

ХІМІЧНА МОДИФІКАЦІЯ ПОЗАКЛІТИННОГО МАТРИКСУ ХІТОЗАНУ ЯК ФАКТОР РЕГУЛЯЦІЇ ПРОЛІФЕРАТИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ КЛІТИННОЇ КУЛЬТУРИ

Т. Юрчук*, В. Кирошка

Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України

вул. Переяславська, 23, Харків 61015, Україна

e-mail: tais_jazz@mail.ru

У роботі досліджено індекси адгезії, проліферації та морфологічні характеристики під час культивування клітин лінії СПЕВ на біополімерних позаклітинних матрицях (БПМ) на основі хітозану та його композитів гіалуронату й альгінату натрію. Показано, що індекс адгезії клітин при культивуванні на пластику та хітозановій матриці достеменно не відрізнявся між собою, тоді як використання матриць із гіалуронату й альгінату натрію призводило до зниження даного показника. Морфологія клітин під час культивування на БПМ була представлена сферичною формою, тоді як у контролі дана клітинна лінія характеризувалася веретеноподібною формою. Індекс проліферації на БПМ на основі хітозану та його композиту з гуаліронатом натрію був у 1,5–1,7 разу нижчим щодо даного показника на пластику. Використання композиту БПМ з альгінатом натрію призводило до пригнічення проліферативних властивостей клітин.

Ключові слова: адгезія, проліферація, позаклітинний матрикс, хітозан.

Позаклітинний матрикс є основою архітектоніки тканин і органів, забезпечує контакти між клітинами, утворює механічно міцні структури, ізолює клітини і тканини одну від одної, здійснює трофічну функцію і транспорт біологічно активних речовин, а також формує шляхи міграції клітин [16]. Характер взаємодій клітин із позаклітинним матриксом визначається фізико-хімічною природою його поверхні, а саме нанотопографією, гідрофобністю, величиною та дискретністю поверхневого заряду. Одним із класів природних полімерів, які формують позаклітинний матрикс, є протеоглікани, що містять нерозгалужену мережу полісахаридів, пов'язану ковалентно з такими структурними білками, як колаген, еластин, фібронектин, ламінін [8, 13]. Унікальним природним полісахаридом є хітозан, отриманий при дезацетилюванні хітину, що містить у своїй хімічній структурі дві реакційно здатні групи: аміно- та гідроксильну. Вони можуть бути хімічно модифіковані під час створення різних синтетичних біополімерних позаклітинних матриць (БПМ). Крім того, хітозан має біосумісні та біодеградуючі показники, а також низьку токсичність і здатність посилювати регенеративні процеси під час загоєння ран [6]. У сучасних умовах інтенсивного розвитку біотехнологій матриці на основі хітозану можуть слугувати субстратами

для формування різних біологічних структур як *in vitro*, так і *in vivo*. У зв'язку з цим, вивчення механізмів взаємодії клітина-БПМ, які варіабельні за хімічним складом і топографією поверхні, є одним із актуальних напрямів у сучасній клітинній і тканинній інженерії [1, 17].

Мета даної роботи – дослідити адгезію, ріст і швидкість проліферації культури епітеліальних клітин залежно від фізико-хімічних характеристик БПМ на основі хітозану.

Матеріали та методи

У роботі використовували БПМ, синтезовані в Інституті високомолекулярних сполук РАН, м. Санкт-Петербург. Основу БПМ становив хітозан, виділений із панцирів крабів ("Біопрогресс", Росія) зі ступенем дезацетилювання 80% і молекулярною масою 160 кДа (БВМ-1). Бішарові композити хітозанових матриць отримані шляхом пошарового нанесення полігонів, що містять шар хітозану і шар гіалуронату натрію (БВМ-2) або альгінату натрію (БВМ-3).

Морфологічні й адгезивні характеристики оцінювали на перещеплюваній культурі епітеліоподібних клітин нирки ембріона свині (СПЕВ). Для культивування клітин лінії СПЕВ використовували поживне середовище DMEM F-12 (Sigma - Aldrich, США), що містить 10% ЕТС (HyClone, США), 100 од/мл пеніциліну, 100 од/мл стрептоміцину, 1,25 мг/мл гентаміцину та 0,5 мг/мл амфотерицину В (Sigma - Aldrich, США). Посівна концентрація клітин у культуральних чашках Петрі діаметром (\varnothing) 30 мм становила $1,9-2,1 \times 10^5$ клітин/мл. Заміну середовища робили кожну третю добу. Культивування клітин здійснювали в CO_2 -інкубаторі фірми Sanyo.

Зразки досліджуваних БПМ розміром $2,7 \times 2,7$ см ($7,29 \text{ см}^2$) попередньо стерилізували ультрафіолетовим випромінюванням з $\lambda=254$ нм упродовж 30 хв. Потім їх поміщали на дно культуральних чашок Петрі \varnothing 30 мм (площа дна 8 см^2) і витримували з культуральним середовищем протягом 5 хв, після чого вносили клітини для посіву. У контрольних чашках плівки були відсутні.

Індекс адгезії (прилипання) клітин лінії СПЕВ визначали через 24 год культивування за формулою $(A-B)/A \cdot 100\%$, де А – вихідна концентрація клітин в 1 мл культурального середовища, В – через 24 год культивування [5].

Швидкість проліферації культури визначали як відношення кількості клітин знятих через 1, 3 та 7 діб культивування, до кількості посіяних клітин. Концентрацію клітин підраховували стандартним методом у камері Горяєва.

Прижиттєву оцінку морфології та характеру росту моношару клітин проводили на 1, 3 і 7 добу культивування із застосуванням інвертованого мікроскопа фірми Olympus із фотокамерою Scopetek ДСМ-130Е (Китай), об'єктив 20 \times .

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою непараметричного критерію Манна-Вітні (Вілкінсона) з використанням програмного пакета Statgraphic plus for Windows (версія 2.1). Результати представлені як $M \pm m$; рівень достовірності p становив 0,05.

Результати і їхнє обговорення

Відомо, що адгезія клітин є складним енергозалежним процесом, який реалізується за допомогою комплексу пов'язаних між собою подій, а саме: зв'язування рецепторів із їхніми лігандами або субстратами, цитоскелетними перебудовами та формуванням зони фокального контакту, необхідного для взаємодії клітин з позаклітинним матриксом [2]. Адгезія клітин є одним із основних факторів, що визначає поведінку клітин на синтезованих біополімерних субстратах. Дослідження адгезивних характеристик клітин лінії СПЕВ при культивуванні на БПМ-1, БПМ-2 та БПМ-3 упродовж першої доби представлені на рис. 1. Індекс адгезії клітин на БПМ-1 становив 74%, що достовірно відрізняється від такого показника при культивуванні на пластику (76,2%). При використанні БПМ-2 і БПМ-3 індекс адгезії клітин достовірно знижувався щодо контролю до 59,6 та 51,3% відповідно.

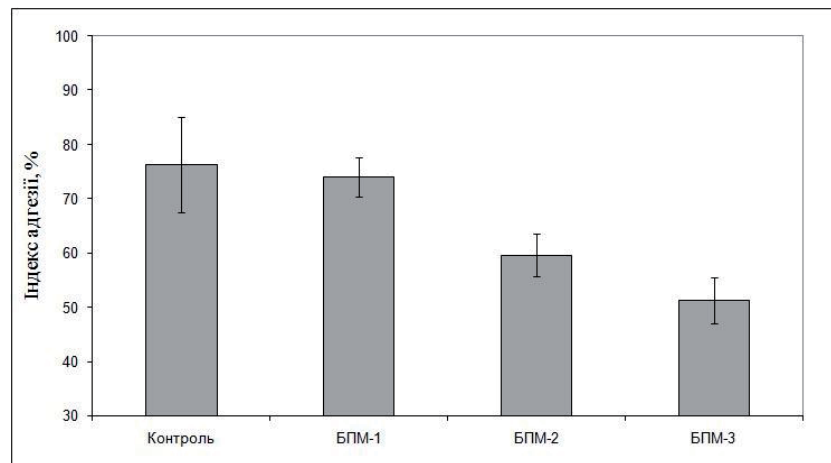


Рис. 1. Індекс адгезії клітин лінії СПЕВ на біополімерних матрицях на основі хітозану та його композитів з гіалуронатом і альгінатом натрію.

Слід зазначити (рис. 1), що за кількістю прикріплених клітин на всіх досліджуваних БПМ не було виявлено відмінностей, тоді як морфологія клітин під час культивування помітно відрізнялась (рис. 2). Так, після 1-ї доби культивування у контролі клітини мали розпластану та сплющену веретеноподібну форму (рис. 2, А), тоді як за використання БПМ-1 спостерігалися утворення двох форм клітин – веретеноподібної, розпластанної, характерної для контролю, та округлої, сферичної форми (рис. 2, Г). У разі використання БПМ-2 та БПМ-3 клітини були сферичної форми (рис. 2, Ж, К). Збільшення термінів культивування приводило до формування моношару клітин веретеноподібної форми на пластику (рис. 2, В) та утворення просторових конгломератів, що складаються з клітин округлої форми на БПМ-1, БПМ-2 (рис. 2, Е, І). Культивування клітин на БПМ-3 не призвело до утворення щільних міжклітинних контактів, характерних для клітин лінії СПЕВ протягом усього терміну

спостереження, а на 7-му добу клітинна лінія була представлена поодинокими клітинами, прикріпленими до позаклітинного субстрату (рис. 2, М).

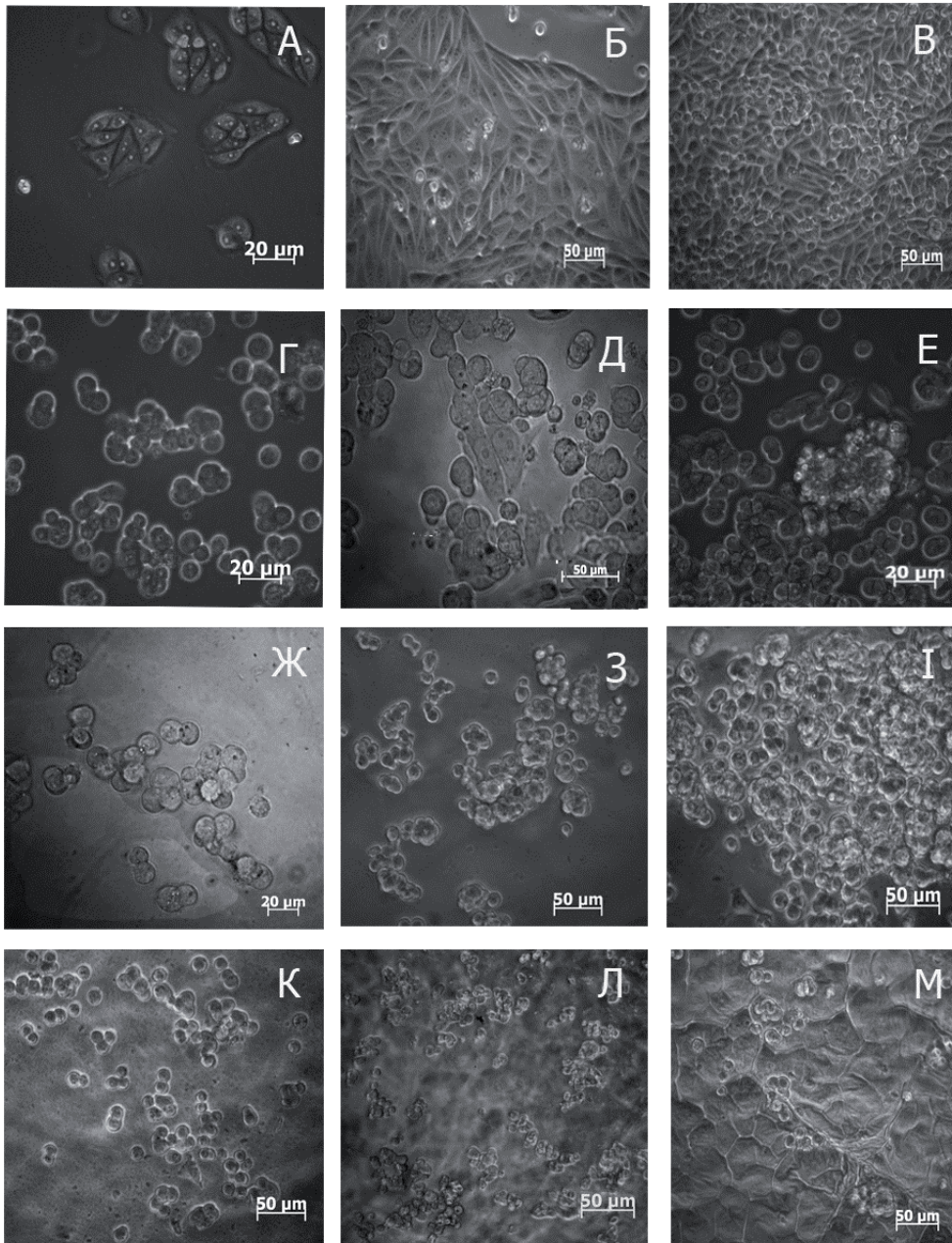


Рис. 2. Мікрофото клітин лінії СПЕВ через 1, 3 та 7 дів культивування на пластику (А-В), БПМ-1 (Г-Е), БПМ-2 (Ж-І) та БПМ-3 (К-М).

Порівняльна динаміка проліферації культури клітин на різних біополімерних матрицях представлена на рис. 3. Як випливає з рис. 3 на 7-му добу культивування індекс проліферації на БПМ-1 і БПМ-2 був у 1,5-1,7 разу нижчим щодо такого показника при культивуванні клітин на пластику, тоді як на БПМ-3 спостерігалася негативна динаміка проліферації клітин (рис. 3).

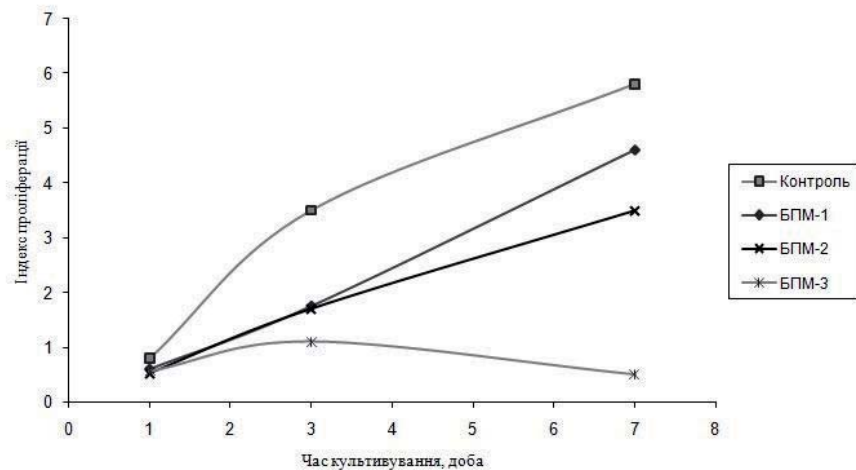


Рис. 3. Індекс проліферації клітин лінії СПЕВ при культивуванні на біополімерних матрицях на основі хітозану та його композитів з гіалуронатом і альгінатом натрію.

Представлені вище експериментальні дані дають підставу зробити висновок, що адгезія, морфологія клітин, динаміка їх проліферації та характер росту визначаються хімічною природою поверхні субстрату [18]. Так, індекс адгезії та проліферації клітин при їхньому культивуванні на пластику був достовірно вищим, ніж на БПМ-1, БПМ-2 і БПМ-3. Слід зазначити, що, незважаючи на різну хімічну структуру БПМ-1 та БПМ-2, профілі кривих динаміки росту клітин на цих субстратах мали подібний характер, тоді як культивування клітин на БПМ-3 призводило до пригнічення проліферативних властивостей культури клітин. Цей факт можна пояснити різними вихідними характеристиками полімерів (величиною поверхневого заряду, ступенем дезацетилювання хітозану, молекулярною вагою та ін.), а отже, різною гідрофобністю поверхні та локальною густиною розподілу заряду [4]. Відомо, що у процесі адгезії клітин і їх розпластування на БПМ залучені різні сили, серед яких ключову роль відіграють хімічні (як правило, це сили малого радіусу дії: Ван-дер-Ваальсові, водневі, гідрофобні тощо) та електростатичні (далекодійні) [9, 11]. Основна гіпотеза, що описує механізм адгезійної взаємодії, носить назву ДЛФО (за першими літерами прізвищ учених – Дерягин, Ландау, Фервей та Овербек [3], яка заснована на припущенні, що

між колоїдними частинками існує два типи взаємодії: Ван-дер-Ваальсова та електростатична. Однак у біологічних моделях необхідно враховувати дискретність і неоднорідність поверхневого заряду як білкових макромолекул, з одного боку, так і поверхні мембрани, з іншого. В експериментальній постановці нашої роботи поведінка клітин на БПМ, вочевидь, визначається двома основними взаємодіями: білок-біоматеріал і клітина-біоматеріал. Слід зазначити, що у випадку культивування клітин на БПМ, крім електростатичних і Ван-дер-Ваальсових сил, важливу роль відіграватимуть гідрофобні взаємодії, що виникатимуть унаслідок гідратованості поверхні білка. Отже, такі параметри поверхні БПМ як гідрофобність, величина та дискретність заряду, шорсткість визначатимуть конформацію, кількісний і якісний склад адсорбованих білкових молекул культурального середовища [12, 14]. Характер абсорбції білків на БПМ, у свою чергу, буде опосередковано впливати на їхню взаємодію з інтегриновими рецепторами мембрани, структуру фокальних контактів, а також на стан і архітектуру цитоскелета, морфологію клітини [2]. Аналізуючи дані, представлені на рис. 2, необхідно вказати на те, що при культивуванні на БПМ спостерігається утворення клітин сферичної форми, які відсутні у контролі та не є характерними для клітин лінії СПЕВ. Можна припустити, що даний факт пов'язаний з високою густиною позитивного заряду на поверхні плівки, обумовленого ступенем його дезацетилювання [15], що, у свою чергу, призводить до виникнення електростатичних взаємодій між клітинами та БПМ. Це може спричиняти обмеження у разі розпластування клітин по поверхні субстрату, а також викликати скорочення актинового цитоскелета і зменшення розміру клітин [7]. Слід зазначити, що ріст клітин на БПМ-1 спостерігається рівномірно по всій поверхні субстрату, тоді як на БПМ-2 відбувається формування зон із просторовими структурами клітин сферичної форми (рис. 2, Е, І). Це, мабуть, можна пояснити присутністю у структурі біополімеру гіалуронової кислоти (поліаніона), яка являє собою залишки D-глюкуронової кислоти і N-ацетилглюкозаміну, що чергуються. Тому неоднорідність даної поверхні залежить не тільки від величини і густини заряду, а й від його знака позитивного або ж негативного. Отже, вочевидь, у зонах поверхні субстрату БПМ-2, де переважає позитивний заряд, відзначається скупчення та зростання клітин сферичної форми, а де переважає негативний – поодинокі клітини розташовуються на значній відстані одна від одної. Виникнення такої «зональності» призводить до зниження індексу проліферації клітин на БПМ-2 (рис. 3). Відсутність позитивно заряджених аміногруп на поверхні БПМ-3 визначається наявністю у структурі поліаніона альгінату натрію. Це призводить до збільшення густини негативного заряду та виникнення сил електростатичного відштовхування між поверхнею мембрани клітини та зарядом поверхні субстрату, що пригнічує проліферацію клітин [10].

Таким чином, можна зробити висновок, що такі параметри поверхні позаклітинного субстрату як гідрофобність, величина та дискретність заряду відіграють ключову роль для характеру адгезії клітин, структури цитоскелета і морфології клітини. Підвищення густини позитивного заряду на поверхні хітозаної матриці за рахунок дезацетилювання призводить до утворення клітин сферичної форми та просторових конгломератів. Отже, дані матриці можуть бути використані як у галузі тканинної інженерії для управління ростом певного типу клітин, так і в галузі регенеративної медицини для поліпшення адгезії та проліферації клітин у зоні пошкодження органів і тканин. Застосування бішарових матриць на основі хітозану й альгінату натрію може бути ефективним при хірургічних втручаннях для зміцнення лінії анастомозів. При цьому хітозан на внутрішньому боці матриці сприятиме регенераційним процесам у зоні рани, тоді як альгінат натрію на зовнішньому боці шва, певно перешкоджатиме адгезії клітин, а отже, спайковому процесові у постоперативний період.

Висловлюємо подяку співробітникам Інституту високомолекулярних сполук РАН (м. Санкт-Петербург) с.н.с., к.х.н. Ю.О. Скорику та н.с. В.О. Петровій за надання полімерних матриць.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Панарин Е. Ф., Нудьга Л. А., Петрова В. А.* и др. Матрицы для культивирования клеток кожи человека на основе природных полисахаридов – хитина и хитозана // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2009. Т. 4. N. 3. С. 42–46.
2. *Bershadskya A. D., Ballestrema C., Carramusaa L.* et al. Assembly and mechanosensory function of focal adhesions: experiments and models // Eur. J. Cell Biol. 2006. Vol. 85. P. 165–173.
3. *Bhattacharjee S., Elimelech M., Borkovec M.* DLVO interaction between colloidal particles: Beyond Derjaguins approximation // Croatica Chimica Acta 1998. Vol. 71. N 5. P. 883–903.
4. *Chatelet C., Damour O., Domard A.* Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films // Biomaterials. 2001. Vol. 22. N 3. P. 261–268.
5. *Davis J. M.* Basic cell culture. Oxford: Univ. Press. Second ed., 2002. 381 p.
6. *Francis S. J., Matthew H.* Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review // Biomaterials. 2000. Vol. 21. N 24. P. 2589–2598.
7. *Huang Y., Onyeri S., Siewe M.* et al. *In vitro* characterization of chitosan – gelatin scaffolds for tissue engineering // Biomaterials. 2005. Vol. 26. N 36. P. 7616–7627.
8. *Le Baron R. G., Athanasiou K. A.* Extracellular matrix cell adhesion peptides: functional applications in orthopedic materials // Tissue Eng. 2000. Vol. 6. N 2. P. 85–103.

9. *McLaughlin S.* The electrostatic properties of membranes // *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 1989. Vol. 18. P.113–136.
10. *Montville R., Schaffner D. W.* Inoculum size influences bacterial cross contamination between surfaces // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. Vol. 69. N 12 P. 7188–7193.
11. *Murray D., Arbutova A., Hangyás-Mihályné G.* et al Electrostatic properties of membranes containing acidic lipids and adsorbed basic peptides : theory and experiment // *Biophys. J.* 1999. Vol. 77. N 6. P. 3176–88.
12. *Qiu Q., Sayer M., Kawaja M.* et al. Attachment, morphology, and protein expression of rat marrow stromal cells cultured on charged substrate surfaces // *J. Biomed. Mater. Res.* 1998. Vol. 42. P. 117–127.
13. *Ruoslahti E.* Proteoglycans in cell regulation // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264. P. 13369–13372.
14. *Sagvolden G., Giaever I.; Pettersen E. O.* Cell adhesion force microscopy // *J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999. Vol. 96. P. 471–476.
15. *Sorlier P., Denuzie A., Viton Ch., Domard A.* Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan // *Biomacromolecules.* 2001. Vol. 2. N 3. P. 765–772.
16. *Stevens M. M., George J. H.* Exploring and engineering the cell surface interface // *Sci.* 2005. Vol. 310. P. 1135–1138.
17. *Ueda H., Tabata Y.* Polyhydroxyalkanoate derivatives in current clinical applications and trials // *Advanced Drug Delivery Rev.* 2003. Vol. 55. N 4. P. 501–518.
18. *Van Der Mei H. C., Vries J. D., Busscher H. J.* Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of thermophilic dairy streptococci // *Appl. Environmen. Microbiol.* 1993. Vol. 59. N 12. P. 4305–4312.

Стаття: надійшла до редакції 12.05.14

доопрацьована 22.09.14

прийнята до друку 23.09.14

**CHEMICAL MODIFICATION OF BIOPOLYMER EXTRACELLULAR MATRIXES AS
PROLIFERATION REGULATE FACTOR OF CELL LINE CULTURE****T. Yurchuk, V. Kiroshka***Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine**23, Pereyaslavska St., Kharkiv 61013, Ukraine**e-mail: tais_jazz@mail.ru*

The study is due to the research of adhesion, proliferation and morphological characteristics of the cell lines SPEV cultured on biopolymer extracellular matrix (BEM) based on chitosan and its composites with hyaluronate and alginate sodium. It is shown that the index of cell adhesion didn't significantly differ among themselves during cultivation on plastic dishes and chitosan matrix, while the use chitosan composites resulted in a decrease of this indicator. The morphology of the cultivated cells on the BEM was provided a spherical shape, whereas the control cell line is characterized by the spindle form. The proliferation index based on the BEM and chitosan composite with sodium hyaluronate was 1.5–1.7 times lower than this indicator on the plastic. Using composite BEM with sodium alginate resulted in inhibition of cell proliferative properties.

Keywords: adhesion, proliferation, extracellular matrix, chitosan.

**ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА КАК ФАКТОР
РЕГУЛЯЦИИ ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ СВОЙСТВ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ****Т. Юрчук, В. Кірошка***Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины**ул. Переяславская, 23, Харьков 61015, Украина**e-mail: tais_jazz@mail.ru*

В работе исследованы индексы адгезии, пролиферации и морфологические характеристики при культивировании клеток линии СПЕВ на биополимерных внеклеточных матрицах (БВМ) на основе хитозана и его композитов гиалуроната и альгината натрия. Показано, что индекс адгезии клеток при культивировании на пластике и хитозановой матрице достоверно не отличался между собой, тогда как использование матриц с гиалуронатом и альгинатом натрия приводило к снижению данного показателя. Морфология клеток при культивировании на БВМ была представлена сферической формой, тогда как в контроле данная клеточная линия характеризовалась веретеновидной формой. Индекс пролиферации на БВМ на основе хитозана и его композита с гиалуронатом натрия был в 1,5–1,7 раза ниже данного показателя на пластике. Использование композита БВМ с альгинатом натрия приводило к угнетению пролиферативных свойств клеток.

Ключевые слова: адгезия, пролиферация, внеклеточный матрикс, хитозан.