

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра физики полупроводников

**«УПРАВЛЕНИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЕМ БАКТЕРИАЛЬНЫХ
КЛЕТОК МОДИФИКАЦИЕЙ ИХ ПОВЕРХНОСТИ
МУЛЬТИСЛОЙНЫМИ ПОЛИМЕРНЫМИ ПОКРЫТИЯМИ»**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 204 группы
направления 22.04.01 «Материаловедение и технологии материалов»
факультета нано- и биомедицинских технологий

Рыбкина Ярослава Андреевича

Научный руководитель

Профессор, д.х.н., доцент _____ Д.А. Горин
должность, место работы, уч. степень, уч. звание подпись, дата инициалы, фамилия

Консультант

к.б.н., с.н.с. _____ А. Лапание
должность, место работы, уч. степень, уч. звание подпись, дата инициалы, фамилия

Зав. кафедрой

Заведующий кафедрой физики полупроводников СГУ,
д.ф.-м.н., профессор _____ А.И. Михайлов
должность, место работы, уч. степень, уч. звание подпись, дата инициалы, фамилия

Саратов, 2017 год

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Всё больше и большее внимание направлено на изучение химических, физических и биологических особенностей клеточного строения, которые позволили бы увеличить эффективность использования бактериальных клеточных систем в различных медицинских и биотехнологических процессах.

Один из возможных путей является иммобилизация (фиксирование) бактериальных клеток, которая открывает широкое применение для использования в системах доставки лекарств, как новых видов носителей лекарства, биотехнологии, для увеличения выхода продукта, без вовлечения генной инженерии и для образования микроструктурированных живых систем [1]. Контроль деления клеток без вмешательства в ДНК является одним из новейших способов по контролю роста клеток и как следствие - заболеваемости. Иммобилизированные клетки имеют ряд преимуществ перед свободными клетками, такие как стабильность клеточных кластеров, легкость отделения полученных продуктов от биомассы и защита бактериальных клеток от внешних воздействий, с предотвращением последующего вымывания.

- химический;
- физический;
- механический.

Химические методы фиксации основаны на образовании ковалентных связей между носителем и реагентами [2]. Как правило, используемые реагенты токсичны для живых клеток, поэтому непосредственный контакт клеток с ними нежелателен. Для снижения этого токсического эффекта можно использовать обработку различными соединениями, предотвращающих взаимодействие с опасными веществами. В целом, для живых клеток химические методы малоприменимы и поэтому используются редко, или могут быть использованы для фиксации мертвых клеток.

Механические методы иммобилизации основаны на включении бактериальных клеток в гелевые системы и различные мембранные структуры. При включении в гели клетки оказываются заключенными в ячейки полимерной сетки, проницаемой для субстрата, но не для самих клеток.

Одним из примеров иммобилизации механическим способом является инкорпорирование бактериальных клеток в полисахаридные гели, где они сохраняют жизнеспособность в течение длительного времени и в питательной среде могут размножаться в поверхностных слоях полимера. Способность этих гелей к растворению дает возможность вести количественный учет клеток, находящихся в ячейках. Также известны способы включения бактерий в кремниевые гели [3,4], гидрогели [5], альгинатно-хитозановые комплексы [6], кальций-альгинат [7], криогели и матрицы [8] и тонкие золь-гель пленки [9]. Недостатком является то, что большинство полисахаридных гелей демонстрируют низкую механическую прочность.

Физические методы основаны на адсорбции и агрегации клеток на поверхности адсорбента [10]. В качестве адсорбентов используются различные органические и неорганические носители. Степень закрепления клеток на носителе зависит от многих факторов таких как: химическая природа адсорбента, его форма, тип используемой клеточной поверхности и условия проведения процедур иммобилизации.

Целью магистерской работы была: изучение и осуществление процесса инкапсуляции живых клеток с последующей функционализацией поверхности мультислойными покрытиями.

Для реализации данной цели были поставлены следующие задачи:

- (i) изучение изменения поверхностного потенциала для различных клеточных организмов, (ii) определение его значений в зависимости от стадии роста культуры, (iii) разработка метода покрытия с возможностью получения мало агрегированных структур, (iv) нанесения различного числа

слоев на поверхность бактериальной культуры и различной функционализацией поверхности.

Однако данные подходы имеют ряд недостатков таких как:

- трудность контроля диффузия питательных веществ;
- дезинтеграция образованных матриц;
- деградация биоальгинатных матриц;
- малая выживаемость клеточной культуры;
- трудное расположение клеток в постоянном порядке в объемной структуре;
- низкое соотношение используемой поверхности к объему.

Поэтому целесообразно разрабатывать подход, который позволит устранить данную проблему и увеличить эффективность процесса. Одним из возможных решений данной проблемы представляет метод послойной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов на поверхность бактериальных клеток.

Научная новизна 1) состоит в выявлении закономерностей между особенностями микробного роста и изменением электрофоретических свойств, которые влияют на процесс инкапсуляции 2) разработана методика по получению покрытых клеток заданной степени агрегации 3) показана выживаемость клеточной культуры после процесса инкапсуляции

Практическая значимость работы заключается в том, что разработанная методика позволяет проводить эффективную модификацию клеточной поверхности с внесением различных активных групп для увеличения эффективности технологических процессов.

Структура работы. Работа состоит из введения, двух глав, заключения, списка использованных источников. Основная часть исследования изложена на 56 страницах, текст иллюстрирован 18 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы магистерской работы, сформулирована основная цель работы, и конкретные задачи для выполнения поставленной цели.

Первая глава представляет обзор результатов современных исследований на тему магистерской работы. Анализ литературы показал, что применение дзета-потенциала не является правильным в случае применения для биологических объектов, таких как бактериальные клетки, которые имеют на поверхности ряд внеклеточных соединений: полисахариды, белки и т.п., которые изменяют проницаемость клетки для ионов. Соответственно, клетки по своей природе нельзя относить к твердым частицам. Во время клеточного роста и деления, клетки проходят ряд стадий, которые влияют на их метаболическую активность. Это влияние выражается в изменение состава, рН и температуры окружающей среды. Также, на различных стадиях роста клетки выделяют различные вещества, которые изменяют поверхностный потенциал. Также наличие мембраны и её строение вносит существенное различие в изменении электростатических свойств у микроорганизмов. Как и в других организмах, клеточная стенка бактерий обеспечивает структурную целостность клетки. В прокариотах основной функцией клеточной стенки является защитой целостности клетки от внутреннего давления, вызванного гораздо более высокими концентрациями белков и других молекул внутри клетки по сравнению с внешней средой. Стенка бактериальных клеток отличается от всех других организмов наличием пептидогликана, который расположен непосредственно вне цитоплазматической мембраны. Пептидогликан состоит из полисахаридного остова, состоящего из чередующихся остатков N-ацетилмурамовой кислоты (NAM) и N-ацетилглюкозамина (NAG) в равных количествах. Пептидогликан отвечает за жесткость стенки бактериальных клеток и за придание формы клеток. Он относительно пористый и не считается барьером проницаемости для небольших субстратов.

Тем самым, строение мембраны представляет собой сложную многомолекулярную систему. В таких системах изменение электрофоретической подвижности объектов исследования дает информацию об элеткростатических свойствах поверхности клеток. Обычно мобильность преобразуется в дзета-потенциал через уравнение Смолуховского. Это уравнение, однако, справедливо для ионно-непроницаемых твердых поверхностей и, следовательно, не должны применяться к биологическим клеткам, поверхность которых обычно покрыта ион-проницаемыми слоями, состоящие из заряженных полимеров. Ряд теоретических исследований проводились на коллоидных частицах с фактурной поверхностью в качестве модели для клеток [11-15]. Согласно полученной модели о мягких частицах измерение потенциала может применяться для исследования биологических клеток с ионно-проницаемыми слоями вокруг ядра частиц.

Вторая глава представляет методики проведения экспериментов и материалы, использованные в ходе данных экспериментов и представляет результаты, полученные в ходе выполнения экспериментов.

Выводы к главе 2:

1. Получены клеточные культуры классическими микробиологическими подходами культивации на твердых и жидких питательных средах.

2. Проведены исследования электрофоретической подвижности следующих культур: *Escherichia coli* (K12, Top 10), *Staphylococcus aureus*, *Bacillus pumils*. Подвижность определялась в диапазоне концентраций хлорида натрия 0.00062 - 0.11 М.

3. Разработан метод создания камеры, позволяющий проводить in vitro измерения культуры в режиме реального времени на конфокальном микроскопе.

4. Разработана методика инкапсуляции бактериальных клеток с минимальной степенью агрегации, основанной на промывке поверхности осажденных клеток. Рассчитан индекс полидисперсности для бактериальных

клеток, покрытых разными подходами. Разница в рассчитанных значениях составляет 2,5 раза, для клеток, покрытых с использованием классического и разработанного подхода, позволяет инкапсулировать отдельные клетки. Также, возможно получение агрегированных клеток заданных размеров, в результате изменения таких параметров нанесения как ионная сила раствора и число наносимых слоёв.

5. Измерены значения изменения оптической плотности и построены кривые для анализа стадий роста бактериальных культур.

6. Установлено, что бактериальные клетки на различных стадиях роста обладают различной электрофоретической подвижностью по причине изменения состава поверхностного слоя. Белки и полисахариды влияют на поверхностный потенциал и электростатическое взаимодействие с полимерами.

Согласно полученным расчётам, поверхностная плотность заряда является максимальной для модельной культура *E.coli* Top 10 в экспоненциальной стадии роста, которая была выбрана для нанесения полиэлектролитов. Другие виды бактериальных клеток, отличающиеся по составу стенки, такие как *Staphylococcus aureus*, имеют наибольшую плотность заряда в лаг-фазе, в то время как *E.coli* K12, со жгутиками для перемещения в средах, в стационарной фазе роста. Поэтому для модификации поверхности различных бактериальных клеток необходимо проводить оценку электрофоретических свойств, так как это влияет на качество покрытия и степень агрегации.

7. Показано, что клетки продолжают жизнедеятельность, находясь в полимерной капсуле. По мере роста клетки, целостность капсулы нарушается и возобновляется нормальный цикл деления. Но по причине механического сдерживание клеток в капсуле первый цикл деления занимает больше времени. В качестве возможного примера применения функционализации поверхности, показана модификация клеток с использованием магнитных наночастиц для управления перемещением при приложении внешнего магнитного поля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Модификация поверхности имеет огромное прикладное значение и позволяет решать задачи находящиеся в области биотехнологии, медицины, нанотехнологии и систем доставки лекарств. Имобилизованные клетки имеют ряд преимуществ перед свободными клетками, такие как стабильность клеточных кластеров, легкость отделения полученных продуктов от биомассы и защита бактериальных клеток от внешних воздействий, с предотвращением последующего вымывания. Использование теории Ошимы позволило оценить характер взаимодействия ионов с мембраной, что делает невозможным использование классического подхода для измерения дзета-потенциала. В данной работе рассматривались 4 штамма бактериальных клеток, которые меняли свои электрофоретические свойства в зависимости от стадии роста, становясь более мягкими и ионно-проницаемыми в конце жизненного цикла и более жесткими в его развитии. Выделение различных веществ, таких как белки, полисахариды и т.п. напрямую влияет на изменение параметров подвижности клеток. Правильный выбор фазы роста напрямую влияет на способность клеток к агрегации и на эффективную площадь метаболической активности бактерий. Также был разработан протокол нанесения полимеров на поверхность клетки, что позволило получать отдельные клетки или агрегаты контролируемых размеров. Покрытые клетки были помещены на питательную среду при оптимальной температуре для роста. Находясь в капсуле, бактерии получали вещества из питательной среды, через поры образованной капсулы, что дало возможность увеличиваться в размере с последующим нарушением целостности оболочки капсулы, что показало жизнеспособность бактерий и способность их к делению.

Были приведены такие примеры функционализации поверхности, как использование прокрашенных молекул для наблюдением за целостностью

капсул или использование магнитных наночастиц для управления перемещением клеток.

Благодаря полученным данным, контроль взаимодействия поверхности клеток с активными молекулами становится возможным с достижением наибольшей эффективности для решения задач, находящихся в области взаимодействия биообъектов с элементами окружающей среды.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Сайт Studbooks [Электронный ресурс]: Иммуобилизация клеток 2017. URL: http://studbooks.net/905668/meditsina/primenenie_immobilizovannyh_mikroorganizmov. - (дата обращения: 18.03.2017г.)
2. Kumar G. et al. Recent insights into the cell immobilization technology applied for dark fermentative hydrogen production //Bioresource Technology. – 2016. – Т. 219. – С. 725-737.
3. Blondeau M. et al. Correlating biological methods to assess Escherichia coli bacteria viability in silica gels //Analytical Methods. – 2014. – Т. 6. – №. 8. – С. 2429-2431.
4. Ghach W. et al. Electrochemically assisted bacteria encapsulation in thin hybrid sol–gel films //Journal of Materials Chemistry B. – 2013. – Т. 1. – №. 7. – С. 1052-1059.
5. Wang J. Y. et al. Application of hydrogel encapsulated carbonate precipitating bacteria for approaching a realistic self-healing in concrete //Construction and building materials. – 2014. – Т. 68. – С. 110-119.
6. Krasaekoopt W., Watcharapoka S. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice //LWT-Food Science and Technology. – 2014. – Т. 57. – №. 2. – С. 761-766.
7. Bekhit M. et al. Encapsulation of Lactococcus lactis subsp. lactis on alginate/pectin composite microbeads: Effect of matrix composition on bacterial survival and nisin release //Journal of Food Engineering. – 2016. – Т. 180. – С. 1-9.
8. Kuyukina M. S. et al. Survival of cryogel-immobilized Rhodococcus strains in crude oil-contaminated soil and their impact on biodegradation efficiency //International Biodeterioration & Biodegradation. – 2013. – Т. 84. – С. 118-125.

9. Ghach W. et al. Electrochemically assisted bacteria encapsulation in thin hybrid sol–gel films //Journal of Materials Chemistry B. – 2013. – T. 1. – №. 7. – C. 1052-1059.
10. Xu L. et al. Electrochemically Tunable Cell Adsorption on a Transparent and Adhesion- Switchable Superhydrophobic Polythiophene Film //Macromolecular rapid communications. – 2015. – T. 36. – №. 12. – C. 1205-1210.
11. Donath E., Pastushenko V. Electrophoretic study of cell surface properties. The influence of the surface coat on the electric potential distribution and on general electrokinetic properties of animal cells //Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry. – 1979. – T. 104. – C. 543-554.
12. Wunderlich R. W. The effects of surface structure on the electrophoretic mobilities of large particles //Journal of Colloid and Interface Science. – 1982. – T. 88. – №. 2. – C. 385-397.
13. Levine S. et al. Theory of the electrokinetic behavior of human erythrocytes //Biophysical journal. – 1983. – T. 42. – №. 2. – C. 127-135.
14. Sharp K. A., Brooks D. E. Calculation of the electrophoretic mobility of a particle bearing bound polyelectrolyte using the nonlinear Poisson-Boltzmann equation //Biophysical journal. – 1985. – T. 47. – №. 4. – C. 563-566.
15. Ohshima H., Kondo T. On the electrophoretic mobility of biological cells //Biophysical chemistry. – 1991. – T. 39. – №. 2. – C. 191-198.