

## **КОНСТРУИРОВАНИЕ МАТРИКСОВ ИЗ ПГА ДЛЯ ЗАДАЧ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ**

**Чернобровкина Д. А.,  
научный руководитель д-р биол. наук Шишачкая Е. И.  
Сибирский федеральный университет**

Актуальной областью современных биомедицинских технологий является тканевая инженерия, разрабатывающая подходы к лечению повреждённых тканей и органов, альтернативные существующим. Эквиваленты тканей и органов, создаваемые методами тканевой инженерии, представляют собой сложные конструкции из функционирующих клеток, закрепленных на каркасах. К имплантируемым в организм человека клеточным носителям предъявляются высокие требования. Поэтому ключевой задачей, которую необходимо решить для успешной реконструкции, является разработка адекватных матриц.

Среди материалов, применяемых для конструирования матриц –металлы, керамика, полимеры, композиты – большим потенциалом обладают полигидроксиалканоаты (ПГА). Это класс биосовместимых и биodeградируемых полиэфиров микробиологического происхождения.

Цель нашей работы – конструирование из ПГА матриц различной геометрии и структуры и исследование их физико-химических и биологических свойств в качестве потенциальных клеточных носителей для тканевой инженерии.

Для исследований были выбраны образцы двухкомпонентного сополимера 3-гидроксипропирата и 3-гидроксибутирата (ПЗГБ/ЗГВ) с включением ЗГВ 9,8 мол.%, полученные в лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза Института биофизики СО РАН. Штамм-продуцент – *Wautersia eutropha* B5786. Величина средневесовой молекулярной массы полимера – 1115 кДа, степень кристалличности –50%, температура плавления –162°C.

Двухмерные матрицы получали методом полива раствора ПГА в дихлорметане на обезжиренную поверхность чашек Петри. Для придания пористости матрицам применяли технику выщелачивания (порообразующий агент - фруктоза). Объёмные полимерные матрицы получали методом прямого холодного прессования на автоматическом прессе Calver (США) под давлением 120 кгс/см<sup>2</sup>. Для получения пористых форм в качестве порообразующего агента использовали полиэтиленгликоль в содержании 20% по массе от навески полимера.

Среди требований, предъявляемых к физико-механическим характеристикам матриц, обязательным является сочетание достаточной механической прочности и высокой пористости изделия, а также благоприятные свойства поверхности для адгезии клеток. Оценку поверхностных свойств матриц проводили на базе измерения контактных углов смачивания водой, на основе которых находили поверхностные характеристики: свободную поверхностную энергию ( $\gamma_s$ ), свободную энергию межфазовой поверхности ( $\gamma_{SL}$ ) и величину сил сцепления (WSL) (эрг/см<sup>2</sup>). Физико-механические характеристики матриц определяли на универсальной электромеханической испытательной машине Instron (Великобритания).

Влагопоглощение и суммарную пористость матриксов определяли методом, основанным на замещении пор жидкостью. На первом этапе взвесили сухие образцы. Затем их экспонировали в дистиллированной воде на магнитной мешалке в течение часа. После этого избыток жидкости с образцов удаляли при помощи воронки Бюхнера.

Влагопоглощение определяли следующим образом:

$$EWC = (W_s - W_d) / W_s \cdot 100,$$

где  $W_s$  – вес влажного образца,  $W_d$  – вес осушенного образца.

Суммарную пористость определяли по формуле:

$$V_{\Sigma} = \frac{G_w - G_d}{G_d \cdot \rho_w} \text{ (см}^3\text{/г)},$$

где  $G_w$  – вес влажного образца,  $G_d$  – вес сухого образца,  $\rho_w$  – плотность воды, принятая за 1 г/см<sup>3</sup>.

Цитотоксичность матриксов оценивали на клеточной линии эмбриональных фибробластов мыши NIH 3T3. Исходная плотность посева составляла 10<sup>3</sup> клеток на матрикс. Интенсивность клеточной пролиферации оценивали в МТТ-тесте – методе, основанном на способности митохондриальных дегидрогеназ восстанавливать 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол бромид до формазана и говорит об активности митохондрий клеток. Подсчёт клеток и определение их морфологии проводили после окрашивания клеток по методу Романовского-Гимза. Кроме того, проводили флуоресцентное окрашивание клеток с использованием красителя DAPI. Морфологию клеток также исследовали с применением растровой электронной микроскопии.

Получено семейство полимерных матриксов и исследованы свойства поверхности. Величина контактного угла смачивания поверхности матриксов водой была на уровне 53,9°-68,9° с минимальным значением у объёмных пористых матриксов. Это позволяет характеризовать поверхностные свойства исследуемых типов матриксов благоприятными, так как установлено, что средняя гидрофобность поверхности (величины краевого угла смачивания до 70°) оптимальна для адгезии клеток.

Влагопоглощение составило 0,98% для плотных матриксов и 3,02% для пористых, суммарная пористость 0,025 г/см<sup>3</sup> для плотных матриксов и 0,13 г/см<sup>3</sup> для пористых. Исследование микроструктуры поверхности пористых матриксов показало наличие многочисленных пор разного диаметра.

Полученные прессованные матриксы имели следующие физико-механические характеристики: абсолютная прочность – 23.5±2.12 МПа, модуль Юнга 2901±300 МПа, что уступает показателям нативной костной ткани конечностей. Повысить прочностные характеристики можно добавлением гидроксиапатита (ГАП). Механически прочные композиты ПГА с ГАП кроме того имеют улучшенные остеointегративные свойства.

Данные, полученные в МТТ-тесте (рис.1), показали отсутствие цитотоксического эффекта со стороны матриксов при прямом контакте с фибробластами. Количество клеток на полимерных матриксах на всех этапах культивирования было сопоставимо с контролем (полистирол).

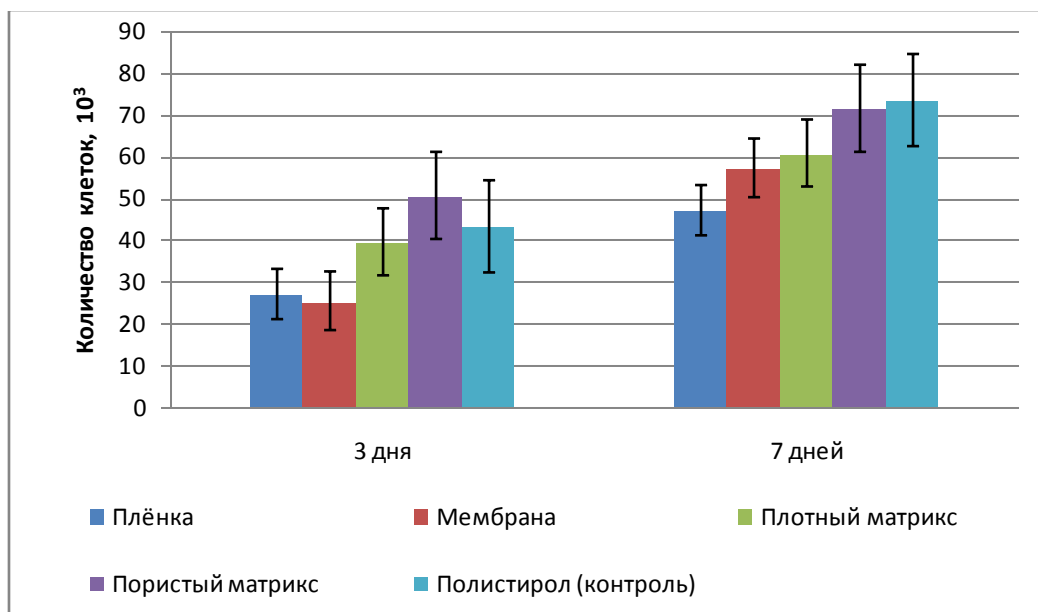


Рис. 1. Количество физиологически активных фибробластов линии NIH 3T3

Адгезионные свойства матриксов исследовали после окрашивания по методу Романовского-Гимза. Подсчет прикрепленных клеток, на всех сроках наблюдения не выявил достоверного отличия ( $p=0,05$ ) в количестве прикрепленных клеток на контроле по сравнению с ПГА-матриксами (рис.2).

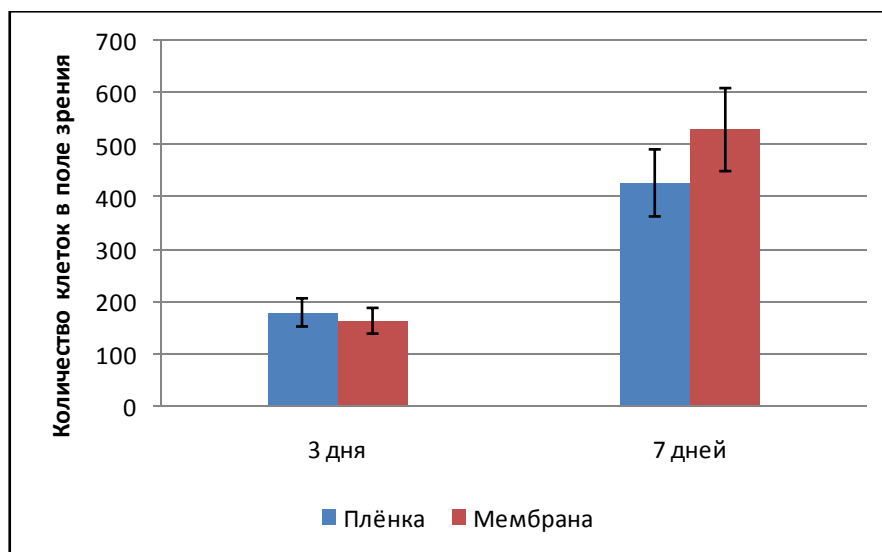


Рис. 2. Количество адгезированных фибробластов линии NIH 3T3

Через трое суток количество клеток в поле зрения составило для плёнок  $180 \pm 50$ , для мембран  $164 \pm 56$ , через семь суток –  $428 \pm 68$  и  $530 \pm 70$  для плёнок и мембран соответственно. Эти показатели близки к контролю, т.е. двухмерные полимерные матриксы обоих типов не оказывали цитотоксического действия, их поверхность благоприятна для адгезии клеток и их дальнейшего роста. Анализ морфологии показал, что прикрепленные клетки были в активном состоянии, о чём свидетельствует их звездчатая форма, хорошая распластанность по поверхности (рис.3).

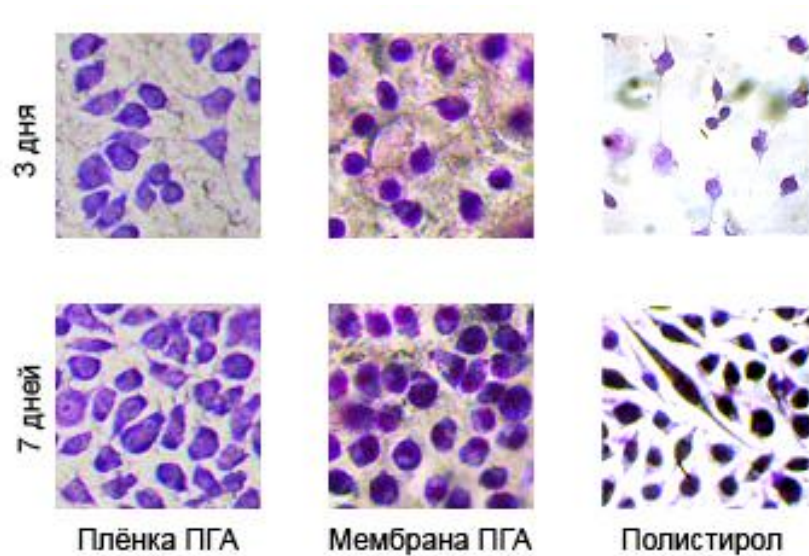


Рис. 3. Изображение фибробластов линии NIH 3T3, окрашенных по методу Романовского-Гимза

Результаты флуоресцентного окрашивания DAPI подтверждают полученные данные.

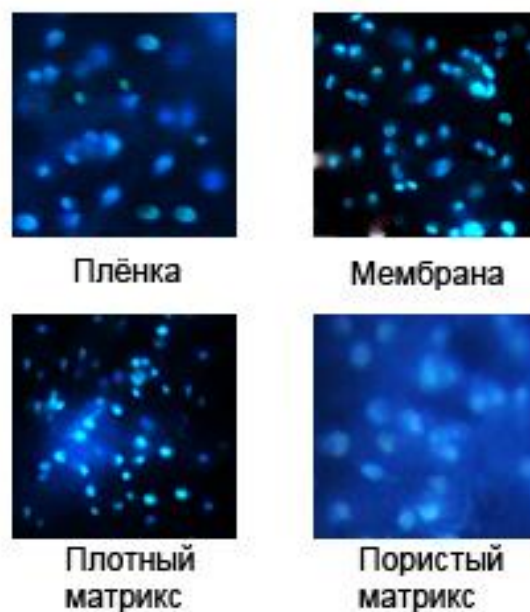


Рис. 5.3. Изображение фибробластов мыши линии NIH 3T3, окрашенных DAPI

Таким образом, проведённая *invitro* оценка биосовместимости изготовленных из ПГА матриксов на примере фибробластов мыши линии NIH 3T3 показала отсутствие цитотоксического эффекта у матриксов всех типов, что позволяет сделать вывод о принципиальной возможности их использования в качестве носителей в тканевой инженерии.