

## **КОНСТРУИРОВАНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ МАТРИКСОВ ИЗ БИОДЕГРАДИРУЕМОГО БИОПЛАСТОТАНА**

**Борисов А.А.**

**Научный руководитель – д-р биол. наук, проф. Шишацкая Е.И.**

*Сибирский федеральный университет*

### **Введение.**

Актуальное направление современной тканевой инженерии использование клеточных матриц из биодegradируемых полимеров микробиологического происхождения для разработки биоискусственных органов и тканей. Одними из перспективных материалов являются полигидроксиалканоаты (ПГА), отличающиеся высокой биологической совместимостью и механической прочностью, помимо этого из ПГА можно получать изделия различной формы и структуры без потери вышеперечисленных свойств.

Свойства полигидроксиалканоатов во многом определяются строением боковых групп, а так же расстоянием между эфирными связями в молекуле. Изучение свойств ПГА как материала для реконструктивной медицины производится с помощью использования 2D и 3D матриц из данных полимеров.

Целью данной работы является конструирование плотных 2D матриц из биодegradируемого биопластотана и исследование их свойств.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Сконструировать семейство плотных 2D матриц из трех различных по составу полимеров (гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты (П-3-ГБ), сополимеры 3-гидроксимасляной кислоты с 4-гидроксибутератом (3-ГБ-со-4-ГБ) 14,9% и 3-гидроксивалератом (3-ГБ-со-3-ГБ) 13%)
2. Изучить гидрофильные свойства поверхности изделий путем измерения краевого контактного угла смачивания.
3. Изучить количество, морфологию и пролиферацию фибробластов мыши линии NIH 3T3, выросших на плотных 2D матрицы из биопластотана на 7е сутки экспонирования, с путем окраски по методу Романовского-Гимза, окраски флуоресцентными красителями DAPI и FITC с последующим микрокопированием.
4. Изучить метаболическую активность клеток с помощью МТТ-теста. Контроль по полистероловой поверхности культуральных планшетов.

### **Материалы и методы.**

#### **Объекты исследования.**

Объектами исследования являются плотные 2D матрицы из полигидроксиалканоатов, синтезированных в лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза СО РАН.

В эксперименте использовались полимеры: гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты (П-3-ГБ), сополимеры 3-гидроксимасляной кислоты с 4-гидроксибутератом (3-ГБ-со-4-ГБ) 14,9% и 3-гидроксивалератом (3-ГБ-со-3-ГБ) 13%.

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – природные полиэфиры микробиологического происхождения, сходные по ряду физико-химических свойств с широкоиспользуемыми синтетическими полимерами (полиэтилен, полипропилен). В отличие от вышеупомянутых полимеров, ПГА обладают биосовместимостью и способностью к биодegradированию, они оптически активны и обладают антиоксидантными свойствами.

В роли культуры клеток выступали фибробласты мыши линии NIH 3T3 (одна из наиболее распространенных выведенных линий фибробластов).

Фибробласты – основная и наиболее распространенная форма соединительной ткани. Функции фибробластов: продукция углеводно-белковых комплексов основного вещества

(протеогликанов и гликопротеинов), образование коллагеновых, ретикулиновых и эластических волокон, регуляция метаболизма и структурной стабильности этих элементов, регуляция микроокружения фибробласта.

#### **Методы исследования.**

##### **Конструирование плотных 2D матриц из ПГА.**

Пленки получали методом испарения растворителя из раствора полимера концентрацией полимера 20 г/л хлороформа. Полимер растворяли из расчета 15 мл раствора полимера в хлороформе на один 2D матрикс, после чего выливали в чашки Петри с обезжиренной внутренней поверхностью, далее высушивали при комнатной температуре несколько суток.

Для получения плотных 2D матриц были использованы полимеры: П-3-ГБ, сополимеры 3-ГБ-со-4-ГБ 14,9% и 3-ГБ-со-3-ГБ 13%.

##### **Изучения количества и морфологии клеток с помощью окраски по методу Романовского-Гимза.**

Пленки с клетками промыть фосфатным буфером, и на 3 минуты залить раствором Мая-Грюнвальда. Затем промыть фосфатным буфером и залить раствором Романовского (раствор азура-эозина) на 8-10 минут. После чего промыть и зафиксировать на предметном стекле, микроскопировать и посчитать количество клеток на матриксе в нескольких полях зрения на одном увеличении (300-кратное увеличение). Микроскопирование проводилось на микроскопе Leica DM 6000 B.

##### **Окраска флуоресцентными красителями DAPI и FITC.**

Флуоресцентное окрашивание клеток на матриксах проводили флуоресцентными красителями DAPI и FITC. Для окрашивания требуется удалить питательную среду, после чего матрикса промыть фосфатным буфером. Затем клетки на них фиксируются 10% раствором формалина в течение 5 минут и вновь промываются фосфатным буфером. Клетки обрабатываются раствором Triton-X (1% раствор в фосфатном буфере) в течение 5 минут, снова промываются фосфатным буфером. После данной процедуры окрашиваются раствором FITC (50мкг/мл деионизированной воды) по 1мл на образец. Экспонировать 1 час при комнатной температуре. Затем проводится окраска раствором DAPI (1 мкг/мл деионизированной воды) по 50мкл на образец. Экспонирование 15 минут. Тщательно промыть образцы фосфатным буфером и микроскопировать. Микроскопирование проводилось на микроскопе Leica DM 6000 B.

##### **Измерение контактного краевого угла смачивания.**

Краевой угол смачивания оценивается посредством контактного смачивания водой по методу лежащей капли. Поверхность 2D матриц обрабатывается спиртом, после чего на неё наносится 100мкл. дистиллированной воды. И с помощью цифровой камеры получали изображения капли, на которых измеряли контактный краевой угол смачивания.

Измерения проводились по формулам:

поверхностное натяжение ( $\gamma$ , эрг/см<sup>2</sup>) по формуле:  $\gamma = ((72,8 * (1 + \cos(\theta))) * 2) / 4$ ;

свободная энергия межфазовой поверхности ( $\gamma_{SL}$ , эрг/см<sup>2</sup>) по формуле:  $\gamma + 72,8 - W_{SL}$ ;

величина сил сцепления ( $W_{SL}$ , эрг/см<sup>2</sup>) по формуле:  $W_{SL} = 2 * (\sqrt{\theta} * 72,8)$ .

##### **Оценка метаболической активности и жизнеспособности клеток методом МТТ-теста.**

МТТ-метод определения жизнеспособности клеточных культур заключается в способности живых клеток превращать растворимый желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (МТТ) в нерастворимые пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы МТТ-формаза (МТТ-ф). Нежизнеспособные мертвые клетки такой способностью не обладают. Интенсивность превращения МТТ в МТТ-ф отражает общий уровень дегидрогеназной активности исследуемых клеток.

Для проведения МТТ-теста удаляется питательная среда, после чего в каждую лунку необходимо добавить 50мкл. стерильного раствора МТТ-бромид (5мг/мл фосфатного

буфера) и довести до 1мл свежей питательной средой. Затем проводится экспонирование от 4 до 24 часов. По завершению экспонирования питательная среда с раствором МТТ-бромидом замещается на 450мкл. ДМСО (диметилсульфоксид) в каждую лунку. Экспонирование 30 минут до полного растворения кристаллов МТТ-формаза. Суператант переносится в 96-луночный планшет и проводится измерение оптической плотности при 540 нм. Измерение проводилось на микропланшетном фотометре Bio-Rad 680 (Bio-Rad LABORATORIES Inc, США). Оценка количества клеток производится по предварительно подготовленному калибровочному графику.

### Результаты исследования.

#### Измерение контактного краевого угла смачивания.

Результаты измерения краевого угла смачивания представлены в таблице №1.

Таблица №1 Результаты измерения контактного краевого угла смачивания.

Исходя из результатов представленных в Таблице №1 можно говорить о том, что плотные 2D матрицы из сополимеров 3-ГБ-со-4-ГБ 14,9% и 3-ГБ-со-3-ГБ 13% имеют близкие значения угла смачивания и схожую гидрофильность, в то время как 2D матрицы

Тип матрикса	Угол смачивания $\theta$ , град	Поверхностное натяжение $\gamma$ , эрг/см <sup>2</sup>	Свободная энергия межфазовой поверхности, $\gamma_{SL}$ , эрг/см <sup>2</sup>	Величина сил сцепления, $W_{SL}$ , эрг/см <sup>2</sup>
П-3-ГБ	72,00	47,6476	2,6554902	117,792
3-ГБ-со-4-ГБ 14,9%	58,75	55,2552	1,2075976	126,848
3-ГБ-со-3-ГБ 13%	61,75	53,6172	1,4638942	124,953

из гомополимера П-3-ГБ более гидрофобны и имеют большее значение угла смачивания.

#### Изучения количества и морфологии клеток с помощью окраски по методу

#### Романовского-Гимза.

Результаты данной работы представлены в Таблице №2.

Таблица №2. Результаты изучения количества клеток с помощью окраски по методу Романовского-Гимза.

Тип матрикса	Среднее количество окрашенных клеток по полям зрения	
	3и сутки	7е сутки
П-3-ГБ	29	39
3-ГБ-со-4-ГБ 14,9%	14,7	28,2
3-ГБ-со-3-ГБ 13%	18,4	40,1

На третьи сутки экспонирования наибольшее количество окрашенных клеток наблюдается на матриксе из гомополимера П-3-ГБ, а наименьшее на матриксе из сополимера 3-ГБ-со-4-ГБ 14,9%. На седьмые сутки экспонирования наибольшее количество окрашенных клеток на матриксе из сополимера 3-ГБ-со-3-ГБ 13%, матрикс из П-3-ГБ имеет схожие результаты. Наименьшее количество окрашенных клеток на матриксе из сополимера 3-ГБ-со-4-ГБ 14,9%.

#### Окраска флуоресцентными красителями DAPI и FITC.

Результаты окраски флуоресцентными красителями DAPI и FITC показывают более высокие результаты, чем при окраске по методу Романовского-Гимза, при этом соотношение количества окрашенных клеток на различных матриксах изменилось, это обусловлено тем, что окраска флуоресцентными красителями дает более корректные результаты с точки зрения физиологической активности клеток. Результаты окраски представлены в Таблице №3.

Таблица №3. Результаты окраски флуоресцентными красителями DAPI и FITC.

Тип матрикса	Среднее кол-во клеток в полях зрения
П-3-ГБ	116
3-ГБ-со-4-ГБ 14,9%	129
3-ГБ-со-3-ГВ 13%	122

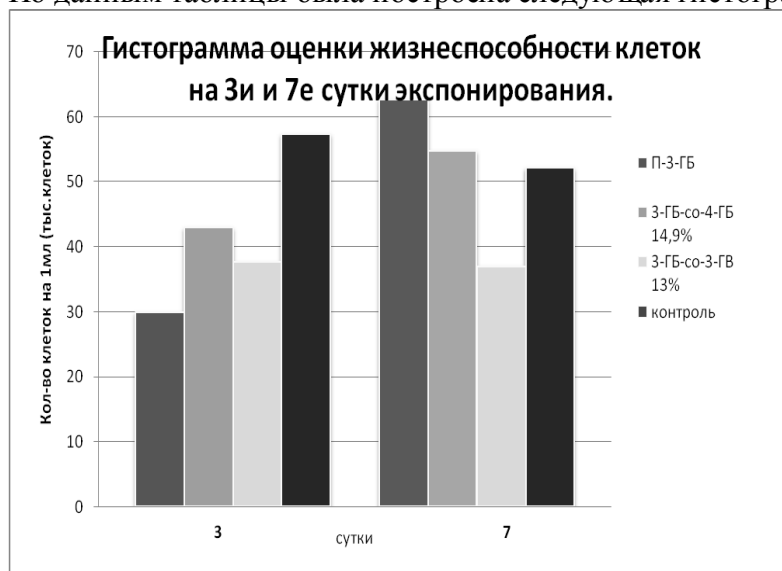
### Оценка метоболической активности и жизнеспособности клеток методом МТТ-теста.

Оценка жизнеспособности клеток методом МТТ-теста (экспонирование 3 и 7 суток) дала следующие результаты, которые представлены в Таблице №4.

Таблица №4. Результаты оценки метоболической активности клеток методом МТТ-теста.

Тип матрикса	Количество клеток (Тыс.)
П-3-ГБ	29,883
3-ГБ-со-4-ГБ 14,9%	42,935
3-ГБ-со-3-ГВ 13%	37,638
контроль	57,342

По данным таблицы была построена следующая гистограмма:



На гистограмме видно, что наиболее близкий результат по отношению к контролю на 3и сутки экспонирования дает сополимер 3-ГБ-со-4-ГБ 14,9%, наиболее слабый результат дает гомополимер П-3-ГБ, на 7е сутки экспонирования ситуация меняется наиболее высокий результат дает гомополимер П-3-ГБ, ниже результат у сополимера 3-ГБ-со-4-ГБ 14,9%, самый слабый результат у сополимера 3-ГБ-со-3-ГВ 13%.

### Выводы.

1. Было сконструировано семейство плотных 2D матриксов из биodeградируемого биопластотана.
2. Изучены гидрофильные свойства полученных изделий. Изделия из сополимеров 3-ГБ-со-4-ГБ 14,9% и 3-ГБ-со-3-ГВ 13% сходны по гидрофильности, матриксы из гомополимера П-3-ГБ более гидрофобны.
3. Измерено количество и изучены морфология и пролиферация фибробластов мыши линии NIH 3T3, на плотных 2D матриксах из биопластотана путем окраски по методу Романовского-Гимза и окраски флуоресцентными красителями DAPI и FITC, с последующим микрокопированием.
4. Произведена оценка жизнеспособности и метоболической активности и косвенно измерено количество жизнеспособных клеток на плотных 2D матриксах из биodeградируемого биопластотана МТТ-методом.