

УДК 57.086.83

©Коллектив авторов

## ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИИ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НА ПОЛИМЕРНЫХ ПЛЕНКАХ

*И.И. Жаркова<sup>1</sup>, А.П. Бонарцев<sup>1,2\*</sup>, А.П. Босхонджиев<sup>2</sup>, Ю.М. Ефремов<sup>1</sup>,  
Д.В. Багров<sup>1</sup>, Т.К. Махина<sup>2</sup>, В.Л. Мышкина<sup>2</sup>, В.В. Воинова<sup>1,2</sup>, С.Г. Яковлев<sup>2</sup>,  
Е.В. Филатова<sup>2</sup>, А.Л. Зернов<sup>1</sup>, Н.В. Андреева<sup>1</sup>, Е.А. Иванов<sup>2</sup>,  
Г.А. Бонарцева<sup>2</sup>, К.В. Шайтан<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Государственное учебно-научное учреждение Биологический факультет  
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,  
119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12; тел.: (495) 930-63-06;  
эл. почта: ant\_bonar@mail.ru

<sup>2</sup>Учреждение Российской академии наук Институт биохимии  
им. А.Н. Баха РАН, Москва;

Биоразлагаемый полимер бактериального происхождения, поли-3-оксибутират (ПОБ), активно исследуется как биоматериал для тканевой инженерии. Однако факторы, определяющие биосовместимость этого полимерного материала, в настоящее время остаются не до конца ясны. С целью исследования влияния свойств поли-3-оксибутирата на жизнеспособность культивируемых на нем клеток была проведена модификация полимерного материала с использованием гидрофильного полимера полиэтиленгликоля 300 (ПЭГ). Были получены композиты ПОБ/ПЭГ с различным содержанием ПЭГ (10, 20, 30 и 50%), после чего 95% ПЭГ было удалено из композитов в ходе инкубации в воде. Были исследованы шероховатость и гидрофильность поверхности пленок методами атомно-силовой микроскопии и измерения контактного угла смачивания, соответственно. Была исследована биосовместимость плёнок *in vitro* на культуре фибробластов линии COS-1. Показано, что как шероховатость полимерной поверхности, так и ее гидрофобность прямо пропорциональны исходному содержанию ПЭГ в композитах ПОБ/ПЭГ. Показано, что интенсивность роста фибробластов линии COS-1 на полимерных пленках определяет сочетание двух основных физико-химических свойств полимерной поверхности: шероховатости и гидрофильности. Оптимальной шероховатостью для роста клеток линии COS-1 является средняя шероховатость более 25 нм, предельных значений контактного угла смачивания, ответственных за относительно высокую жизнеспособность клеток, найдено не было. Это свидетельствует о том, что наибольшее влияние на рост клеток оказывает шероховатость поверхности пленок, а уровень гидрофильности полимерной поверхности вызывает дополнительный положительный эффект на жизнеспособность прикрепившихся на плёнках клеток через посредство формирования на ней слоя адсорбированного белка. Таким образом, модификация полимерного материала ПОБ с использованием ПЭГ привело к улучшению жизнеспособности клеток, культивируемых на полимерных пленках *in vitro*. Полученные данные можно использовать для разработки таких медицинских изделий, как хирургические заплаты и пародонтологические мембраны.

**Ключевые слова:** поли-3-оксибутират (ПОБ), полиэтиленгликоль (ПЭГ), шероховатость поверхности, гидрофильность поверхности, биосовместимость, COS-1.

\* - адресат для переписки

## ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НА ПОЛИМЕРНЫХ ПЛЕНКАХ

**ВВЕДЕНИЕ.** Среди разрабатываемых и используемых биомедицинских полимеров особое внимание привлекают биоразлагаемые полиоксиданканоаты (ПОА), получаемые химическим и биотехнологическим путем. ПОА обладают набором уникальных свойств: высокой механической прочностью и термопластичностью. Это обеспечивает простоту переработки различными методами и позволяет получать широкий спектр изделий, способностью к образованию композитов с синтетическими полимерами, неорганическими материалами и лекарственными веществами, способностью к полному биоразложению с образованием нетоксичных продуктов, биосовместимостью с тканями и органами человека и животных и экологической безопасностью. В связи с этим ПОА находят широкое применение в биологии и медицине. Медицинскими сферами применения этих биополимеров являются: хирургическое применение медицинских имплантатов, тканевая инженерия, создание новых лекарственных форм в фармацевтике, создание новых материалов для стоматологии и другие. Однако, как и другие полимерные материалы, ПОА могут обладать и недостатками, к числу которых относятся: высокая гидрофобность, высокая кристалличность, длительная биодеградация и низкая пластичность, в некоторых случаях серьезно ограничивающие их применение как биоинженерных материалов и в медицине [1, 2].

Модификация ПОА с помощью других полиэфигов с целью улучшения их физико-химических и биологических свойств, в частности, биосовместимости, и придания им биологической активности является перспективным направлением в биоинженерии. Образование композитов ПОА с другими полимерами, обладающими иным набором физико-химических и биологических свойств, позволяет получать биополимеры с наиболее оптимальным сочетанием свойств для использования их в медицине и фармацевтике [3]. Так, получение композитов ПОА и его сополимера с 3-оксигексаноатом позволяет значительно улучшить механические свойства полимеров-предшественников и регулировать скорость их биодеградации [4].

Полиэтиленгликоль (ПЭГ) является нейтральным водорастворимым полиэфиром, который обладает относительно низкой токсичностью по отношению к живым клеткам и тканям организма и используется в клетке для модификации белков и фосфолипидов, участвует в процессе слияния клеток [5-7]. В современной фармакологии и биоинженерии ПЭГ используется для химической модификации наночастиц, липосом и биофармацевтических препаратов белковой природы (например, препаратов интерферона) [8, 9].

Образование сополимеров и композитов ПОА с ПЭГ используется для улучшения биосовместимости этих полимеров. Однако, результаты исследования влияния ПЭГ на биосовместимость ПОА часто противоречат друг другу. Так, китайскими исследователями показано значительное улучшение биосовместимости ПОА с клетками, уменьшение адгезии тромбоцитов и коагуляции крови при контакте с композитами ПОА/ПЭГ, которое было сопряжено с увеличением гидрофильности, диффузионных характеристик и механических свойств при образовании смесей полимеров [10, 11]. Однако, в других работах приводятся данные о значительном ухудшении прикрепления и роста клеток на пленках как из сополимеров ПОА с ПЭГ, так и композитов ПОА/ПЭГ [12-14].

Более того, ПЭГ используют также для модификации структуры полимерного материала ПОА, например, для увеличения пористости и шероховатости поверхности полимерных изделий из ПОА. В этом случае данные о влиянии такой модификации ПОА на биосовместимость полимера также существенно разнятся [15-17]. Существуют и другие способы модификации структуры полимера, в частности, пористости поверхности полимерных изделий из ПОА: с помощью образования композитов с другими полимерами [10, 11], методом химического травления [18], обработки ферментами (например, липазами) [18, 19], методом литографии [20], обработкой плазмой [21-24] и с помощью ультрафиолетового облучения [25]. Во всех перечисленных случаях

модификация структуры полимера и морфологии его поверхности значительным образом влияло жизнеспособность клеток, культивируемых на полимере *in vitro*. Улучшение биосовместимости ПОА с помощью модификации ПЭГ может быть использовано для разработки таких медицинских изделий, как хирургические заплаты и пародонтологические мембраны.

Таким образом, целью данной работы является изучение влияния модификации полимерного материала ПОБ с использованием ПЭГ на его биосовместимость, исследованную на клеточных культурах *in vitro*.

#### **МЕТОДИКА.**

*Материалы.* Для получения полимерных плёнок в работе использовали поли-3-оксибутират, полученный нами микробиологическим путём. В качестве продуцента биополимера был использован высокопродуктивный штамм-продуцент ПОБ *Azotobacter chroococcum* 7Б. Коллекционные штаммы *Azotobacter* поддерживали на среде Эшби. Для достижения высокой продуктивности клеток культуру *Azotobacter* выращивали на среде Берка в условиях избыточного содержания источника углерода в среде. Молекулярную массу полимеров определяли методом вискозиметрии. Для получения полимера в виде порошка высокого качества (тонкого порошка высокой гомогенности для быстрой и хорошей растворимости) была использована Нанораспылительная сушилка, порошок полимера получен согласно инструкции к прибору Nano Spray Dryer B-90 (“Buchi Labortechnik AG”, Швейцария). Биосинтез, выделение и очистка полимера описаны в работе [26].

*Получение плёнок ПОБ и их модификация полиэтиленгликолем.* Для изучения роста клеток *in vitro* на полимерных плёнках была получена серия полимерных плёнок толщиной 40 мкм и диаметром 30 мм. В качестве контрольной плёнки была использована плёнка ПОБ с молекулярной массой (ММ) равной 810 кДа. Для получения модифицированных полимерных плёнок был использован ПЭГ с ММ = 300 Да (PEG-300, “MP Biomedicals”, США). Модификацию полимерных плёнок ПОБ при помощи ПЭГ производили следующим образом: ПОБ и ПЭГ в различных соотношениях (10, 20, 30 и 50% (масса/масса) массовой доли ПЭГ в полимерной смеси) были растворены совместно в хлороформе, после чего были получены плёнки композита. Плёнки полученных композитов и контрольная плёнка ПОБ были приготовлены путём испарения растворителя (хлороформа) на стеклянной подложке. Вес плёнок был измерен с помощью весов AL-64 (“Acculab”, США) и составил  $61 \pm 8$  мг. Затем полимерные плёнки ПОБ и композитов ПОБ/ПЭГ инкубировали в деионизованной воде при 37°C в термостате (ЕС 1/80 СПУ, РФ) в течение 24 ч, после чего их промывали 5-6 раз, в результате чего ПЭГ переходил из полимерного композита в водный раствор, формируя пористую структуру полимерной плёнки [16]. По этой методике были получены плёнки из композитов ПОБ с ПЭГ со следующими исходными массовыми долями ПЭГ в начальной полимерной смеси: 10%, 20%, 30% и 50% (масса/масса) и, соответственно, мы будем условно обозначать эти образцы как ПОБ/ПЭГ10, ПОБ/ПЭГ20, ПОБ/ПЭГ30 и ПОБ/ПЭГ50.

*Метод определения ПЭГ.* Свободный ПЭГ, высвободившийся из композитов ПОБ/ПЭГ после инкубации в воде, определяли согласно [27]. Принцип метода заключается в окислении этиленгликоля йодной кислотой до формальдегида, количество которого определяется затем колориметрически по реакции с хромотроповой кислотой. К 2 мл исследуемой жидкости добавляли 0,5 мл серной кислоты и 0,3 мл раствора периодата калия. Смесь перемешивали и давали постоять 30 мин. Затем для восстановления избытка КЮ<sub>4</sub> добавляли по каплям сульфит натрия до исчезновения окраски выделившегося йода. После прибавления 2,5 мл хромотроповой кислоты пробы ставили на кипящую водяную баню. К охлаждённым растворам добавляли 2 мл воды, осторожно перемешивали и через 5 мин измеряли оптическую плотность растворов на спектрофотометре Ultrospec 1100 pro (“Amersham Biosciences Corp.”, США). Концентрации ПЭГ определяли, используя построенную калибровочную кривую.

## ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НА ПОЛИМЕРНЫХ ПЛЕНКАХ

*Атомно-силовая микроскопия.* Микрофотографии поверхности плёнок ПОБ и ПОБ/ПЭГ были получены методом атомно-силовой микроскопии. Для исследования полимерных пленок использовали атомно-силовой микроскоп Solver PRO-M (НТ-МДТ, Россия). Сканировали поверхность плёнок ПОБ/ПЭГ, сформированную на стеклянной подложке, и только контрольную плёнку из ПОБ сканировали с обеих сторон. Исследуемый кусочек плёнки размером  $\sim 2 \times 2$  мм<sup>2</sup> закрепляли на держателе двухсторонним скотчем. Сканирование проводили в полуконтактном режиме с использованием кантелеверов NSG01 (типичная жёсткость 5.1 Н/м), частота сканирования составляла 1-3 Гц, размер кадров от  $3 \times 3$  до  $20 \times 20$  мкм<sup>2</sup>.

Для описания поверхности образцов вычисляли два параметра шероховатости: средняя шероховатость и среднеквадратичная шероховатость. Эти параметры вычислялись по трем кадрам  $20 \times 20$  мкм<sup>2</sup>, в каждом кадре -  $512 \times 512$  точек. Кроме того, обычно с каждого образца были получены несколько кадров с лучшим разрешением (например,  $5 \times 5$  мкм<sup>2</sup>,  $512 \times 512$  точек) для более детального описания поверхности [19].

*Измерение контактного угла смачивания.* Гидрофильность поверхности полимерных плёнок оценивали с помощью измерения контактного угла смачивания, формирующегося между каплей воды и поверхностью полимерной плёнки, с помощью фотокамеры Canon PowerShot SX 200 IS (“Canon”, Япония) с функцией макросъёмки и программы CorelDRAW X3 (“Corel Corporation”, США). Для этой цели каплю деионизованной воды milliQ объёмом 10 мкл наносили на поверхность плёнки и затем фотографировали. Капли наносили на поверхность плёнок ПОБ/ПЭГ сформированную на стеклянной подложке, и только на контрольной плёнке из ПОБ капли наносили на обе стороны плёнки. Измерения контактного угла были проведены для 8 капель на одной поверхности при комнатной температуре; вычислялось среднее значение параметра. Визуально контактный угол смачивания можно измерить достаточно точно (с погрешностью 0,1%), но вследствие неравномерности шероховатости образцов ошибка может составлять 2-3% [4].

*Адсорбция белков.* Для анализа адсорбции белков на плёнках полимерных композитов пленки ПОБ и ПОБ/ПЭГ инкубировали в среде DMEM, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (“Invitrogen”, США) в течение 24 ч при 37°C. После инкубации образцы выдерживали в 10 mM Трис-буфере (pH 7,4), содержащем 1 mM этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и 0,1% додецилсульфата натрия (СДС) (масса/объём) при постоянном перемешивании в течение 6 ч в холодильной камере при 3-4°C. Такая процедура приводит к смыву белков, обратимо адсорбированных на поверхности полимерных плёнок [4]. Концентрацию смывшихся с плёнок в раствор белков определяли при помощи колориметрического метода количественного определения общего белка Брэдфорд с использованием набора Bradford Reagent (“Sigma-Aldrich”, США) на спектрофотометре Ultrospec 1100 pro (“Amersham Biosciences Corp.”). Экспериментальные данные представлены в виде массы адсорбированного белка на единицу (см<sup>2</sup>) поверхности полимерной плёнки [4].

*Изучение роста клеток in vitro на полимерных плёнках.* Для оценки биосовместимости пленок были использованы фибробласты зелёной мартышки линии COS-1 (“Биолот”, Россия) [28, 29]. Клетки культивировались в среде DMEM (Dubecco’s Modified Eagle Medium, “Invitrogen”) с повышенным содержанием глюкозы (4,5 г/л), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (“Invitrogen”). Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>, среду меняли каждый день. Фибробласты снимали с подложки раствором трипсина-версена (0,05% трипсин и 0,02% версен в фосфатно-солевом буфере (ФСБ)) (“Serva”, Германия) и подсчитывали с помощью камеры Горяева. По восемь образцов каждого полимера помещали в лунки 96-луночного планшета и клеточную суспензию наносили сверху на каждый образец из расчета 5000 клеток

в лунку. Полимерные плёнки композитов ПОБ/ПЭГ располагали “гладкой” стороной вверх, контрольные пленки ПОБ помещали как “гладкой”, так и шероховатой” стороной вверх. Планшеты инкубировали 24, 48, и 72 ч. Выживаемость и пролиферацию клеток контролировали с помощью теста, основанного на реакции восстановления соли тетразолиума в окрашенную в оранжевый цвет растворимую соль формазана, осуществляемую митохондриями метаболически активных клеток - интенсивность окраски пропорциональна числу метаболически активных клеток (набор реактивов ХТТ Cell Proliferation Kit, “Biological Industries”, Израиль). Через 24, 48 или 72 ч полимерные плёнки быстро и аккуратно переносили в лунки с 10 мкл свежей среды DMEM того же состава, которая использовалась для инкубации клеток. Затем добавляли по 50 мкл смеси ХТТ в каждую лунку и инкубировали при 37°C в течение 4 ч. После извлечения полимерных плёнок из лунок проводили измерения оптической плотности на планшетном спектрофотометре Zenyth 3100 Microplate Multimode Detector (“Anthos Labtec Instruments GmbH”, Австрия) при длине волны 450 нм против фонового контроля (бесклеточная культуральная среда при той же длине волны), для контроля неспецифической окраски проводили измерения при длине волны 640 нм., т.е. из данных, рассчитанных из показателей оптической плотности при длине волны 450 нм вычитались данные, рассчитанные по показателям оптической плотности при длине волны 640 нм. Количество живых клеток определяли по стандартной калибровочной прямой для теста ХТТ. Результаты представлены в виде оптической плотности. Эти данные представлены как характеристика биосовместимости *in vitro* полимерных плёнок.

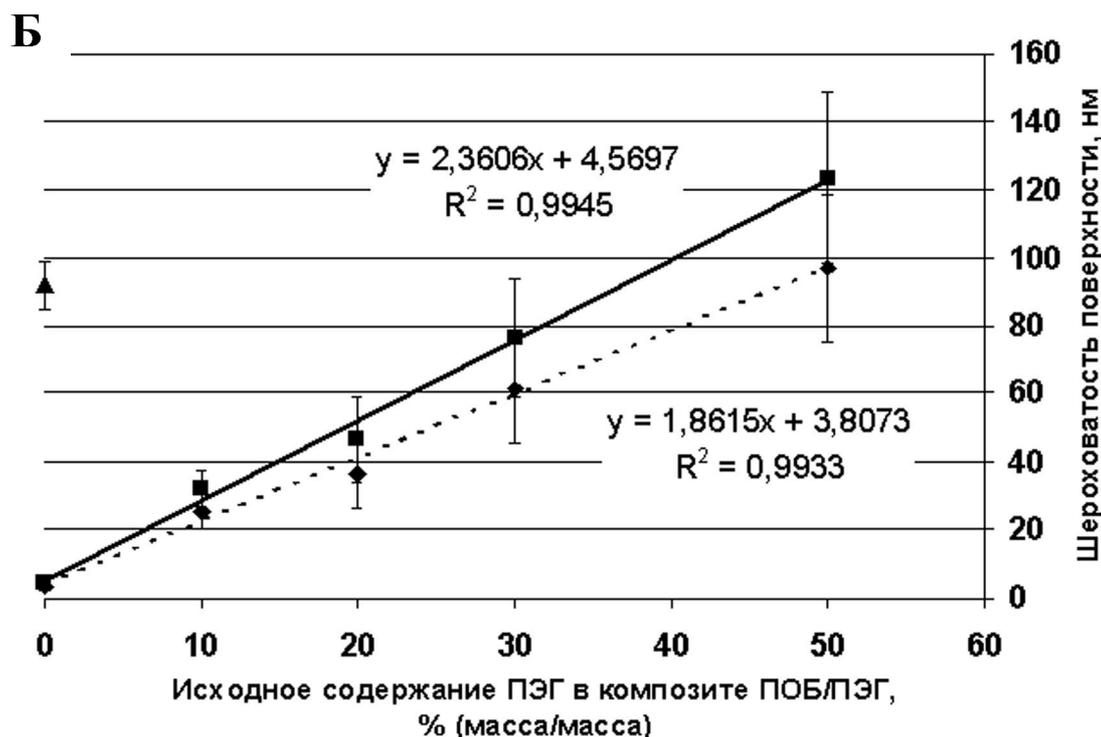
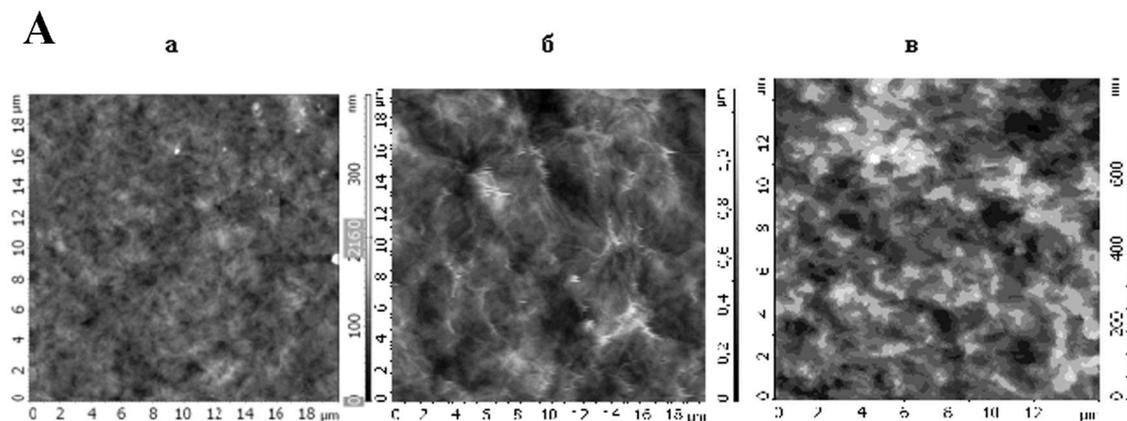
*Статистика.* Статистическая обработка данных производилась с использованием пакета программ SPSS/PC+ Statistics™ 12.1 (SPSS). После подтверждения нормального распределения полученных данных непараметрический тест Крускала-Уоллиса был использован для оценки достоверности отличий данных исследуемых образцов полимерных плёнок от контрольного образца “гладкой” поверхности плёнки ПОБ. На диаграммах данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение при уровне достоверности  $p < 0,05$ .

#### **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.**

*Шероховатость поверхности полимерных плёнок из композитов ПОБ/ПЭГ.* В качестве контрольного образца был выбран образец ПОБ с ММ = 810 кДа, полученный при формовании на стеклянной подложке из раствора полимера в хлороформе. Такой метод получения плёнок предполагает возможное различие в структуре/морфологии поверхностей, прилегающих к стеклу или обращённых к воздуху. Действительно, как это видно из рисунка 1, одна из сторон, обращённая на воздух, шероховатая (рис. 1А-в), с множеством пор глубиной 500-700 нм. Поверхность покрыта переплетающимися выступами шириной 200-400 нм и длиной 1-2,5 мкм, которые, возможно, представляют собой кристаллические области. У обратной стороны плёнки, обращённой к стеклу, (рис. 1А-а) наблюдается менее рельефная морфология, для которой характерная глубина пор составляет менее 100 нм. Таким образом, анализ шероховатости различных поверхностей одной и той же плёнки показывает, что средняя и среднеквадратичная шероховатости плоскостей, обращённых к воздуху и стеклу, отличаются приблизительно в тридцать раз. Подобные различия связаны с условиями десорбции растворителя (хлороформа) из формируемых образцов ПОБ. В случае испарения хлороформа с поверхности в окружающую воздушную среду поток растворителя формирует дополнительные каналы - поры, которые фиксируются по мере затвердевания и кристаллизации образца. В то же время, морфология ПОБ на противоположной поверхности менее подвержена воздействию транспорта растворителя и обусловлена поверхностной энергетикой (поверхностным натяжением) на границе стекло-полимер. Именно поэтому, морфология, размер пор и шероховатость поверхности, обращённой к воздуху, определяются условиями испарения растворителя, такими как температура,

## ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НА ПОЛИМЕРНЫХ ПЛЕНКАХ

скорость десорбции хлороформа, скоростью формирования кристаллических областей, препятствующих диффузии хлороформа в полимере. Напротив, при фиксированном химическом составе стеклянной матрицы (подложки) и неизменном химическом составе ПОБ энергетика поверхности стекло-полимер будет менее зависима от вышеприведенных факторов. Поэтому в этой работе мы использовали в качестве экспериментальных образцов поверхность плёнок, обращённую в сторону стекла.



**Рисунок 1.**

**А:** Изображения рельефа "гладкой" (а) и "шероховатой" (в) поверхностей плёнки из ПОБ и ПЭГ/ПОБ50 (б), полученные методом атомно-силовой микроскопии.

**Б:** Зависимость средней ( $R_a$ ) и среднеквадратичной ( $R_q$ ) шероховатости поверхности плёнок, полученных из композитов ПЭГ/ПОБ с различным исходным содержанием ПЭГ: 10, 20, 30 и 50% (масса/масса) в композитах. Квадраты и сплошная прямая аппроксимации данных с расположением формулы вверху графика относятся к средней ( $R_a$ ) шероховатости поверхности плёнок.

Ромбы и штрихованная прямая аппроксимации данных с расположением формулы внизу графика относятся к среднеквадратичной ( $R_q$ ) шероховатости поверхности плёнок. На графике присутствует также значение средней ( $R_a$ ) шероховатости "шероховатой" поверхности контрольной плёнки из ПОБ.

Исследование шероховатости “гладкой” поверхности плёнок, полученных из композитов ПОБ/ПЭГ путём вымывания последнего, показало, что методика образования композита с различным соотношением ПЭГ:ПОБ и последующим вымыванием ПЭГ позволяет регулировать шероховатость поверхности полимерных плёнок, а следовательно и пористости полимерного биоматериала. Действительно, измерение концентрации ПЭГ при отмывании композитов ПОБ/ПЭГ показало, что из композитов вымывается  $95 \pm 4\%$  ПЭГ, что свидетельствует о том, что ПЭГ-300 можно использовать как порообразователь благодаря его способности растворяться как в органических растворителях (например, в хлороформе), так и в воде [16]. Различие в шероховатости особенно хорошо видно при сравнении чистой плёнки ПОБ и модифицированной полимерной плёнки с помощью смешения с ПЭГ в соотношении 1:1 и последующем его вымывании (рис. 1А). Интересно, что “гладкая” поверхность модифицированной ПЭГ плёнки из ПОБ имеет такую же шероховатую структуру (хотя и различающуюся морфологически), что и “шероховатая” поверхность контрольной плёнки из ПОБ, близки и значения средней шероховатости этих поверхностей (рис. 1). Расчёт показателей средней и среднеквадратичной шероховатости показал, что чем больше содержание ПЭГ в его композите с ПОБ, тем больше будет шероховатость полимерных плёнок на основе ПОБ при вымывании из них ПЭГ. Причем, зависимость шероховатости полимерных плёнок от содержания ПЭГ в композите описывается линейной функцией с очень хорошей точностью (величина корреляции  $R^2$  составляет более 99%) (рис. 1Б). Если подставить значение шероховатости для “шероховатой” поверхности плёнки ПОБ в уравнение прямой на рисунке 1Б, то окажется, что для того, чтобы достичь того же значения шероховатости для “гладкой” поверхности полимерной плёнки, которая наблюдается для “шероховатой” поверхности ПОБ, необходимо изготовить композит ПОБ/ПЭГ с содержанием ПЭГ в 37%, после чего удалить ПЭГ из композита вымыванием.

*Гидрофильность поверхности пленок из композитов ПОБ/ПЭГ.* Анализ гидрофильности поверхности плёнок, полученных путём вымывания ПЭГ из композитов ПОБ/ПЭГ, с помощью измерения контактного угла смачивания показал, что как и при исследовании шероховатости, наблюдается прямая зависимость между значением контактного угла и исходным содержанием ПЭГ в композитах ПОБ/ПЭГ: чем больше массовая доля ПЭГ – тем больше контактный угол смачивания и, соответственно, гидрофобность поверхности (рис. 2). При этом контактный угол смачивания для “гладкой” поверхности контрольной плёнки ПОБ значительно выше соответствующего значения для ПОБ/ПЭГ10 ( $\theta_{\text{ПОБ(глад.)}} = 63,9 \pm 2,1^\circ$  статистически достоверно выше  $\theta_{\text{ПОБ/ПЭГ10}} = 56,0 \pm 1,6^\circ$ ,  $p < 0,05$ ), а для “шероховатой” поверхности контрольной плёнки ПОБ этот показатель гидрофобности значительно больше как соответствующего максимального значения для композитов ПОБ/ПЭГ–ПОБ/ПЭГ50 ( $\theta_{\text{ПОБ(шер.)}} = 69,7 \pm 2,0^\circ$  статистически достоверно выше  $\theta_{\text{ПОБ/ПЭГ50}} = 65,1 \pm 1,8^\circ$ ,  $p < 0,05$ ), так и контактного угла “гладкой” поверхности плёнки ПОБ ( $\theta_{\text{ПОБ(шер.)}} = 69,7 \pm 2,0^\circ$  статистически достоверно выше  $\theta_{\text{ПОБ(глад.)}} = 63,9 \pm 2,1^\circ$ ,  $p < 0,05$ ). Эти данные, во-первых, свидетельствуют о влиянии шероховатости и пористости структуры полимерной плёнки на гидрофильность её поверхности, а во-вторых, о значительном повышении гидрофильности поверхности композитов ПОБ/ПЭГ, вызванным, по-видимому, остатками неотмывшегося из композитов ПЭГ. Наблюдаемая тенденция увеличения гидрофобности поверхности при увеличении её шероховатости может быть обусловлена общими закономерностями формирования пор и укладки полимерных цепей ПОБ, как при испарении хлороформа в ходе формирования поверхности полимерной плёнки, контактирующей с воздухом, из раствора чистого ПОБ, так и при вымывании ПЭГ из композитов ПОБ/ПЭГ в водной среде. К сожалению, исследования зависимости гидрофильности поверхности полимеров от её шероховатости

## ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НА ПОЛИМЕРНЫХ ПЛЕНКАХ

были проведены в основном в работах, где шероховатость полимерной поверхности формировалась с помощью таких физико-химических методов, как ультрафиолетовое облучение или воздействие плазмой, вызывающих также и химическую модификацию полимерных макромолекул, в частности, их окисление, что неизбежно приводит к росту гидрофильности полимерной поверхности [21-24]. В случае использования таких методов рост гидрофильности поверхности полимера часто не коррелирует с изменением её шероховатости, что было показано, например, для полимолочной кислоты и её сополимера с полигликолевой кислотой [21, 22] и сополимера ПОБ с 3-оксивалератом [24]. Как было показано нами ранее, ПОБ формирует кристаллические структуры в виде ламелей нанометровой толщины [19, 30]. Морфология укладки этих ламелей при формировании пористой полимерной поверхности может одновременно влиять как на среднюю шероховатость полимерной плёнки, так и на гидрофильность её поверхности, так как гидрофильность ПОБ значительным образом зависит от его кристалличности [4], а гидрофильность кристаллических структур может быть значительно меньше гидрофильности аморфных структур [31]. Таким образом, различия в укладке полимерных ламелей ПОБ в ходе формирования поверхности полимерной плёнки различной пористости может быть причиной зависимости между шероховатостью и гидрофильностью поверхности полимерных плёнок композитов ПОБ/ПЭГ.

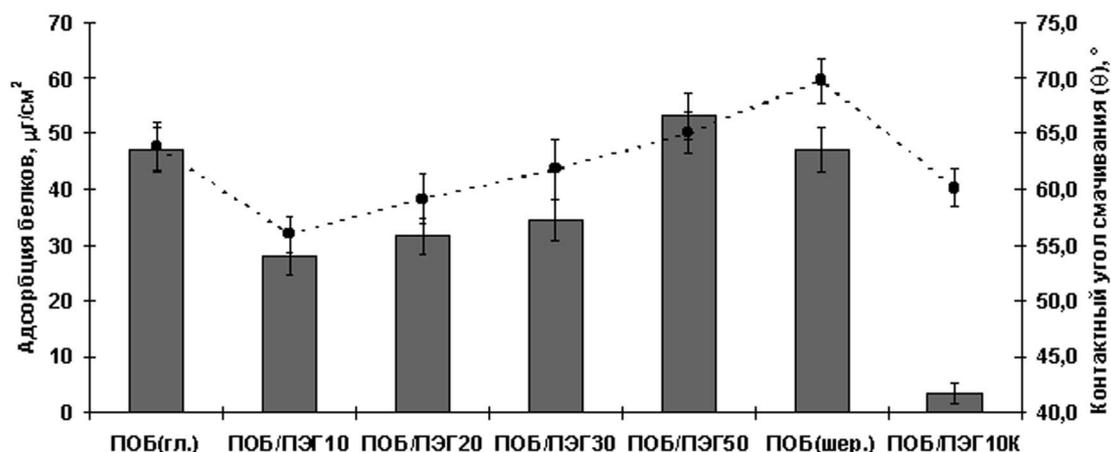


Рисунок 2.

Контактный угол смачивания (чёрные заполненные кружки; соединяющие их пунктирные линии показаны только для облегчения восприятия) и адсорбция белков фетальной телячьей сыворотки (серые столбцы) на поверхности плёнок из ПОБ и композитов ПОБ/ПЭГ с различным исходным содержанием ПЭГ (10, 20, 30, 50% (масса/масса) - ПОБ/ПЭГ10, ПОБ/ПЭГ20, ПОБ/ПЭГ30, ПОБ/ПЭГ50 соответственно на диаграмме), из которых ПЭГ был удалён отмыванием,

"гладкой" и "шероховатой" сторон контрольной пленки ПОБ (ПОБ(глад.) и ПОБ(шер.) соответственно на диаграмме, в случае адсорбции белков эти значения даны как одинаковые) и необработанного композита ПОБ/ПЭГ с содержанием ПЭГ 10% (масса/масса) (ПОБ/ПЭГ10К).

\* - статистически достоверное отличие адсорбции белков на всех плёнках от адсорбции белков на контрольной плёнке ПОБ,  $p < 0,05$  ( $n=5$ ).

*Адсорбция сывороточных белков на поверхности плёнок из композитов ПОБ/ПЭГ.* Как видно на представленной диаграмме, на адсорбцию белков на полимерных плёнках также влияет модификация ПОБ с использованием ПЭГ (рис. 2). Адсорбция белков на композитах ПОБ/ПЭГ10, ПОБ/П

и ПОб/ПЭГ30 была достоверно ниже адсорбции белков на поверхности контрольной плёнки ПОб со слабо выраженной тенденцией увеличения адсорбции белков с ростом исходного содержания ПЭГ в композитах ПОб/ПЭГ, тогда как адсорбция на плёнке ПОб/ПЭГ50 не отличалась от контроля. Адсорбция белков сыворотки крови на полимерной поверхности зависит от множества факторов: свойств адсорбируемого белка (аминокислотного состава, величины и распределения заряда, расположения и природы гидрофобных участков, изоэлектрической точки, склонности к конформационным изменениям), свойств раствора для инкубации (концентрации белка, pH, ионной силы, температуры и др.) и свойств полимерной поверхности (химической природы полимера или полимеров композита, гидрофильности/гидрофобности поверхности, пористости/шероховатости, поверхностного заряда, химической реакционной способности полимеров и др.) [17]. Однако, многими исследователями была продемонстрирована зависимость адсорбции сывороточных белков прежде всего от гидрофильности полимерной поверхности, причём при возрастании гидрофобности полимерной поверхности возрастала и адсорбция на ней белков. Так, адсорбция мажорных белков плазмы крови альбумина и фибриногена на поверхности окисленного силоксана с иммобилизованными метильными группами (контактные углы смачивания варьировали от 10° до 90°) возрастала с увеличением гидрофобности поверхности полимера. Зависит адсорбция белков и от пористости или шероховатости полимерной поверхности, так как при возрастании шероховатости увеличивается площадь адсорбционноспособной поверхности. Интересно, что в общих чертах степень адсорбции белков на различных плёнках ПОб и композитов ПОб/ПЭГ повторяет величины их контактного угла смачивания, что заставляет предполагать рост адсорбции белков с ростом гидрофобности полимерной поверхности в нашем случае и слабую зависимость адсорбции белков от шероховатости поверхности полимерных плёнок. По-видимому, гидрофобные участки, образованные неполярными цепями гомополимера ПОб связывают гидрофобные домены альбумина и других белков сыворотки крови, приводя к образованию слоя адсорбированных белков на поверхности полимерного материала [17].

*Рост клеток на поверхности плёнок из композитов ПОб/ПЭГ.* Биосовместимость полимерных плёнок оценивалась исходя из интенсивности прикрепления и роста на них фибробластов линии COS-1. На “гладкой” поверхности плёнки ПОб клетки линии COS-1 слабо прикреплялись и плохо росли, как видно из данных диаграммы, представленной на рисунке 3. Однако, даже незначительное повышение шероховатости плёнки модифицированного композита ПОб/ПЭГ10 приводило к резкому возрастанию пролиферации клеток на полимерных плёнках – более, чем в 4 раза к 3-м сут. культивирования клеток. Дальнейшее увеличение шероховатости у композитов ПОб/ПЭГ20, ПОб/ПЭГ30 и ПОб/ПЭГ50, а также “шероховатой” стороны плёнки из ПОб не приводило к статистически значимому увеличению роста клеток на полимерных плёнках. Для исследования влияния неотмывшегося ПЭГ на рост клеток был изготовлен композит ПОб/ПЭГ с содержанием ПЭГ 10% (масса/масса), который не обрабатывали с целью удаления ПЭГ. На “гладкой” поверхности плёнки из этого полимерного композита клетки росли статистически значимо хуже на 1 и 2 сут., чем на контрольном образце “гладкой” поверхности ПОб. Это может свидетельствовать об отрицательном влиянии ПЭГ-300 на жизнедеятельность культивируемых *in vitro* клеток, что было показано ранее другими исследователями [12, 13]. Кроме того, эти данные свидетельствуют об отсутствии отрицательного влияния незначительных остатков невымывшегося ПЭГ из исследуемых композитов ПЭГ/ПОб на жизнедеятельность растущих на их поверхности клеток.

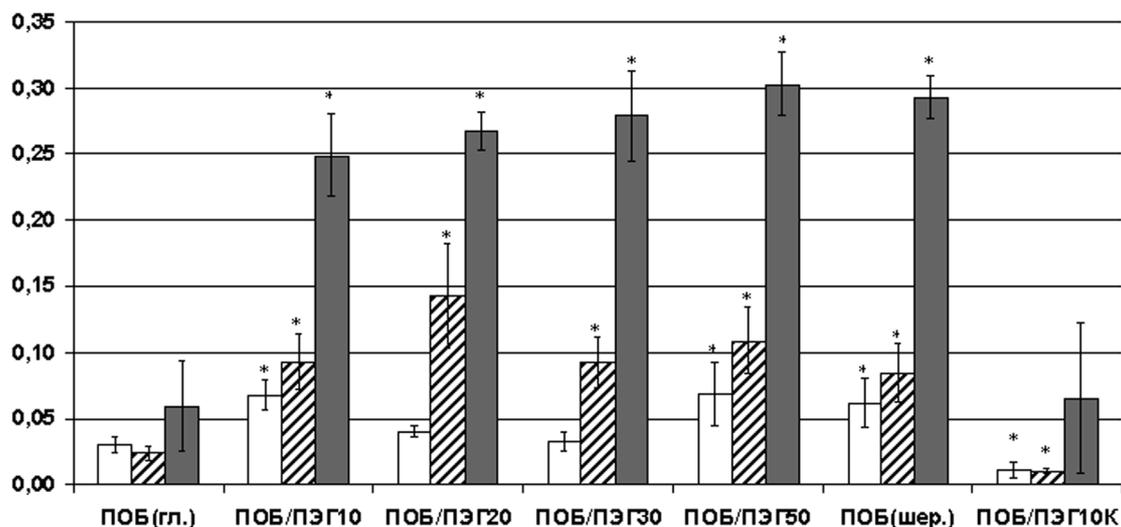


Рисунок 3.

Жизнеспособность фибробластов линии COS-1 при их культивировании в течение 1, 2 и 3 сут. (белые, штрихованные и серые столбцы, соответственно) на "гладкой" стороне плёнок из композитов ПОБ/ПЭГ с различным исходным содержанием ПЭГ (10, 20, 30, 50% (масса/масса) - ПОБ/ПЭГ10, ПОБ/ПЭГ20, ПОБ/ПЭГ30, ПОБ/ПЭГ50, соответственно, на диаграмме), из которых ПЭГ был удален отмыванием, "гладкой" и "шероховатой" сторон контрольной плёнки ПОБ (ПОБ(глад.) и ПОБ(шер.)), соответственно, на диаграмме) и необработанного композита ПОБ/ПЭГ с содержанием ПЭГ 10% (масса/масса) (ПОБ/ПЭГ10К).

\* - статистически достоверное отличие жизнеспособности клеток, растущих на всех плёнках различного времени (1, 2 или 3 сут.) от жизнеспособности клеток, растущих на "гладкой" стороне контрольной плёнки ПОБ (ПОБ(гл.)),  $p < 0,05$  ( $n=6$ ).

Для наглядного сопоставления полученных результатов на рисунке 4 представлена диаграмма, на которой приведены совокупные данные по шероховатости, гидрофильности поверхности, адсорбции белков и относительному росту клеток на плёнках на 3 сут. культивирования плёнок ПОБ и модифицированных композитов ПОБ/ПЭГ. Из диаграммы следует, что жизнеспособность и интенсивность роста фибробластов линии COS-1 на полимерных плёнках определяет взаимосвязанное влияние двух основных физико-химических свойств полимерной поверхности: шероховатости и гидрофильности. Причём, оптимальной шероховатостью для роста клеток линии COS-1 является средняя шероховатость в диапазоне от 25 до 97 нм, тогда как предельных значений контактного угла смачивания, ответственных за относительно высокую жизнеспособность клеток, не наблюдается. Ранее было показано, что различные типы клеток млекопитающих при культивировании их *in vitro* на полимерных плёнках предпочитают полимерные поверхности с различной шероховатостью. Так, фибробласты лучше прикрепляются и растут на плёнках с относительно более шероховатой поверхностью, тогда как эпителиальные клетки прикрепляются и растут только на гладких полимерных плёнках [32]. Во многих работах также показано, что гидрофильность поверхности влияет на прикрепление и рост клеток на полимерных плёнках [17, 21, 22, 24], в том числе и на плёнках из ПОБ [18, 24]. Кроме того, было показано положительное влияние образование слоя адсорбированного белка на полимерной поверхности на рост на ней клеток. В частности, фибробласты предпочитают прикрепляться и расти на полимерных поверхностях с мультислойным адсорбированным белком [17].

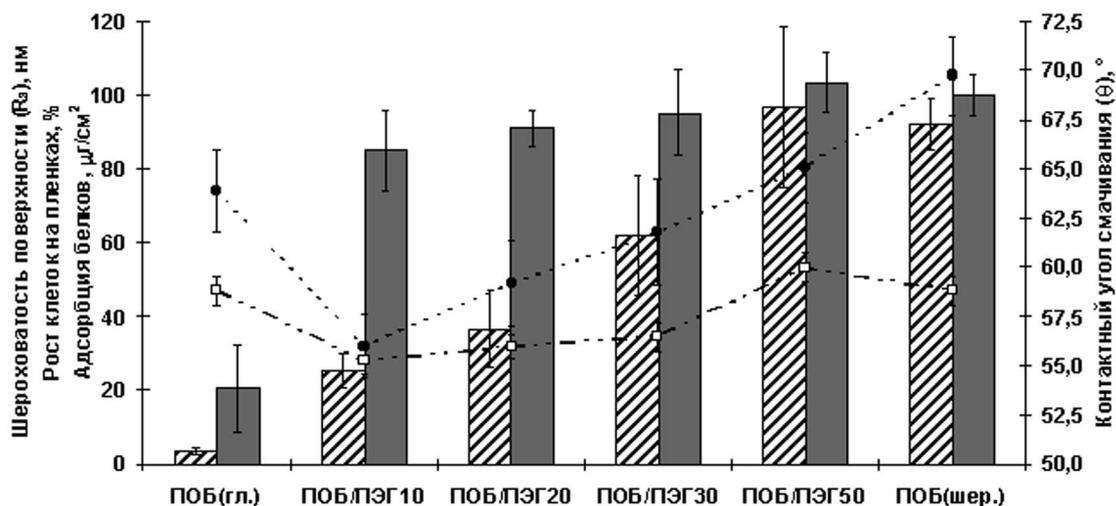


Рисунок 4.

Средняя ( $R_a$ ) шероховатость поверхности (штрихованные столбцы), жизнеспособность фибробластов линии COS-1 через 3 сут. культивирования (серые столбцы), контактный угол смачивания (чёрные заполненные кружки; соединяющие их пунктирные линии показаны только для облегчения восприятия) и адсорбция белков фетальной телячьей сыворотки (белые пустые квадраты; соединяющие их пунктирные линии показаны только для облегчения восприятия) "гладкой" поверхности пленок из композитов ПОБ/ПЭГ с различным исходным содержанием ПЭГ (10, 20, 30, 50% (масса/масса) - ПОБ/ПЭГ10, ПОБ/ПЭГ20, ПОБ/ПЭГ30, ПОБ/ПЭГ50 соответственно на диаграмме), из которых ПЭГ был удалён отмыванием, а также "гладкой" и "шероховатой" поверхностей контрольной пленки ПОБ (ПОБ(глад.) и ПОБ(шер.) соответственно на диаграмме).

Таким образом, наибольшее влияние на жизнеспособность и рост клеток на полимерных плёнках, по-видимому, оказывает шероховатость их поверхности, а уровень гидрофильности полимерной поверхности вызывает дополнительный положительный эффект на жизнеспособность прикрепившихся на плёнках клеток через посредство формирования на ней слоя адсорбированного белка. Полученные в данной работе данные можно использовать для разработки таких медицинских изделий, как хирургические заплаты и пародонтологические мембраны.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГК №№ 16.512.11.2019, П548, П1351, 14.740.11.1077, 16.740.11.0652 Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы" и ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" с использованием оборудования Центров коллективного пользования МГУ имени М.В. Ломоносова (в т.ч. в рамках Программы развития МГУ имени М.В. Ломоносова до 2020 года, н.н. 02104050001305) и Института биохимии им. А.Н. Баха РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Дженкинс М.* (ред.) (2010) Полимеры в биологии и медицине (пер. с англ.), Научный мир, Москва.
2. *Bonartsev A.P., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P.* (2011) *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, **5**, 10–21.
3. *Lu J.M., Wang X., Marin-Muller C., Wang H., Lin P.H., Yao Q., Chen C.* (2009) *Expert. Rev. Mol. Diagn.*, **9**(4), 325-341.
4. *Zheng Z., Bei F.F., Tian H.L., Chen G.Q.* (2005) *Biomaterials*, **26**, 3537-3548.
5. *Boni L.T., Hah J.S., Hui S.W., Mukherjee P., Ho J.T., Jung C.Y.* (1984) *Biochim. Biophys. Acta*, **775**, 409–418.
6. *Yamazaki M., Ito T.* (1990) *Biochemistry*, **29**, 1309–1314.
7. *Lentz B.R., Lee J.K.* (1999) *Mol. Membr. Biol.*, **16**(4), 279-296.
8. *Xiao R.Z., Zeng Z.W., Zhou G.L., Wang J.J., Li F.Z., Wang A.M.* (2010) *Int. J. Nanomedicine.*, **26**, 1057-1065.
9. *Jevsevar S., Kunstelj M., Porekar V.G.* (2010) *Biotechnol. J.*, **5**, 113-128.
10. *Cheng G., Cai Z., Wang L.* (2003) *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **14**, 1073-1078.
11. *Pan J., Li G., Chen Z., Chen X., Zhu W., Xu K.* (2009) *Biomaterials*, **30**, 2975-2984.
12. *Zanzig J., Marimuthu B., Werka J., Scholz C.* (2003) *J. Bioactive Compatible Polymers*, **18**, 339-354.
13. *Townsend K.J., Busse K., Kressler J., Scholz C.* (2005) *Biotechnol. Prog.*, **21**, 959-964.
14. *Li G., Li P., Qiu H., Li D., Su M., Xu K.* (2011) *J. Biomed. Mater. Res. A*, **98**, 88-99.
15. *Fernández-Carballido A., Pastoriza P., Barcia E., Montejo C., Negro S.* (2008) *Int. J. Pharm.*, **352**, 50-57.
16. *Oh S.H., Kim T.H., Jang S.H., Im G.I., Lee J.H.* (2011) *J. Biomed. Mater. Res A*, **97**, 441-450.
17. *Севастьянов В.И., Курпичников М.П.* (ред.) (2011) Биосовместимые материалы, ООО “Издательство “Медицинское информационное агенство””, Москва.
18. *Yang X., Zhao K., Chen G.Q.* (2002) *Biomaterials*, **23**, 1391-1397.
19. *Босхонджиев А.П., Бонарцев А.П., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Иванов Е.А., Багров Д.В., Филатова Е.В., Иорданский А.Л., Бонарцева Г.А.* (2009) *Биомед. химия*, **55**, 625-635.
20. *Giavaresi G., Tschon M., Daly J.H., Liggat J.J., Sutherland D.S., Agheli H., Fini M., Torricelli P., Giardino R.* (2006) *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **17**, 1405-1423.
21. *Biazar E., Heidari M., Asefnezhad A., Montazeri N.* (2011) *Int. J. Nanomedicine*, **6**, 631-639.
22. *Teraoka F., Nakagawa M., Hara M.* (2006) *Dent. Mater. J.*, **25**(3), 560-565.
23. *Wan Y., Qu X., Lu J., Zhu C., Wan L., Yang J., Bei J., Wang S.* (2004) *Biomaterials*, **25**, 4777-4783.
24. *Lucchesi C., Ferreira B.M., Duek E.A., Santos A.R. Jr., Joazeiro P.P.* (2008) *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **19**, 635-643.
25. *Fu Y.J., Qui H.Z., Liao K.S., Lue S.J., Hu C.C., Lee K.R., Lai J.Y.* (2010) *Langmuir*, **26**(6), 4392-4399.
26. *Мышкина В.Л., Иванов Е.А., Николаева Д.А., Махина Т.К., Бонарцев А.П., Филатова Е.В., Ружицкий А.О., Бонарцева Г.А.* (2010) *Прикл. биохим. микробиол.*, **46**(3), 1-8.
27. *Карева Л.В.* (1975) *Криобиология и Криомедицина, республиканский межведомственный сборник, из-во “Наукова Думка”, Киев, выпуск 1*, сс. 88-90.
28. *Demirel M.C., So E., Ritty T.M., Naidu S.H., Lakhtakia A.* (2007) *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, **81**, 219-223.

29. *Gizdavic-Nikolaidis M., Ray S., Bennett J.R., Easteal A.J., Cooney R.P.* (2010) *Macromol. Biosci.*, **10**, 1424-1431.
30. *Багров Д.В., Бонарцев А.П., Жаркова И.И., Иванов Е.А., Босхомджиев А.П., Махина Т.К., Филатова Е.В., Яковлев С.Г., Воинова В.В., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В.* (2011) Современные достижения бионаноскопии. Пятая международная конференция, 15-17 июня 2011, Москва, Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Сборник тезисов, с. 11-12.
31. *Kitagawa D., Yamashita I., Kobatake S.* (2011) *Chemistry*, **17**, 9825-9831.
32. *Cochran D., Simpson J., Weber H., Buser D.* (1994) *Int. J. Oral. Max. Impl.*, **9**, 289-297.

Поступила: 05. 11. 2011.

**THE EFFECT OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) MODIFICATION  
BY POLY(ETHYLENE GLYCOL) ON THE VIABILITY OF CELLS GROWN  
ON THE POLYMER FILMS**

*I.I. Zharkova<sup>1</sup>, A.P. Bonartsev<sup>1,2</sup>, A.P. Boskhomdzhev<sup>2</sup>, Yu.M. Efremov<sup>1</sup>, D.V. Bagrov<sup>1</sup>, T.K. Mahina<sup>2</sup>,  
V.L. Myshkina<sup>2</sup>, V.V. Voinova<sup>1,2</sup>, S.G. Yakovlev<sup>2</sup>, E.V. Filatova<sup>2</sup>, A.L. Zernov<sup>1</sup>, N.V. Andreeva<sup>1</sup>,  
E.A. Ivanov<sup>2</sup>, G.A. Bonartseva<sup>2</sup>, K.V. Shaitan<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory, 1-12, Moscow, 119992 Russia; tel.: (495) 930-63-06; e-mail: ant\_bonar@mail.ru

<sup>2</sup>A.N. Bah's Institute of Biochemistry, RAS, Moscow, Russia

A biodegradable polymer of bacterial origin, poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), is intensively studied as biomaterial for tissue engineering. However, factors determining its biocompatibility still require better understanding. To analyze the PHB films biocompatibility, the polymer material was modified by hydrophilic polymer, poly(ethylene glycol) 300 (PEG). The blends PHB/PEG with different PEG content (10, 20, 30 and 50%) were produced by subsequent incubation in water resulted in removal of 95% PEG. The surface roughness and hydrophilicity were studied by atomic force microscopy (AFM) and contact angle "water-polymer" measurement, respectively. The film biocompatibility on cell culture of COS-1 fibroblasts was studied *in vitro*. It was shown that both roughness and hydrophobicity are directly proportional to initial PEG content in the PHB/PEG blends. The growth rate of COS-1 fibroblasts on polymer films is determined by combination of two basic physicochemical properties of the polymer surface: the roughness and hydrophilicity. The optimal roughness required for COS-1 cells growth is the average roughness more than 25 nm, whereas the limit values of the contact angle "water-polymer" that was responsible for relatively high cell viability were not found. These data indicate that the film surface roughness had the greatest effect on the cell growth, whereas the increase in the polymer surface hydrophilicity caused the additional positive effect on viability of attached cells. Thus, the modification of PHB polymer material by PEG resulted in the improved viability of cells cultivated on the polymer films *in vitro*. The obtained data can be used for development of such medical devices as surgeon patches and periodontal membranes.

**Key words:** poly(3-hydroxybutyrate), poly(ethylene glycol), surface roughness, surface hydrophilicity, biocompatibility, COS-1.