ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

**МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
«Перспективные материалы с иерархической структурой
для новых технологий и надежных конструкций»**

**X МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
«Химия нефти и газа»**

Томск

Издательский Дом ТГУ

2018

DOI: 10.17223/9785946217408/195

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИЛАКТИДНЫХ НАНОВОЛОКОННЫХ МАТРИКСОВ В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЯ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КАРДИОМИОЦИТОВ

¹Балашов В.А., ¹Цвеляя В.А., ¹Слотвицкий М.М., ²Чепелева Е.В.,
²Павлова С.В., ²Пономаренко А.В., ²Докучаева А.А., ²Васильева М.Б.,
²Красильникова А.А., ¹Агладзе К.И., ²Стрельников А.Г., ²Сергеевичев Д.С.
¹Московский физико-технический институт (государственный университет), Россия
²ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, Новосибирск, Россия

На сегодняшний день использование синтетических биodeградируемых полимеров на основе полиуретана, поликапролактона, полилактидной кислоты, полигликолевой кислоты и их сополимеров является одним из перспективных направлений в тканевой инженерии [1]. Один из распространённых методов создания подложек для культивирования клеток – электроспиннинг (метод электростатического формования растворов высокомолекулярных соединений), позволяющий создавать матриксы из нановолокон различной конфигурации, способных к биodeградации и обладающих хорошей биосовместимостью. Данная работа посвящена получению полимерных нановолокон, используемых в качестве носителя для клеток, применяющихся в терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

Полимерные матриксы (подложки) для культивирования сердечной ткани методом электроспиннинга создавались на промышленной установке MECC NANON-03. Растворы поликапролактона и полилактида для электроспиннинга готовились в гексофлюориспропанолe при концентрации 10-15%. Раствор рекомбинантного спидроина готовился в гексофлюориспропанолe при концентрациях 15-25%.

Полидиметилсилоксан (PDMS) был подготовлен полным смешиванием двух жидких компонентов (Dow Corning Toray Corp., Япония) в отношении 1:10 в плоской чашке Петри. После выдерживания при 80° С в течение нескольких часов, полимеризовавший слой PDMS был отделен от чашки и промывался 70% этанолем перед использованием.

Подготовленные растворы полимеров электроспиннулись на установке Nanon-01 (MECC CO., LTD). Раствор загружался в 2 мл шприц и энжектировался тупую иглу 20 калибра при скорости потока 0.1-1мл / ч. Приложенное напряжение между наконечником шприца и заземленным коллектором было в диапазоне от 5 до 10 кВ. Нановолокна депонировались либо непосредственно на поверхность покровного стекла, находящегося на заземленном коллекторе, либо на щелевой коллектор, изготовленный из 0,1 мм алюминиевой фольги.

Полимерные нановолокна производимые на электроспиннинговой установке, либо поступали на коллектор-накопитель в произвольной меняющейся хаотически ориентации, либо улавливались щелевым коллектором. Длина волокон в этом случае определяется шириной щели коллектора. Подбор параметров электроспиннинга, таких как время и скорость инъекции полимерного раствора, амплитуда прикладываемого напряжения, расстояние между соплом и коллектором, позволял получить необходимую линейную плотность нановолокон и их диаметр. Размер щели коллектора определял размер образца. Следует отметить, что в силу физических свойств процесса электроспиннинга, отдельные волокна могут располагаться под значительным углом к оси выравнивания. Однако, при подобранных параметрах, фракция таких волокон составляла менее полутора процентов от общего числа и, как показало культивирование клеток, не оказывала влияния на архитектуру получаемого клеточного слоя.

Полимерные волокна с коллектора контактным образом переносились на полидиметилсилоксановый (PDMS) блок. Далее процедура варьировалась. При необходимости, сердечные клетки могли высеваться непосредственно на тщательно простерилизованный блок PDMS. Однако, обычная процедура подготовки для тестирования заключалась в микроконтактной печати нановолокон на стеклянную подложку. Для этого блок, содержащий нановолокна, приводился в плотное соприкосновение со стеклянной подложкой, а затем нагревался в течение 65-70 секунд до температуры 170° – 200° С. Таким

Секция 4. Научные основы разработки материалов с многоуровневой иерархической структурой, в том числе для экстремальных условий эксплуатации

образом, нановолокна отпечатывались на стеклянной подложке.

Стеклянные подложки с нановолокнами покрывались раствором фибронектина (10 мкг/мл) и выдерживались не менее часа. Затем подложки стерилизовались УФ излучением 265 нм, не менее 30 минут с каждой стороны. Стерилизованные подложки помещались в чашку Петри и хранились до посадки клеток в стерильных условиях не более 3-х дней.

Полученные образцы подложек из различных материалов тестировались высаживанием на них неонатальных крысиных кардиомиоцитов и должны были удовлетворять следующим условиям:

- полученные образцы должны быть морфологически и функционально однородны,
- способны к сокращению и проведению возбуждения.

Инкубация клеточных культур осуществлялась при +37°C, и 5% уровне CO₂. По истечении 18 часов после посадки культура переносилась в ламинарный шкаф и промывалась теплым физраствором с целью удаления неприкрепившихся клеток и частей разрушенных клеток. После этого в чашки заливалась новая культуральная среда (DMEM с 5% бычьей сыворотки, стрептомицином 1мг/мл и гентамицином 10мг/мл).

Контроль образования клеточного монослоя проводился с помощью фазово-контрастного микроскопа. Способность клеточного слоя к проведению возбуждения определялась на установке оптического картирования состоящей из высокоскоростной камеры Andor iXon+ 888, сопряженной с флуоресцентным микроскопом Olympus MVX-10.

В результате проведенных работ по подбору полимерных составов для приготовления полимерных матриц с различными свойствами было выявлено, что наилучшими материалами с точки зрения эффективности клеточной адгезии являются поликапролактоновые, покрытые фибронектином подложки, диаметром около 2000 нм. В то же время, спидроиновые подложки немного проигрывают по первичной адгезии, достоинством последних является существенная эластичность и отсутствие необходимости в дополнительной обработке фибронектином.

Работа выполнена в рамках проекта РНФ 16-15-10322 «Разработка научных подходов создания пейсмейкерных клеток человека с целью замещения функции проводящей системы сердца, используя матрицы из полимерного нановолокна».

Литература

1. Байрамова С.А., Стрельников А.Г., Романов А.Б. и соавт. Перспективы создания биологического пейсмейкера с использованием современных технологий // Гены и клетки 2017. -№12(2). – С.29-36.