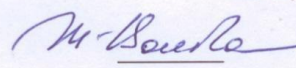


5/6/7

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра базовой биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой



Подпись

Волова Т.Г.

Инициалы, Фамилия

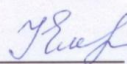
«    »    \_\_\_\_\_    20\_\_ г.

## БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Выделение и культивирование первичных культур клеток на  
клеточных носителях из полигидроксиалканоатов разного состава.

Научный руководитель



Подпись, дата

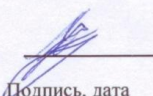
канд. биол. наук

Ученая степень

Николаева Е.Д.

Фамилия, инициалы

Выпускник



Подпись, дата

Каковкин А.В.

Фамилия, инициалы

Красноярск, 2016

## Оглавление

<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	3
<b>ГЛАВА I. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР</b>	6
1.1. Тканевая инженерия	6
1.2. Биоразлагаемые матриксы из ПГА	7
<b>ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	13
2.1. Характеристика используемых образцов ПГА	13
2.2. Получение и характеристика матриксов	13
2.3. Выделение и культивирование нервных клеток головного мозга крысы	13
2.4. Выделение и культивирование МСК	15
2.5. Культивирование фибробластов NIH 3T3	15
2.6. Исследование жизнеспособности клеточных линий на полимерных матриксах.	
2.7. Культивирование ЭНК с использованием подложек	16
2.8. Статистическая обработка результатов	17
<b>ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ</b>	16
3.1. Характеристика поверхности полученных матриксов	18
3.2. Результаты культивирования нервных клеток in vitro	20
3.3. Исследование жизнеспособности клеточных линий на полимерных матриксах	22
3.4. Результаты культивирования нервных клеток с подложками	35
<b>ВЫВОДЫ</b>	38
<b>ЛИТЕРАТУРА</b>	39

## Введение

Заболевания нервной системы являются серьезнейшей проблемой для человечества XXI века. Современный образ жизни негативно сказывается сначала именно на нервной системе, а затем нарушается работа остальных частей организма. Все заболевания нервной системы можно разделить на сосудистые, инфекционные, хронически прогрессирующие, наследственные и травматические патологии:

1. Сосудистые заболевания являются чрезвычайно распространенными и опасными. Они часто ведут к инвалидности или даже смерти больного. В эту группу входят нарушения мозгового кровообращения острого характера (инсульты) и хронически текущая сосудисто-мозговая недостаточность, становящаяся причиной изменений со стороны мозга.
2. Инфекционные заболевания нервной системы развиваются вследствие патогенного воздействия различных вирусов, бактерий, грибков и паразитов. Страдает преимущественно головной мозг, а периферическая нервная система и спинной мозг поражаются реже. Распространенными заболеваниями этой группы являются энцефалиты, малярия, корь.
3. Хронически прогрессирующие заболевания возникают из-за специфического строения нервной системы и патогенного действия инфекций, интоксикации или обменных нарушений. Данная группа объединяет склероз, миастению и другие заболевания. Течение болезни обычно длительное, а поражение носит системный характер.
4. Наследственные заболевания нервной системы разделяют на хромосомные (клеточные) и геномные. Самым распространенным хромосомным заболеванием нервной системы является болезнь Дауна, а геномные патологии поражают чаще всего нервно-мышечную систему.
5. Травматические повреждения нервной системы возникают вследствие травмы, ушиба или сдавливания головного, или спинного мозга.

В процессе развития заболевания, в первую очередь гибнут нервные клетки нервной системы, и это является причиной нарушения связи различных систем организма друг с другом. Причины заболеваний нервной системы можно классифицировать:

1. Различные инфекционные возбудители (грибки, паразиты, вирусы, кокки).
2. Плацентарная передача во время беременности (цитомегаловирус).
3. Ушибы, опухоли, сосудистые нарушения головного и спинного мозга.

#### 4. Недостаточное питание, отсутствие витаминов, вследствие отравления химическими веществами.

Проблема заболеваемости очень остро стоит среди населения. Согласно статистике, около 40% трудоспособного населения России страдает от заболеваний периферической нервной системы, а в 2013 году заболевания нервной системы среди населения России составили 2364 случая, по 16,5 случаев на 1000 человек населения (согласно Федеральной службе государственной статистики).

Одним из современных способов лечения заболеваний нервной системы является тканевая инженерия – это комплекс наук, включающий в себя биологию, медицину и технические науки, изучающий создание *in vitro* эквивалентов тканей и органов, и использующий принцип трансплантации клеточной культуры на биосовместимом носителе.

Успехи регенеративной медицины показали возможность лечения ряда ранее неизлечимых заболеваний с помощью клеточных технологий, в том числе и заболеваний нервной системы, например, для лечения болезни Паркинсона (ScienceDaily; 2008) и восстановления периферической нервной системы (Steve Johnson; 2009)

Основным направлением регенеративной медицины является восстановление соматических органов. И если создание и трансплантация целого мозга является пока неразрешимой задачей, восстановление повреждений периферической нервной системы вполне возможно. В настоящее время исследуются разнообразные материалы, пригодные в качестве клеточных носителей для нейронов и нейроглиальных клеток, например гидрогелевые матриксы на основе полиакриловой кислоты (ПАК) (Фомина Г.А., Маггутов Р.Ф; 2007) и на основе композита хитозан/ $\beta$ -глицерофосфат (Sungwoo Kim, Satoru K.; 2007).

Одним из подобных материалов являются полигидроксиалканоаты (ПГА) – природные полиэфиры бактериального происхождения. ПГА обладают хорошей биосовместимостью и биоразрушаемостью, а также, в зависимости от мономерного состава, большим спектром физико-механических свойств. Известно несколько работ, в которых показана возможность культивирования нейрональных клеток на ПГА (Yu, Chen; 2009; Bian, Wang; 2008; Xu, Li; 2010; Novikova, Pettersson; 2007; Wang, Wang; 2009).

Исходя из этого, была сформулирована цель дипломной работы – получить и исследовать тканеинженерные раневые покрытия на основе полигидроксиалканоатов, исследовать влияние подложек на адгезию и пролиферацию нервных клеток, исследовать влияние ростовых факторов на пролиферацию нервных клеток.

Для достижения цели были сформулированы задачи:

1. Получить серию матриц из 4-х компонентных полигидроксиалканоатов.
2. Отработать методики выделения и культивирования эмбриональных нервных клеток головного мозга крыс, провести сравнительное культивирование клеток с ростовыми факторами и в обычной культуральной среде.
3. Провести оценку жизнеспособности 3 клеточных линий на 4-компонентных ПГА разных составов.
4. Провести исследование влияния подложек на адгезию и пролиферацию нервных клеток, в сравнении с чистым полимером и культуральным пластиком.

## Глава I. Литературный обзор

### 1.1. Тканевая инженерия

Одним из современных способов лечения заболеваний нервной системы является тканевая инженерия в совокупности с подбором способа доставки конструкции «ткань/матрикс» в организм.

Тканевая инженерия – это комплекс естественных наук, изучающий создание *in vitro* эквивалентов тканей и органов, и последующую трансплантацию клеточной культуры на биосовместимом носителе. На сегодняшний момент дисциплина занимает крепкую позицию в медицине, ее целью является восстановление биологических функций, т.е. регенерация ткани, а не просто замещение ее синтетическим материалом. Продукты тканевой инженерии называют тканевые имплантаты, их создание включает несколько этапов:

1. Отбор и культивирование собственного или донорского клеточного материала.
2. Разработка специального клеточного носителя (матрикса) из биосовместимых материалов.
3. Нанесение культуры клеток на матрикс и размножение клеток в подходящих условиях культивирования.
4. Непосредственное внедрение матрикса в область пораженного органа.

Матрикс через некоторое время после имплантации в организм хозяина полностью исчезают (в зависимости от скорости роста ткани), а в месте дефекта останется только новая ткань. Также возможно внедрение матрикса с уже частично сформированной новой тканью («биокомпозит»). После имплантации, ткане-инженерная конструкция должна сохранить свою структуру и функции в течение периода времени, достаточного для восстановления нормально функционирующей ткани в месте дефекта, и интеграции с окружающими тканями.

Наиболее важным элементом тканевой инженерии является наличие необходимого количества функционально активных клеток, способных дифференцироваться, поддерживать соответствующий фенотип и выполнять конкретные биологические функции. Источником клеток могут быть ткани организма и внутренние органы. Возможно использование собственных клеток пациента, нуждающегося в реконструктивной терапии, или близкого родственника (аутогенных клеток). Могут быть использованы клетки различного происхождения, в том числе первичные и стволовые клетки:

1. **Первичные клетки** - это зрелые клетки определенной ткани, которые могут быть взяты непосредственно от организма-донора (*ex vivo*). Если первичные клетки взяты у определенного организма-донора, и впоследствии необходимо имплантировать эти клетки ему же в качестве реципиента, то вероятность отторжения

имплантированной ткани исключается, поскольку присутствует максимально возможная иммунологическая совместимость первичных клеток и реципиента. Однако первичные клетки, как правило, не способны делиться - их потенциал к размножению и росту низок.

2. **Стволовые клетки** - недифференцированные клетки, которые имеют способность к делению, самообновлению и дифференцировке в различные типы специализированных клеток под воздействием конкретных биологических факторов. Стволовые клетки подразделяются на «взрослые» и «эмбриональные». Эмбриональные стволовые клетки образуются из внутренней клеточной массы развития зародыша на ранней стадии, а взрослые - из тканей взрослого организма, пуповины или плодных тканей. Однако существует этическая проблема, связанная с неизбежным разрушением эмбриона при получении эмбриональных стволовых клеток. Поэтому предпочтительнее «добыча» клеток из тканей взрослого организма. Так, например, в 2007 году Шинью Яманакой из Киотского университета Японии были открыты индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), стволовые клетки, полученные из каких-либо иных (соматических, репродуктивных или плюрипотентных) клеток путем эпигенетического перепрограммирования.

Для направления организации, поддержания роста и дифференцировки клеток в процессе реконструкции поврежденной ткани необходим специальный носитель клеток – матрикс. Для их создания применяют биологически инертные синтетические материалы, материалы на основе природных полимеров (хитозан, ПГА, коллаген) и биокompозиты. Одним из перспективных материалов по изготовлению матриксов являются материалы из ПГА. Также было замечено, что нервные клетки плохо адгезируют и для ее улучшения используют так называемые подложки, за счет которых клетки лучше прикрепляются к матриксу и показывают более лучшую пролиферацию. Такими подложками могут быть подложки из коллагена, фибронектина, желатина и других органических веществ.

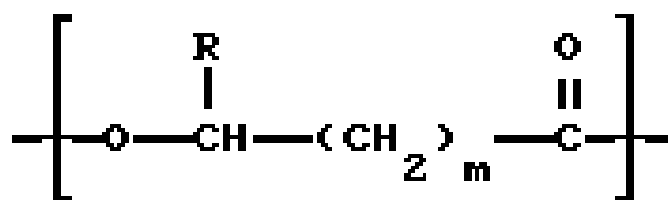
## 1.2. Биоразлагаемые матриксы из ПГА

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – это семейство полимеров различной химической структуры, образованных мономерами с длиной C-цепи от C<sub>4</sub> до C<sub>12</sub> и выше. Такие материалы хорошо подходят для изготовления клеточных матриксов, так как они обладают рядом положительных свойств:

1. Высокая биосовместимость полимера, это связано с тем, что мономеры таких соединений являются естественными метаболитами клеток и тканей организмов.

2. ПГА не гидролизуются в жидких средах, поэтому деградация полимеров является истинно биологической и происходит клеточными путями.
3. Скорость биоразложения ПГА ниже чем у других биосовместимых материалов, например, полигликолидов, поэтому изделия из ПГА после имплантации, могут функционировать от нескольких месяцев до 2-3 лет, также было показано, что скорость разложения можно контролировать.
4. Процесс получения ПГА является методом прямой ферментации, производство ПГА не требует серии технологических этапов (синтез мономеров, полимеризация, добавление пластификаторов и модифицирующих компонентов).
5. Сырьем для производства ПГА могут быть сахара, органические кислоты, спирты, смеси углекислого газа и водовода, промышленные отходы производства сахара, тем самым показано, что процесс изготовления ПГА не является ресурс затратным.

Общая формула полигидроксиалканоатов:



где R предпочтительно представляет собой H, алкил или алкенил, а m – принимает значение от 1 до 4.

В зависимости от набора мономеров, ПГА классифицируются как гомополимеры (1 тип мономера) и сополимеры (несколько типов полимера), за счет этого многие характеристики, включая физические и механические свойства, зависят от содержания мономеров в полимере. Например, короткоцепочечные ПГА являются полимерами с высокой степенью кристалличности, образуют жесткие кристаллы, которые не могут быть растянуты без разрыва, а среднецепочечные полимеры являются эластичными материалами с низкой степенью кристалличности и низкой температурой плавления (Zinn et al.;2001). Также ПГА классифицируют на «обычные» и «необычные» полимеры.

1. **«Обычные ПГА»** представляют собой полимеры, которые синтезируют микроорганизмы внутриклеточно, например, полимеры из мономеров (R)-3-гидроксипропионата, (R)-3-гидроксибутирата и т.д. или их комбинации (Волова Т.Г.; Шишацкая Е.К.).
2. **«Необычные ПГА»** представляют собой полимеры которые образованы природными мономерами с необычной химической структурой (4-гидроксиалкановыми кислотами, 5-гидроксиалкановыми кислотами), которые синтезируются отдельными видами микроорганизмов, а также полимеры образованные «необычными» мономерами – ксенобиотиками, которые способны активироваться и



использоваться в качестве субстратов для синтеза ПГА (Волова Т.Г.; Шишацкая Е.К.).

Один из известных полимеров линейки ПГА является поли-3-гидроксибутират (ПЗГБ), но также кроме него известно около 150 различных по структуре мономеров ПГА, и использование их в различных комбинациях позволяет получать полимеры с известными свойствами (степень кристалличности, температура плавления, пластичность, механическая прочность и т.д.) и также контролировать степень биоразложения *in vivo*.

По своей природе ПГА являются резервными макромолекулами клеток и синтезируются прокариотами, например, *Ralstonia eutropha* – способны накапливать полимер в концентрации около 80%, в специфических условиях (синтез белка и нуклеиновых кислот ограничен, но есть избыток углерода). Полигидроксиалканоаты растворяется в хлороформе, трихлорэтилене, этилацетате, диметилформальдегиде, но нерастворимы в воде, метаноле, этаноле, ацетоне, гексане, разбавленных неорганических кислотах.

Был проведен ряд исследований по применению ПГА для восстановления костной, хрящевой, нервной ткани, для восстановления дефектов кожи, для создания искусственных клапанов сердца и др. ПГА хорошо поддерживают пролиферацию фибробластов, остеобластов, хондроцитов, нервных клеток, стволовых клеток. Замечено, что на более кристаллическом и гидрофобном ПГБ адгезия клеток протекает хуже по сравнению с гетерополимерами и смесями различных ПГА.

Поскольку ПГА, и особенно, ПЗГБ – достаточно гидрофобные материалы, для улучшения адгезивных свойств матрикса необходимо обработать фибронектином, коллагеном или желатином, за счет чего образуется «подложка» к которой клетки лучше прикрепляются и растут, а за счет использования свойств ПГА, обеспечивается наиболее низкая воспалительная реакция, что тоже положительно сказывается на культивировании нервных клеток (Chen, Wu, 2005, Grøndahl et al., 2005; Duan, Wang, 2010; Hu et al., 2003).

Проведен ряд работ по использованию ПГА для культивирования клеток нервной ткани и восстановлению периферической нервной системы. Так, в работе (Yu, Chen, 2009) был использован ряд сополимеров ПЗГБ/ЗГВ и ПЗГБ/ЗГГ с разным соотношением компонентов для создания 3 типов матриксов: компактные матриксы методом термического прессования, гладкие пленки методом отлива из раствора и нановолокнистые скаффолды методом электроспинового формования. Клетки были выделены из мозжечка крыс и включали гранулярные нейроны и глиальные клетки, что впоследствии обеспечило формирование нейронной сети. Электронная микроскопия показала образование нейронной сети и синапсов на всех типах матриксов и формирование трехмерных клеточных структур. Но наибольшее количество жизнеспособных клеток отмечено на матриксах, образованных ультратонкими волокнами, из сополимера ПЗГБ/ЗГГ.

В работе (Bian, Wang, 2009) были исследованы сополимеры ПЗГБ/ЗГГ в качестве материала для нервной регенерации. На модели седалищного нерва крыс было показано, что биодеградируемые пористые ПЗГБ/ЗГГ нервные каналы имели необходимые механические свойства, способность пропускать питательные вещества, поддерживать нормальный рост периферических нервов, защищать нервные каналы от врастания прилежащих тканей.

Были проведены работы по использованию ПЗГБ/4ГБ для культивирования нервных стволовых клеток (НСК) (Xu et al., 2010). Были исследованы ПЗГБ, ПЗГБ/4ГБ, ПЗГБ/ЗГГ в виде пленок и трехмерных матриц, и показано, что жизнеспособность НСК возрастает на матрицах в следующем порядке: ПЗГБ – ПЗГБ/4ГБ – ПЗГБ/ЗГГ, причем нановолокнистые матрицы поддерживали адгезию и рост клеток лучше по сравнению с пленками.

В работе (Kalbermatten, Kingham, 2008) использовали ПЗГБ для создания нервных каналцев для восстановления дефектов седалищных нервов крыс. Для более успешной регенерации в скаффолды были добавлены мезенхимальные стволовые клетки или клетки Шванна в фибриновом геле. Однако регенерация нервов происходила и в матрицах ПЗГБ без добавления клеток и фибрина, в отличие от каналов на основе альгинатного геля, который ингибировал регенерацию.

Еще в одной работе исследованы матрицы из ПЗГБ для восстановления дефекта спинного мозга у крыс (Novikova et al., 2008) исследовали ПЗГБ в качестве матриц для культивирования клеток Шванна. При предварительной обработке матриц такими белками как фибронектин, ламинин и коллаген наблюдалось увеличение адгезии и пролиферации клеток Шванна *in vitro*, в эксперименте *in vivo* на модели спинного мозга крыс не было выявлено разницы между необработанными и обработанными нервными ПЗГБ каналцами, во всех случаях происходил активный рост аксонов и проникновение внутрь имплантатов. Через 4 недели эксперимента имплантаты «ПЗГБ+клетки Шванна» образовали нервные мостики внутри вырезанного крестцового сегмента спинного мозга, внутри имплантатов были заметны проникшие в имплантат клетки, кровеносные сосуды и протонейрофибриллы. Вростание аксонов внутрь имплантатов происходило с обеих сторон. Использование подобных имплантатов позволяет решить проблему нехватки аутологичных нервных клеток, которые являются «золотым стандартом» при восстановлении периферической нервной системы. Кроме того, по сравнению с нервными проводниками из других материалов, таких как альгинат и силикон, ПГА вызывают наиболее низкую воспалительную реакцию (Novikov et al., 2002).

Также, в одной работе исследовалось культивирование и дифференцировка человеческих мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в нервные клетки на скэффолдах из сополимеров ПЗГБ/ПЗГГ и ПЗГБ/ПЗГВ, а также из полилактида (Lei Wang, Zhi-Hui Wang, 2009). Скаффолды были получены путем отливания пленок из полимеров, а затем

засеиванием предварительно выделенными клетками костного мозга и культивированием в присутствии факторов роста нервов. Было показано, что сополимер ПЗГБ/ПЗГВ обеспечивает лучшую выживаемость клеток по сравнению с другим сополимером. Также при культивировании были обнаружены маркерные белки экспрессируемые нервными клетками и нейральными стволовыми клетками.

В то же время помимо получения гомогенных полимеров из мономеров ПЗГБ, сейчас активно используются многокомпонентные и разнообразные по составу полимеры, совмещающие в себе такие компоненты как: 2-гидроксибутират, 2-гидроксивалерат, 3-гидроксивалерат, 3-гидроксигексаноат, 3-гидроксиоктаноат, а также встречаются такие компоненты, как 4-гидроксибутират, 4-гидроксивалерат и их сополимеры. Эти полимеры, в отличие от гомогенного ПЗГБ, характеризуются большей механической прочностью и эластичностью, способностью перерабатываться в разнообразные изделия с высокими физико-механическими характеристиками и более высокой скоростью биodeградации в биологических средах (патенты США №№: 5245023; 6323010; 6316262).

Особенно привлекательно в качестве одного из компонентов полимера использовать 4ГБ, что придает полимерам свойства эластомеров – полимеров, обладающих высокоэластичными свойствами и высокой упругостью. Известен способ синтеза 3-х компонентных полимеров (3ГБ/3ГВ/4ГБ) в культуре *Ralstonia eutropha* при культивировании в ферментере на глюкозе; обеспечивший высокий выход по биомассе (136 г/л). (Madden, Anderson, Asrar, Berger, Garrett. Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Ralstonia eutropha* in fed-batch cultures). Все это обеспечивает более благоприятные условия для пролиферации клеток и их адгезии на полимерный матрикс. Так, в работе Шишацкой Е.И. и Воловой Т.Г. был произведен синтез 3-х компонентных полимеров с различным содержанием мономеров 3ГБ, 3ГВ и 4ГБ, с выходами от 52 до 60% с суммарным содержанием мономеров 3ГВ и 4ГБ выше 50 мол.% (от 51.7 до 74.7 мол. %) при содержании мономеров 3ГБ ниже 50 мол.% (от 25.30 до 46.20 мол.%), и дальнейшее исследование их адгезионных свойств в культуре линейных фибробластов НИИ ЗТЗ. Полученные пленки из полимера характеризуются эластичностью и имеют показатель удлинения при разрыве свыше 100%, а также обеспечивают высокие показатели по адгезии, росту и жизнеспособности фибробластов НИИ ЗТЗ. (Способ получения сополимера 3-гидроксибутирата, 3-гидроксивалерата и 4-гидроксибутирата RU 2565815. Шишацкая Е.И., Волова Т.Г.).

Также проводилось исследование по культивированию мезенхимальных стволовых клеток костного мозга на 3-х компонентном образце ПГА, включающего компоненты 3ГБ, 3ГВ, 3ГГ (Ya-Jun Hu, Xing Wei, 2008). Скаффолды были получены путем отливания пленок и засеиванием их человеческими мезенхимальными стволовыми клетками, полученными из

костного мозга. Результаты показали, что 3-х компонентные образцы способствуют лучшей адгезии, пролиферации и дифференцировке стволовых клеток костного мозга и могут быть использованы в работах тканевой инженерии.

Таким образом, в качестве полимерного материала в данной работе были выбраны 4-х компонентные образцы ПГА, синтезированные в лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза Института биофизики СО РАН.

## Глава II. Материалы и методы

### 2.1. Характеристика используемых образцов ПГА

Для работы были использованы 4-компонентные образцы ПГА, синтезированные в лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза Институте биофизики СО РАН.

Химическую структуру полимера определяли после предварительного метанолиза проб по метиловым эфирам ЖК на хромато-масс-спектрометре GCD plus (Hewlett Packard, США).

Степень кристалличности определяли на рентгеноспектрометре D8 ADVANCE «Bruker» (Германия) (графитовый монохроматор на отраженном пучке).

Таблица 1 – Состав исследуемых образцов.

№ Образца	Состав				Кристалличность Сх, %
	3ГБ	3ГВ	3ГГ	4ГБ	
1	83,522	0,505	0,412	15,561	45
2	79,548	19,568	0,506	0,378	37
3	70,648	24,588	0,483	4,281	34
4	83,197	6,99	1,275	8,538	41
5	89,751	4,895	2,48	2,874	42
6	85,198	7,419	2,074	5,31	36

### 2.2. Получение и характеристика матриц

Матрицы в виде пленок получали методом полива 1,5% растворов ПГА на обезжиренную поверхность чашек Петри. Высушивали пленки в беспылевом боксе при комнатной температуре в течение 24-48 часов.

Микроструктуру матриц исследовали с помощью электронного микроскопа ТМ-3000 (Hitachi, Япония). Предварительно на образцы напыляли слой платины (10 мА, 40 с) с помощью установки вакуумного напыления Emitech K575X (Quorum Technologies Ltd, Великобритания).

Гидрофильные свойства поверхности матриц определяли с помощью прибора DSA-25E (Krüss, Германия).

Полученные матрицы нарезали на диски диаметром 10 мм, стерилизовали в 70 % этаноле в течение 10 минут, и в УФ в течение 2 часов, затем помещали в 24-луночные культуральные планшеты (TPP, Швейцария).

### **2.3. Выделение и культивирование нервных клеток головного мозга крысы.**

Нервные клетки головного мозга выделялись из крысиных эмбрионов, путем усыпления беременной крысы хлороформом, далее вскрывалась брюшная стенка, выделялась матка, в стерильных условиях оттуда извлекались эмбрионы, клетки были получены путем сбора клеточной суспензии головного мозга шприцом с дальнейшим рассеиванием в культуральную посуду.

Культивирование проводилось в присутствии среды DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% смеси антибиотиков Antibiotic-Antimycotic (стрептомицин, амфотерицин, пенициллин, GIBCO®) в течение трех пассажей. Замена культуральной среды осуществлялась каждые 3 дня. Опираясь на научные статьи по этой теме, производилось наблюдение за культурой.

Второй пассаж был рассеян в культуральный планшет, после чего исследовалось влияние на дифференцировку и пролиферацию нервных клеток ростовых факторов B27 supplement ( GIBCO®) в концентрации 1%, и NGF (GIBCO®) в концентрации 1 мкл, 2 мкл, 3 мкл.

### **2.4. Выделение и культивирование МСК**

Мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани выделяли ферментативным способом. Жировую ткань промывали раствором DPBS с добавлением антибиотиков, измельчали и инкубировали в растворе коллагеназы I типа (100 Ед/мл) при 37 °С до растворения кусочков ткани, но не более 1 часа. Затем коллагеназу инактивировали раствором альбумина, центрифугировали и промывали средой DMEM несколько раз до полного удаления слоя липидов, клетки, находящиеся в осадке суспендировали и высевали на чашки Петри с питательной средой DMEM с добавлением 10 % телячьей эмбриональной сыворотки и раствора антибиотиков. Клетки приобретали фибробластоподобный фенотип. Для засева использовали клетки 3 пассажа.

### **2.5. Культивирование фибробластов NIH 3T3**

Мышиные эмбриональные фибробласты NIH 3T3 относятся к постоянной линии клеток. Культивирование проводили в среде DMEM с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки и раствора антибиотиков (стрептомицин 100 мкг/мл, пенициллин 100 МЕ/мл) (Gibco).

## 2.6. Исследование жизнеспособности клеточных линий на полимерных матриксах

Цитотоксичность полученных матриксов исследовали в культурах постоянной линии эмбриональных мышинных фибробластов NIH 3T3, мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из жировой ткани крыс, и эмбриональных нервных клеток крыс. Клетки снимали с пластика культуральных планшетов трипсином. Подсчет клеток проводили в камере Горяева. Рассев клеток на матриксы проводили из расчета 40 тыс.кл./матрикс, в 1 мл среды. Культивирование проводили в среде ДМЕМ с добавлением 10 % телячьей эмбриональной сыворотки и раствора антибиотиков, в 5% атмосфере CO<sub>2</sub>, при 37 °С, в течение 7 дней. Замену среды проводили каждые три дня.

Жизнеспособность клеточных линий была исследована методом МТТ (в его основе лежит реакция восстановления бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия митохондриальными дегидрогеназами живых клеток до пурпурных кристаллов формазана, которые нерастворимы в водной среде. Кристаллы формазана растворяют в ДМСО (диметилсульфоксид), и определяют колориметрически.) В результате интенсивность окраски, обусловленной формазаном пропорциональна количеству живых клеток.

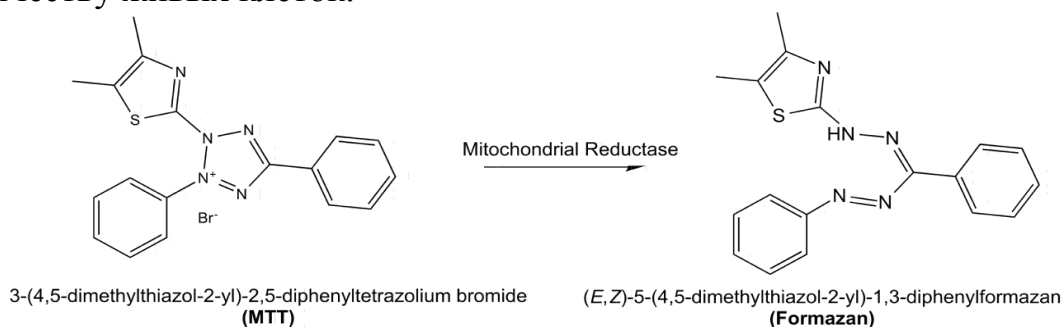


Рис. 1- Реакция восстановления МТТ.

Для этого на 1, 3 и 7 сутки из планшетов удаляли питательную среду и добавляли 950 мкл новой среды и 50 мкл раствора МТТ-бромида (5 мг/мл), клетки на матриксах инкубировали в течение 4 часов. Затем удаляли среду, нерастворимый осадок МТТ-формазана растворяли в 150 мкл диметилсульфоксида, раствор переносили в 96-луночный планшет и измеряли оптическую плотность при длине волны 540 нм на микропланшетном фотометре iMark (Bio-Rad LABORATORIES Inc, США). Количество клеток оценивали по предварительно подготовленному калибровочному графику.

Флуорисцентное окрашивание клеток на матриксах проводили флуорисцентными красителями DAPI и FITC (рис. 2;3).

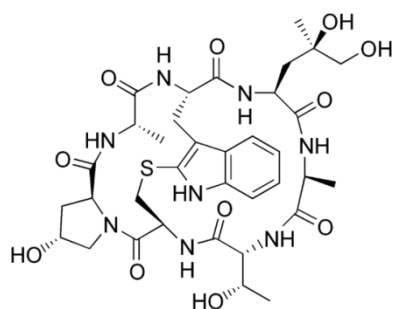


Рис. 2- Структура FITC

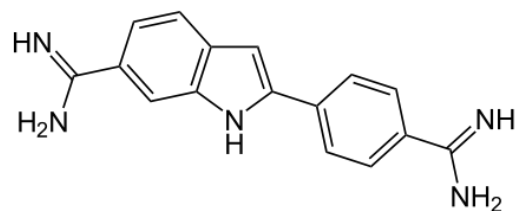


Рис. 3- Структура DAPI

После удаления питательной среды клетки промыли фосфатно-буферным раствором, фиксировали 10% раствором формалина в течение 5 минут, затем снова промыли фосфатно-буферным раствором, обработали раствором Triton-X в фосфатно-буферном растворе (1 % v/v) в течение 5 минут, затем снова промыли фосфатно-буферным раствором. Затем клетки окрасили FITC (концентрация 50 мкг/мл в деионизированной воде, по 1 мл раствора на образец) в течение 1 часа при комнатной температуре. После этого клетки окрасили DAPI (концентрация рабочего раствора 1 мкг/мл, по 50 мкл раствора на образец) в течение 15 минут. Затем каждый образец тщательно промыли фосфатно-буферным раствором. Также было произведено электронное микрофотографирование образцов полимерных матриц с культивируемыми клетками.

Также морфологию культивируемых клеток регистрировали с использованием растровой электронной микроскопии. Для этого матрицы с клетками промывали от питательной среды фосфатным буфером и фиксировали формалином в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее матрицы были промыты этанолом с увеличивающейся концентрацией, от 30 до 96 %. Снимки клеток на матрицах получены с использованием электронного микроскопа ТМ-3000 (Hitachi, Япония).

## 2.7. Культивирование ЭНК с использованием подложек

Для исследования были подобраны 4 вещества, которые могут служить в качестве подложек:

1. Желатин
2. Фибронектин
3. Коллаген
4. Поли-D-лизин

Также в качестве скаффолда был выбран образец 4-х компонентного ПГА, наиболее подходящего для культивирования нервных клеток (ЗГБ/ЗГВ/4ГБ/ЗГГ 79,548/19,568/0,378/0,506).

Для исследования была использована новая клеточная линия ЭНК крыс. Нервные клетки головного мозга выделялись из крысиных эмбрионов, путем усыпления беременной крысы хлороформом, далее вскрывалась брюшная стенка, выделялась матка, в стерильных условиях оттуда извлекались



эмбрионы, клетки были получены путем сбора клеточной суспензии головного мозга шприцом с дальнейшим рассеиванием в культуральную посуду.

Культивирование проводилось в присутствии среды DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% смеси антибиотиков Antibiotic-Antimycotic (стрептомицин, амфотерицин, пенициллин, GIBCO®), с добавлением ростовых факторов B27 supplement ( GIBCO®) в концентрации 1%, и NGF (GIBCO®) в концентрации 1 мкл.

Были приготовлены культуральные планшеты на которые были нанесены подложки из расчета трех повторов на каждую подложку и объема 1 мл. на лунку. Далее производился подсчет нервных клеток в камере Горяева и рассев в культуральные планшеты с подложками из расчета 40 тыс. клеток на лунку. Исследование проведено из расчета 3 повторов для каждой подложки и 3 точек МТТ теста на 1, 3, 7 сутки культивирования, в качестве контроля брались данные с культивирования непосредственно на матриксе, без подложки.

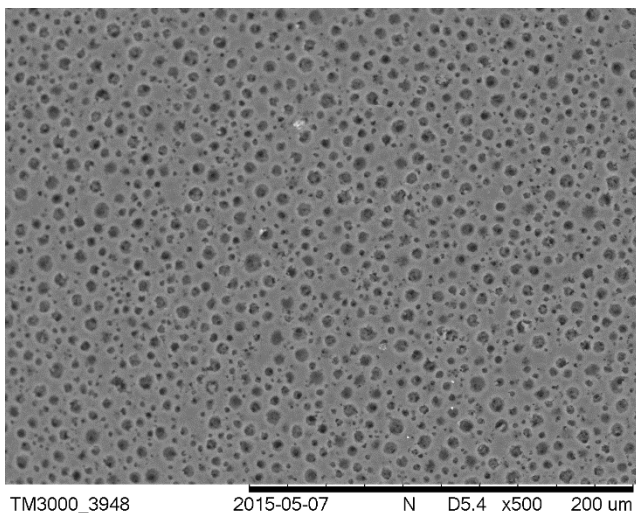
## **2.8. Статистическая обработка результатов**

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel. Для получения данных рассчитывали среднее арифметическое, среднеквадратичное отклонение, ошибку средней арифметической. Достоверность отличия средних значений проверяли по U-критерию Манна-Уитни (уровень значимости 0,05).

## Глава III. Результаты

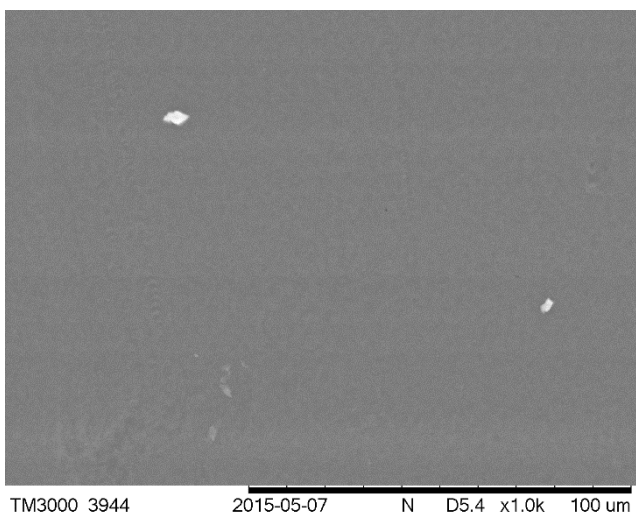
### 3.1. Характеристика поверхности полученных матриц

Были исследованы образцы 4-х компонентных полимеров. Была проведена электронная микроскопия и она показала отличия в структуре поверхности матриц, в зависимости от состава используемого полимера (рис. 4).



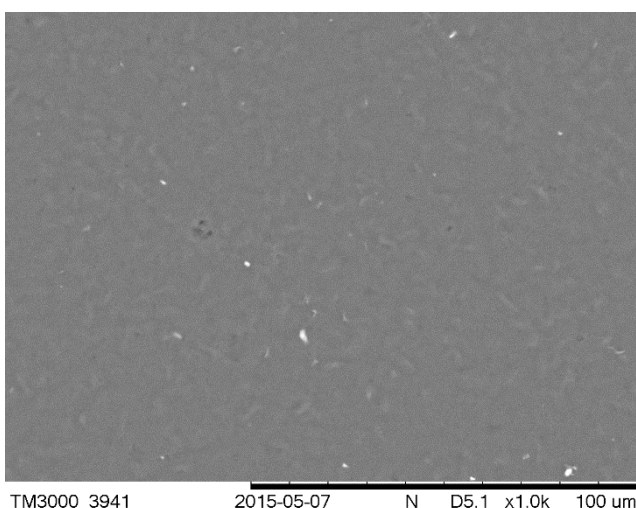
Образец № 1.

Поверхность пористая, диаметр пор  $\approx 10-15$  нм, кристалличность самая высокая из всех образцов, обладает наилучшими показателями гидрофильности.



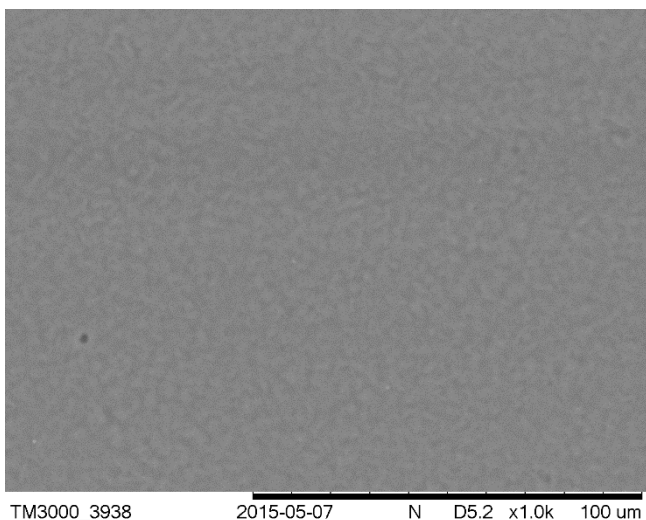
Образец № 2.

Поверхность однородная, гладкая, кристалличность – 37%, обладает гидрофобными свойствами.



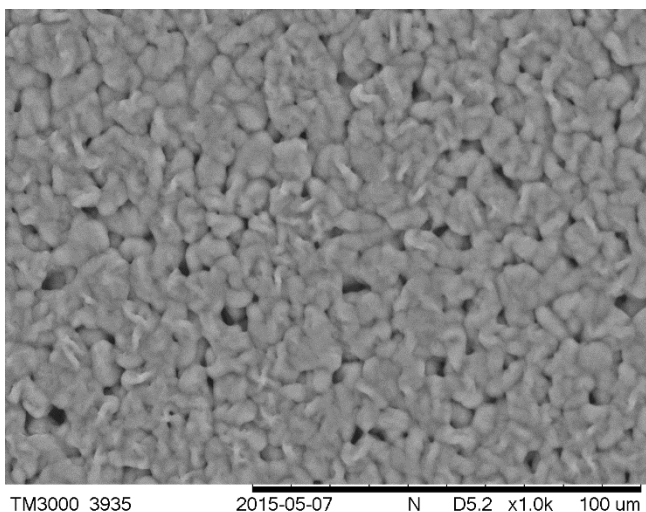
Образец № 3.

Поверхность неоднородная, наблюдаются шероховатости из-за «хлопьев» полимера, наиболее эластичный из всех образцов, обладает средними показателями гидрофильности.



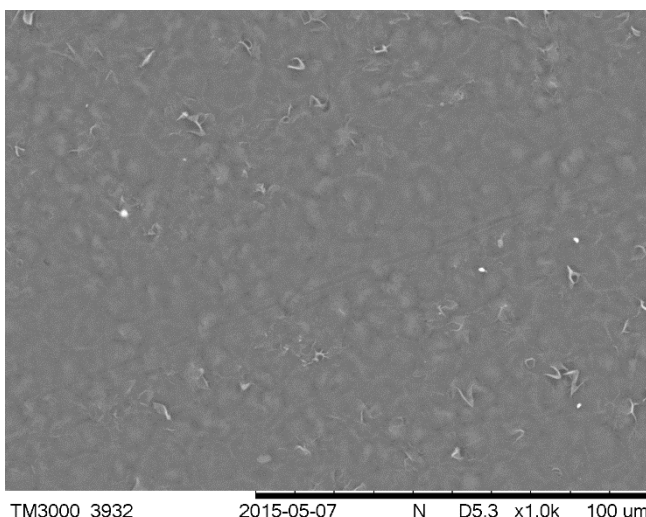
#### Образец № 4.

Поверхность также неоднородная из – за «хлопьев» полимера, но неоднородностей меньше чем на образце №42, обладает хорошими свойствами гидрофильности и средними свойствами кристалличности.



#### Образец № 5.

Поверхность неоднородная, состоит из зерен полимера близко расположенных друг к другу, обладает высокими показателями кристалличности и наилучшими гидрофобными свойствами.



#### Образец № 6.

Поверхность неоднородная, обладает средними показателями кристалличности и высокими показателями гидрофобности.

Рис 4- Характеристика поверхности матриц.

Оценка гидрофильных свойств поверхности матриц из разных ПГА не выявила закономерности состава полимеров и гидрофильно-гидрофобного

баланса поверхности. Гидрофильно-гидрофобный баланс определяется по контактно-краевым углам смачивания полярной ( $H_2O$ ) и неполярной ( $CH_2I_2$ ) жидкостями. Поскольку величина дисперсной свободной энергии у исследуемых образцов имеет близкие значения, величина полярной свободной энергии характеризует гидрофильность поверхности матриц. Наиболее гидрофильными определены образцы № 1 и №4 с включениями мономеров 3ГБ/3ГВ/4ГБ/3ГГ 83,522/0,505/15,561/0,412 и 83,197/6,990/8,538/1,275, соответственно.

[Изъято 19 страниц]

## Выводы

1. Получена серия матриксов из 4-х компонентных полигидроксиалканоатов.  
[Изъят 1 абзац]
2. Отработаны методики выделения и культивирования эмбриональных нервных клеток головного мозга крыс, проведено сравнительное культивирование пассажа клеток с ростовыми факторами и пассажа в обычной культуральной среде. По результатам исследования было показано, что ростовые факторы повышают выживаемость клеток и ускоряют процессы дифференцировки.
3. Проведена оценка жизнеспособности 3 клеточных линий на 4-компонентных ПГА разных составов. Показано, что высокопористый образец ПГА (№1) плохо поддерживает адгезию и пролиферацию всех линий клеток.
4. По результатам МТТ-теста, флуоресцентного окрашивания и электронного микроскопирования, руководствуясь степенью адгезии клеток и величиной динамики роста, были выбраны наилучшие образцы полимеров для каждой из трех линий клеток.  
[Изъят 1 абзац]
5. Проведено исследование влияния подложек на адгезию и пролиферацию нервных клеток, в сравнении с чистым полимером и культуральным пластиком. По результатам МТТ- теста, были сделаны выводы, что наилучшей подложкой для нервных клеток является поли-D-лизин, достигается это за счет сил электростатического притяжения. Как видно из графиков, подложку имеет смысл использовать при культивировании на чистом пластике, но при правильном выборе полимерного матрикса, подложка теряет свой смысл, так как сам матрикс будет обладать нужными свойствами подложки.

### Литература.

1. Yu-Zhu Bian, Yang Wang, G. Aibaidoula, Guo-Qiang Chen, Qiong Wu. Evaluation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 30 (2009) 217–225.
2. Liudmila N. Novikova , Jonas Pettersson , Maria Brohlin, Mikael Wiberg, Lev N. Novikov. Biodegradable poly-b-hydroxybutyrate scaffold seeded with Schwann cells to promote spinal cord repair. *Biomaterials* 29 (2008) 1198e1206.
3. Lei Wang , Zhi-Hui Wang , Chong-Yang Shen , Ming-Liang You , Jian-Feng Xiao , Guo-Qiang Chen. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells grown in terpolyesters of 3-hydroxyalkanoates scaffolds into nerve cells. *Biomaterials* 31 (2010) 1691–1698.
4. Xian-Yi Xu, Xiao-Tao Li, Si-Wu Peng, Jian-Feng Xiao, Chao Liu , Guo Fang, Kevin C. Chen, Guo-Qiang Chen. The behaviour of neural stem cells on polyhydroxyalkanoate nanofiber scaffolds. *Biomaterials* 31 (2010) 3967–3975.
5. A.C. Shivachar. Isolation and Culturing of Glial Neuronal and Neural Stem Cell Types Encapsulated in Biodegradable Peptide Hydrogel. 22.
6. П.В. Кругляков, И.Б. Соколова, Д.Г. Полинцев. Стволовые клетки дифференцированных тканей взрослого организма. 2008, Цитология.
7. R.I. Freshney. Культура животных клеток, 1989, 333.
8. Рукша Т.Г., Зобова С.Н. Культивирование клеток, 2009, 46.
9. Sergey Fedorov. Protocols for Neural Cell Culture. 2001. 611.
10. Кухарчук А.Л., Радченко В.В., Сирман В.М. Стволовые клетки. 2004. 505.
11. В.А. Ткачук. Стволовые клетки и регенеративная медицина. 2011.
12. К.Н. Ярыгин, В.В. Семченко. Регенеративная биология и медицина. 2015.
13. Ya-Jun Hu, Xing Wei. Biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) with bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2009.

14. Yu Dai, Lynette Lambert. Characterisation of polyhydroxyalkanoate copolymers with controllable four-monomer composition. *Biomaterials* 2008.
15. Suchada Chanprateepand, Songsri Kulpreecha. Production and Characterization of Biodegradable Terpolymer Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate-co-4-Hydroxybutyrate) by *Alcaligenes* sp. *Biomaterials* 2005.
16. T. M. Fahima Azira, A. A. Nursolehah. Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) terpolymer by *Cupriavidus* sp. USMAA2-4 through two-step cultivation process. *World J Microbiol Biotechnol.* 2011.
17. Hema Ramachandran, Nurhezreen Md Iqbal. Biosynthesis and Characterization of Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) Terpolymer with Various Monomer Compositions by *Cupriavidus* sp. *Appl Biochem Biotechnol* (2011) 164:867–877. 2011.
18. Wei Zhao, Guo-Qiang Chen. Production and characterization of terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) by recombinant *Aeromonas hydrophila* 4AK4 harboring genes *phaAB*. *Process Biochemistry* 42 (2007) 1342–1347. 2007.
19. Гомазков О.А. Нейрогенез как адаптивная функция мозга. 84. Москва. 2014