

## КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК НА МИКРОСФЕРАХ, ПОКРЫТЫХ ГИСТОНАМИ

© *О. А. Горюхина*<sup>1,\*</sup>, *С. В. Мартюшин*<sup>2</sup>, *М. И. Блинова*<sup>3</sup>, *Г. Г. Полянская*<sup>3</sup>,  
*О. А. Черепанова*<sup>3</sup>, *Г. П. Пинаев*<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Кафедра биохимии С.-Петербургского государственного университета,*

<sup>2</sup> *Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов*

*Федерального медико-биологического агентства*

*и* <sup>3</sup> *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;*

*\* электронный адрес: pushkeen@gmail.com*

Исследовали возможность использования гистонов для модификации поверхностей, предназначенных для культивирования клеток. Работу проводили на линии клеток 293 (почки эмбриона человека), трансформированных вирусом Ad5, и линии спонтанно трансформированных эмбриональных фибробластов мыши BALB/3T3 (клон А31). Анализировали взаимодействие клеток с гистонами разных типов, нанесенных на гидрофобную поверхность стекла или на декстрановые микросферы диаметром 1.0 мкм. Показано, что все исследованные гистоны обладали адгезивной способностью, но их комплексы в виде суммарного гистона и коровых гистонов оказывали наилучшее влияние на адгезию и морфологию клеток в культуре. При этом перекрестно сшитые конъюгаты гистоновых комплексов, иммобилизованные на микросферах, в большей степени способствовали формированию сети клеточных структур за счет образования межклеточных контактов и одновременного взаимодействия клеток с несколькими микросферами. Для линии клеток 293 в отличие от линии BALB/3T3 (клон А31) показано существенное увеличение пролиферативной активности через 11 сут культивирования на микросферах, покрытых перекрестно сшитыми конъюгатами гистоновых комплексов. Проведенные исследования показали, что этот субстрат может быть использован в дальнейшем при создании трехмерных пористых матриц, предназначенных для формирования в них тканеподобных клеточных структур *in vitro*.

**Ключевые слова:** гистоны, микросферы, адгезия, пролиферация культивируемых клеток.

Конец прошлого века ознаменовался интенсивным развитием клеточных технологий, направленных на лечение травм и тяжелых заболеваний человека с помощью стволовых и других клеток. В тех случаях, когда для этих целей используются нормальные клетки, выделенные из организма, их до пересадки в поврежденное место переводят в культуру, размножают и даже проводят направленную дифференцировку.

В настоящее время культивирование клеток производят повсеместно в специальных культуральных сосудах, изготовленных из полистирола, поверхность которого обрабатывают различными способами, чтобы создать на ней положительный заряд (Khademhosseini et al., 2004). Так как общий поверхностный заряд клеток отрицательный, такая обработка поверхности культуральных сосудов способствует прикреплению к ней культивируемых клеток. При культивировании в монослое прикрепившиеся клетки начинают синтезировать и секретировать в среду белки внеклеточного матрикса, которые позволяют им распластываться на субстрате и осуществлять разнообразные физиологические функции: пролиферацию, миграцию, образование межклеточных контактов и многие другие. Не все клетки легко прикрепляются к поверхности культуральных сосудов, и в этих случаях поверхность предварительно покрывают такими мажорными белками внеклеточного матрикса, как коллаген, фибронектин или лами-

нин. Взаимодействие клеток с этими белками осуществляется с помощью поверхностных адгезионных рецепторов — интегринов (Olson et al., 2000; Peterson, Burridge, 2001).

Недостатком такого способа клеточной терапии является предварительный перевод клеток из их исходного трехмерного существования в тканях живого организма в культуру, где они растут на плоских поверхностях. При этом они теряют естественное микроокружение, изменяют свою форму и функциональные способности, что сказывается на эффективности их дальнейшего участия в процессах регенерации при имплантации в поврежденные ткани.

В связи с этим в последнее время интенсивно развивается новое направление, получившее название тканевой инженерии, суть которого состоит в культивировании клеток в трехмерном пространстве, образуемом специально разработанными пористыми полимерными матрицами с целью получения тканеподобных структур для их дальнейшей трансплантации в организм человека (Minuth et al., 2005).

Большинство из разработанных к настоящему времени полимеров имеет гидрофобную поверхность, которую необходимо модифицировать для лучшего взаимодействия с ней клеток. Для этой цели пытаются использовать компоненты внеклеточного матрикса или другие адге-

живные молекулы (Hubbell, 2000; Saltzman, 2000). Однако модификация поверхности должна способствовать не только прикреплению к ней клеток, но также стимуляции их размножения и образованию межклеточных контактов.

Было обнаружено, что успешному размножению одноклеточных клеток способствует покрытие поверхности положительно заряженными белками, в частности гистонами (Mc Keehan, Nam, 1976). Кроме того, показано, что гистоны содержат гепаринсвязывающие домены, способные взаимодействовать с протеогликанами клетки, которые могут контактировать с поверхностными рецепторами и индуцировать внутриклеточные сигналы, сопровождающиеся реорганизацией цитоскелета (Cardin, Weintraub, 1989; Minuth et al., 2005).

В наших исследованиях было показано, что гистоны увеличивают проницаемость биологических мембран и опосредуют транспорт ковалентно связанных с ними веществ, которые характеризуются низкой способностью проникать через клеточные мембраны и тканевые барьеры (Мищенко, Горюхина, 1996; Горюхина, 1999, 2004; Горюхина и др., 2000). Приведенные данные позволяют предположить, что экзогенные гистоны в качестве агента, модифицирующего поверхность создаваемой матрицы, могут оказывать положительное влияние на создание тканеподобных клеточных структур.

На характер приращения клеток к субстрату и их поведение оказывает влияние не только химический состав субстрата, но и топография его поверхности, от которой будут зависеть организация и физиологическая активность формирующихся клеточных структур (Pietres et al., 2002; Suh et al., 2004; Nakanishi et al., 2008).

В качестве модели, позволяющей выявить реакцию клеток на модифицированную поверхность субстрата и его пространственную организацию, могут служить микросферы, покрытые лигандом и расположенные на поверхности культурального сосуда.

Целью настоящей работы явилось исследование адгезии, роста и морфологии клеток разного происхождения, культивируемых на поверхности культуральных сосудов, топографически модифицированной декстрановыми микросферами с иммобилизованными на их поверхности положительно заряженными гистонами.

## Материал и методика

Клеточные культуры. Использовали постоянную линию клеток 293 (почки эмбриона человека), трансформированных вирусом Ad5, и постоянную линию спонтанно трансформированных эмбриональных фибробластов мыши BALB/3T3, клон А31. Клетки получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде ДМЕМ (Биолот, Санкт-Петербург) с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Биолот, Санкт-Петербург) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). В каждую лунку 6-луночных культуральных плат, покрытых связанными с гистонами микросферами, вносили 5 · 10<sup>5</sup> клеток и выдерживали 4.5 ч в бессывороточной среде для прикрепления клеток к микросферам. Затем для дальнейшего культивирования клеток в течение от 1 до 6 сут бессывороточную среду заменяли либо средой с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, либо средой с ростовыми добавками (10 мкг/мл трансферрина, 25 мкг/мл

инсулина, 0.5 мкг/мл гидрокортизона 0.1 мкг/мл и ретиноидной кислоты). Морфологию клеток исследовали с помощью инвертированного микроскопа после фиксации препаратов метанолом и окрашивания стандартным раствором кристалл-виолета. Контролем служили клетки, посеянные на полистироловую поверхность культуральных плат.

Получение гистонов и их ковалентных конъюгатов. Препараты суммарного гистона, содержащие в своем составе гистоны H1, H2A, H2B, H3 и H4, и препараты коровьих гистонов, содержащих гистоны H2A, H2B, H3 и H4, получали из ткани тимуса телят (Горюхина и др., 1995). Препараты индивидуальных классов гистонов получали с помощью хроматографического разделения коровьих гистонов (Горюхина и др., 1995). Растворимые ковалентные конъюгаты суммарного и коровьих гистонов получали методом перекрестного связывания с помощью сшивающего агента, в качестве которого использовали диметилсуберимидат дигидрохлорид (Sigma, США) (Горюхина, 2001).

Микросферы получали на основе кристаллизованного декстрана (Schröder, 1985). Равные весовые количества декстранов с мол. массой 425—575 и 9—11 кДа (Sigma, США) растворяли в дистиллированной воде и вносили в эмульсионную среду, в качестве которой использовали хлопковое масло (Fluka, Германия). Эмульсию подвергали ультразвуковой обработке при мощности 50 Вт в течение 30 с и затем вносили в ацетон, содержащий 0.1%-ный Твин-80 (Fluka, Германия). Образовавшиеся микросферы отделяли с помощью центрифугирования, последовательно промывали ацетоном и дистиллированной водой и высушивали при комнатной температуре. Для определения формы и размера микросфер препараты микросфер из кристаллизованного декстрана исследовали с помощью электронного трансмиссионного микроскопа JEM-100 (Миронов и др., 1994).

Ковалентное связывание гистонов с микросферами. Микросферы в количестве 100 мг помещали в ацетон, осаждали с помощью центрифугирования, осадок суспендировали в 1 мл ацетона и помещали в ледяную баню. Перед иммобилизацией гистона на поверхности микросфер проводили предварительную активацию микросфер с помощью сшивающего агента бромциана (Fluka, Германия) в присутствии триэтиламина (Fluka, Германия) для связывания выделяющейся в ходе активации бромистоводородной кислоты. Для этого к суспензии микросфер добавляли 50 мг бромциана до конечной концентрации 0.42 моль/л и 0.1 мл триэтиламина до конечной концентрации 0.64 моль/л и интенсивно перемешивали в течение 2 мин. Активированные микросферы последовательно промывали ацетоном и дистиллированной водой с помощью центрифугирования и добавляли к ним 1 мл 0.1%-ного раствора суммарного гистона в PBS (137 mM NaCl, 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4, 1.5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и 267 mM KCl). Полученную суспензию инкубировали при 4 °C в течение 2 ч для связывания гистоновых белков с активированными микросферами, которые затем осаждали из суспензии с помощью центрифугирования, промывали дистиллированной водой и высушивали лиофилизацией до постоянного веса.

Определение количества белка, связанного с микросферами, осуществляли с помощью аминокислотного анализа (Lundblad, 1995). В качестве стандарта использовали препарат гистона. Оба образца гидролизуют 6 н. хлористо-водородной кислотой в герметических про-

бирках в течение 24 ч при 110 °С и после высушивания образцов до постоянного веса проводили аминокислотный анализ. Количество белка также определяли с помощью радиоактивного метода, используя йодированные гистоны, меченные [<sup>125</sup>I] (Остерман, 1983).

Покрытие поверхности субстрата микро-сферами. На поверхность 6-луночных культуральных плат (Corning Costar, США) с диаметром лунки 35 мм нанесли 10—20-кратный избыток покрытых гистонами микросфер, что составляло от 0.5 до 1.0 мг водной суспензии микросфер на 1.0 см<sup>2</sup>. Платы выдерживали в ламинарном боксе в течение ночи для полного высушивания субстрата, затем промывали PBS для удаления не связанного с субстратом материала и повторно высушивали, как описано выше. На поверхности субстрата формировался равномерный слой микросфер, который имел устойчивость к действию культуральной среды.

Анализ структуры актинового цитоскелета. Покровные стекла, обработанные Repell-Silane (Pharmacia, Biotech. Швеция) для придания поверхности гидрофобных свойств, покрывали различными типами гистонов (H1, H2B, H2A, H3, суммарным гистонам, коровым гистонам, перекрестно сшитыми конъюгатами суммарного гистона или перекрестно сшитыми конъюгатами коровых гистонов) в концентрации 20 мкг/мл и инкубировали в течение 18 ч при 4 °С с последующей отмывкой PBS для удаления не связанного с поверхностью белка. Для предотвращения неспецифического взаимодействия клеток с поверхностью стекла дополнительно покрывали 2%-ным раствором БСА (в течение 1 ч при 37 °С) с последующей отмывкой PBS. Для изучения влияния адсорбированных гистонов на структуру актинового цитоскелета клетки в концентрации 1·10<sup>5</sup> кл./мл культивировали в среде без сыворотки на покрытых различными типами гистонов покровных стеклах при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> в течение 1 ч. Затем неприкрепившиеся клетки удаляли, а прикрепившиеся к субстрату промывали PBS, фиксировали 4%-ным раствором формалина (15 мин при комнатной температуре), трижды промывали PBS, обрабатывали 0.1%-ным раствором Тритона X-100 в течение 15 мин при комнатной температуре и снова трижды отмывали PBS. Препараты окрашивали стандартным раствором родамин-фаллоидина в течение 10 мин при 37 °С, заключали в пропиленгалат и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Opton ICM (Zeiss).

Для характеристики пролиферативной активности измеряли индекс пролиферации (отношение количества клеток в данный момент к исходному количеству посеянных клеток, которое составляло 3×10<sup>5</sup> на лунку диаметром 35 мм). В каждом варианте анализировали 3 повторности. Полученные результаты статистически обрабатывали с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при вероятности нулевой гипотезы  $P < 0.01$ .

## Результаты

Для того чтобы установить, с какими из использованных в данной работе типов гистонов происходит лучшее взаимодействие культивируемых клеток, белки были нанесены на силиконизированные покровные стекла и затем на эти субстраты были посеяны клетки линий 293 и BALB/3T3. Характер взаимодействия оценивали по степени распластывания клеток на субстрате и по организа-

ции актинового цитоскелета, окрашенного родамин-фаллоидином.

Проведенные эксперименты показали, что прикрепление и распластывание клеток на всех испытанных гистонах занимают длительное время. В течение 4 ч культивирования клетки только прикреплялись к субстрату, но не распластывались на нем. Полное распластывание и формирование актинсодержащих структур завершалось к 20 ч культивирования. При этом степень распластывания и организации актинового цитоскелета зависела от типа нанесенного на стекло гистона.

По степени взаимодействия клеток с иммобилизованными белками все исследованные гистоны можно разделить на три группы.

К первой группе следует отнести гистон H1. Клетки обоих типов к нему только прикрепляются, но практически не распластываются. Актин выявляется в них только в виде мелких агрегатов, а система микрофиламентов отсутствует (рис. 1, *д*; 2, *з*).

Вторую группу составляют гистоны H2A, H2B, H3, суммарный гистон и коровые гистоны. К этим белкам клетки 293 прикрепляются и при распластывании приобретают вытянутую поляризованную форму с длинными отростками на полюсах, заполненными пучками актина, но без организованных актинсодержащих структур в цитоплазме. Фибробласты линии BALB/3T3 (клон A31) значительно лучше распластываются на субстрате с иммобилизованным суммарным гистонам и на коровых гистонах, образуя полигональную форму. На субстрате с иммобилизованным суммарным гистонам они формировали широкие ламеллы. Актиновые структуры были сосредоточены в кортикальной области и преимущественно в центральной части цитоплазмы, но типичных стресс-фибрилл среди них не наблюдали (рис. 1, *а, в, г, е, ж*; 2, *а, в*).

Третью группу представляют перекрестно сшитые конъюгаты суммарного гистона. На таком субстрате клетки линий 293 и BALB/3T3 лучше всего распластывались, соблюдая при этом типичную форму клеток для каждой линии. Клетки линии 293 имели вытянутую поляризованную форму, а BALB/3T3 — полигональную с крупными псевдоподиями, направленными в разные стороны. В этих клетках выявлялись типичные стресс-фибриллы и сети актинового структур на периферии. Кроме того, полимеризованный актин располагался в перинуклеарной области (рис. 1, *б*; 2, *б*).

Таким образом, при данных условиях эксперимента из всех испытанных гистонов в качестве субстрата наилучшими адгезивными свойствами обладал перекрестно сшитый суммарный гистон.

Вместе с тем возникал вопрос: являются ли морфология клеток, степень их распластывания и организация актинового цитоскелета результатом взаимодействия клеток именно с иммобилизованными гистонами? Известно, что приблизительно через 30 мин после посева клетки начинают синтезировать и секретировать в окружающую среду белки внеклеточного матрикса, которые как раз способствуют их распластыванию на субстрате. Ввиду того что распластывание клеток на гистонах занимало продолжительное время, необходимо было выяснить, являются ли отмеченные характеристики прикрепленных к субстрату клеток результатом их взаимодействия именно с гистонами.

Поэтому в следующей серии экспериментов прикрепление и распластывание клеток линии 293, которые хуже

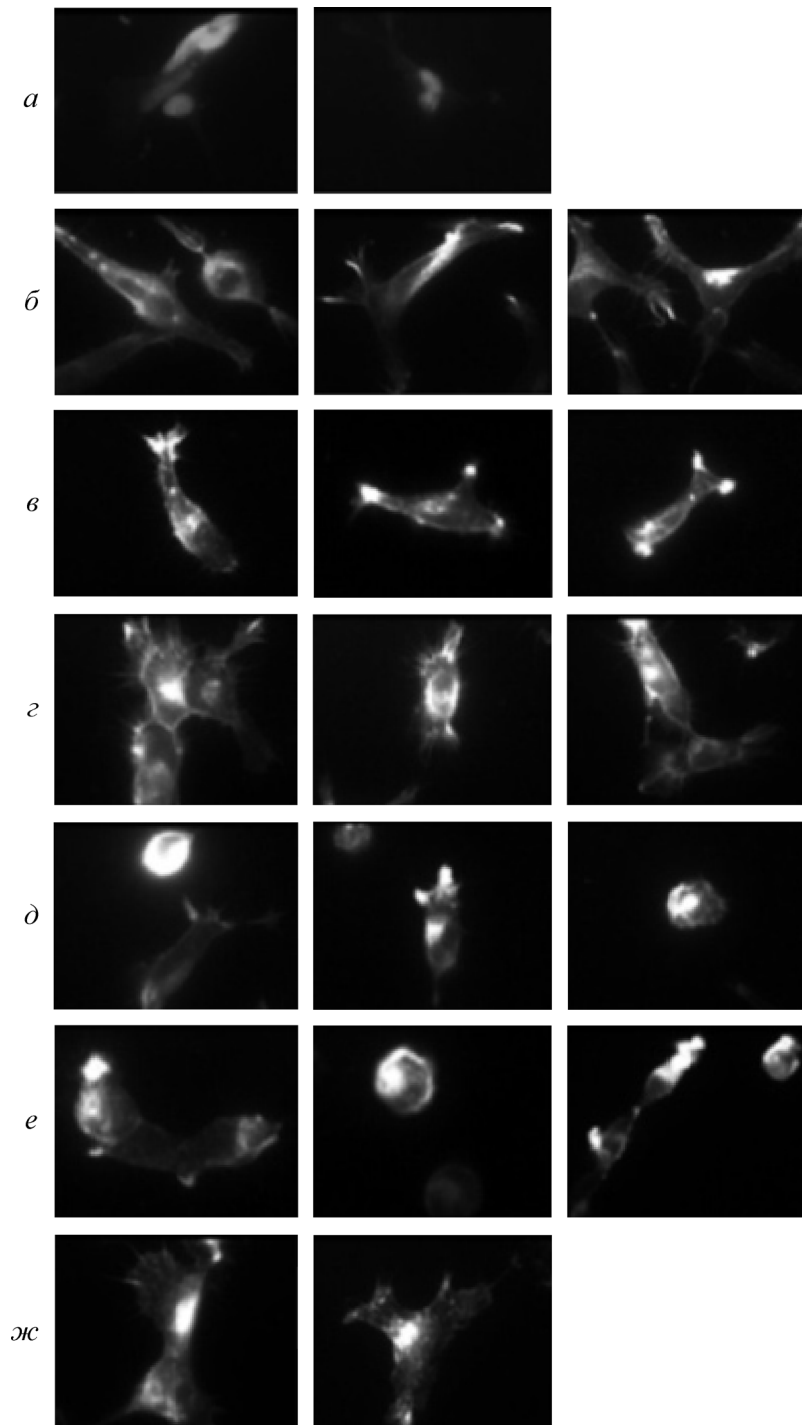


Рис. 1. Организация актинового цитоскелета клеток 293, распластанных на субстратах, покрытых суммарным гистонам (*a*), перекрестно сшитыми конъюгатами суммарного гистона (*б*), коровыми гистонами (*в*), гистонам H2B (*г*), гистонам H1 (*д*), гистонам H2A (*е*) или гистонам H3 (*ж*).

Об. 100×.

взаимодействуют с субстратом, проводили в присутствии циклогексимида — ингибитора синтеза белков. Проведенные эксперименты продемонстрировали, что в этих условиях взаимодействие клеток со всеми тремя группами гистонов, даже с гистонам H1, было значительно более эффективным (рис. 3, *a—д*). При сохранении типичной для них морфологии они были значительно более распластаны на субстрате и в цитоплазме формировалось большее количество актиновых структур. Из этих резуль-

татов следует, что характер взаимодействия клеток с субстратом, выявленный в предыдущих экспериментах, определяется их контактом именно с нанесенными гистонами. Поскольку известно, что экзогенные гистоны являются мембраноактивными агентами, в дальнейших экспериментах проводили их ковалентную иммобилизацию на микросферах, для того чтобы исключить непосредственное влияние гистонов на клетки в процессе длительного культивирования.

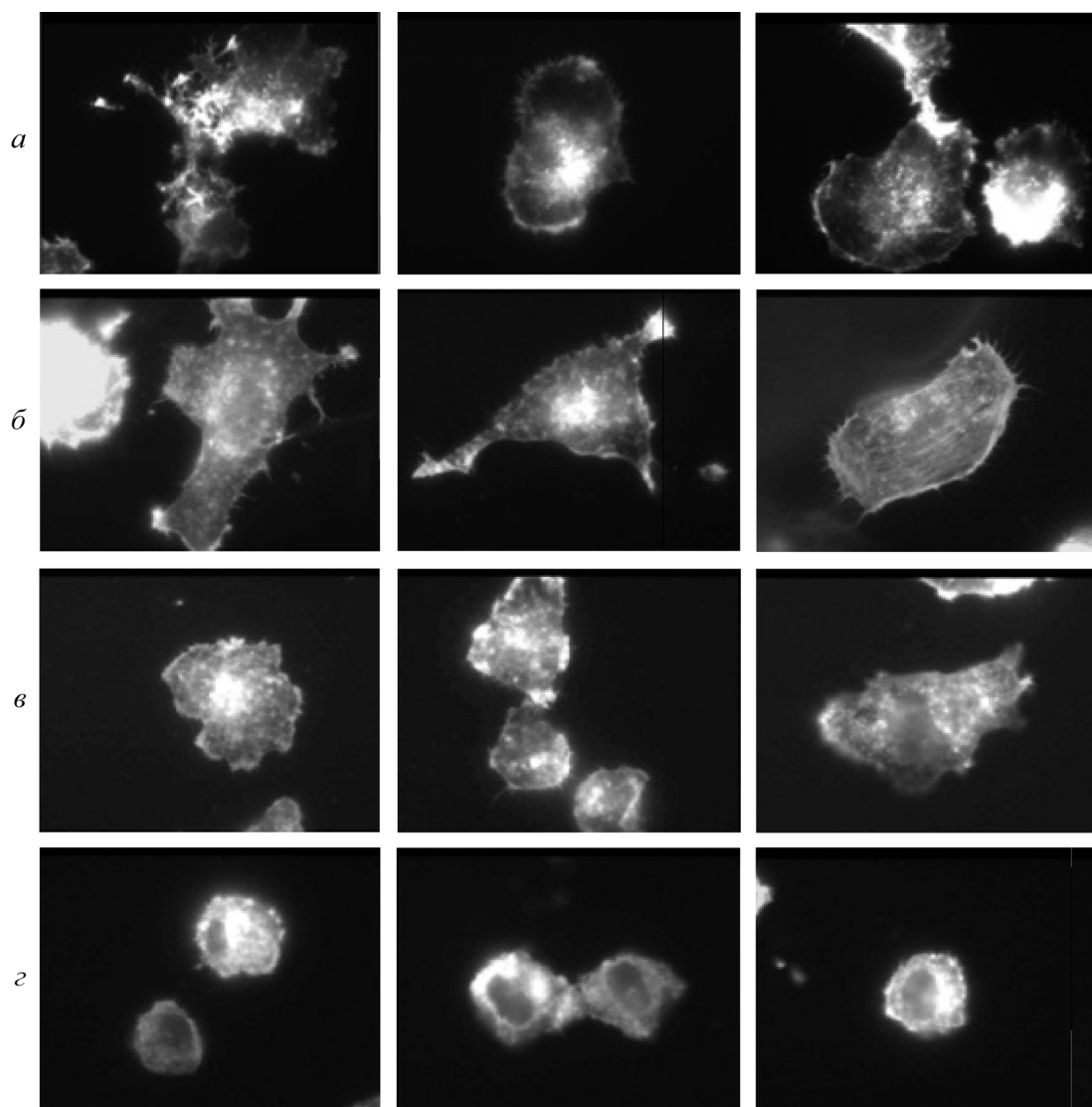


Рис. 2. Организация актинового цитоскелета клеток BALB/3T3 (клон А31), распластанных на субстратах, покрытых суммарным гистонами (а), перекрестно сшитыми конъюгатами суммарного гистона (б), коровыми гистонами (в) или гистонами H1 (г).

Об. 100×.

Последующие эксперименты были посвящены получению биосовместимых микросфер из кристаллизованного декстрана и анализу распределения на поверхности покровного стекла микросфер, ковалентно связанных с гистонами. Результаты, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии, показывают, что микросферы со средним диаметром 1.0 мкм равномерно распределяются на субстрате с образованием небольших конгломератов, расположенных на оптимальных расстояниях друг от друга, не превышающих размеры культивируемых клеток (рис. 4, а). При большем увеличении можно видеть, что в образующихся группах микросферы в основном не примыкают плотно друг к другу, между ними сохраняются тонкие промежутки (рис. 4, б). На фотографии, сделанной под углом к плоскости стекла, отчетливо видно, что микросферы, прикрепившиеся к поверхности, образуют рельефную ячеистую сеть, напоминающую пористые матрицы, которые создают из искусственных полимерных материалов (рис. 4, в). Таким образом, с помощью микросфер, нанесенных таким способом на поверхность культурального сосуда, можно мо-

делировать поведение культивируемых клеток в трехмерном пространстве. В связи с тем что гистоны ковалентно связаны с декстраном, они не могут ни переходить в питательную среду, ни интернализироваться клетками.

Для ковалентной иммобилизации гистонов на поверхности микросфер использовали следующие типы белков: суммарный гистон, коровые гистоны, перекрестно сшитые конъюгаты суммарного гистона и перекрестно сшитые конъюгаты коровых гистонов. Количество ковалентно связанного белка с 1 г сухого веса микросфер для суммарного и коровых гистонов составляет  $(180-190) \pm 5$  мкг, что соответствует 5.8 пкмоль на  $1 \text{ cm}^2$  поверхности микросфер, а для ковалентных конъюгатов этих белков —  $(50-60) \pm 5$  мкг и 1.9 пкмоль соответственно. Известно, что количество адгезивного белка на поверхности субстрата, достаточное для инициации и стабилизации прикрепления клеток, лежит в пределах от 0.01 до 100 пкмоль на  $1 \text{ cm}^2$  поверхности субстрата (для белков с мол. массой 100 кДа). Кроме того, при взаимодействии клетки с субстратом только 0.001 % общей площади поверхности клетки участвует во взаимодействии (Vitte et

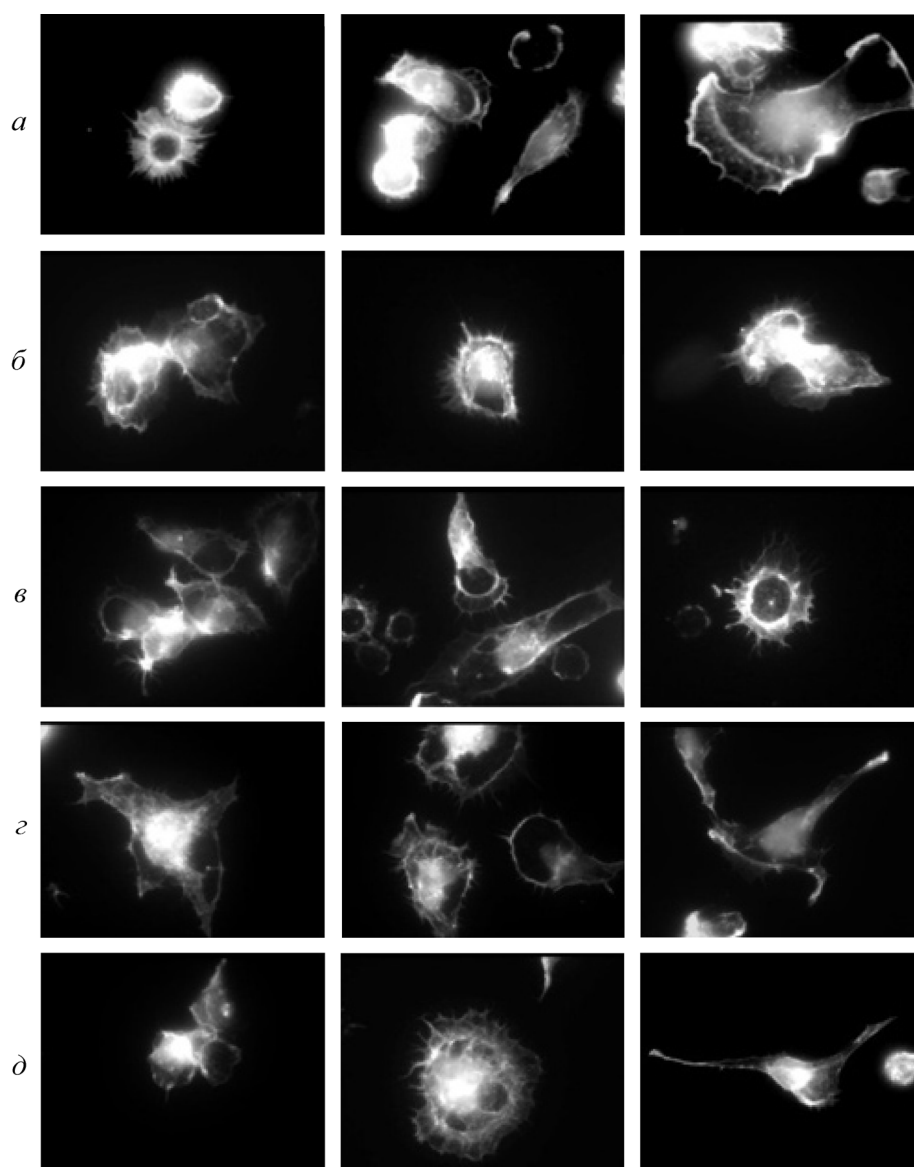


Рис. 3. Организация актинового цитоскелета клеток 293, распластанных в присутствии циклогексимида на субстратах, покрытых суммарным гистонном (*a*), перекрестно сшитыми конъюгатами суммарного гистона (*б*), коровыми гистонами (*в*), гистонном H2B (*г*) или гистонном H1 (*д*).

Об. 100×.

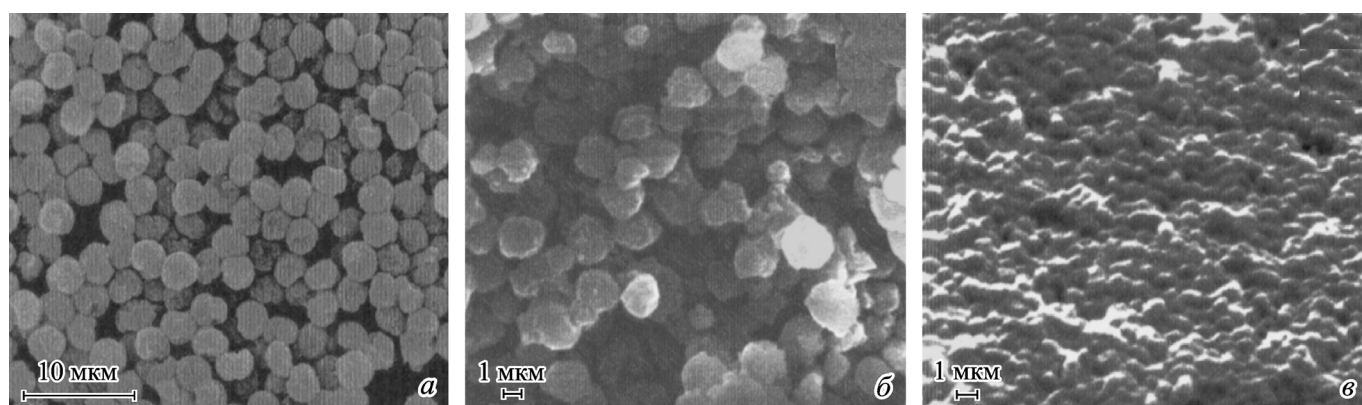


Рис. 4. Сканирующая электронная микроскопия микросфер из кристаллизованного декстрана, ковалентно связанных с суммарным гистонном.

*a*, *б* — адсорбция на поверхности стекла; *в* — вид под углом к плоскости стекла.

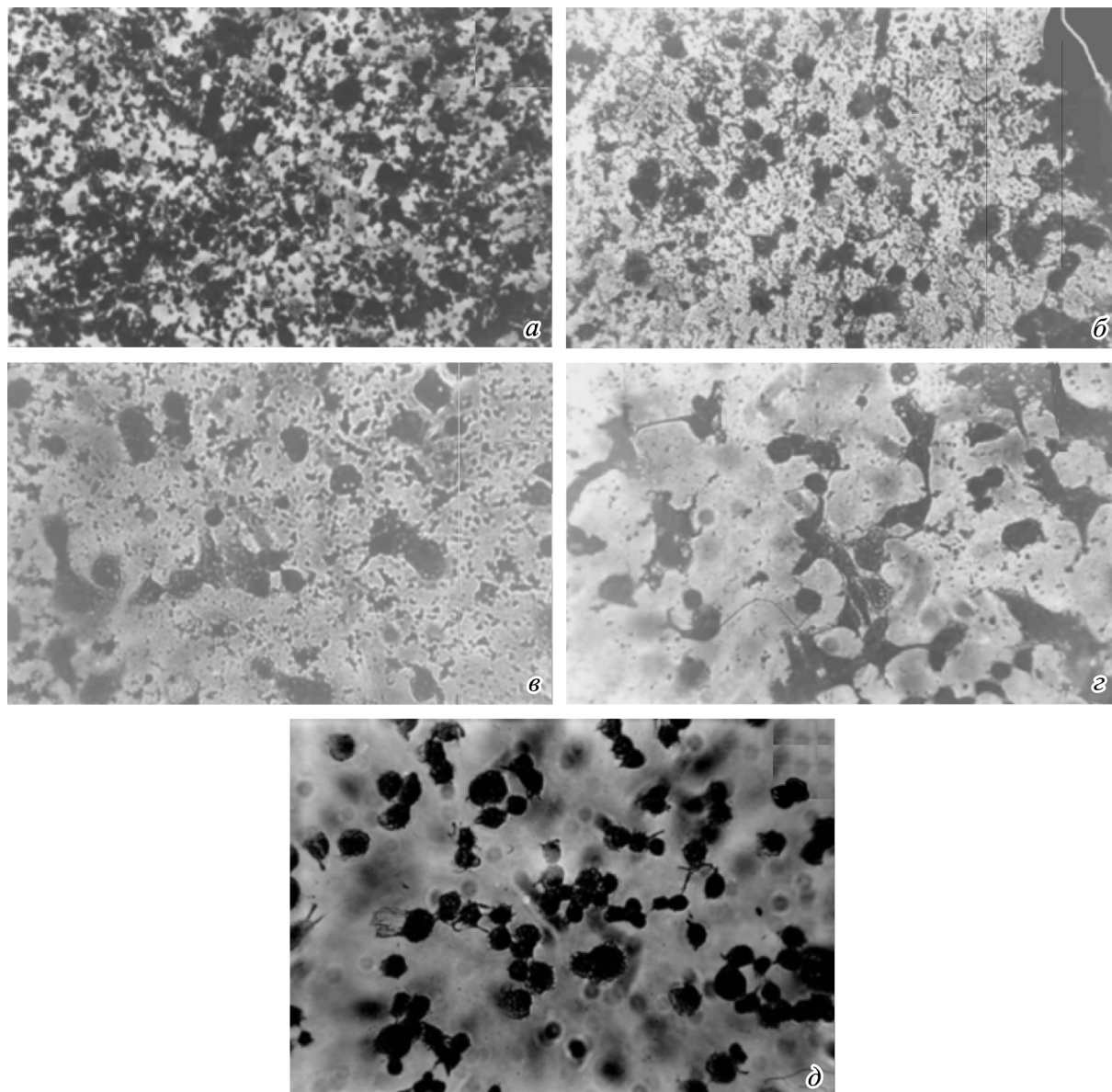


Рис. 5. Прикрепление и распластывание клеток 293 на субстратах, покрытых микросферами, ковалентно связанными с суммарным гистоном (а), перекрестно сшитыми конъюгатами суммарного гистона (б), коровыми гистонами (в), перекрестно сшитыми конъюгатами коровых гистонов (г), и на полистироловой поверхности (д, контроль).

Об. 100×.

al., 2004). Эти данные показывают, что в ковалентное связывание гистонов с поверхностью микросфер вовлечена лишь незначительная доля присоединяемых белков. Это обусловлено тем, что при рН 9—10 ковалентное связывание полисахаридов с белками ограничено. При этом количество ковалентно связанного с поверхностью микросфер суммарного гистона и коровых гистонов в 3 раза больше, чем их перекрестно сшитых ковалентных конъюгатов. Это обусловлено тем, что в белковых конъюгатах снижено количество аминогрупп, доступных для связывания и вовлеченных в формирование гистоновых димеров, доля которых в конъюгатах обоих типов гистонов составляет 90 % (Горюхина, 1999, 2001).

Следующим этапом настоящего исследования были анализ взаимодействия клеток с поверхностью субстрата, топографически модифицированной микросферами, и оценка скорости роста клеток на этом субстрате. Для по-

крытия микросфер в этих экспериментах использовали вышеперечисленные типы гистонов.

При сопоставлении взаимодействия клеток линии 293 с микросферами, покрытыми суммарным гистоном и перекрестно сшитыми конъюгатами того же гистона, легко можно заметить, что и в том и в другом случае клетки равномерно распределены на слое нанесенных микросфер (рис. 5, а, б). Тем не менее с микросферами, покрытыми перекрестно сшитым суммарным гистоном, выявляется большое количество клеток, образующих длинные тонкие отростки. Клетки в этом случае имеют более плотные межклеточные контакты и формируют плотные кластеры, чего не наблюдается в первом случае. Там образовавшиеся, но более мелкие кластеры клеток плохо взаимодействуют между собой.

Аналогичная картина наблюдается и при сравнении взаимодействия этих же клеток на микросферах, покры-

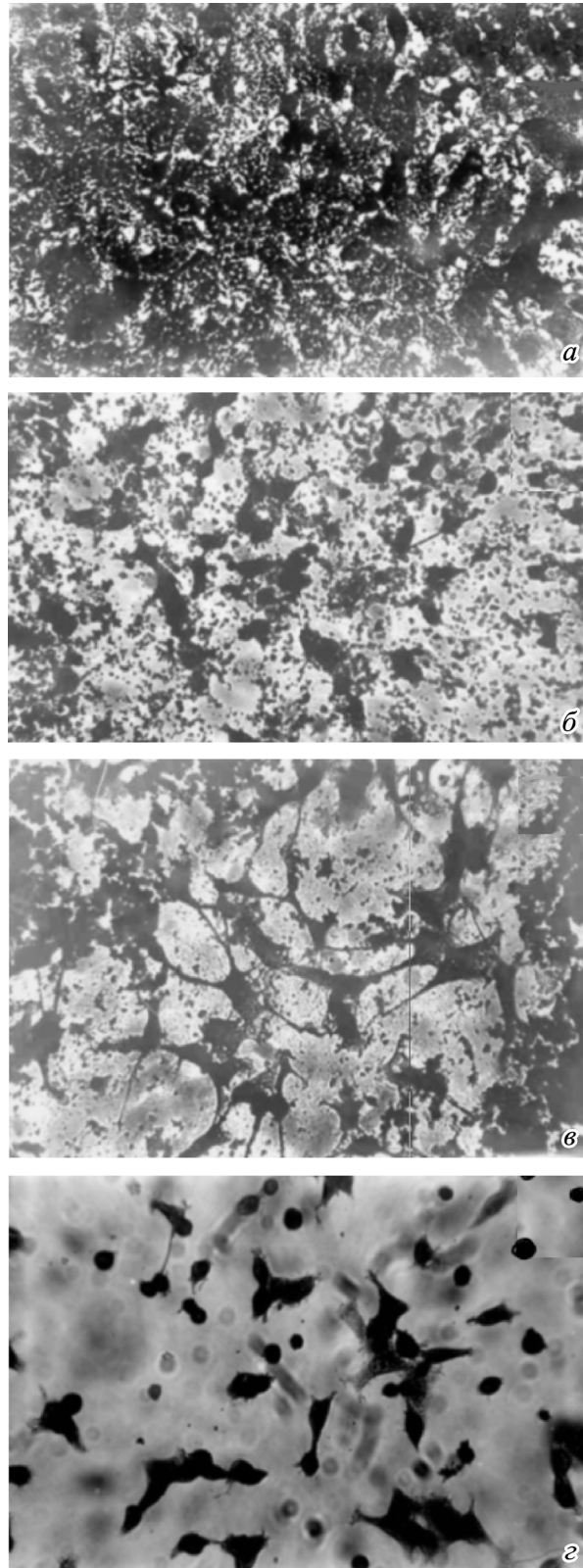


Рис. 6. Прикрепление и распластывание клеток VALB/3T3 (клон А31) на субстратах, покрытых микросферами, ковалентно связанными с суммарным гистонам (*а*), коровыми гистонами (*б*), перекрестно сшитыми конъюгатами суммарного гистона (*в*), и на полистироловой поверхности (*г*, контроль).



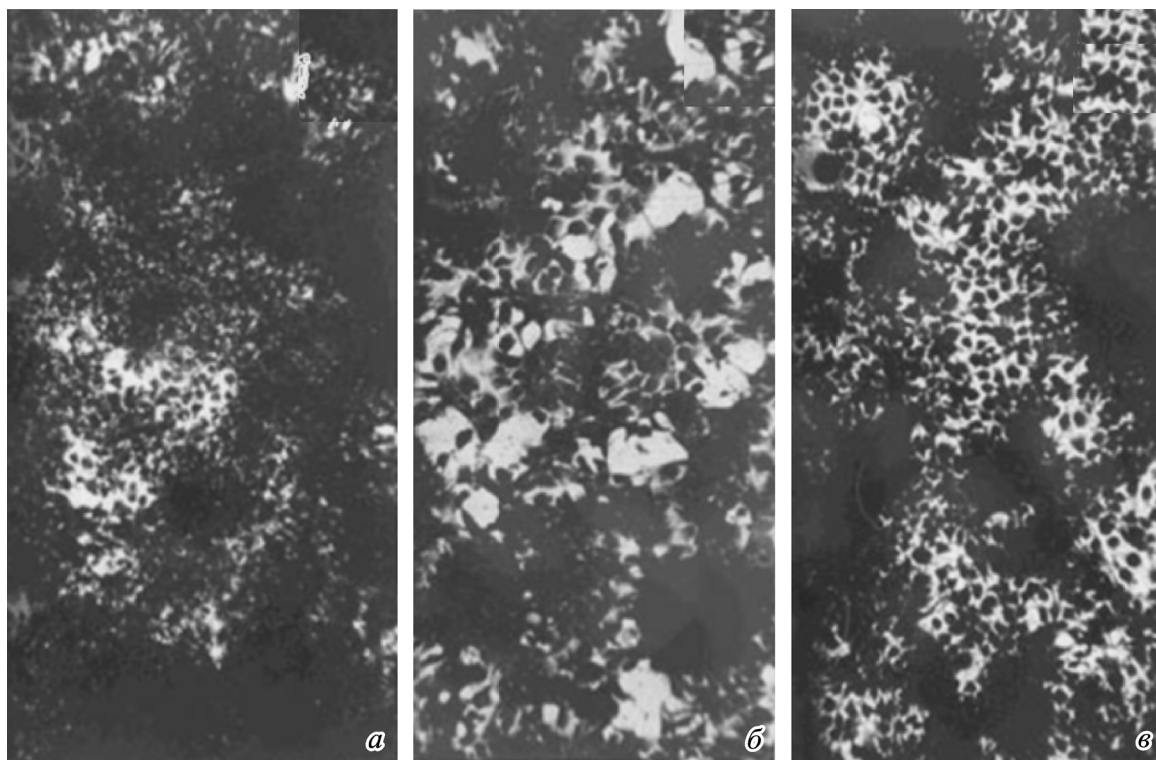


Рис. 7. Прикрепление и распластывание клеток 293 через 6 сут культивирования на субстрате, покрытом микросферами, ковалентно связанными с суммарным гистоном.

*a* — клетки после культивирования в среде, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки телят; *b* — клетки после культивирования в бессывороточной среде с ростовыми добавками; *v* — клетки после культивирования на полистироловой поверхности (контроль). Об. 100×.

тых коровыми гистонами и перекрестно сшитыми их конъюгатами (рис. 5, *в*, *г*). Здесь, как и в предыдущем случае, степень распластывания и образование межклеточных взаимодействий за счет активно формирующихся псевдоподий значительно более выражены у клеток, посаженных на перекрестно сшитый вариант коровых гистонов. В контроле при посадке клеток на полистироловую поверхность за это же время происходит только их распластывание, лишь в отдельных случаях просматривается образование тонких выростов, связывающих близко лежащие клетки (рис. 5, *д*).

При сопоставлении поведения клеток на слоях микросфер, покрытых этими двумя типами гистонов, можно сделать вывод о том, что клетки линии 293 имеют большее сродство к коровым гистонам. При этом, однако, принципиальных различий ни в форме распластанных клеток, ни в их взаимодействии между собой у клеток, нанесенных на эти два типа гистонов, не наблюдали.

Клетки линии BALB/3T3 демонстрируют несколько отличное поведение при посадке на микросферы, покрытые теми же типами гистонов. На представленных фотографиях видно, что клетки, посаженные на микросферы, покрытые суммарным гистоном, образуют более плотную сеть (рис. 6, *а*), чем при посадке на микросферы, покрытые коровыми гистонами (рис. 6, *б*). Такой характер поведения проявляется в еще большей степени у клеток, посаженных на микросферы с перекрестно сшитыми конъюгатами суммарного гистона (рис. 6, *в*). Эти микросферы способствуют гораздо большей распластности клеток, образованию ими плотных межклеточных контактов. Данный тип клеток характеризуется наличием большого числа отростков, с помощью которых формируются длин-

ные клеточные цепи. Такое поведение характерно для фибробластов и фибробластоподобных клеток, находящихся в составе соединительных тканей.

В связи с тем что исследуемые микросферы, покрытые гистонами, могут быть использованы в дальнейшем при создании трехмерных пористых матриц, предназначенных для формирования в них тканеподобных структур *in vitro*, необходимо было проверить, как идет рост посаженных на них клеток при длительном культивировании. С этой целью клетки линии 293, посаженные на микросферы, покрытые перекрестно сшитыми конъюгатами суммарного гистона, культивировали в течение 6 сут. Культивирование проводили в присутствии сыворотки или в бессывороточной среде с ростовыми добавками.

При сопоставлении культур, представленных на фотографиях (рис. 7, *а*, *б*), можно легко заметить, что к этому времени число клеток в обоих вариантах значительно увеличилось (по сравнению с культивированием в течение 1 сут — рис. 5, *а*, *б*). Кроме того, они образовывали большие колонии, связанные в крупночешуйчатую сеть. При этом в бессывороточной среде практически отсутствуют отдельные клетки или не связанные с ними микросферы, что наблюдается при культивировании в среде с сывороткой. В контроле при культивировании клеток на полистироловой поверхности в присутствии сыворотки состояние культуры практически не отличается от состояния клеток, культивируемых на микросферах в этих же условиях (рис. 7, *в*). По-видимому, в результате взаимодействия белков сыворотки с гистонами последние становятся недоступными для рецепторов на поверхности культивируемых клеток.

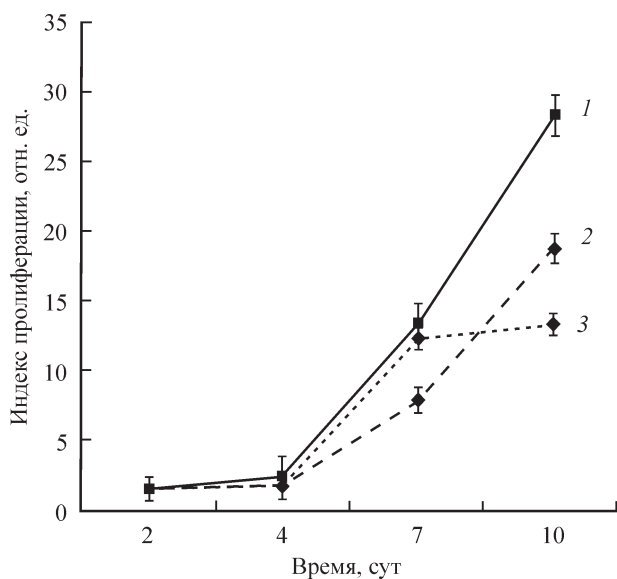


Рис. 8. Зависимость пролиферативной активности клеток 293 от времени культивирования на субстрате, покрытом микросферами, ковалентно связанными с перекрестно сшитыми конъюгатами суммарного гистона (кривая 1) и с суммарным гистонами (кривая 2). Культивирование клеток на полистироловой поверхности (контроль, кривая 3).

Параллельно проводили сравнительную оценку пролиферативной активности тех же клеток при длительном культивировании на полистироловой поверхности и на микросферах, покрытых как суммарным гистонами, так и перекрестно сшитыми конъюгатами суммарного гистона. Клетки линии 293 культивировали в течение 11 сут. Индекс пролиферации определяли через 2, 4, 7 и 11 сут. Индекс пролиферации клеток в течение 4 сут был низок и не различался между исследуемыми вариантами. Через 7 сут наблюдается значительное увеличение индекса пролиферации во всех трех вариантах опыта по сравнению с предыдущими сроками ( $P < 0.01$ ), но достоверных различий между опытными и контрольным вариантами не обнаружено (рис. 8, кривые 1—3). Существенные изменения по исследуемому параметру наблюдаются через 11 сут. Так, в контроле индекс пролиферации не изменяется по сравнению с предыдущими сроками. В обоих опытных вариантах пролиферативная активность значительно увеличивается. Достоверное увеличение индекса пролиферации имеет место при культивировании клеток на микросферах, покрытых перекрестно сшитыми конъюгатами суммарного гистона, по сравнению с контролем ( $P < 0.01$ ). Наблюдается также тенденция к увеличению индекса пролиферации при культивировании клеток на микросферах, покрытых суммарным гистонами ( $P < 0.05$ ; рис. 8, кривые 1—3). Следует отметить, что индекс пролиферации при культивировании клеток линии BALB/3T3 в течение 11 сут на микросферах, покрытых как суммарным гистонами, так и перекрестно сшитыми конъюгатами суммарного гистона, не изменяется по сравнению с контролем.

### Обсуждение

Задачей настоящей работы явилось исследование адгезии, морфологии и пролиферации клеток разного происхождения, культивируемых на покрытых гистонами

микросферах, нанесенных на поверхность культуральных сосудов, с целью выявления возможности использования подобных микросфер для топографической модификации поверхностей, используемых при трехмерном культивировании клеток.

В литературе имеются данные о присутствии ядерных белков, таких как гистоны и негистоновые хромосомные белки с высокой электрофоретической подвижностью, не только в клетках, но и во внеклеточном пространстве (Zlatanova et al., 1990; Brix et al., 1998; Watson et al., 1999; Muller et al., 2001; Henriquez et al., 2002).

Положительно заряженные гистоны давно привлекают внимание исследователей в качестве биологически активных молекул, которые могут быть использованы в медицине и биотехнологии (Zeppenzauer, Reichhart, 1993; Ашмарин и др., 1995). Было показано, например, что экзогенный гистон H1 способен взаимодействовать с перлеканом и регулировать пролиферативную активность миобластов (Henriquez et al., 2002).

Таким образом, выбор гистонов для покрытия микросфер представляется вполне обоснованным. Действительно, проведенные эксперименты показали, что как эпителиальные клетки, так и фибробласты одинаково хорошо прикреплялись и распластывались на поверхностях с иммобилизованными на них гистонами. При этом наилучший эффект демонстрировали комплексы гистонов — суммарный гистон и коровые гистоны. По всей вероятности, в этих комплексах гистонов за счет межбелковых взаимодействий на их поверхности экспонируются аминокислотные последовательности, обладающие наибольшим сродством к адгезионным поверхностным рецепторам клетки (Isenberg, 1979; Cardin, Weintraub, 1989). В пользу этого предположения свидетельствуют результаты, показывающие, что перекрестно сшитые конъюгаты суммарного гистона и перекрестно сшитые конъюгаты коровых гистонов в еще большей степени способствовали распластыванию клеток на субстрате и организации в них развитого цитоскелета. В связи с тем что в процессе распластывания клеток на субстрате возникает механическое натяжение в области фокальной адгезии за счет сократительной активности актинового цитоскелета, возможно изменение конформации гистоновых комплексов при нарушении в них исходного взаимного расположения гистонов и адгезионных свойств. Поэтому использование перекрестно сшитых конъюгатов гистонов, сохраняющих исходно сложившиеся структурные межбелковые взаимодействия, представляется предпочтительным, что подтвердилось также и в экспериментах по взаимодействию клеток с микросферами, покрытыми разными типами гистонов.

Микросферы использовали в настоящей работе с целью выявления возможности их применения для топографической модификации поверхностей, предназначенных для трехмерного культивирования клеток. Поэтому микросферы должны были иметь оптимальные размеры и располагаться на субстрате на таком удалении друг от друга, чтобы клетки были способны одновременно взаимодействовать с несколькими микросферами, рассредоточенными в пространстве. Микросферы уже давно применяются в качестве субстрата для культивирования клеток, но они имеют диаметр от 100 до 250 мкм, и клетки полностью распластываются и размножаются на поверхности каждой из них (Bardouille et al., 2001). В данном исследовании использовали микросферы из кристаллизованного декстрана диаметром не более 1 мкм. Такой

диаметр микросфер соответствует размеру фокального контакта, образующегося при прикреплении клетки к субстрату (Peterson, Burridge, 2001). Кроме того, при нанесении на поверхность культурального сосуда микросферы располагались на расстоянии друг от друга, не превышающем площади распластанной клетки. Это должно было способствовать одновременному взаимодействию каждой отдельной клетки с несколькими микросферами.

Известны данные, демонстрирующие сходное поведение эндотелиальных клеток при культивировании их на поверхности субстрата, содержащей адгезивные островки диаметром от 3 до 5 мкм, покрытые фибронектином, расположенные на расстоянии не более 10 мкм друг от друга (Chen et al., 1997).

Проведенные эксперименты подтвердили правильность выбранного подхода. Клетки линий 293 и BALB/3T3 (клон А31), посеянные на такой субстрат, преимущественно прикреплялись к микросферам и распластывались на них, образуя межклеточные контакты, а также длинные псевдоподии, соединяющие между собой клетки, входящие в разные колонии. Перекрестно сшитые конъюгаты суммарного гистона и в этом случае оказывали наилучшее влияние на распластывание и морфологию клеток, а в клеточной линии 293 способствовали и более интенсивной пролиферации. Отсутствие изменений пролиферативной активности в линии BALB/3T3 по сравнению с линией 293 может быть связано с разным происхождением исследуемых линий. Так, 293 — эпителиоподобная линия почки эмбриона человека, трансформированная вирусом Ad5; BALB/3T3 (клон А31) — фибробластоподобная линия, спонтанно трансформированная с контактным торможением роста клеток при достижении определенной плотности.

Таким образом, микросферы, покрытые перекрестно сшитыми конъюгатами гистонов, могут быть использованы в дальнейшем при создании трехмерных пористых матриц, предназначенных для формирования в них тканеподобных клеточных структур *in vitro*. Тем не менее при подборе оптимального субстрата для культивирования клеток необходимо учитывать особенности используемых клеточных линий.

Работа выполнена при финансовой поддержке ООО «С.-Петербургский научный центр Корнинг».

### Список литературы

- Ашмарин И. П., Перельман А. Е., Горюхина О. А., Вишневский Б. И., Вавилин Г. И., Габер И. Э. 1995. Средство, потенцирующее противотуберкулезное действие изониазида. Патент на изобретение № 2045278. РФ. Бюл. изобр. 28 : 127.
- Горюхина О. А. 1999. Способ получения растворимых ковалентных конъюгатов. Патент на изобретение № 2127606. РФ. Бюл. изобр. 8 : 323.
- Горюхина О. А. 2001. Комплекс природных катионных белков и способ его получения. Патент на изобретение № 2176517. РФ. Бюл. изобр. 34 : 214—215.
- Горюхина О. А. 2004. Перспективы применения катионных белков для транспорта лекарственных средств в ткань мозга. В кн.: Биохимические и молекулярно-биологические основы физиологических функций. (Нервная система, вып. 37). СПб.: СПбГУ. 168—175.
- Горюхина О. А., Илюк Р. Д., Мищенко И. В. 2000. Сравнительное исследование поступления экзогенного гистона в паренхиму головного мозга крыс. Бюл. эксперим. биол. мед. 130 (7) : 63—66.
- Горюхина О. А., Мюльберг А. А., Кривева М. А., Тишкина Т. Е. 1995. Способ очистки препарата гистона H4 из ткани тимуса телят. Патент на изобретение № 1319352. РФ. Бюл. изобр. 25 : 249.
- Миронов А. А., Комиссарчик Я. Ю., Миронов В. А. 1994. Сканирующая электронная микроскопия нативных препаратов. В кн.: Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. СПб.: Наука. 251—264.
- Мищенко В. А., Горюхина О. А. 1996. Структура, проницаемость гематоэнцефалического барьера и перспективы доставки через него лекарственных средств. Журн. невропатол. и психиатр. 96(4) : 116—120.
- Остерман Л. А. 1983. Введение радиоактивной метки в белки. В кн.: Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. М.: Наука. 236—250.
- Bardouille C., Lehmann J., Heimann P., Jockusch H. 2001. Growth and differentiation of permanent and secondary mouse myogenic cell lines on microcarriers. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55 : 556—562.
- Brix K., Summa W., Lottspeich F., Herzog V. 1998. Extracellularly occurring histone H1 mediates the binding of thyroglobulin to the cell surface of mouse macrophages. J. Clin. Invest. 102 : 283—293.
- Cardin A. D., Weintraub H. J. R. 1989. Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. Arteriosclerosis. 9 : 21—32.
- Chen C. S., Mrksich M., Huang S., Whitesides G. M., Ingber D. E. 1997. Geometric control of cell life and death. Science. 276 : 1425—1428.
- Henriquez J. P., Casar J. C., Fuentealba L., Carey D. J., Brandan E. 2002. Extracellular matrix histone H1 binds to perlecan, is present in regenerating skeletal muscle and stimulates myoblast proliferation. J. Cell Sci. 115 : 2041—2051.
- Hubbell J. A. 2000. Matrix effects. In: Principles of tissue engineering. San Diego; San Francisco; New York; Boston; London; Sydney; Tokyo: Acad. Press. 237—250.
- Iserberg I. 1979. Histones. Ann. Rev. Biochem. 48 : 159—191.
- Khademhosseini A., Suh K. Y., Yang J. M., Eng G., Yeh J., Lengenberger S., Langer R. 2004. Layer-by-layer deposition of hyaluronic acid and poly-L-lysine for patterned cell co-cultures. Biomaterials. 25 : 3583—3592.
- Lundblad R. L. 1995. Amino acid analysis. In: Techniques in protein modification. Boston; London; New York; Washington: CRC Press, Boca Raton. 15—22.
- McKeehan W. L., Ham R. G. 1976. Stimulation of clonal growth of normal fibroblasts with substrata coated with basic polymers. J. Cell Biol. 71 : 727—734.
- Minuth W. W., Strehl R., Schumacher K. 2005. Tissue engineering: essentials for daily laboratory work. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 314 p.
- Müller S., Scaffidi P., Degryse B., Bonaldi T., Ronfani L., Agresti A., Beltrame M., Bianchi M. E. 2001. The double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. EMBO J. 20 : 4337—4340.
- Nakanishi J., Takarada T., Yamaguchi K., Maeda M. 2008. Recent advances in cell micropatterning techniques for bioanalytical and biomedical sciences. Anal. Sci. 24 : 67—72.
- Olsen B. R. 2000. Matrix molecules and their ligands. In: Principles of tissue engineering. San Diego; San Francisco; New York; Boston; London; Sydney; Tokyo: Acad. Press. 57—72.
- Peterson L., Burridge K. 2001. Focal adhesions and focal complexes. In: Cell adhesion. Oxford: Oxford Univ. Press. 288—299.
- Pierres A., Benoliel A. M., Bongrand P. 2002. Cell fitting to adhesive surfaces: a prerequisite to firm attachment and subsequent events. Eur. Cell Mater. 3 : 31—45.
- Saltzman W. M. 2000. Cell interaction with polymers. In: Principles of tissue engineering. San Diego; San Francisco; New York; Boston; London; Sydney; Tokyo: Acad. Press. 221—236.
- Schröder U. 1985. Crystallized carbohydrate spheres for slow release and targeting. Methods Enzymol. 112 : 116—128.
- Suh K. Y., Seong J., Khademhosseini A., Laibinis P. E., Langer R. 2004. A simple soft lithographic route to fabrication of

poly(ethylene glycol) microstructures for protein and cell patterning. *Biomaterials*. 25 : 557—563.

Vitte J., Benoliel A. M., Pierres A., Bongrand P. 2004. Is there a predictable relationship between surface physical-chemical properties and cell behaviour at the interface? *Eur. Cell Mater.* 7 : 52—63.

Watson K., Gooderham N. L., Davies D. S., Edwards R. J. 1999. Nucleosomes bind to cell surface proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 274 : 21 707—21 713.

Zeppezauer M., Reichhart R. 1993. Use of pure histones H1 and H2A : H2B dimmers in therapeutic methods. US Patent 5, 182, 257. (<http://patft.uspto.gov/>).

Zlatanova J. S., Srebrevna L. N., Banchev T. B., Tasheva B. T., Tsanev R. G. 1990. Cytoplasmic pool of histone H1 in mammalian cells. *J. Cell Sci.* 96 : 461—468.

Поступила 10 VIII 2009

#### CULTIVATION OF CELLS ON A SURFACE COVERED BY MICROSPHERES WITH COUPLED HISTONES

O. A. Goryukhina,<sup>1</sup>\* S. V. Martyushin,<sup>2</sup> M. I. Blinova,<sup>3</sup> G. G. Poljanskaya,<sup>3</sup> O. A. Cherepanova,<sup>3</sup> G. P. Pinaev

<sup>1</sup> Department of Biochemistry of St. Petersburg State University,

<sup>2</sup> State Research Institute of Highly Pure Biopreparations

and <sup>3</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

\* e-mail: pushkeen@gmail.com

The use of histones for modification of the surface intended for cultivation of cells was studied. The work was carried out on the cell line 293 of human embryonic kidney transformed by adenovirus (Ad5) and on the cell line BALB/3T3 clone A31 of mouse spontaneous transformed embryonic fibroblasts. We analyzed interaction of cells with histones of different types put on a hydrophobic surface or on dextran microspheres with diameters of 1.0  $\mu$ . It was shown, that all histones studied possessed adhesive ability, but their complexes consisting of total and core histones rendered the best influence on adhesion, morphology and growth of the cells in culture. Thus, cross-linked conjugates of histones immobilized on microspheres promoted in a greater degree formation of a network of cellular structures due to formation of intracellular contacts and simultaneous interaction of cells with several microspheres. Comparing with BALB/3T3 clone A31 the cell line 293 showed significant increase in proliferative activity in 11 days of cultivation on microspheres covered with cross-linked conjugates of histones. Our investigations have shown that the microspheres covered with cross-linked conjugates of histones can be used in the further at creation of the three-dimensional porous matrices intended for *in vitro* formation of tissue-like cellular structures in them.

Key words: histones, microspheres, adhesion, spreading, proliferation of cultivated cells.