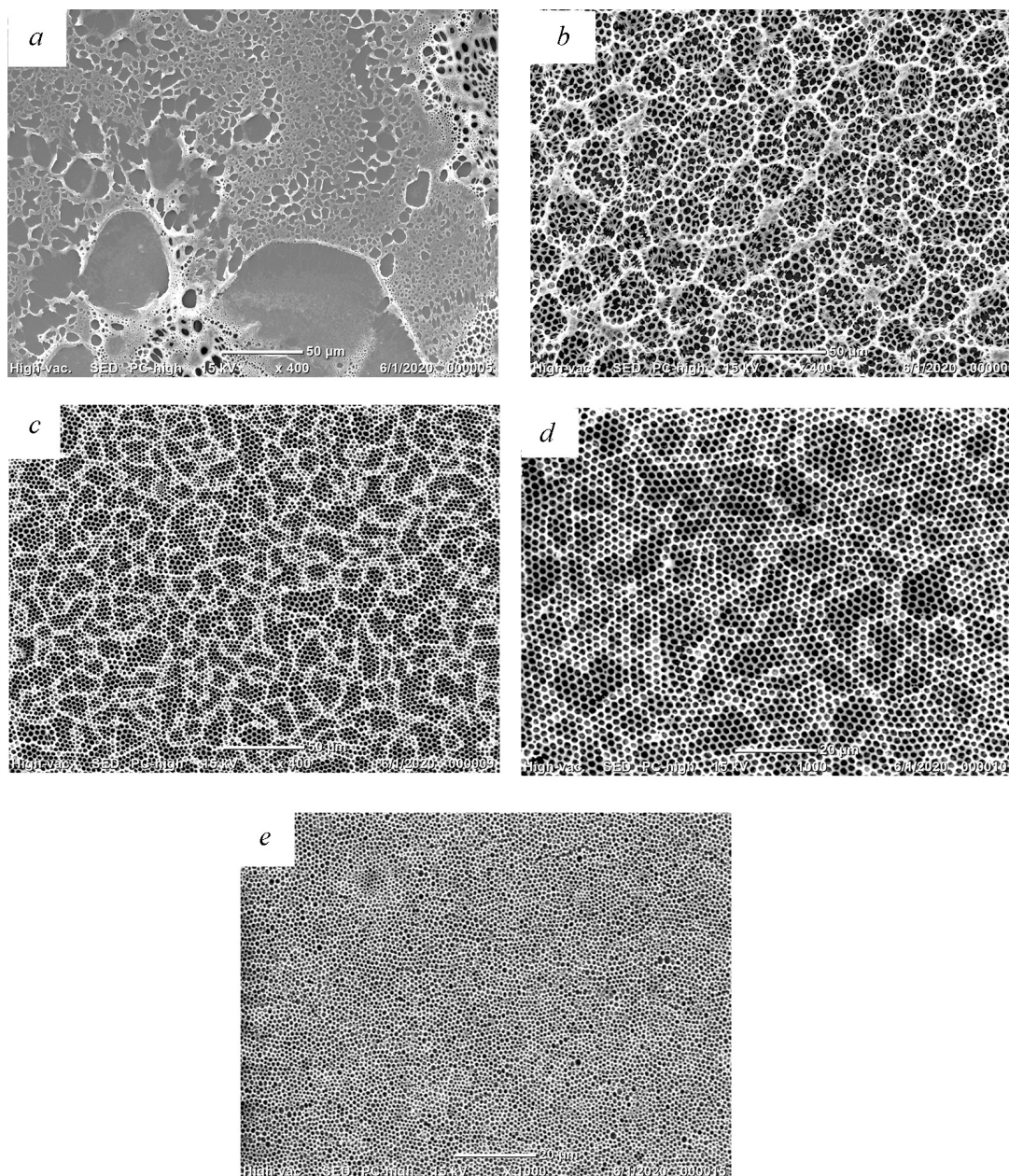


Рис. 2. СЭМ-изображения пленок ПОБ, сформированных из растворов с концентрацией 1 (а), 5 (b), 10 (c), 20 (d) и 40 (e) мг/мл (наносимый объем – 150 мкл)

Fig. 2. SEM images of PHB films formed from solutions with concentrations of 1 (a), 5 (b), 10 (c), 20 (d) and 40 (e) mg/mL (applied volume is of 150 μ L)

Т а б л и ц а 2. Углы смачивания микроструктурированных пленок ПОБ (град)

Table 2. Wetting angles of microstructured PHB films (deg)

Концентрация ПОБ, мг/мл	Объем наносимого раствора, мкл	
	300	150
40	74,5	77,8
20	77,4	77,2
10	94,9	82,2
5	100,2	81,4

Эти результаты хорошо согласуются с полученными нами ранее данными, что для пленок на основе карбоксилированной нитроцеллюлозы и поли-L-лактида повышение концентрации приводит к снижению размера пор [14, 15]. Авторы [16] также продемонстрировали аналогичную тенденцию для пленок на основе разветвленных полимеров. Можно предположить, что чем выше концентрация полимера в сформированной жидкой полимерной пленке, тем быстрее полимер осаждается на поверхности микрокапель воды, обеспечивая стабилизацию и препятствуя их укрупнению за счет коалесценции.

Изучено влияние объема раствора ПОБ, наносимого на подложку, на структуру формируемых пленок. При снижении объема разбавленного раствора ПОБ (1 мг/мл), наносимого на подложку площадью 2×2 см², в 2 раза (до 150 мкл) наблюдается образование островковых пленок с редкими и нерегулярными порами (рис. 2, *a*), что обусловлено, по-видимому, недостатком полимера для формирования сплошного покрытия. При увеличении концентрации до 5 мг/мл формируется микроструктурированная пленка, для которой, как и в случае 300 мкл, характерна доменная структура (рис. 1, *b* и 2, *b*). При дальнейшем увеличении концентрации ПОБ сохраняется тенденция к снижению среднего диаметра ячеек, который составляет $2,7 \pm 0,6$, $2,0 \pm 0,2$ и $1,0 \pm 0,1$ мкм для пленок, полученных из растворов ПОБ с концентрацией 10, 20 и 40 мг/мл, соответственно. При этом следует отметить, что выраженная доменная структура характерна для пленок, сформированных из растворов, содержащих 5–20 мг/мл ПОБ (рис. 2). Таким образом, в изученном диапазоне (150–300 мкл) объем раствора ПОБ, наносимый на подложку, не оказывает существенного влияния на структуру формируемых пленок, наблюдается только небольшое снижение среднего диаметра ячеек с уменьшением содержания ПОБ в растворе.

Экспериментально показано, что повышение температуры подаваемого воздуха выше 40 °С приводит к формированию сплошных пленок, что обусловлено, по-видимому, быстрым испарением хлороформа еще до процесса конденсации микрокапель воды на поверхности жидкой полимерной пленки.

Известно, что наличие микроструктуры поверхности оказывает влияние на ее гидрофильность. Поэтому для полученных пленок ПОБ были определены углы смачивания водой (табл. 2). По сравнению с гладкой пленкой ПОБ для всех полученных микроструктур наблюдалось увеличение угла смачивания от 66,8 до 74,5–100,2°. При этом следует отметить, что чем больше был размер ячеек, тем большее значение принимал угол смачивания. Такое поведение полученных микроструктурированных пленок ПОБ можно объяснить с помощью модели Касье–Бакстера [18], согласно которой пористую пленку можно рассматривать как двухкомпонентную систему, в которой вторым компонентом является воздух с углом контакта 180°. Такая система будет иметь больший угол смачивания по сравнению с гладкой пленкой из того же полимера.

Получение пористых материалов на основе ПОБ с использованием обратных эмульсий.

Получение пористых пленок не растворимых в воде полимеров с помощью обратных эмульсий основано на том, что после нанесения такой эмульсии на подложку и испарения органического растворителя микрокапли дисперсионной фазы (воды) могут выступать шаблоном формирующихся пор. Для получения пористых пленок в качестве дисперсионной среды был взят раствор ПОБ в хлороформе, а дисперсионной фазы – дистиллированная вода. Согласно полученным данным, критическими параметрами, влияющими на структуру формирующихся пленок, являются концентрация ПОБ и объемное соотношение фаз в эмульсии (рис. 3). Так, при соотношении раствор ПОБ:вода = 1:1 формирование пористых пленок наблюдается только при концентрации ПОБ = 40 мг/мл (рис. 3, *b*). Размер пор в таких структурах находится в диапазоне 1–3 мкм. Введение в водную фазу сахарозы (3 мас.%) приводит в случае использования раствора ПОБ с концентрацией 40 мг/мл (рис. 3, *d*) к снижению размера формируемых пор до субмикронных значений (0,4–0,5 мкм) и не оказывает влияния на структуру пленки из разбавленного ПОБ (рис. 3, *c*). Показано, что при увеличении объема дисперсионной фазы до 70 % пористые пленки можно получить как из разбавленных, так и из концентрированных растворов ПОБ (рис. 3, *e, f*). При этом такие структуры характеризуются редко расположенными порами субмикронного размера.

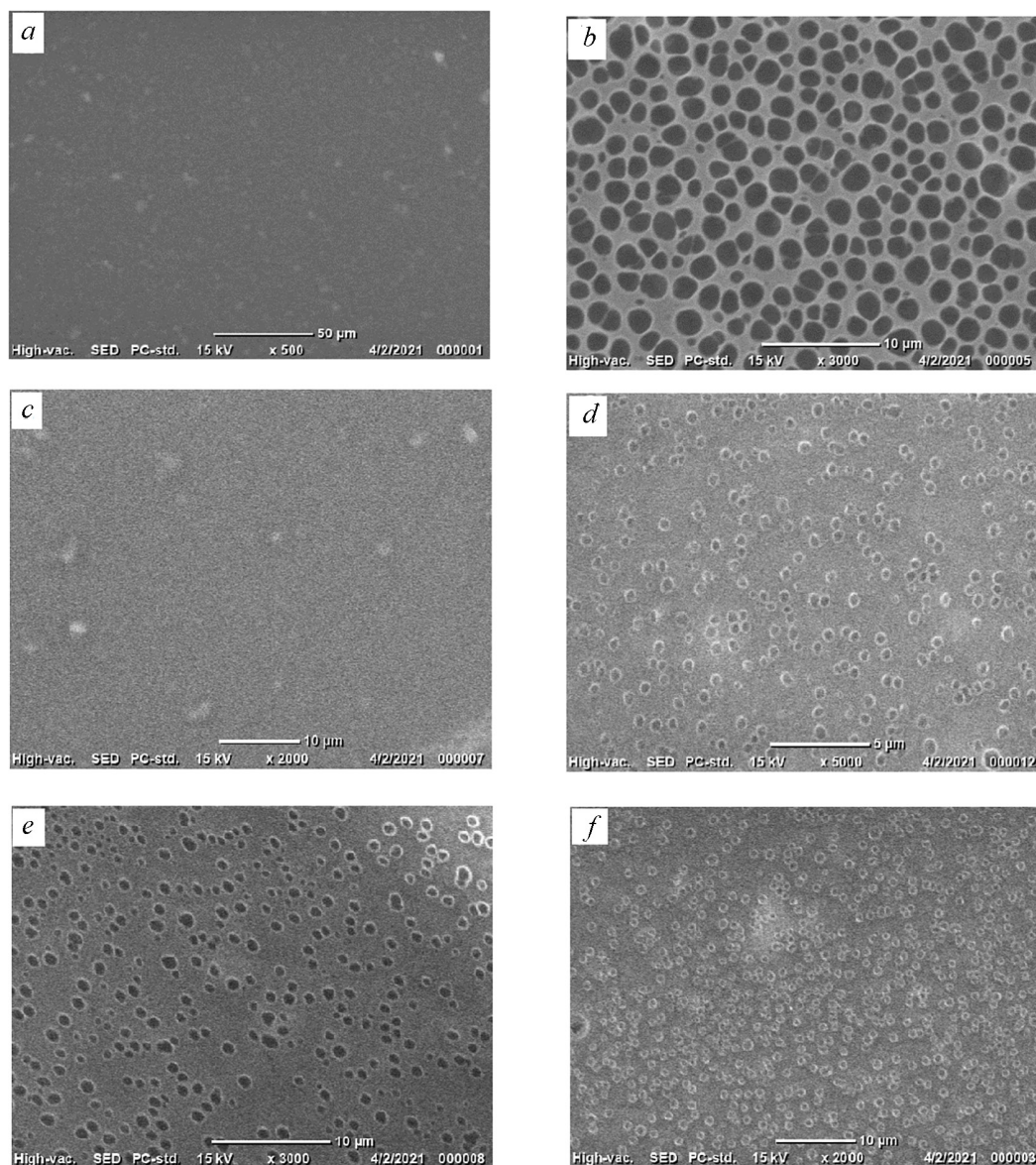


Рис. 3. СЭМ-изображения пленок ПОБ, полученных без (*a, b*) и в присутствии сахарозы (*c–f*). Концентрация ПОБ: 20 (*a, c, e*) и 40 (*b, d, f*) мг/мл. Объемное соотношение раствор ПОБ : вода = 1:1 (*a–d*) и 7:3 (*e, f*)

Fig. 3. SEM images of PHB films obtained without (*a, b*) and in the presence of sucrose (*c–f*). PHB concentration is 20 (*a, c, e*) and 40 (*b, d, f*) mg/mL. The volume ratio "PHB solution: water" = 1:1 (*a–d*) and 7:3 (*e, f*)

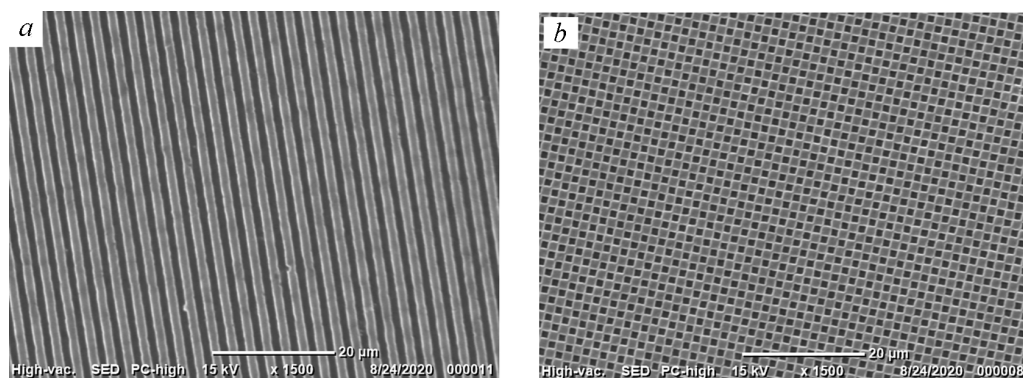


Рис. 4. СЭМ-изображения пленок ПОБ, полученных с шаблонов TGZ3 (*a*) и TGX1 (*b*)

Fig. 4. SEM images of PHB films obtained from templates TGZ3 (*a*) and TGX1 (*b*)

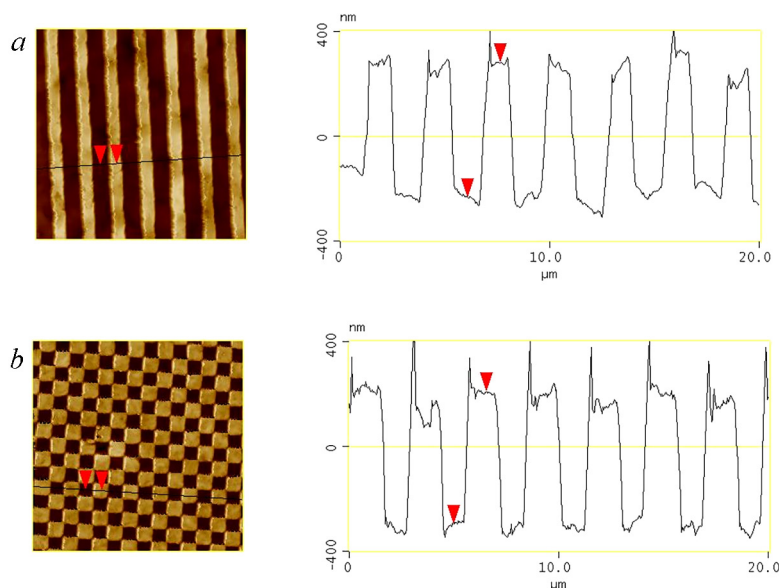


Рис. 5. АСМ-изображения и профиль сечения пленок ПОБ, полученных с шаблонов TGZ3 (a) и TGX1 (b)

Fig. 5. AFM images of PNB films obtained from templates TGZ3 (a) and TGX1 (b)

Таким образом, путем использования обратных эмульсий ПОБ можно формировать пористые пленки с регулируемым размером ячеек от 0,4 до 3 мкм.

Получение микроструктурированных пленок ПОБ с использованием искусственных шаблонов. В качестве шаблона для получения микроструктурированных пленок ПОБ были использованы калибровочные решетки для атомно-силового микроскопа производства TipsNano. Как видно на СЭМ-микрофотографиях (рис. 4), ПОБ формирует хорошо воспроизводимые реплики с микроструктурированных поверхностей, при этом структура таких пленок является однородной по большой площади без выраженных дефектов. Более детально структура пленок изучена методом АСМ (рис. 5). Согласно АСМ-данным, для пленок, представляющих собой чередующиеся параллельные полосы, высота выступов составляет ~ 510 – 520 нм, а ширина выступов и впадин – 1,2 и 1,8 мкм соответственно (рис. 5, a). Следует отметить, что согласно паспортным данным для исходного шаблона TGZ3, высота выступа составляет 520 нм, а ширина выступа и впадин – по 1,5 мкм. Таким образом, при переносе структуры высота элементов остается неизменной, но наблюдается незначительное увеличение расстояния между выступами, что может быть обусловлено формированием полимерного слоя толщиной около 0,15 мкм на элементах исходного шаблона при получении реплики. Для пленок ПОБ, полученных с шаблона TGX1, характерно наличие «столбиков» высотой $\sim 0,5$ мкм и шириной – 1,5 мкм, расстояние между соседними элементами составляет 1,3 мкм, что также близко к исходным параметрам шаблона (рис. 5, b).

Устойчивость микроструктурированных пленок ПОБ при стерилизации и в фосфатном буфере. Микроструктурированные пленки ПОБ с регулируемой топографией поверхности обладают большим потенциалом применения для изучения влияния структуры полимерного носителя на адгезию клеток и их функциональное состояние. В связи с этим важное значение имеет стабильность получаемых образцов ПОБ в процессе стерилизации и в среде для культивирования клеток. В качестве объекта исследования для оценки устойчивости при стерилизации и в фосфатном буфере были взяты пленки ПОБ, полученные с помощью эмульсий, с субмикронным размером пор. Для стерилизации пленок было предложено использовать 70 %-ный раствор этилового спирта, так как в лабораторных условиях предпочтительно применять методы обеззараживания на основе дезинфицирующих растворов. Исследование стабильности в фосфатном буфере обусловлено тем, что он используется в качестве основы для получения среды для культивирования клеток.

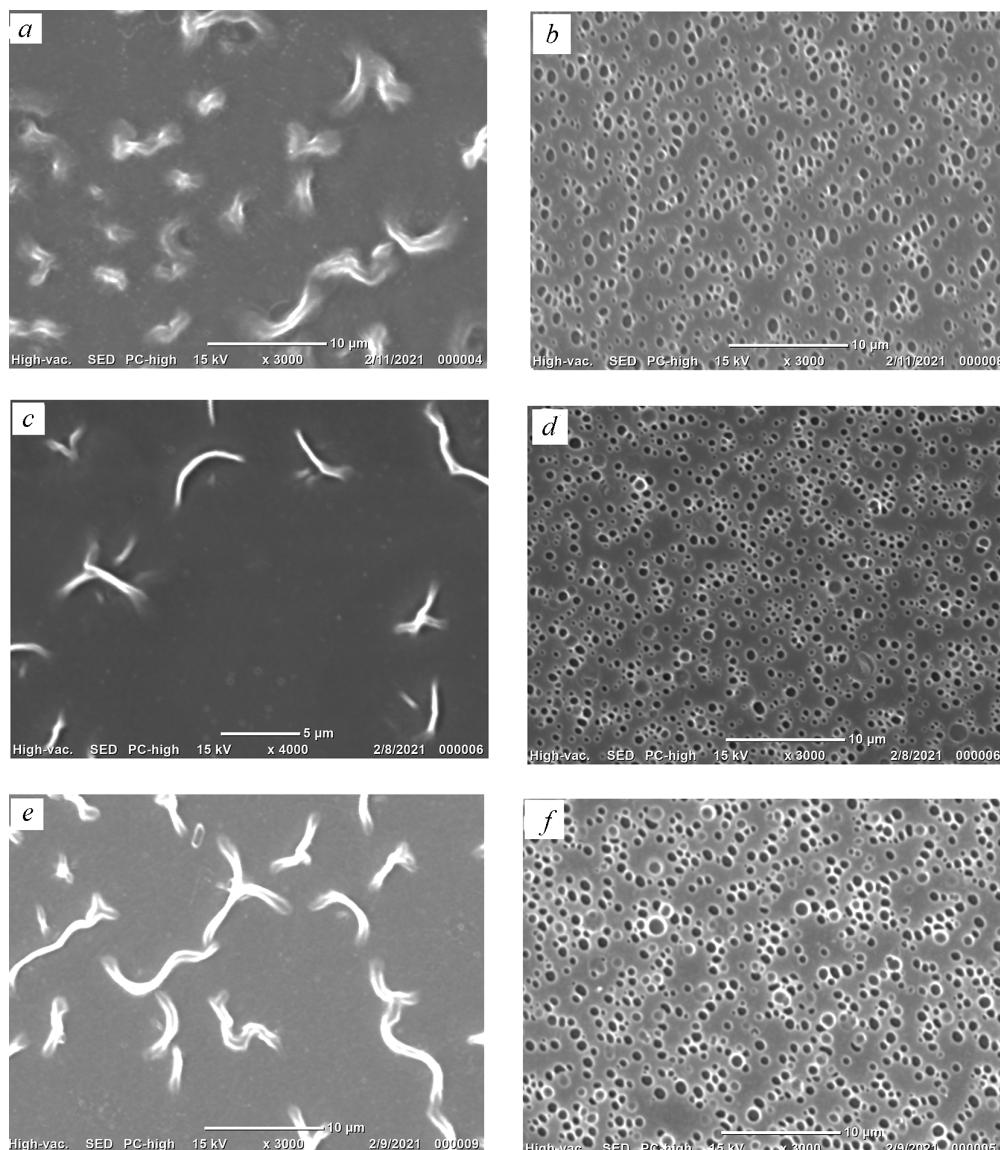


Рис. 6. СЭМ-изображения сплошной (*a, c, d*) и пористой (*b, d, f*) пленок ПОБ до (*a, b*) и после выдерживания в стерилизующем растворе (*c, d*) и фосфатном буфере (*e, f*)

Fig. 6. SEM images of flat (*a, c, d*) and porous (*b, d, f*) PHB films before (*a, b*) and after exposure to sterilizing solution (*c, d*) and phosphate buffer (*e, f*)

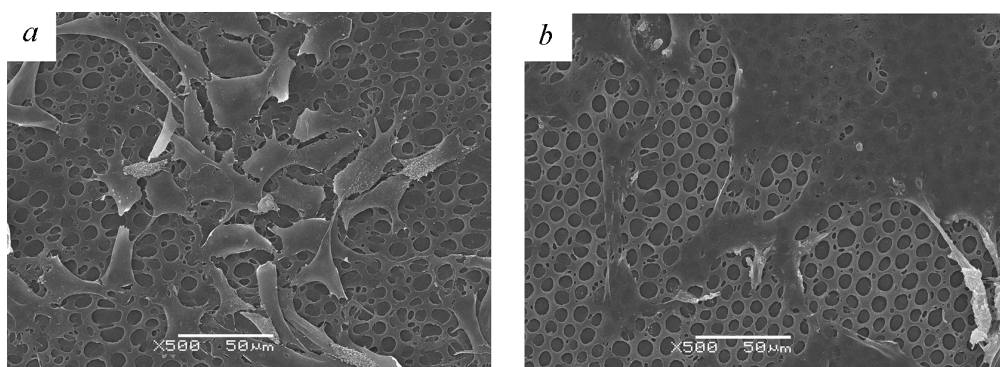


Рис. 7. СЭМ-изображения МСК на структурированных пленках ПОБ на 2-е (*a*) и 5-е (*b*) сутки

Fig. 7. SEM images of MSCs on structured PHB films on 2 (*a*) and 5 (*b*) days

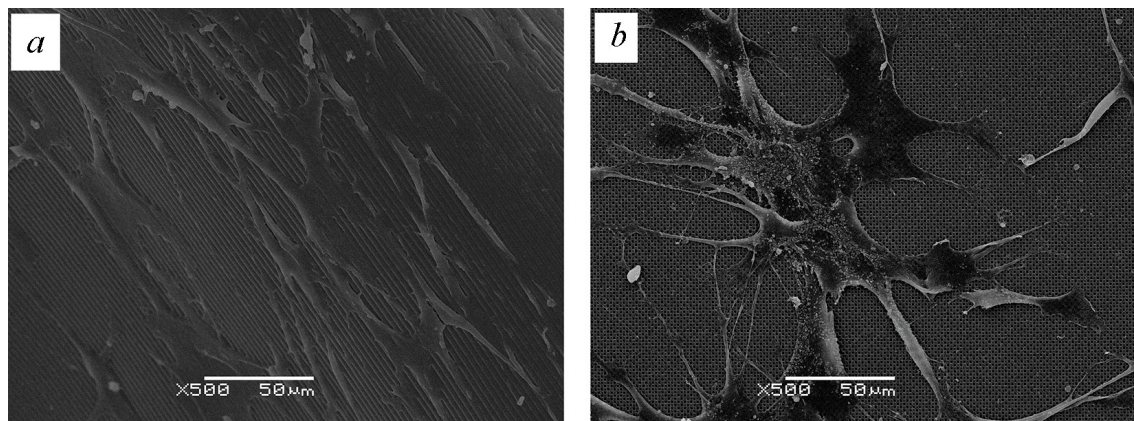


Рис. 8. СЭМ-изображения МСК на структурированных пленках, полученных с шаблонов TGZ3 (a) и TGX1 (b)

Fig. 8. SEM images of MSCs on structured films obtained from templates TGZ3 (a) and TGX1 (b)

Согласно данным сканирующей электронной микроскопии (рис. 6), полученные пленки являются полностью устойчивыми как в фосфатном буфере, так и в стерилизующем растворе (70 % этанол), что подтверждает возможность их применения в качестве скаффолдов для клеток. Как видно из рис. 6, при выдерживании в изучаемых средах структура пленок не претерпевает изменений и остается идентичной исходной.

Оценка возможности применения микроструктурированных пленок ПОБ для культивирования стволовых клеток. Показана принципиальная возможность использования пористых пленок ПОБ в качестве носителей для МСК. В качестве объектов исследования были выбраны пленки ПОБ, полученные методом «самоорганизации» микрокапель воды, а также с помощью искусственных шаблонов. Выбор пленок для клеточных экспериментов связан с тем, что именно эти образцы имели упорядоченные элементы структуры с микронными размерами.

Согласно результатам СЭМ-анализа (рис. 7), МСК не только хорошо прикрепляются к поверхности пористых пленок ПОБ, но и распластаются, при этом видно, что клетки стремятся как можно лучше покрыть поверхность образцов и иногда даже своими выростами заходят в поры. На основании этого можно сделать вывод, что поверхность таких образцов благоприятна для культивирования клеток.

Также показана возможность использования для поддержания клеток пленок ПОБ, имеющих регулярную структуру шаблонов (рис. 8). На изображениях видно, что структура пленок ПОБ влияет на ориентацию расположения клеток на их поверхности. На пленках с рельефом в виде чередующихся параллельных полос (шаблон TGZ3) клетки вытягиваются вдоль полос, в то время как на пленках со столбиками (шаблон TGX1) направление ориентации клеток не выражено, клетки более распластаны во все стороны, формирование выростов более выражено (рис. 8).

Заключение. Таким образом, показано, что на основе ПОБ можно сформировать микроструктурированные пленки с регулируемой топографией с использованием как темплатных методов, так и метода «самоорганизации». При этом за счет применения искусственных шаблонов можно получать реплики ПОБ со сложной топографией поверхности, размеры структурных элементов в которых с высокой точностью повторяют исходный шаблон. Для получения пористых пленок рациональнее применять метод «самоорганизации» микрокапель воды или использовать обратные эмульсии ПОБ. При этом в случае необходимости формирования пленок с микронными размерами пор лучшим выбором является метод «самоорганизации» микрокапель воды. Он позволяет формировать пленки с гексагональным расположением ячеек и их диаметром в диапазоне от 1 до 4 мкм. При необходимости получить пленки ПОБ с порами субмикронной величины (0,4–0,5 мкм) целесообразность использовать его обратные эмульсии. Продemonстрировано,

что варьирование структуры пленок ПОБ позволяет изменять смачиваемость их поверхности. Сформированные микроструктурированные пленки ПОБ устойчивы в стерилизующем растворе и фосфатном буфере. На примере МСК показано, что поверхность микроструктурированных пленок ПОБ благоприятна для их адгезии, поэтому они имеют высокий потенциал использования в качестве скаффолдов для культивирования различных типов животных пленок.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке БРФФИ (грант № X20P-165) и РФФИ (грант № 20-54-00021) (в части получения очищенного поли-3-оксибутирата и культивирования МСК на структурированных пленках) и в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (в части биосинтеза поли-3-оксибутирата). В работе использовано оборудование ЦКП «Электронная микроскопия в науках о жизни» МГУ им. М. В. Ломоносова (уникальное оборудование «Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия») и ФИЦ биотехнологии РАН.

Acknowledgements. This work has been supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research, grant No. X20P-165 and the Russian Foundation for Fundamental Research, grant No. 20-54-00021 (in terms of obtaining purified poly-3-hydroxybutyrate and cultivating MSCs on structured films) and within the framework of the state task of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (in terms of the biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate). The work used the equipment of the Center for Collective Use “Electron Microscopy in the Life Sciences” of Lomonosov Moscow State University (unique equipment “Three-dimensional electron microscopy and spectroscopy”) and FRC Biotechnology RAS.

Список использованных источников

1. Additive manufacturing techniques for the production of tissue engineering constructs / C. Mota [et al.] // *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. – 2015. – Vol. 9, N 3. – P. 174–190. <https://doi.org/10.1002/term.1635>
2. L'Heureux, N. Clinical translation of tissue-engineered constructs for severe leg injuries / N. L'Heureux, D. Letourneur // *Annals of Translational Medicine*. – 2015. – Vol. 3, N 10. – P. 134. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.05.03>
3. Preparation and characterization of macroporous (D,L-lactic acid) film for tissue engineering scaffold / Sh. Shi [et al.] // *International journal of nanomedicine*. – 2010. – Vol. 5. – P. 1049–1055. <https://doi.org/10.2147/IJN.S13169>
4. Robust and hydrophilic polymeric films with honeycomb pattern and their cell scaffold applications / L. Li [et al.] // *Journals of Materials Chemistry*. – 2009. – Vol. 19. – P. 2789–2796. <https://doi.org/10.1039/B820279F>
5. Honeycomb-shaped surface topography induces differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSCs): uniform porous polymer scaffolds prepared by the breath figure technique / T. Kawano [et al.] // *Biomaterial Sciences*. – 2014. – Vol. 2. – P. 52–56. <https://doi.org/10.1039/c3bm60195a>
6. Honeycomb-Structured Porous Films from Polypyrrole-Containing Block Copolymers Prepared via RAFT Polymerization as a Scaffold for Cell Growth Danelle / D. Beattie [et al.] // *Biomacromolecules*. – 2006. – Vol. 7. – P. 1072–1082. <https://doi.org/10.1021/bm050858m>
7. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering / G. Turnbull [et al.] // *Bioactive Materials*. – 2018. – Vol. 3. – P. 278–314. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.10.001>
8. Применение полиоксиканоатов в медицине и природные функции поли-3-оксибутирата / А. П. Бонарцев [и др.] // *Acta Naturae*. – 2019. – Vol. 11, N 41. – P. 4–16.
9. Braun, H. G. Microprinting – a new approach to study competitive structure formation on surfaces / H. G. Braun, E. Meyer // *Macromolecular Rapid Commun.* – 1999. – Vol. 20. – P. 325–327. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3927\(19990601\)20:6<325::AID-MARC325>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3927(19990601)20:6<325::AID-MARC325>3.0.CO;2-R)
10. François, B. Polymer films with a self-organized honeycomb morphology / B. François, O. Pitois, J. François // *Advance Material*. – 1995. – Vol. 7. – P. 1041–1044. <https://doi.org/10.1002/adma.19950071217>
11. Widawski, G. Self-organized honeycomb morphology of star-polymer polystyrene films / G. Widawski, M. Rawiso, B. François // *Nature*. – 1994. – Vol. 369. – P. 387–389. <https://doi.org/10.1038/369387a0>
12. Multiple interfaces in self-assembled breath figures / L. Sh. Wan [et al.] // *Chemical Communications*. – 2014. – Vol. 50. – P. 4024–4039. <https://doi.org/10.1039/c3cc49826c>
13. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) copolymers by *Azotobacter chroococcum* 7B: A precursor feeding strategy / A. P. Bonartsev [et al.] // *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. – 2017. – Vol. 47. – P. 173–184. <https://doi.org/10.1080/10826068.2016.1188317>
14. Poly(3-hydroxybutyrate)/hydroxyapatite/alginate scaffolds seeded with mesenchymal stem cells enhance the regeneration of critical-sized bone defect / A. V. Volkov [et al.] // *Materials Science and Engineering: C, Materials for biological application*. – 2020. – Vol. 114. – P. 110991. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110991>
15. Influence of the conditions of formation of nitrocellulose honeycomb-structure films on their morphology / V. I. Shadrina [et al.] // *Russian Journal of Applied Chemistry*. – 2010. – Vol. 83. – P. 1318–1323. <https://doi.org/10.1134/S1070427210070281>

16. Fabrication and characterization of ultrathin spin-coated poly(L-lactic acid) films suitable for cell attachment and curcumin loading / V. I. Kulikouskaya [et al.] // *Biomedical Materials*. – 2020. – Vol. 15. – article 065022. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aba40a>
17. Honeycomb-Structured Microporous Films Made from Hyperbranched Polymers by the Breath Figure Method / W. Dong [и др.] // *Langmuir*. – 2009. – Vol. 25. – P. 173–178. <https://doi.org/10.1021/la802863m>
18. Nagayama, G. Intermediate wetting state at nano/microstructured surfaces / G. Nagayama, D. Zhang // *Soft Matter*. – 2020. – Vol. 16. – P. 3514–3521. <https://doi.org/10.1039/C9SM02513H>

References

1. Mota C., Puppi D., Chiellini F., Chiellini E. Additive manufacturing techniques for the production of tissue engineering constructs. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2015, vol. 9 (3), pp. 174–190. <https://doi.org/10.1002/term.1635>
2. L'Heureux N., Letourneur D. Clinical translation of tissue-engineered constructs for severe leg injuries. *Annals of translational medicine*, 2015, vol. 3(10), pp. 134. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.05.03>
3. Shi Sh., Wang X. H., Guo G., Fan M., Huang M. J., Qian Z. Y. Preparation and characterization of macroporous (D,L-lactic acid) film for tissue engineering scaffold. *International journal of nanomedicine*, 2010, vol. 5, pp. 1049–1055. <https://doi.org/10.2147/IJN.S13169>
4. Li L., Chen C., Li J., Zhang A., Liu X., Xu B., Gao S., Jin G., Ma Z. Robust and hydrophilic polymeric films with honeycomb pattern and their cell scaffold applications. *Journals of materials chemistry*, 2009, vol. 19, pp. 2789–2796. <https://doi.org/10.1039/B820279F>
5. Kawano T., Sato M., Yabu H., Shimomura M. Honeycomb-shaped surface topography induces differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSCs): uniform porous polymer scaffolds prepared by the breath figure technique. *Biomaterial Sciences*, 2014, vol. 2, pp. 52–56. <https://doi.org/10.1039/c3bm60195a>
6. Beattie D., Wong K. H., Williams Ch., Poole-Warren L. A., Davis T. P., Barner-Kowollik Ch., Stenzel M. H. Honeycomb-Structured Porous Films from Polypyrrole-Containing Block Copolymers Prepared via RAFT Polymerization as a Scaffold for Cell Growth Danelle. *Biomacromolecules*. 2006, vol. 7, pp. 1072–1082. <https://doi.org/10.1021/bm050858m>
7. Turnbull G., Clarke J., Picard F., Riches P., Jia L., Han F., Li B., Shu W. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials*, 2018, vol. 3, pp. 278–314. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.10.001>
8. Bonartsev A. P., Bonartseva G. A., Reshetov I. V., Kirpichnikov M. P., Shaitan K. V. Application of polyhydroxyalkanoates in medicine and the biological activity of natural poly(3-hydroxybutyrate). *Acta Naturae*, 2019, vol. 11, no. 41, pp. 4–16. <https://doi.org/10.32607/20758251-2019-11-2-4-16>
9. Braun H.-G., Meyer E. Microprinting – a new approach to study competitive structure formation on surfaces. *Macromolecular Rapid Communications*, 1999, vol. 20, pp. 325–327. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3927\(19990601\)20:6<325::AID-MARC325>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3927(19990601)20:6<325::AID-MARC325>3.0.CO;2-R)
10. François B., Pitois O., François J. Polymer films with a self-organized honeycomb morphology. *Advance Material*, 1995, vol. 7, pp. 1041–1044. <https://doi.org/10.1002/adma.19950071217>
11. Widawski G., Rawiso M., François B. Self-organized honeycomb morphology of star-polymer polystyrene films. *Nature*, 1994, vol. 369, pp. 387–389. <https://doi.org/10.1038/369387a0>
12. Wan L.-Sh., Zhu L.-W., Ou Y., Xu Zh.-K. Multiple interfaces in self-assembled breath figures. *Chemical Communications*, 2014, vol. 50, pp. 4024–4039. <https://doi.org/10.1039/c3cc49826c>
13. Bonartsev A. P., Zharkova I. I., Yakovlev S. G., Myshkina V. L., Mahina T. K., Voinova V. V., Zernov A. L., Zhuikov V. A., Akoulina E. A., Ivanova E. V., Kuznetsova E. S., Shaitan K. V., Bonartseva G. A. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) copolymers by *Azotobacter chroococcum* 7B: A precursor feeding strategy. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2017, vol. 47, pp. 173–184. <https://doi.org/10.1080/10826068.2016.1188317>
14. Volkov A. V., Muraev A. A., Zharkova I. I., Voinova V. V., Akoulina E. A., Zhuikov V. A., Khaydapova D. D., Chesnokova D. V., Menshikh K. A., Dudun A. A., Makhina T. K., Bonartseva G. A., Asfarov T. F., Stamboliev I. A., Gazhva Y. V., Ryabova V. M., Zlatev L. H., Ivanov S. Y., Shaitan K. V., Bonartsev A. P. Poly(3-hydroxybutyrate)/hydroxyapatite/alginate scaffolds seeded with mesenchymal stem cells enhance the regeneration of critical-sized bone defect. *Materials Science and Engineering: C, Materials for biological application*, 2020, vol. 114, pp. 110991. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110991>
15. Shadrina V. I., Bashmakov I. A., Gracheva E. A., Agabekov V. E., Kaputskii F. N. Influence of the conditions of formation of nitrocellulose honeycomb-structure films on their morphology. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 2010, vol. 83, pp. 1318–1323. <https://doi.org/10.1134/S1070427210070281>
16. Kulikouskaya V., Chyshankou I., Pinchuk S., Vasilevich I., Volotovskii I., Agabekov V. Fabrication and characterization of ultrathin spin-coated poly(L-lactic acid) films suitable for cell attachment and curcumin loading. *Biomedical Materials*, 2020, vol. 15, article 065022. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aba40a>
17. Dong W., Zhou Y., Yan D., Mai Y., He L., Jin C. Honeycomb-Structured Microporous Films Made from Hyperbranched Polymers by the Breath Figure Method. *Langmuir*, 2009, vol. 25, pp. 173–178. <https://doi.org/10.1021/la802863m>
18. Nagayama G., Zhang D. Intermediate wetting state at nano/microstructured surfaces. *Soft Matter*, 2020, vol. 16, pp. 3514–3521. <https://doi.org/10.1039/C9SM02513H>

Информация об авторах

Куликовская Виктория Игоревна – канд. хим. наук, доцент, зам. директора. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kulikouskaya@gmail.com
ORCID 0000-0001-6505-3929

Николайчук Виктория Викторовна – магистрант, мл. науч. сотрудник. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vical0bcn@gmail.com

Чишанков Игнат Геннадьевич – мл. науч. сотрудник. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: chishankov_ignat@mail.ru

Гилевская Ксения Сергеевна – канд. хим. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: k_hilevskay@mail.ru
ORCID 0000-0002-3121-0014

Бонарцев Антон Павлович – канд. биол. наук, доцент. Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова (Ленинские горы, д. 1, стр. 12, 199234, Москва, Российская Федерация). E-mail: ant_bonar@mail.ru
ORCID 0000-0001-5894-9524

Бонарцева Гарина Александровна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН (Ленинский проспект, д. 33, стр. 2, 119071, Москва, Российская Федерация). E-mail: bonar@inbi.ras.ru

Акулина Елизавета Александровна – мл. науч. сотрудник. Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова (Ленинские горы, д. 1, стр. 12, 199234, Москва, Российская Федерация). E-mail: akoulinaliza@gmail.com
ORCID 0000-0002-2560-624X

Демьянова Ирина Валерьевна – мл. науч. сотрудник. Московский государственный университета им. М. В. Ломоносова (Ленинские горы, д. 1, стр. 12, 199234, Москва, Российская Федерация). E-mail: irinydem@yandex.com
ORCID 0000-0002-5208-8775

Воинова Вера Владимировна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова (Ленинские горы, д. 1, стр. 12, 199234, Москва, Российская Федерация). E-mail: veravoinova@mail.ru
ORCID 0000-0002-0253-6461

Information about the authors

Kulikouskaya Viktoryia I. – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Deputy Director. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skorina str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kulikouskaya@gmail.com
ORCID 0000-0001-6505-3929

Nikalaichuk Viktoryia V. – Master student, Junior Researcher. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skorina str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vical0bcn@gmail.com

Chyshankou Ihnat G. – Junior Researcher. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skorina str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: chishankov_ignat@mail.ru

Hileuskaya Kseniya S. – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Leading Researcher. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skorina str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: k_hilevskay@mail.ru
ORCID 0000-0002-3121-0014

Bonartsev Anton P. – Ph. D. (Biology), Associate Professor. Lomonosov Moscow State University (1, Bld. 12, Leninskie gory, 119071, Moscow, Russian Federation). E-mail: ant_bonar@mail.ru
ORCID 0000-0001-5894-9524

Bonartseva Garina A. – Ph. D. (Biology), Senior Researcher. Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences (33, Bld. 2, Leninsky Ave, 119071, Moscow, Russian Federation). E-mail: bonar@inbi.ras.ru

Akoulina Elizaveta A. – Junior Researcher. Lomonosov Moscow State University (1, Bld. 12, Leninskie gory, 119071, Moscow, Russian Federation). E-mail: akoulinaliza@gmail.com
ORCID 0000-0002-2560-624X

Demianova Irina V. – Junior Researcher. Lomonosov Moscow State University (1, Bld. 12, Leninskie gory, 119071, Moscow, Russian Federation). E-mail: irinydem@yandex.com
ORCID 0000-0002-5208-8775

Voinova Vera V. – Ph. D. (Biology), Senior Researcher. Lomonosov Moscow State University (1, Bld. 12, Leninskie gory, 119071, Moscow Russian Federation). E-mail: veravoinova@mail.ru
ORCID 0000-0002-0253-6461