

Сравнительное исследование клеточных носителей, полученных из резорбируемых полигидроксиалканоатов различного химического состава

Е.Д. Николаева¹, Е.И. Шишатацкая^{1,2}, К.Е. Мочалов³, Т.Г. Волова^{1,2}, Э.Д. Сински⁴

¹ Институт биофизики СО РАН, Красноярск

² Сибирский Федеральный университет, Красноярск

³ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

⁴ Массачусетский технологический институт, Кембридж, США

Comparative investigation of polyhydroxyalkanoate scaffolds with various chemical compositions

E.D. Nikolaeva¹, E.I. Shishatskaya^{1,2}, K.E. Mochalov³, T.G. Volova^{1,2}, A.J. Sinsky⁴

¹ Institute of Biophysys, SB RAS, Krasnoyarsk

² Siberian Federal University, Krasnoyarsk

³ Shemyakin and Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry RAS, Moscow

⁴ Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA

В работе сконструировано и охарактеризовано семейство опорных клеточных носителей в виде мембран, полученных из резорбируемых полигидроксиалканоатов (ПГА) — полимеров микробиологического происхождения различного состава. Исследованы 5 типов ПГА: гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты, сополимеры 3-гидроксимасляной и 4-гидроксимасляной кислот, 3-гидроксимасляной и 3-гидроксивалериановой кислот, 3-гидроксимасляной и 3-гидроксигексановой кислот. С использованием растровой электронной микроскопии и атомно-силовой микроскопии изучена микроструктура поверхности мембран и показано, что наиболее шероховатой поверхностью обладали мембраны из сополимеров с 3-гидроксигексаноатом, наиболее гладкой — из сополимеров 3-гидроксибутирата с 3-гидроксивалератом. Показано снижение краевых углов смачивания водой и возрастание гидрофильности у клеточных носителей из сополимеров по сравнению с носителями из высококристаллического гомополимера 3-гидроксимасляной кислоты. На примере культуры фибробластов мыши линии NIH 3T3 по результатам окрашивания культивируемых клеток флуоресцентным зондом на ДНК DAPI и в МТТ-тесте выявлено, что все представленные типы ПГА не проявляют цитотоксичности при прямом контакте с клетками, обладают высокой биосовместимостью; по адгезивным свойствам и способности поддерживать пролиферацию фибробластов сопоставимы с полистиролом и превосходят полимолочную кислоту.

Ключевые слова: тканевая инженерия, биополимеры, клеточные носители.

Тканевая инженерия, ориентированная на создание конструкций, обеспечивающих восстановление, укрепление и улучшение функций тканей и органов, остро нуждается в специализированных материалах, обладающих высокой биосовместимостью, механической прочностью, способностью стимулировать пролиферацию и дифференциацию клеток [1–3]. Среди широкого спектра разрабатываемых биоматериалов особое место принадлежит линейным полиэфирам микробиологического происхождения, так называемым полигидроксиалканоатам (ПГА). ПГА в последние несколько лет начали активно исследовать применительно к задачам клеточной и тканевой инженерии. Многообещающей представляется

The authors have constructed and characterized a series of membranes based on resorbable polyhydroxyalkanoates of different compositions. Five PHA types have been studied: a homopolymer of 3-hydroxybutyric acid, copolymers of 3-hydroxybutyric and 4-hydroxybutyric acids, 3-hydroxybutyric and 3-hydroxyvaleric acids, 3-hydroxybutyric and 3-hydroxyhexanoic acids. Scanning electron microscopy and atomic-force microscopy were used to examine the microstructure of membrane surfaces, showing that membranes based on the copolymer of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyhexanoate had the roughest surface, while membranes based on the copolymer of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate had the smoothest surface. The contact angle for water in air was smaller and hydrophilic properties better in the copolymer membranes than in the membranes based on the high-crystallinity homopolymer of 3-hydroxybutyric acid. The culture of mouse fibroblast cell line NIH 3T3 was used to test PHA-based membranes; results of fluorescent probes of DNA DAPI and the MTT assay show that membranes based on studied PHAs are not cytotoxic on direct contact with cells and are highly biocompatible; their adhesive properties and ability to maintain fibroblast proliferation are similar to those of polystyrene and better than those of polylactic acid membranes.

Key words: tissue engineering, biopolymers, scaffolds.

перспектива использования этих полимеров для восстановления поврежденных кожных покровов, восполнения дефектов мягких и костной тканей, изготовления тканеинженерных эквивалентов кровеносных сосудов и клапанов сердца и др. [4–7].

Наиболее изученный представитель семейства ПГА — полимер 3-гидроксимасляной кислоты (поли-3-гидроксибутират, поли-3-ГБ) — высококристаллический (степень кристалличности — свыше 70%) термопласт. Высокая биосовместимость поли-3ГБ базируется на том, что гидроксимасляная кислота — естественный метаболит клеток и тканей высших животных и человека [8]. Недостатком этого типа ПГА является то, что он не кристаллизуется упорядоченно.

e-mail: nikolaeva-lena@mail.ru

доченно, его весьма сложно перерабатывать в изделия, которые характеризуются низкой ударной прочностью, жесткостью и «старятся» во времени [9].

Особо ценным в ПГА является возможность синтеза полимеров различного состава, образованных мономерами с различной длиной С-цепи. Сополимерные ПГА более перспективны, так как в зависимости от соотношения мономеров их базовые свойства могут изменяться в достаточно широких пределах [4, 7, 10]. Однако наличие в ПГА, помимо гидроксимасляной кислоты, других мономеров делает необходимым проверку биосовместимости материала в полном объеме.

Вторым объектом активного изучения после поли-3-гидроксibuтирата стали более технологичные сополимеры 3-гидроксibuтирата с 3-гидроксивалератом, которые имеют пониженную степень кристалличности (50–60%). Однако понадобилось около 10 лет для доказательства биосовместимости этого типа ПГА [11–16].

Относительно других типов ПГА информация весьма отрывочна. Например, в США компанией Terpha проводятся исследования резиноподобного полимера 3-гидроксиоктановой кислоты (полигидроксиоктаноата, ПГО) с низкой температурой плавления (40–60°C) [17–18]. Группа ученых в Китае с недавних пор активно исследуют сополимеры 3-гидроксibuтирата с 3-гидроксигексаноатом (ЗПГБ/ЗПГГ) [19]. Имеются немногочисленные данные о трехкомпонентных ПГА, образованных мономерами масляной, валериановой и гексановой кислот [20–22]. Одним из перспективных, но мало изученных ПГА, является сополимер 3-гидроксibuтирата/4-гидроксibuтирата, для которого характерна высокая скорость биodeградации *in vivo*, он является эластомером, имеет более высокие показатели удлинения при разрыве и относительно высокий предел прочности на разрыв в отличие от большинства общеизвестных полимеров этого класса [18, 24]. Опубликованные данные фрагментарны и весьма противоречивы, поэтому для ответа на вопрос о том, какие типы ПГА наиболее перспективны, необходимы комплексные исследования.

Цель настоящей работы – конструирование и сравнительное исследование свойств клеточных носителей из ПГА различной химической структуры.

Материалы и методы

В работе использована серия высокоочищенных образцов ПГА, полученных в Институте биофизики СО РАН: гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты (ПЗГБ), сополимеры 3-гидроксимасляной и 4-гидроксимасляной кислот (ПЗГБ/4ГБ), 3-гидроксимасляной и 3-гидроксивалериановой кислот (ПЗГБ/ЗГВ), 3-гидроксимасляной и 3-гидроксигексаноатом (ПЗГБ/ЗГГ) [25–27].

Химическую структуру образцов ПГА определяли после предварительного метанолиза проб по метиловым эфирам жирных кислот на хромато-масс-спектрометре GCD plus (Hewlett Packard, США). Рентгеноструктурный анализ и определение степени кристалличности образцов ПГА выполнены на рентгеноспектрометре D8 ADVANCE «Bruker» (Германия) (графитовый монохроматор на отраженном пучке). Термические свойства биополимеров были исследованы методом дифференциальной сканирующей калориметрии с использованием прибора фирмы «NETZCH» (Германия). Температуры плавления

и термодеструкции оценивали по кривым дифференциальной сканирующей калориметрии при данной скорости нагрева. Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение ПГА исследовали с использованием хроматографа для гелепроницающей хроматографии Breeze System (Waters, США) относительно полистироловых стандартов (Fluka, Швейцария, Германия). Находили среднемолекулярную (M_w) и среднечисловую (M_n) молекулярную массу, а также полидисперсность ($PDI = M_w/M_n$).

Мембраны получены методом полива разогретого до 35°C 1,5 % раствора полимера в трихлорметане на обезжиренную поверхность предварительно нагретых до такой же температуры чашек Петри. С использованием специальной формы нарезали диски диаметром 10 мм. Стерилизацию мембран проводили H_2O_2 -плазмой в стерилизаторе Sterrad NX (Johnson & Johnson, США). В качестве контроля использованы мембраны из полилактида (Sigma) и полистирол (планшеты фирмы Orange Scientific).

Микроструктуру поверхности мембран определяли растровой электронной микроскопией (Phillips SEM 525 M, ЦКП ЛИН СО РАН, Иркутск). Свойства поверхности рассчитывали на базе измерения контактного краевого угла смачивания водой, используя уравнения Де Жена [28]; находили свободную поверхностную энергию (γ_s), свободную энергию межфазовой поверхности (γ_{sl}) и величину сил сцепления (W_{sl}) (эрг/см²).

Шероховатость поверхности мембран определяли с использованием атомно-силовой микроскопии (АСМ) в полу-контактном режиме («SmartSPM™», ООО «АИСТ-НТ», Россия, Зеленоград). Для характеристики шероховатости поверхности образцов вычисляли среднюю шероховатость (Ra) и среднеквадратичную шероховатость (Rq) по 10 точкам как среднее арифметическое абсолютных значений отклонений высоты 5 самых высоких и 5 самых глубоких точек от средней линии профиля поверхности 2×2 мкм, используя стандартные уравнения [29]. Для оценки адгезионных свойств поверхности мембран и их способности поддерживать пролиферативный потенциал клеток использовали линию фибробластов мыши NIH 3T3, которыми засеивали мембраны 5×10³ кл/см², размещенные в 24-луночных планшетах. Культивирование фибробластов проводили по стандартной методике в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональную бычью сыворотку (Gibco, Invitrogen), раствор антибиотиков (стрептомицин 100 мкг/мл, пенициллин 100 ЕД/мл (Gibco, Invitrogen)) в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂ в атмосфере и 37°C. Замену среды производили раз в три дня.

Анализ морфологии клеток и подсчет их количества в ходе культивирования выполняли через 1, 4 и 7 сут. после засева окрашиванием азур-эозином. Для этого мембраны с прикрепленными клетками были промыты от питательной среды фосфатным буфером, зафиксированы раствором Май-Грюнвальда, снова промыты буферным раствором и окрашены красителем. Визуализацию и подсчет клеток проводили с помощью микроскопа Биолам П2-1 (ЛОМО) при увеличении ×300 в 10 полях зрения. Для количественного подтверждения результатов проведено окрашивание клеток с помощью флуоресцентного красителя DAPI (Sigma); подсчет клеток проводили на флуоресцентном микроскопе Axiovert 40 (Carl Zeiss).

Уровень клеточного метаболизма культивируемых фибробластов NIH 3T3 изучали в реакции с МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол бромидом (Sigma)), основанной на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать МТТ до формазана, что характеризует активность митохондрий и количество живых клеток и косвенно отражает способность клеток к пролиферации на матриксах. Для этого в лунку с каждым типом полимера было добавлено по 50 мкл 5% раствора МТТ и 950 мкл полной питательной среды. Через 3,5 ч культивирования среду с растворов МТТ заменяли ДМСО для растворения образовавшихся кристаллов МТТ-формазана. Через 30 мин супернатант был перенесен в 96-луночный планшет и проведено измерение оптической плотности при длине волны 540 нм на микропланшетном фотометре Bio-Rad 680 (Bio-Rad Laboratories Inc, США). Количество клеток оценивали по калибровочному графику.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel. Результаты представлены как средние арифметические со стандартными отклонениями. Статистическую значимость результатов определяли по критерию Стьюдента (уровень значимости $p = 0,05$).

Результаты и обсуждение

Характеристика химического состава и физико-химических свойств образцов ПГА и контрольного полилактида, использованных для изготовления мембран, представлены в табл. 1. Полилактид в отличие от образцов ПГА имел существенно более низкую величину средневесовой молекулярной массы ($M_w = 100$ кДа) – в 5 раза ниже по сравнению с показателем у сополимера ЗГБ/ЗГГ и на порядок ниже, чем у остальных сополимерных образцов, а также гомополимера 3-гидроксипропаната. Весьма важным показателем высокомолекулярных материалов служит значение степени кристалличности, которое характеризует соотношения аморфной и упорядоченной фаз и оказывает значительное влияние на перерабатываемость материала и свойства получаемых изделий, в частности, гидрофобно-гидрофильные характеристики поверхности. Среди исследуемых образцов ПГА гомополимер 3-гидроксипропаната имел наиболее высокое значение показателя C_x (76%). Степень кристалличности сополимерных образцов ПГА – существенно ниже, при этом минимальное

значение C_x зарегистрировано для сополимера ЗГБ/ЗГГ (32%); для других сополимеров величина C_x оказалась близкой (43–50%).

Важным показателем биосовместимости клеточных носителей служит физико-химическая реактивность поверхности. Поверхностная топография, шероховатость, структура, химический и фазовый состав – факторы, оказывающие влияние на прикрепление клеток к поверхности клеточных носителей. При этом первоначальное поведение клетки на поверхности в значительной степени определяет дальнейшие процессы дифференцировки и пролиферации клеток, формирования межклеточного матрикса [30–31].

Различия базовых физических свойств исследуемых полимеров влияли на характеристики полученных мембран. Электронная микроскопия структуры поверхности мембран, полученных из образцов ПГА различного химического состава и различающихся базовыми физико-химическими свойствами, показала некоторые отличия (рис. 1). Поверхность мембран, полученных из гомополимерного ПЗГБ, имела минимальную рельефность и была плотной и практически без пор. На поверхности мембран, полученных из сополимера ПЗГБ/4ГБ видны множественные поры размером около 1 мкм. Поверхность мембран, полученных из сополимеров 3-гидроксипропаната и 3-гидроксипропаната, более гладкая и однородная. У мембран, изготовленных из сополимера 3-гидроксипропаната и 3-гидроксигексаноата, поверхность наиболее рельефная с многочисленными порами различного диаметра от 0,5 до 5,0 мкм. Поверхность мембран, полученных из полилактида, лишена пор и образована сферическими слоистыми структурами.

Значимым показателем, косвенно характеризующим биологическую совместимость и оказывающим влияние на адгезию и жизнеспособность клеток, является гидрофильно/гидрофобный баланс поверхности [32, 33]. Показателем этого соотношения служит величина краевого угла смачивания водой. Измерение этой величины позволяет вычислить также такие важные характеристики поверхности, как величину сил сцепления, поверхностное натяжение и свободную энергию межфазовой поверхности. Самое высокое значение краевого угла имели мембраны, полученные из полилактида ($71,8 \pm 4,8$), следующими были мембраны из ПЗГБ ($70,0 \pm 0,4^\circ$) (табл. 2).

Таблица 1. Состав и свойства полимеров, использованных для получения мембран

Состав полимеров, мол. %	Свойства полимеров					
	M_n , кДа	M_w , кДа	ПД	C_x %	$T_{пл}$, °С	$T_{дегр}$, °С
Полилактид (ПМК)100	50,6	100	1,78	аморфен	50	-
ПЗГБ 100	722,9	1 200	1,66	76	179,7	273
ПЗГБ/4ГБ 89,3/10,7	477,1	1 100	2,32	43	171,9	268
ПЗГБ/ЗГВ 87/13	332,8	1 115	3,35	50	162	266
ПЗГБ/ЗГВ 72,4/27,6	347,4	1 077	3,1	45	157	263
ПЗГБ/ГГ 93/7	253,5	507	2,0	32	158	240

Примечание: M_n – среднечисловая молекулярная масса; M_w – средневесовая молекулярная масса; ПД – полидисперсность; C_x – степень кристалличности; $T_{пл}$ – температура плавления; $T_{дегр}$ – температура деградации.

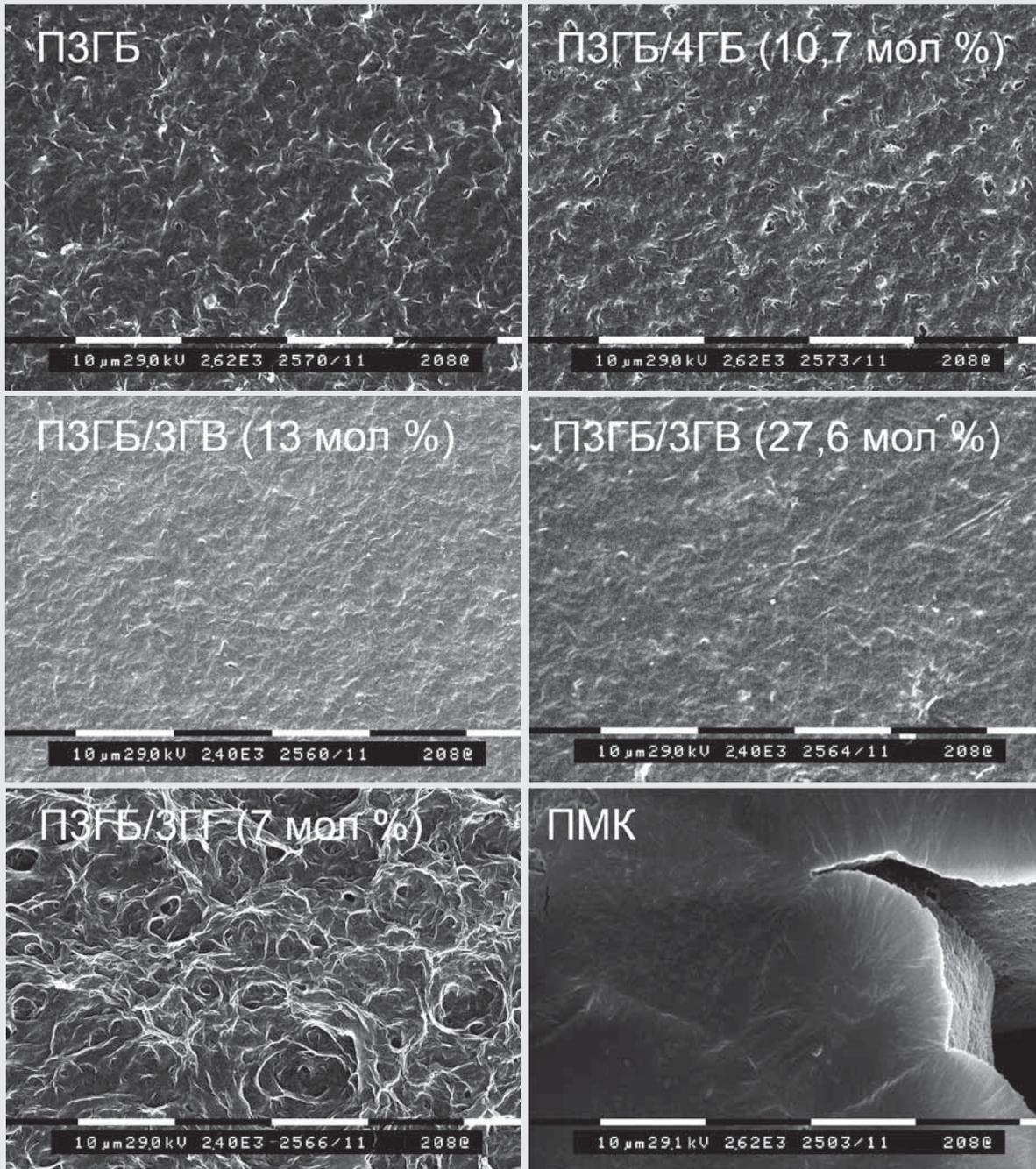


Рис. 1. Поверхность мембран из ПГА различного химического состава и полилактида. Растровая электронная микроскопия

Таблица 2. Свойства поверхности мембран, изготовленных из ПГА разных типов

Состав полимера мол. %	Контактный краевой угол смачивания водой, 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
Полилактид, 100	71,8±4,8	31,3	8,6	95,5
ПЗГБ, 100	70,0±0,4	32,8	7,9	97,7
ПЗГБ/4ГБ 89,3/10,7	57,4±0,6	43,1	3,9	112,0
ПЗГБ/3ГБ 87/13	60,3±2,8	40,7	4,6	108,9
ПЗГБ/3ГБ 72,4/27,6	62,5±2,0	38,9	5,3	106,4
ПЗГБ/ГГ 93/7	60,9±1,6	42,4	4,1	111,1

Мембраны, изготовленные из сополимерных ПГА трех типов, имели существенно меньшую величину краевого угла смачивания водой. Соплимерные мембраны из 3-гидроксипропиридата/3-гидроксивалерата и 3-гидроксипропиридат/3-гидроксигексаноата по этому показателю практически не различались ($60-62,5^\circ$). Это соответствует значению показателя у клеточных планшетов из полистирола (контроль). Величина краевого угла поверхности матриц из сополимера 3-гидроксипропиридат/4-гидроксипропиридата была достоверно ниже и составила $57,4 \pm 0,6^\circ$. Это промежуточная область между гидрофобными и гидрофильными поверхностями. По вычисленным характеристикам, наиболее низкие значения соотношения гидрофильность/гидрофобность поверхности имели сополимерные образцы, следовательно, они более благоприятны для культивирования клеток.

Поверхностная энергия также является фундаментальной характеристикой, способной влиять на «поведение» клеток [34–36]. Однако влияние на клетки гидрофильно-гидрофобного баланса поверхности, определяющее поверхностную энергию и другие показатели, не универсально: в одних случаях функции клеточных структур увеличиваются на гидрофильных поверхностях, в других – на гидрофобных [37]. В ходе исследования клеточных мембран, изготовленных из ПГА различного химического состава, в настоящей работе показано, что наиболее

низкие значения поверхностного натяжения и величины сил сцепления характерны для мембран из полилактида и поли-3-гидроксипропиридата, (порядка $31-32$ и $95-97$ эрг/см²), имеющих самую низкую гидрофильность (см. табл. 2). У сополимерных мембран эти значения выше, соответственно, $38,9-43,1$ и $106,4-112,0$ эрг/см².

Шероховатость поверхности на уровне нанометров, как известно, может определять адгезию, распластывание и двигательную активность клеток, а также влиять на синтез специфических белков [38]. При этом по одним данным, адгезия клеток увеличивается на шероховатых поверхностях по сравнению с полированными, по другим – изменение шероховатости не сопровождается какими-либо клеточными эффектами [39].

В наших исследованиях при оценке шероховатости поверхности мембран из ПГА получены следующие результаты (рис. 2, табл. 3): среднеквадратичная шероховатость (R_q) поверхности мембран из полилактида составила $241,629$ нм, что в 2 раза выше, чем у мембран из ПГА всех типов. Значение R_q оказалось близким как для гомополимера ПЗГБ, так и сополимеров 3-гидроксипропиридата с 4ГБ, 3ГВ, 3ГГ, в диапазоне $109-113$ нм. Это согласуется с результатами, полученными для сополимера ПЗГБ/3ГВ ($82,37$ нм) в работе [7], но ниже R_q , определенной для гомополимера ПЗГБ (165 нм) в работе [40].

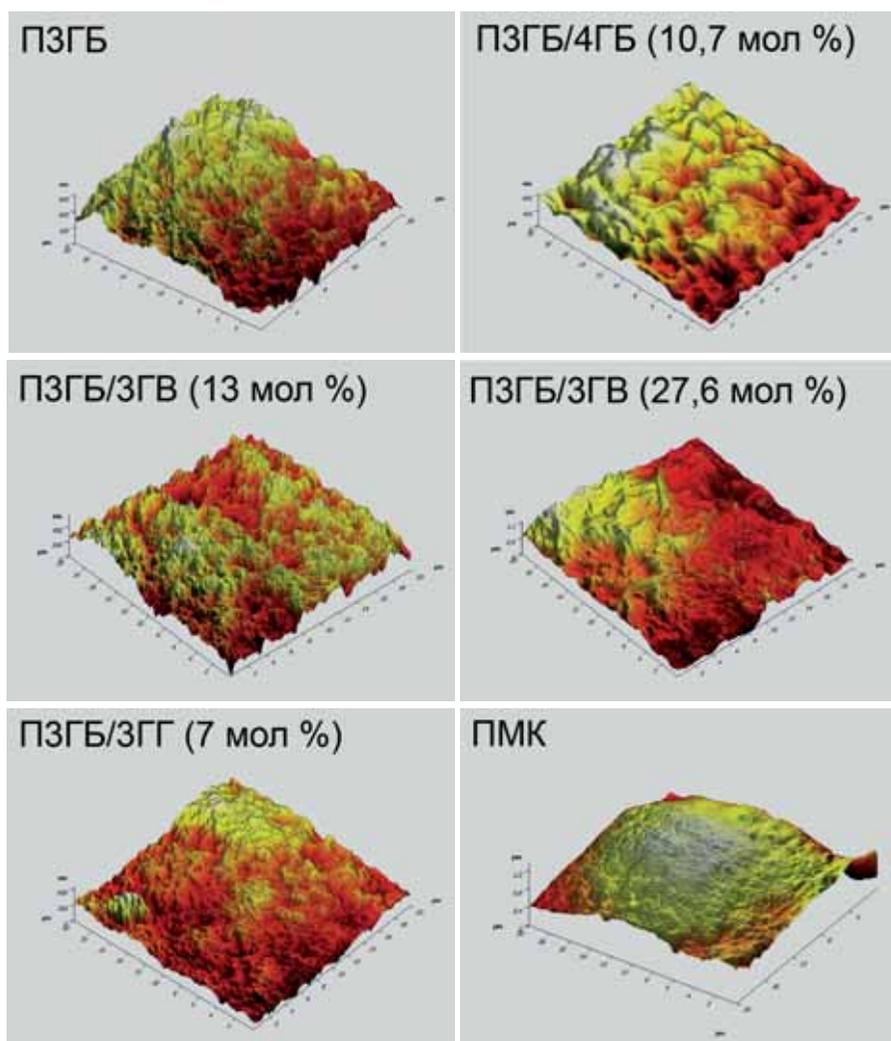


Рис. 2. АСМ-карты поверхности мембран из ПГА различного химического состава и полилактида

Таблица 3. Показатели шероховатости поверхности мембран из ПГА разных типов, вычисленные по результатам АСМ

Состав ПГА, мол%	Rz – высота неровностей профиля по десяти точкам, нм	Ra – среднее арифметическое отклонение профиля (шероховатость), нм	Rq – среднеквадратичная шероховатость, нм
ПЗГБ (100)	1307,2	93,200	109,390
ПЗГБ/4ГБ (89,3/10,7)	1405,6	92,909	113,062
ПЗГБ/ЗГВ 87,0/13,0)	644,6	98,682	107,931
ПЗГБ/ЗГГ (93,0/7,0)	577,8	99,12	113,466
ПМК (100)	2188,6	226	241,629

Подсчет фибробластов NIH 3T3, окрашенных азур-эозином (рис. 3), прикрепленных и растущих на исследуемых мембранах на всех сроках наблюдения выявил достоверно меньшее ($p = 0,05$) количество клеток на мембране из полилактида по сравнению с мембранами из ПГА всех типов. Через 24 ч после засева количество клеток (в поле зрения) составило на мембранах из ПЗГБ – $n = 24,3$, ПЗГБ/4ГБ – $n = 16,7$), ПЗГБ/ЗГВ (13 и 27,6 мол.%) – $n = 30,3$ и $n = 38,3$. Через 4 суток количество клеток на мембранах из ПГА было более равномерным и находилось в пределах $n = 139–150$. Спустя 7 сут. количество клеток на мембранах из ПГА измерялось на уровне $n = 402,7–498,0$, что выше показателей на полилактиде и близко к контролю, соответственно, $n = 265$ и $n = 380$. Таким образом, мембраны из ПГА при прямом контакте с фибробластами мыши линии NIH 3T3 не оказывали негативного влияния на их адгезию и рост. Следует отметить, что прикрепленные клетки на всех исследуемых мембранах были хорошо распластаны, в основном имели звездчатую форму; то есть были в активном состоянии.

Результаты подсчета клеток с использованием флуоресцентного зонда на ДНК DAPI дали результаты, в общем, сходные с окрашиванием азур-эозином (рис. 4). Применение флуоресцентных красителей, в частности, DAPI позволяет по сравнению с другими реактивами более корректно произвести подсчет физиологически активных клеток.

Спустя 24 ч после засева мембран фибробластами NIH 3T3 их количество в контроле (полистирол) и на мембранах из ПМК было достоверно ниже, чем на мембранах из ПГА (рис. 5); это отставание сохранялось на сроке 4 сут. Однако к концу наблюдения количество клеток на полистироле было сопоставим с экспериментальными мембранами из ПГА, но достоверное отставание количества клеток на полилактиде сохранилось. На мембранах, изготовленных из ПГА, получены следующие результаты: через 4 суток количество клеток на мембранах из ПЗГБ составило $n = 154 \pm 13,4$; на ПЗГБ/4ГБ – $n = 139 \pm 12,2$; на ПЗГБ/ЗГВ (13 и 27,6 мол. %) , соответственно, $n = 180 \pm 13,9$ и $n = 150,7 \pm 14,8$; на ПЗГБ/ЗГГ – несколько ниже – $n = 120,7 \pm 9,5$ кл/поле, при этом статистически значимых различий между ПЗГБ и сополимерными мембранами всех типов не выявлено. В конце наблюдения (7 суток после засева) количество клеток было достоверно самым низким – $n = 300 \pm 14,6$ кл/поле на мембранах, изготовленных из полилактида. На мембранах из ПГА

количество клеток было близким и составило (кл/поле) $n = 440 \pm 27,4$ на ПЗГБ; $n = 366 \pm 18,9$ – на ПЗГБ/4ГБ (близко к контролю); $n = 423 \pm 32,6$ – на ПЗГБ/ЗГВ-13, $n = 452 \pm 13,8$ – на ПЗГБ/ЗГВ-27,6 и $n = 402 \pm 19,4$ на ПЗГБ/ГГ. Таким образом, количество клеток на мембранах сравнения (полилактид) было на всех сроках достоверно меньшим, чем на исследуемых мембранах из всех типов ПГА. Это согласуется с результатами многих авторов, которые, изучая адгезию и пролиферацию различных клеток – остеобластов [40], фибробластов [41], кератиноцитов [20], показали, что мембраны и пленки из полилактида, а также сополимеров полилактида с полигликолидом уступают аналогичным изделиям из ПГА. Это связано с тем, что в жидких средах полилактид в отличие от ПГА подвергается гидролитической деградаци, а образуемые при этом мономеры молочной кислоты ($pH = 3.2$) вызывают значительное закисление среды [41].

Выявленные в результате окрашивания незначительные отличия в количестве клеток, пролиферирующих на мембранах, изготовленных из ПГА разных типов, не позволяют отдать предпочтение какому-либо из исследованных типов полимеров и, в целом, свидетельствуют об высокой биосовместимости ПГА и пригодности для выращивания клеток *in vitro*. Об этом же свидетельствуют результаты исследования морфологии фибробластов. На всех этапах культивирования клетки были активными, имели звездчатую форму.

О высокой биосовместимости мембран, полученных из всех исследованных типов ПГА, свидетельствуют также результаты МТТ-теста (рис. 6). Однако, анализируя полученные результаты, нельзя не отметить, что имеющиеся весьма противоречивые результаты исследования биологической совместимости ПГА разного химического состава не дают сегодня однозначного ответа на вопрос, какому из типов ПГА по этому тесту можно отдать предпочтение. Так, в работе [41] показано, что первичная культура остеобластов в тесте МТТ дала лучшие результаты на сополимере 3-гидроксибутирата с 3-гидросигексаноатом, а на ПЗГБ и полилактиде дыхательная активность клеток была ниже на 40 и 60% соответственно. Исследование потенциальной цитотоксичности пленок и нетканого полотна из ПЗГБ и ПЗГБ/ГВ (5 мол. %) в культурах человеческих остеобластов SaOS-2 и фибробластов мыши L 929 цитотоксичности со стороны всех типов полимеров не зафиксировано и влияния состава полимера на количество клеток не выявлено.

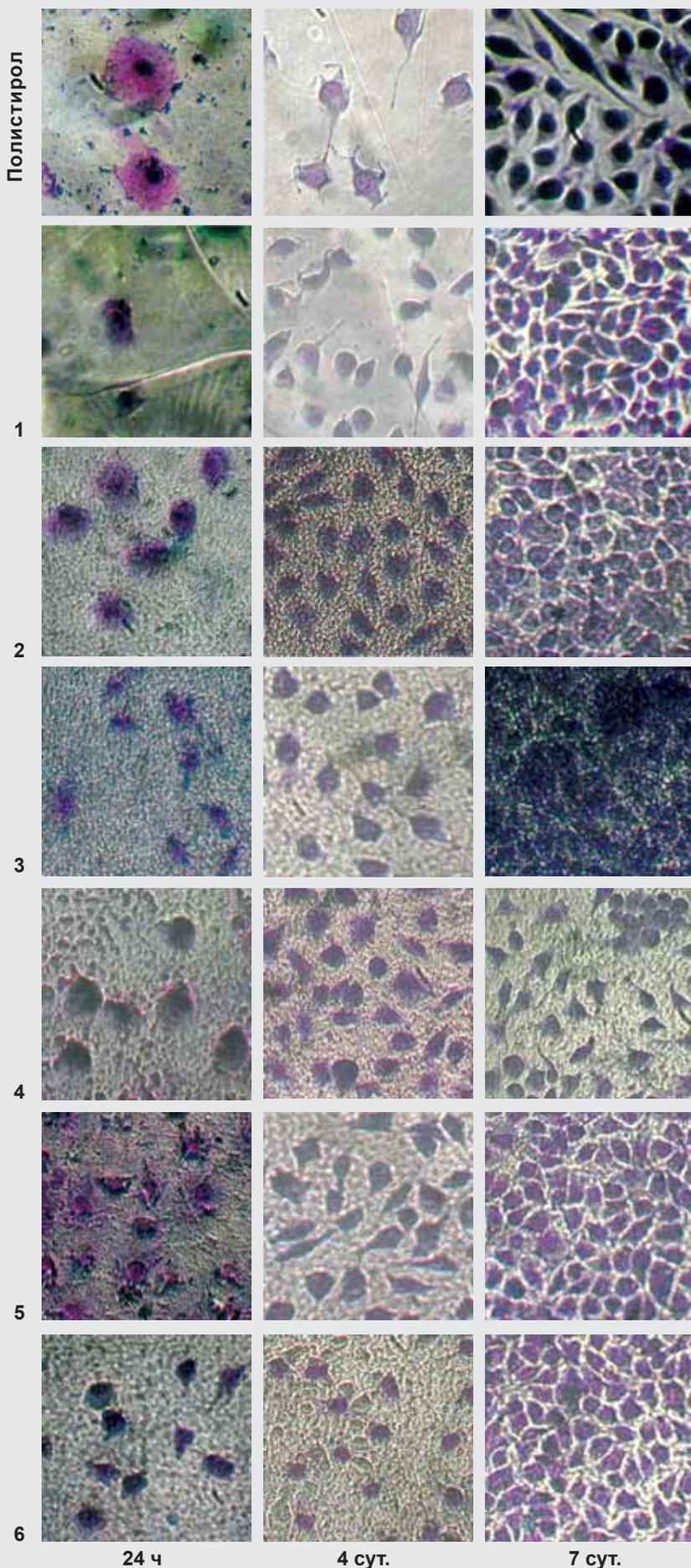


Рис. 3.
 Фибробласты мышцы линии
 NIN 3Т3, окрашенные
 азур-зозином,
 культивируемые
 на мембранах разных типов,
 контроль – полистирол:
 1 – ПМК;
 2 – ПЗГБ;
 3 – ПЗГБ/4ГБ(10,7 мол.
 %); 4 и 5 – ПЗГБ/3ГВ
 (13 и 27,6 мол. %);
 6 – ПЗГТ (7 мол. %)



Рис. 4.
 Фибробласты мыши линии
 фибробластов NIH 3T3 DAPI
 на мембранах разных типов,
 окраска DAPI:
 контроль – полистирол;
 1 – ПМК;
 2 – ПЗГБ;
 3 – ПЗГБ/4ГБ(10,7 мол. %);
 4 и 5 – ПЗГБ/3ГВ
 (13 и 27,6 мол. %);
 6 – ПЗГГ (7 мол. %)

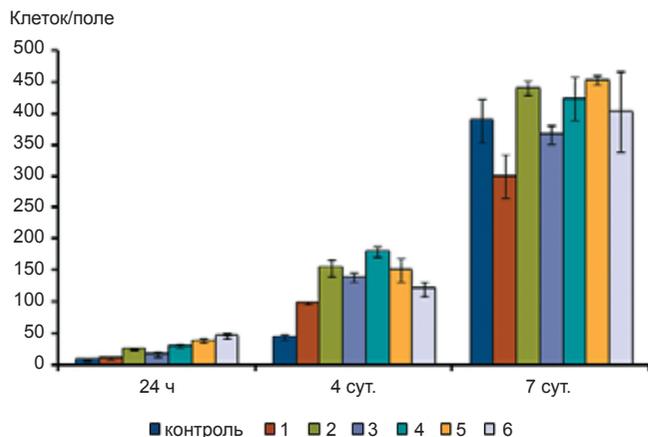


Рис. 5. Прирост количества фибробластов мыши линии NIH 3T3 (окраска DAPI) на мембранах разных типов: контроль – полистирол; 1 – ПМК; 2 – ПЗГБ; 3 – ПЗГБ/4ГБ (10,7 мол. %); 4 и 5 – ПЗГБ/ЗГВ (13 и 27,6 мол. %); 6 – ПЗГГ (7 мол. %)

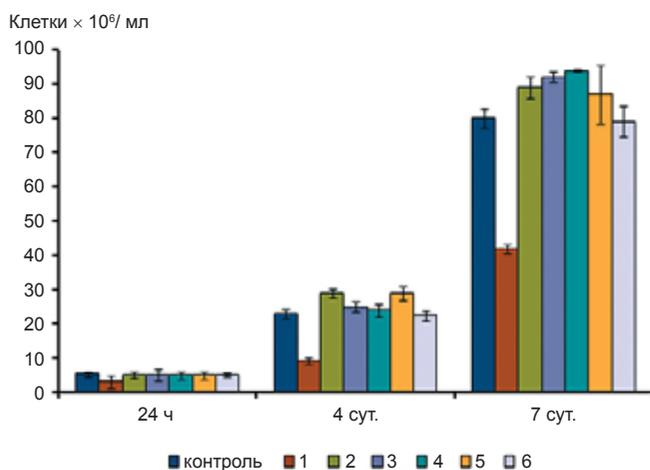


Рис. 6. Прирост количества фибробластов мыши линии NIH 3T3 на мембранах разных типов по результатам МТТ-теста: контроль – полистирол; 1 – ПМК; 2 – ПЗГБ; 3 – ПЗГБ/4ГБ (10,7 мол. %); 4 и 5 – ПЗГБ/ЗГВ (13 и 27,6 мол. %); 6 – ПЗГГ (7 мол. %)

В ходе сравнительного исследования полилактида, ПЗГБ, ПЗГБ/ЗГГ (5, 12 и 20 мол. %), обнаружено позитивное влияние гидроксигексаноата на жизнеспособность остеобластов только на самом гидрофобном матриксе из сополимера ПЗГБ/ЗГГ с 12 мол. % фракции ЗГГ (величина краевого угла 85°), в то время, как при 5 и 20 мол. % этого мономера в сополимере результаты были сопоставимы с полученными на матриксах из ПЗГБ и ПМК; при этом в культуре фибробластов линии L 929, напротив, самые высокие показатели получены на пленках из ПЗГБ/ЗГГ при 20 мол. % ЗГГ [42]. В другой работе при культивировании клеток костного мозга на пленках из ПГА, пролиферативная активность клеток на 3 день культивирования была выше на 30% на трехкомпонентном полимере (ПЗГБ/ЗГВ/ЗГГ) по сравнению с ПЗГБ/ГГ, при этом результаты, полученные на ПЗГБ/ГГ и на полилактиде были сходными [22]. При сравнении поверхностей пленок с различной степенью шероховатости и гидрофильности изготовленных из полилактида, ПЗГБ, сополимеров ЗГБ с ЗГГ (12 мол. %) и с 4ГБ (7, 12, 20 и 40 мол. %) в культуре гладкомышечных клеток сосудов кролика RaSMCs авторы

не выявили различий в количестве клеток в МТТ-тесте через 24 ч после засева [24]; и только через 4 сут. обнаружено минимальное количество клеток на ПЗГБ, максимальное – на ПЗГБ/4ГБ (7 мол. %). Однако при увеличении содержания мономера 4ГБ количество клеток снижалось, приближаясь к показателям на других типах пленок. Другие исследователи при сравнении биосовместимости полилактид-гликолида с ПЗГБ и ПЗГБ/4ГБ (11, 22, 30 и 45 мол. %) в культуре фибробластов линии L 929 показали, что через 4 сут. в МТТ-тесте количество активных клеток на сополимере ПЗГБ/4ГБ (45 мол. %) составило $12,2 \times 10^5$, что в 4 раза выше, чем на ПЗГБ ($3,1 \times 10^5$), однако сопоставимо с контрольным полилактид-гликолидом ($11,3 \times 10^5$ клеток/мл) [43].

Таким образом, имеющиеся результаты не дают однозначного ответа о биосовместимости того или иного типа ПГА, и это вполне объяснимо. Связано это с тем, что в экспериментах были использованы различные типы ПГА, различной степени очистки (об этом важном моменте информация в публикациях не представлена). Анализируемые изделия (пленки, мембраны и др.) были изготовлены различными методами, и далеко не во всех работах биосовместимость матриксов оценена комплексно, то есть с учетом физико-химических свойств полимеров, структуры и свойств поверхности.

Результаты исследования фибробластов мыши линии NIH 3T3, культивированных на разработанных мембранах, оцененные в тесте МТТ, представлены на рис. 6. Через 24 ч после засева количество клеток было одинаковым в контроле (полистирол) и на всех мембранах, изготовленных из всех типов ПГА и несколько выше, чем на полилактиде. Через 4 сут. количество клеток на мембранах из ПГА всех типов, а также в контроле было сопоставимым, а количество клеток на полилактиде – практически вдвое ниже. Через 7 суток количество клеток на мембранах из ПЗГБ, ПЗГБ/4ГБ, ПЗГБ/ЗГВ (13 и 27,6 мол. %) было практически одинаковым – соответственно $n = 89, 92, 94$ и $87 \times 10^6/\text{мл}$, а на мембранах, изготовленных из сополимера ПЗГБ/ЗГГ – несколько ниже ($n = 79 \times 10^6/\text{мл}$), что аналогично контролю (полистирол). Количество клеток на мембранах из полилактида было ниже в 2 раза по сравнению с данными, полученными для всех типов исследованных ПГА.

Таким образом, на примере фибробластов линии NIH 3T3 показано, что для культивирования клеток пригодны мембраны, изготовленные из всех исследованных ПГА. Количество жизнеспособных клеток, культивируемых на мембранах из ПГА различного химического состава, достоверно не отличалась, поэтому для изготовления конструкций, необходимых для клеточных технологий, могут быть использованы как гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты, так и сополимерные ПГА, образованные мономерами 3-гидроксипропионата и другими мономерами (4-гидроксипропионата, 3-гидроксипропионата, 3-гидроксипропионата).

Работа выполнена по проекту по постановлению Правительства РФ № 220 от 09.04.2010 для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих учёных в Российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования (договор № 11.G34.31.0013) и Программе интеграционных исследований СО РАН (проект № 96).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Хенч Л., Джонс Д. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей (под ред. А.А. Лушниковой). Серия «Мир биологии и медицины». М.: Техносфера; 2007.
2. Шумаков В.И., Онищенко Н.А. Биологические резервы клеток костного мозга и коррекция органных дисфункций. М.: Лавр; 2009.
3. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток. Практическое руководство. М.: Бином; 2010.
4. Volova T.G. Polyhydroxyalkanoates – plastic materials of the 21st century: production, properties, application. NY: Nova Science Pub; 2004.
5. Williams D.F., Martin D.P. Applications of PHAs in medicine and pharmacy. Biopolymers 2004; 91–28.
6. Chen G.Q., Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. Biomaterials 2005; 26: 6565–78.
7. Волова Т.Г., Севастьянов В.И., Шишацкая Е.И. Полиоксиканоаты – биоразрушаемые полимеры для медицины. Красноярск: «Платина»; 2006.
8. Reusch R.N., Sparrow A.W., Gardiner J. Transport of poly- β -hydroxybutyrate in human plasma. Biochim. Biophys. Acta. 1992; 1123: 33–0.
9. Lakshmi S., Laurencin C. Biodegradable polymers as biomaterials. Prog. Polym. Sci. 2007; 32: 762–98.
10. Sudesh K., Abe H., Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. Prog. Polym. Sci. 2000; 25: 1503–55.
11. Gogolewski S., Javanovic M., Perren S.M. et al. Tissue response and in vivo degradation of selected polyhydroxyacids: polylactides (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerates) (PHB/PHV). J. Biomed. Mater. Res. 1993; 27: 1135–48.
12. Шишацкая Е.И. А.В. Еремеев, И.И. Гительзон и др. Исследование цитотоксичности полиоксиканоатов в культуре животных клеток. Доклады РАН 2000; 374 (4): 561–4.
13. Севастьянов В.И., Н.В. Перова Н.В., И.А. Довжик И.А. и др. Медико-биологические свойства полиоксиканоатов – биодegradуемых бактериальных полимеров. Перспективные материалы 2001; 5: 46–55.
14. Volova T.G., Shishatskaya E.I., Sevastianov V.I. et al. Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers. Biochemical. Engin. J. 2003; 16: 125–33.
15. Shyshatskaya E.I., Volova T.G. A comparative investigation of biodegradable polyhydroxyalkanoate films as matrices for in vitro cell cultures. J. Mater. Sci.: Mater. Med. 2004; 15: 915–23.
16. Köse G., Korkusur F., Ozkul A., et al. Tissue engineerig cartilage on collagen and PHBV matrices. Biomaterials 2005; 26: 5187–97.
17. Williams S.F., Martin D.P. Therapeutic uses of polymers and oligomers composing gamma-hydroxybutyrate. PCT Patent Application No. WO 01/19361A2. 2001.
18. Martin D.P., Williams S. Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterials. Biochem. Engin. J. 2003; 16: 97–105.
19. Chen G.Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio-and materials industry. Chem. Soc. Rev. 2009; 38: 2434–46.
20. Ji Y., Li X.T., Chen G.Q. Interactions between a poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) terpolyester and human keratinocytes. Biomaterials 2008; 29: 3807–14.
21. Ji G.Z., Wei X., Chen G.Q. Growth of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on the terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate). J. Biomater. Sci.: Polymer Edn. 2009; 20: 325–39.
22. Wang L., Wang Z.H., Shen C.Y. et al. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells grown in terpolyesters of 3-hydroxyalkanoates scaffolds into nerve cells. Biomaterials 2010; 31: 1691–8.
23. Martin D.P., Williams S. Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterials. Biochem. Engin. J. 2003; 16: 97–105.
24. Cheng S.T., Chen Z.F., Chen G.Q. The expression of cross-linked elastin by rabbit blood vessel smooth muscle cells cultured in polyhydroxyalkanoate scaffolds. Biomaterials 2008; 29: 4187–94.
25. Волова Т.Г., Шишацкая Е.И., Гордеев С.А. и др. Исследование структуры и свойств полиоксибутирата – термопластичного биоразрушаемого полимера. Перспективные материалы 2001; 2: 40–8.
26. Волова Т.Г., Плотников, Е.И. Шишацкая и др. Физико-химические свойства двухкомпонентных -(поли (3ГБ/3ГВ)) полигидроксиалканоатов. Биофизика 2004; 49 (6): 1038–46.
27. Volova T.G., Kalacheva G.S., Steinbuechel A. Biosynthesis multi-component Polyhydroxyalkanoates by the bacterium Wautersia eutropha. Macromol. Symposia. 2008; 269: 1–7.
28. Де Жен П.-Ж. Смачивание: статика и динамика. Успехи физических наук. 1987; 151: 619–81.
29. Шероховатость поверхности. Параметры, их значения и общие правила установления технических требований. ISO 468: 1982.
30. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. Biomaterials 2000; 21: 667–81.
31. Meyer U., Büchter A., Wiesmann H.P. et al. Basic reactions of osteoblasts on structured material surface. J. Eur. Cells Mater. 2005; 9: 39–49.
32. Andrade J.D., Gregonis D.E., Smith L.M. Polymer surface dynamics. In: Andrade J.D., editor. Surface and interfacial aspects of biomedical polymers. NY: Plenum Press. 1985; 1: p. 15–41.
33. Ou W., Qiu H., Chen Z. et al. Biodegradable block poly(ester-urethane)s based on poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymers. Biomaterials 2011; 32: 3178–88.
34. Van der Valk P., Van Pelt A.W.J., Busscher H.J. et al. Interactions of fibroblast and polymer surfaces, relation between surface free energy and fibroblast spreading. Biomed. Mater. Res. 1983; 17: 807–17.
35. Hallab N.J., Bundy K.J., O'Connor K.J. et al. Evaluation of metallic and polymeric surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion. Tissue Engineering 2001; 7: 55–71.
36. Kennedy S.B., Washburn N.R., Simon C.G. et al. Combinatorial screen of effect of surface energy on fibronectin mediated osteoblast adhesion, spreading and proliferation. Biomaterials 2006; 27: 3817–24.
37. Links J., Boyan B.D., Blanchard C.R. et al. Responce of MG63osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is depend on surface roughness and composition. Biomaterials 1998; 19: 2219–32.
38. Xavier S.P., Carvalho P.S.P., Beloti M.M. et al. Responce of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments. J. Dent. 2003; 31: 173–80.
39. Босхомджиев А.П. Изучение биодеструкции и биосовместимости полимерных систем на основе полиоксиканоатов [диссертация] Москва: Института биохимии им. А.Н. Баха РАН; 2010.
40. Wang Y.W., Wu Q., Chen G.Q. Attachment, proliferation and differentiation of osteoblasts on random biopolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds. Biomaterials 2004; 25: 669–75.
41. Wang Y.W., Yang F., Wu Q. et al. Effect of composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) on growth of fibroblast and osteoblast. Biomaterials 2005; 26: 755–61.
42. Sombatmankhong K., Sanchavanakit N., Pavasant P. et al. Bone scaffolds from electrospun fiber mats of poly(3-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and their blend. Polymer 2007; 48: 1419–27.
43. Chee J.W., Amirul A.A., Muhammad T.S. et al. The influence of copolymer ratio and drug loading level on the biocompatibility of P(3HB-co-4HB) synthesized by Cupriavidus sp. (USMAA2-4). Biochem. Engin. J. 2008; 38: 314–8.

Поступила 22.05.2011