

НАНОТЕХНОЛОГИЯ NANOTECHNOLOGY

УДК 612.115:612.085.2

Атомно-силовая микроскопия клеток фибробластов, культивируемых на коллаген-хитозановом каркасе

*Р.А. Морозов¹, А.В. Никитина², А.В. Ромашкин¹,
В.К. Неволин¹, И.А. Суетина³*

¹Национальный исследовательский университет «МИЭТ»

²ООО «НИОБИС» (г. Москва)

³НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (г. Москва)

Atomic Force Microscopy of Fibroblast Cells Cultured on Collagen-Chitosan

*R.A. Morozov¹, A.V. Nikitina², A.V. Romashkin¹,
V.K. Nevolin¹, I.A. Suetina³*

¹National Research University of Electronic Technology, Moscow

²LIC «NIOBIS», Moscow

³GU Institute of Virology. D.I. Ivanovskogo RAMS, Moscow

С применением методов атомно-силовой микроскопии исследована морфология клеточных структур, культивируемых на пленках из волокон коллагена и хитозана. Изучены особенности морфологии растущих клеток на субмикронном уровне, в частности показано, что количество жгутиков диаметром до 100 нм у клеток, выращенных на пленках из волокон коллагена и хитозана, больше, чем у контрольных образцов, выращенных на стеклянных подложках.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия; коллаген; хитозан; фибробласт; пролиферация; морфология клеток.

Using the atomic force microscopy methods the morphology of cell structures, cultivated on films from collagen and chitosan fibers, has been studied. The specific features of the growing cells morphology on a submicron level have been investigated, in particular, it has been shown that the number of the flagella of diameter up to 100 nm of the cells grown on the films from the collagen and hitosan fibers is larger than that one of the control samples, grown on glass substrates.

Keywords: atomic force microscopy; collagen; chitosan; fibroblast proliferation; cell morphology.

Введение. Фибробласты – одни из основных секреторных клеток организма, участвующих в формировании внеклеточного матрикса, репарации повреждений кожи, стимуляции роста кератиноцитов и сосудов [1]. Коллаген и эластин формируют волокнистый каркас ткани, гликозаминогликаны и фибронектин составляют ее межклеточный матрикс, фибронектин отвечает за адгезию, подвижность, дифференцировку и взаимную ориентацию клеток в ткани. Данные клетки также продуцируют и выделяют в межклеточное пространство цитокины и факторы роста, оказывающие аутокринный и паракринный эффекты. Фибробласты играют важную роль в процессах эпителизации и заживления ран. Заживление ран включает в себя несколько фаз, среди которых можно выделить следующие: воспаление, грануляция, эпителизация и в случае неполной эпителизации – образование рубца.

Клеточные каркасы из природных биополимеров способствуют более интенсивной адгезии, миграции и пролиферации клеточных культур. Это происходит путем физического взаимодействия волокон каркаса со жгутиками клеток. Данный процесс обеспечивает ускоренный рост новой ткани организма.

С позиций современной медицины важным является разработка и расширение спектра имплантируемых материалов на основе биополимерных матриксов, содержащих стимулирующие добавки, которые характеризуются биосовместимыми, биodeградируемыми свойствами и способствуют пролиферации клеток и регенерации нервных тканей [2, 3].

Эксперимент. Обсуждение результатов. На приготовленные с помощью установки аэрозольного нанесения на покровных стеклах образцы коллаген-хитозанового каркаса, а также на чистые стекла (контрольные образцы) в НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского посеяны клетки двух типов: фибробласты эмбриона человека (ФЭЧ) и клетки печени (Chang liver). Исследование образцов после культивирования в течение 48 ч показало повышение пролиферативной активности клеток на каркасе по сравнению с контрольным образцом. Затем образцы исследовались методами атомно-силовой микроскопии (АСМ) [4].

АСМ-изображение клеток ФЭЧ до и после культивации на коллаген-хитозановом каркасе представлено на рис.1.

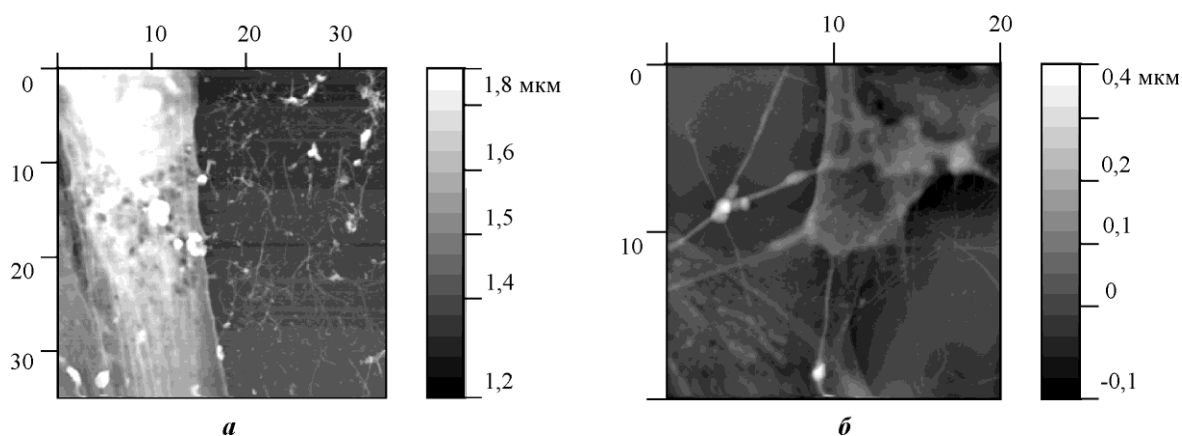


Рис.1. АСМ-изображение коллаген-хитозановой пленки до (а) и после (б) культивации клеток ФЭЧ

Из рис.1,б видно, что клетки ФЭЧ в процессе роста на каркасе поглощают волокна исходной структуры, в результате чего на образце остаются лишь отдельные волокна. Это позволяет сделать вывод о биологическом разложении материала в ходе клеточного роста.

Направленное движение клеток является ключевым событием, без которого завершение воспаления и успешная регенерация становятся абсолютно невозможными. На клеточной поверхности имеются структуры, определяющие передвижение клеток в среде. Способность к быстрому и направленному перемещению обусловлена наличием у клеток специального органа движения – жгутика. Жгутики состоят из плотно уложенных субъединиц, которые придают им спиралевидную форму. Поступательное движение клетки обуславливается вращательным движением жгутиков и существенно зависит от их количества. Таким образом, наличие большого числа отростков позволяет клетке двигаться с большей скоростью. Кроме того, этот фактор обуславливает хорошую фиксацию клеточных культур. Профиль поперечного сечения жгутиков составляет 20–40 нм, что соизмеримо с высотой волокон исходной коллаген-хитозановой структуры. Соответствие размеров благоприятно влияет на клеточную фиксацию, миграцию и рост. Условия культивирования значительно влияют на количество клеточных жгутиков. Чтобы проверить это, а также сравнить морфологию выращенных клеток, проведено АСМ-исследование ФЭЧ, культивированных на чистых покровных стеклах (рис.2).

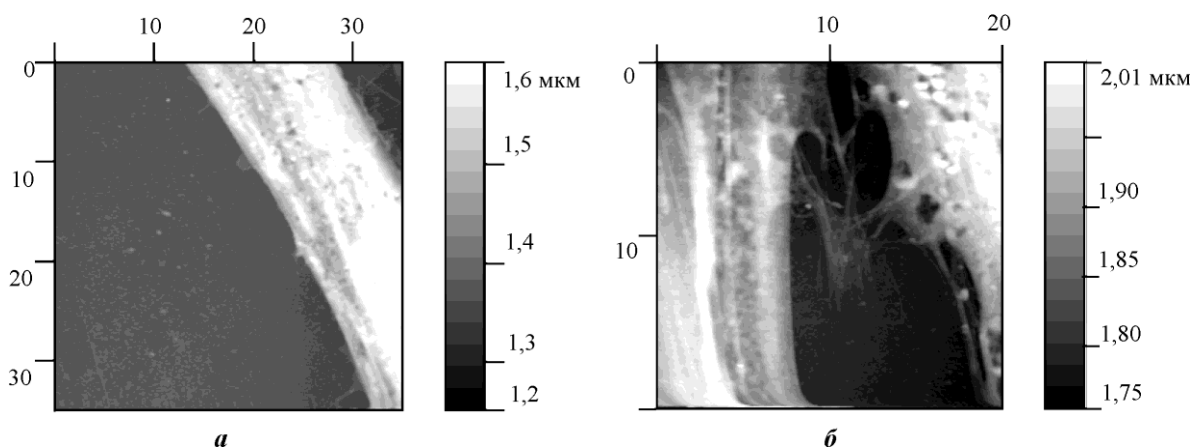


Рис.2. АСМ-изображение клеток ФЭЧ, культивированных на чистых покровных стеклах (а) и на коллаген-хитозановой пленке (б)

На АСМ-изображении видно, что количество жгутиков у выращенных на чистых покровных стеклах клеток существенно меньше, чем у ФЭЧ, культивированных на коллаген-хитозановом каркасе. Таким образом, у клеток, культивированных на волокнах, более высокая подвижность к поврежденной поверхности, а также лучше фиксация и пролиферативная активность. Поэтому можно сделать вывод, что волокна каркаса благоприятно влияют на процесс ранозаживления.

АСМ-исследования клеток печени, выращенных на коллаген-хитозановом каркасе, и клеток ФЭЧ показали похожие результаты: хорошо заметны остаточные волокна коллаген-хитозановой структуры, клетки, культивированные на каркасе, имеют большее количество отростков, чем клетки, выросшие на чистых покровных стеклах. Диаметр жгутиков клеток печени составляет 20–30 нм, что соизмеримо с рельефом коллаген-хитозановой структуры. Благодаря этому клетки лучше фиксируются и повышается их пролиферативная активность.

Средствами АСМ исследовано большое количество образцов (более 60). Проведено сравнение числа жгутиков у клеток, выращенных на каркасе, с количеством жгутиков у клеток, выращенных на контрольных образцах. Клетки ФЭЧ, выращенные на каркасе, имеют в среднем 12 жгутиков на клетку, а выросшие на контрольных образцах культуры – в среднем 5 жгутиков на клетку. Клетки печени, выращенные на каркасе, имеют 17 жгутиков на клетку, а выросшие на контрольных образцах культуры – в среднем 10 жгутиков на клетку.

Заключение. Экспериментально показано, что коллаген-хитозановый каркас является биологически эффективным для клеточного роста, фиксации и быстрого деления культур. Это свойство – одно из ключевых в процессе восстановления поврежденной ткани, так как высокая пролиферативная активность клеток способствует ускоренному ранозаживлению. Обобщая полученные данные, можно утверждать, что развитая морфологическая структура тонких слоев каркаса обеспечивает оптимальную среду для миграции и ориентированного роста клеток и позволяет при хирургических операциях ускоренно создавать новые монослои клеток, что ведет к быстрой регенерации внутренних органов в зоне репарации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 гг.» (соглашение №14.578.21.0113 от 27.10.2015 г., уникальный идентификатор RFMEFI57815X0113).

Литература

1. Characterization of chitosan films and effects on fibroblast cell attachment and proliferation / **V. Hamilton, Y. Yuan, D.A. Rigney et al.** // J. of Materials Science: Materials in Medicine. – 2006. – Vol. 17. – P. 1373–1381. – DOI 10.1007/s10856-006-0613-9/
2. **Гаврилюк В.Б., Иванов В.К., Куликов А.В., Гаврилюк Б.К.** Зависимость эффективности клеточного роста на биосинтетических медицинских материалах от микроструктуры их поверхности // Цитология. – 2013. – Т. 55. – № 8. – С. 593–596.
3. **Hakkinen K.M., Harunaga J.S., Doyle A.D., Yamada K.M.** Direct comparisons of the morphology, migration, cell adhesions, and actin cytoskeleton of fibroblasts in four different three-dimensional extracellular matrices // Tissue Engineering. P.A. – 2011. – Vol. 17. – N. 5–6. – P. 713–724.
4. **Bhanu P. Jena, Heinrich Horber J.K.** Atomic force microscopy in cell biology // Methods in Cell Biology. 2002. – 68 p. – URL: http://health120years.com/Hamlet/120_Cell-Biology_Atomic-Force.pdf (дата обращения: 22.12.2015).

Статья поступила
11 января 2016 г.

Морозов Роман Андреевич – кандидат технических наук, ведущий инженер Научно-образовательного центра «Зондовая микроскопия и нанотехнология» (НОЦ «ЗМНТ») МИЭТ. *Область научных интересов:* наноинженерия органических и биологических интегрируемых систем, нанотехнология, зондовая микроскопия.

Никитина Анна Вячеславовна – инженер ООО «НИОБИС» (г. Москва). *Область научных интересов:* наноинженерия органических и биологических интегрируемых систем, нанотехнология, зондовая микроскопия.

Ромашкин Алексей Валентинович – кандидат технических наук, ведущий инженер НОЦ «ЗМНТ» МИЭТ. *Область научных интересов:* органическая электроника, ионно-лучевое травление, нанотехнология и наноэлектроника, зондовая микроскопия.

Неволин Владимир Кириллович – доктор физико-математических наук, профессор кафедры квантовой физики и наноэлектроники, руководитель НОЦ «ЗМНТ» МИЭТ. *Область научных интересов:* зондовая микроскопия, нанотехнология и наноэлектроника. **E-mail:** vkn@miec.ru

Суетина Ирина Александровна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории культур тканей НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (г. Москва). *Область научных интересов:* изучение *in vitro* влияния различных факторов на жизнедеятельность клеточных культур, исследование вирусов и иммунопатологий.

**Информация для читателей журнала
«Известия высших учебных заведений. Электроника»**

Вы можете оформить подписку на 2016 г. в редакции с любого номера. Стоимость одного номера – 1000 руб. (с учетом всех налогов и почтовых расходов).

Адрес редакции: 124498, г. Москва, г. Зеленоград, пл. Шокина, д. 1, МИЭТ, комн. 7231.

Тел.: 8-499-734-62-05. E-mail: magazine@miec.ru

<http://www.miet.ru>