

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ МИКРОБИОТЫ ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

Н.И. Гудовщикова

Научные руководители – к.б.н., доцент А.Г. Першина; м.н.с. В.А. Петров

Национальный исследовательский Томский политехнический университет
634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина 30, nadya_i_300194@mail.ru

На настоящий момент все больше внимания уделяется влиянию состава микробиоты – колоний симбиотических бактерий, населяющих организм, на состояние человека. Сохранение физиологических соотношений в содержании различных видов бактерий крайне важно для поддержания здоровья. При изменении состава флоры, в частности вызванного бесконтрольным приемом антибиотиков, нормальное функционирование организма нарушается. В качестве примера можно привести инфекцию *Clostridium difficile*, которая является главным возбудителем псевдомембранозного колита, тяжёлого заболевания кишечника, зачастую связанного с уничтожением кишечной микробиоты в случае нерациональной антибиотикотерапии [1].

Стандартные методы коррекции флоры включая прием про и пребиотиков не в состоянии восстановить состав микробиоты при его серьезном изменении. В последние годы в мире набирает популярность трансплантация кишечной микрофлоры от здорового донора человеку, страдающему расстройствами стула. В России впервые трансплантация микробиоты от донора к больному человеку успешно прошла в Новосибирске в ЦНМТ [2]. На сегодняшний день инфекция *Clostridium difficile* по рекомендациям FDA является прямым показанием для трансплантации микробиоты [3].

Целью данной работы является разработка методики выделения микробиоты кишечника человека для последующей её трансплантации.

При решении поставленных задач в комплексе использовались разные протоколы пробоподготовки. Для разработки методики использовали образцы кала от разных доноров, навешанных в навеске 1 г, гомогенизированных при помощи пестика и ступки в 5 мл 1% фосфатно-солевого раствора (ФСР). За основу выделения бактериальной культуры взяли метод градиентного центрифугирования, количество градиентной жидкости составляло 1,6, 3,2 и 5,0 мл. Перед нанесением пробы с бактериями

на градиент, пробу очищали от крупного мусора (различных волокон) с помощью стрейнера с размером пор 100 мкм и 70 мкм. От более мелкого мусора (кристаллов солей и т.д.) использовали метод отмывки в ФСР и осаждения бактерий центрифугированием при 5000 и 10000 g, 4 °С, 10, 15 и 30 мин. После градиентного центрифугирования (10000 g, 4 °С, 60 мин.) бактериальное кольцо отбирали и дважды отмывали в ФСР (5 мл пробы и 25 мл ФСР, центрифугирование 14000 g, 5 мин.).

Для анализа качества выделения микробиоты проводили подсчет бактерий микроскопическим методом, определяли концентрацию белка (метод Бредфорда) и ДНК.

Максимальное количество бактериальных клеток ($9,7 \cdot 10^7$ кл/мл), белка (0,30 мг/мл) и ДНК (32 мг/мл) наблюдали в образцах прошедших все степени очистки (стрейнер 100 мкм, отмывка ФСР) и при использовании более щадящего метода центрифугирования (5000 g, 15 мин.), а также наслоение на 5 мл градиентной жидкости. При более жестком центрифугировании (10000 g, 10 мин.; 5000 g, 30 мин.) концентрации клеток, белка и ДНК были низкими – $3,7 \cdot 10^7$ и $4,4 \cdot 10^7$ кл/мл, 0,10 и 0,11 мг/мл, 0,5 и 17,5 мг/мл, соответственно.

В образцах, не прошедших предварительной очистки, при микроскопировании было обнаружено большое количество волокон, микрокристаллов и других примесей, что значительно мешало подсчету клеток и определению концентрации белка и ДНК.

Для сохранения бактериальной культуры, бактерии замораживали в 20% глицерине при -20 °С и -80 °С. МТТ-тест на жизнеспособность бактерий до и после замораживания показал более высокий процент живых бактерий после заморозки при -80 °С.

Таким образом, были подобраны условия для выделения очищенной микробиоты человека, методы стандартизации количественного определения и хранения.

Список литературы

1. Loo V.G., Poirier L., Miller M.A., et al. A Predominantly Clonal Multi-Institutional Outbreak of *Clostridium difficile* –Associated Diarrhea with High Morbidity and Mortality // *N. Engl. J. Med.*, 2005.– Vol.353.– №23(8).– P.2442–2449.
2. Центр новых медицинских технологий [Электронный ресурс]: офиц. сайт. Новосибирск, 2017.– URL: <http://www.cnmt.ru> (дата обращения: 23.03.2017).
3. [www.fda.gov](https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/UCM488223.pdf) [Электронный ресурс]: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/UCM488223.pdf> (дата обращения: 23.12.2016).

РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ СКАФФОЛДОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИМОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ С МОДИФИЦИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ

Р.О. Гуляев, С.И. Горенинский, К.С. Станкевич, В.В. Лисина
 Научные руководители – д.х.н., профессор В.Д. Филимонов; к.ф.-м.н., доцент С.И Твердохлебов

Национальный исследовательский Томский политехнический университет
 634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина 30, guliaev.g2016@yandex.ru

Биоразлагаемые скаффолды на основе полимолочной кислоты (ПМК) находят широкое применение в регенеративной медицине [1]. Однако, у них есть ряд недостатков, таких как гидрофобность поверхности, малое количество реакционно-способных групп, присутствие остаточных растворителей [2]. Нанесение биополимеров, таких как, желатин позволяет увеличить гидрофильность и биосовместимость скаффолдов [3].

Целью настоящей работы является разработка и исследование физико-химических свойств биodeградируемых скаффолдов на основе полимолочной кислоты с поверхностью, модифицированной желатином.

Модифицирование скаффолда проводили с использованием ранее предложенной стратегии «растворитель/нерастворитель» [4, 5] в два этапа: вначале скаффолд размером 30×10 мм обрабатывали в течение 10 мин. смесью толуол/этанол в объемном соотношении 1/9. После чего наносили желатин из раствора желатина растворенном в натрий-фосфатном буфере (PBS)-желатин с концентрацией 0,005 мг/мл.

Время выдерживания составляло 1, 2, 3, 4 и 5 ч. после чего, полученные образцы тщательно

промывали в PBS и высушивали в вакууме течение 3 ч.

С использованием сканирующей электронной микроскопии (JEOL JCL-6000 plus) была изучена морфология скаффолда. Также было показано, что диаметр волокон образцов, выдержанных в растворе PBS-желатин увеличивается с увеличением времени выдерживания от $3,91 \pm 0,82$ до $5,30 \pm 0,64$ мкм.

Смачиваемость поверхности скаффолда исследовали методом оптической гониометрии на приборе CAM 101 наблюдали, что скаффолды с нанесенным желатином обладают большей гидрофильностью (краевой угол смачивания 0) по сравнению с чистым скаффолдом из полимолочной кислоты (краевой угол смачивания $59,20 \pm 16,6$).

Таким образом, был получен биodeградируемый скаффолд на основе полимолочной кислоты с использованием нового метода нанесения желатина. Предложенный нами метод модифицирования скаффолда не влияет на макроструктуру, но позволяет увеличить диаметр волокон. Полученные материалы обладают повышенной гидрофильностью

Список литературы

1. Ma P.X. // *Scaffolds for tissue fabrication. Mater. Today*, 2004.– Vol.7.– №5.– P.29–41.
2. Kasoju N., Bora U. // *Silk Fibroin in Tissue Engineering Adv. Healthc. Mater.*, 2012.– Vol.1.– №4.– P.393–412.
3. Yanzhong Zhang, Hongwei Ouyang, Chwee Teck Lim, Seeram Ramakrishna, Zheng-Ming Huang // *Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials*, 2005.– 156–159.
4. Ksenia Stankevich; Victor Filimonov; Alex-