УДК 57.085.23

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОПЛАСТОТАНА, КАК МАТРИКСА ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ КЛЕТОК

Копылевич Н.В.
научный руководитель д-р биол. наук, проф. Шишацкая Е.И.
Сибирский федеральный университет

Введение

Актуальное направление биотехнологии - это клеточная и тканевая инженерия, связанные с разработкой биодеградирующих полимеров для медицинского применения. Одни из перспективных материалов являются полигидроксиалканоаты (ПГА) – полиэфиры микробиологического происхождения, которые способны к биодеградации в природной среде с образованием нетоксичных продуктов.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Разработать методы получения из ПГА 2D матриксов в виде плотных и пористых пленок из образцов ПГА различного химического состава.
2. Исследовать влияние типа матрикса из ПГА на рост клеток на примере культуры фибробластов мыши лини NIH 3T3.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

1.1 Объекты исследования

Объекты исследования данной работы – образцы полигидроксиалканоатов, синтезированные в лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза Института биофизики СО РАН. Зарегистрированная марка материала «Биопластотан».

Для экспериментов были взяты три типа ПГА: гомополимер 3-гидрокисмасляной кислоты (полигидроксибутират (ПГБ)) и его сополимеров поли-(3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерат)(П3ГБ/3ГВ) (включение 3-ГВ 27,6%) и поли-(3-гидроксибутират-со-3-гидроксигексаноат) (П3ГБ/3ГГ) (включение 3-ГГ 7%),

1.2 Методы исследования

1.Изготовление полимерных 2D матриксов в виде пленок.

Для получения плотных пленок использована техника испарения растворителя из раствора полимера.

2. Оценка краевого угла смачивания водой полимерных 2D матриксов.

Используем контактное смачивание (метод лежащей капли).Проводились следующие измерения: поверхностное натяжение (γ, эрг/см^2) по формуле ((72,8*(1+COS(θ)))*2)/4; свободная энергия межфазовой поверхности (γ_{SL}, эрг/см^2) по формуле γ+72,8 - W_{SL}; величина сил сцепления (W_{SL}, эрг/см^2) по формуле $2*(\sqrt{\theta * 72,8})$.

3.Изучение адгезии клеток на разных видах матриксов.

Для изучения сцепления провели метод окрашивания клеток на матриксе красителем эозин-метиленовым синим по Май-Грюнвальду (в растворе).Посчитать количество клеток по различным полям зрения в зависимости от увеличения.

4.Наблюдение клеточной флуоресценции при помощи флуоресцентных красителей DAPI и FITC.

Используем флуорохромы DAPI и ФИТС (FITC). DAPI позволяет корректно произвести подсчет физиологически активных клеток. Визуализацию цитоплазмы клеток, растущих на поверхности матриксов, провели с применением фаллоидина, конъюгированного с флуорохромом (FITC), связывающимся с актином цитоплазмы клеток. Снимки образцов получены при помощи микроскопа Leica DM 6000 B.

5.Оценка жизнеспособности клеток.

Культивирование клеток проводили на примере культуры фибробластов мыши лини NIH 3T3 по стандартной методике в полной питательной среде.

Для оценки жизнеспособности клеток использовали МТТ-тест. В качестве контроля взята полистероловая поверхность культуратьльных планшетов. Расчеты производятся по калибровочному графику. Измерение оптической плотности проводилось при 490 нм на микропланшетном фотометре Bio-Rad 680. Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel**.**

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Конструирование полимерных 2D матриксов

Получены полимерные матриксы из гомополимера 3-гидрокисмасляной кислоты (полигидроксибутират (ПГБ), сополимера поли-(3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерат) (П3ГБ/3ГВ) (включение 3-ГВ 27,6 мол.%) и поли-(3-гидроксибутират-со-3-гидроксигексаноат) (П3ГБ/3ГГ) (включение 3-ГГ 7 мол. % **)** в виде пленок.

2. Провели оценку краевого угла смачивания водой полимерных 2D матриксов.

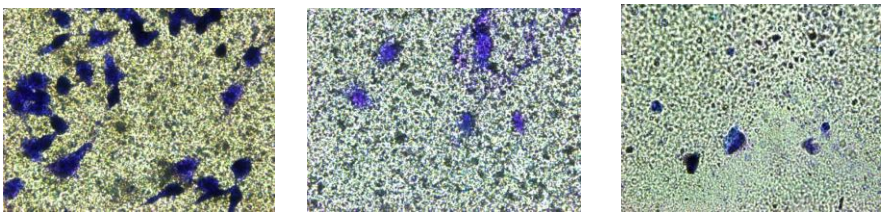
Таблица 1. Параметры оценки краевого угла смачивания водой, исходя из расчетов для средних значений.

Состав	Вид матрикса	Контактный угол смачивания θ, град	Поверхностное натяжение γ, эрг/см^2	Свободная энергия межфазовой поверхности, γ_{SL}, эрг/см^2	Величина сил сцепления, W_{SL}, эрг/см^2
ПГБ (100 мол. %)	плотный	77,7±2,6	43,8	3,6	113,0
П3ГБ/3ГВ (27,6 мол. %)	плотный	63±9,0	52,7	1,0	128,2
П3ГБ/3ГГ (7 мол. %)	плотный	56,2±4,0	56,5	1,7	123,8

3. Исследование степени адгезии

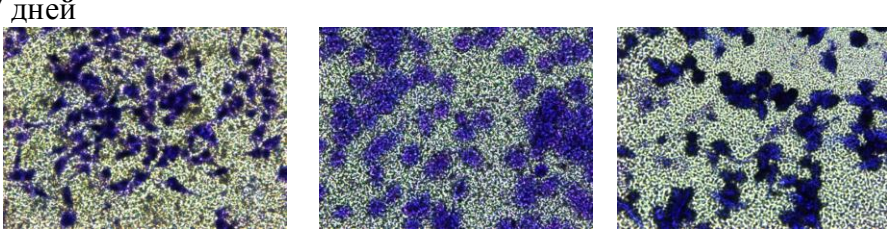
Микроскопирование проходило на 300 кратном увеличении.

3 дня



1 2 3

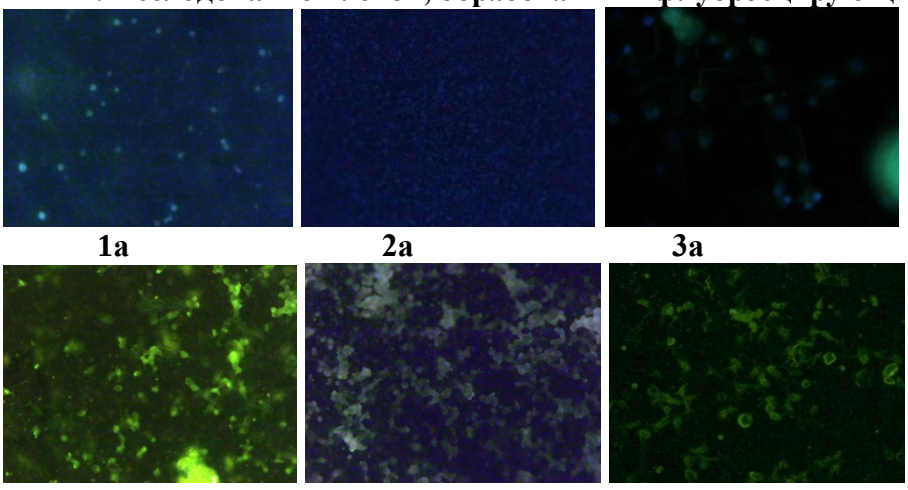
7 дней



1 2 3

Рисунок 1. Изображение фибробластов мыши линии NIH 3T3, окрашенных и культивируемых на матриксах разных типов: 1 – ПЗГБ, 2 – ПЗГБ/3ГВ (27,6 мол. %), 3 – ПЗГГ (7 мол. %).

4. Исследование клеток, обработанных флуоресцирующими антителами.



1а **2а** **3а**

1б **2б** **3б**

Рисунок 2. Изображение фибробластов NIH 3T3, окрашенных DAPI, на полимерных мембранах разных типов; 1а – ПЗГБ, 2а – ПЗГБ/3ГВ (27,6 мол. %), 3а – ПЗГГ (7 мол. %); окрашенных FITC, на полимерных мембранах разных типов; 1б – ПЗГБ, 2б – ПЗГБ/3ГВ (27,6 мол. %), 3б – ПЗГГ (7 мол. %).

5. Оценка жизнеспособности клеток.

Таблица 2. Результаты оценки жизнеспособности клеток, культивируемых в течение 3-х суток м 7-ми дней на ПГА-матркисах разных типов.

Вид матрикса	Оптическая плотность (D)	Итоговое количество клеток
ПГБ 100% мол.	1,787	39711±4,3
ПЗГБ/3ГВ 27,6,% мол.	1,582	35170±10,0
ПЗГБ/3ГГ 7% мол.	2,026	45025±10,3

Контроль	2,575	57225±14,5
ПГБ 100% мол.	2,756	61253±9,2
П3ГБ/3ГВ 27,6, % мол.	1,672	37168±14,1
П3ГБ/3ГГ 7% мол.	2,225	49457±10,3
Контроль	2,346	52135±5,1

В результате оценки жизнеспособности клеток методом МТТ-теста на 3-е и 7-е сутки были получены следующие результаты:

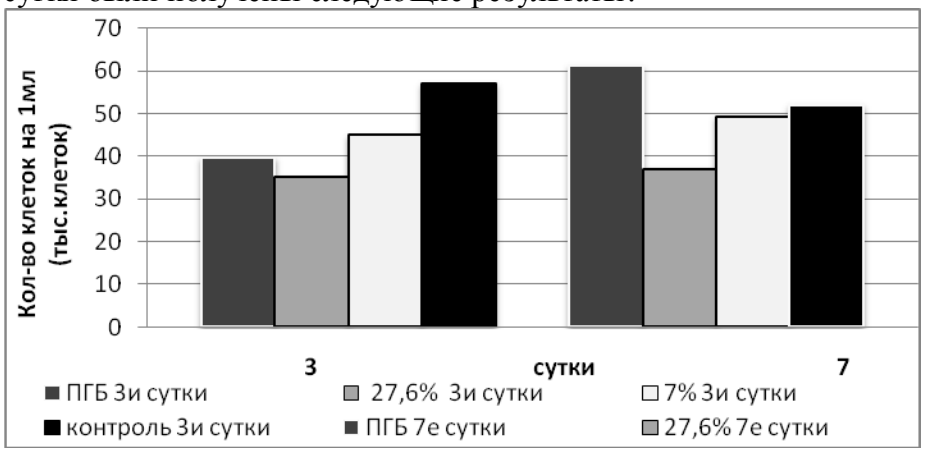


Рисунок 3. Сравнительная гистограмма (МТТ-тест) роста клеток на ПГА-матриксах на 3-и и 7-е сутки экспонирования.

Выводы

1) Разработаны полимерные матриксы из образцов полимеров различной химической структуры.

2) Судя по результатам (Таб.1) у сополимера П3ГБВ угол меньше, и достоверных отличий между сополимерами нет, а у гомополимера П3ГБ угол достоверно выше, т.е. этот полимер имеет менее гидрофобную поверхность.

3) При изучение адгезии выявлено, что количество клеток через 7мь дней значительно увеличилось в сравнение с 3мя днями, наибольшее количество наблюдается на матриксах из П3ГБ. Следовательно, мембраны из ПГА при прямом контакте с изучаемыми клетками не оказывали негативного влияния на их адгезию и рост.

4) При окрашивание флуорохромами статистически значимых различий между П3ГБ и сополимерными используемых типов не выявлено.

5) По гистограмме (Рис.3) можно утверждать, что на 3е сутки, наилучший рост клеток наблюдается на поверхности культуратьльных планшетов; на 7е сутки, наилучший рост наблюдается на матриксе из ПГБ 100% мол., что свидетельствует об улучшение роста на 17,5% в сравнение с контролем.