

## АДГЕЗИЯ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ НА МОДИФИЦИРОВАННОМ СТЕКЛЕ

© А. Н. Фаттахова,<sup>1,\*</sup> А. Ю. Храмова,<sup>1</sup> М. А. Белините,<sup>1</sup>  
Р. Н. Кашипов,<sup>2</sup> Н. Ф. Кашипов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт фундаментальной медицины и биологии  
Казанского (Приволжского) федерального университета  
и <sup>2</sup>Институт физики, Казань;

\* электронный адрес: afattakh@rambler.ru

С помощью ионно-плазменной обработки силикатного стекла создана двухмерная матрица для культивирования клеток. Показано, что гепатоциты мышей CD-1 в течение 1 сут адсорбировались на модифицированном и контрольном стеклах. Количество клеток на модифицированном стекле в  $2.8 \pm 0.2$  раза превышало данный показатель в случае контрольного гладкого стекла. Фибробласты, адгезированные на модифицированном стекле, имели нормальную для этих клеток конфигурацию, а их число в  $1.5 \pm 0.5$  раза превышало число клеток на контрольных гладких стеклах.

Ключевые слова: культивирование клеток, 2D-матрица, стекло, ионно-плазменная обработка.

Разработка новых технологичных и недорогих субстратов для культивирования клеточных культур для целей медицины и биотехнологии является неотъемлемой частью развития биомедицинской науки. Функции и поведение клеток, прикрепляемых к твердым субстратам, зависят от характеристик субстрата, которые можно разделить на поверхностные и объемные. К первой группе относятся такие характеристики, как гидрофобность, заряд, морфология или шероховатость поверхности с учетом ее модификации. Ко второй — жесткость и внутриструктурные особенности материала (Tabata, 2011). Несмотря на то что огромное влияние на клетки оказывает химическая композиция материала, важно учитывать и топографию субстрата, поскольку поведение культивируемых клеток на субстратах, в структуре которых имеются пики, бороздки и другие особенности текстуры, отличается от такового на гладком субстрате. Суммарная реакция клеток на топографию складывается из их способности к прикреплению, пролиферации и дифференцировке (Zinger et al., 2005). Примером может служить приращение моноцитов и макрофагов к кристаллическим образованиям в костях и к базальным мембранам (Ventre et al., 2012). Стекло было первым субстратом для культивирования клеток благодаря заряду поверхности и своим оптическим свойствам.

Целью нашего исследования было создать 2D-матрицу, обладающую поверхностью с зарядом и бороздчатой контактной поверхностью, на основе Na-силикатного стекла с помощью бомбардировки поверхности стекла ионами аргона в вакууме. Силикатное стекло в отличие от оптически чистого стекла не содержит свинца, или антиокислителей с эстрогенной активностью, как пластиковые матрицы (Freshney, Freshney, 2002).

### Материал и методика

Для выделения, культивирования и анализа клеточных культур использовали среду DMEM, раствор Хэнкса, трипсин, L-глутамин, пенициллин и стрептомицин, полученные из ООО ПанЭко (Москва), коллагеназу и трипановый голубой (Sigma-Aldrich, США).

Культуру гепатоцитов получали из печени самцов мышей SPF CD-1 из ООО «Питомник лабораторных животных Пушино» с помощью стандартного метода (Freshney, Freshney, 2002). Мышей содержали согласно международным правилам в установке ISOCAGE TECHNIPLAST (Финляндия) на подстилке Rihofix (Германия). Они получали воду и корм ad libitum. Культура фибробластов человека была любезно предоставлена Отделом генных и клеточных культур Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского университета.

Стекло модифицировали методом ионно-плазменной обработки. Для получения плоской матрицы использовали Na-силикатное стекло размером  $2.5 \times 2.5$  см. Модификацию стекла проводили на установке ВУП-2М (Россия). Электродная система этой установки была модернизирована таким образом, чтобы имелась возможность подбора энергии ионов, образующихся в тлеющем разряде. Вакуумная система установки обеспечивала остаточное давление в камере  $6.5 \cdot 10^{-3}$  Па и последующую работу магнетрона при давлении газа 0.1—0.4 Па. Бомбардировку ионами аргона проводили под прямым углом к поверхности стекла в течение 30 мин. Перед использованием модифицированные матрицы стерилизовали в сухожаровой камере при 180 °С в течение 1 ч. В опытные и контрольные лунки планшета вносили по 300 мкл суспензии, содержащей 250—300 тыс. клеток в среде DMEM. Затем в

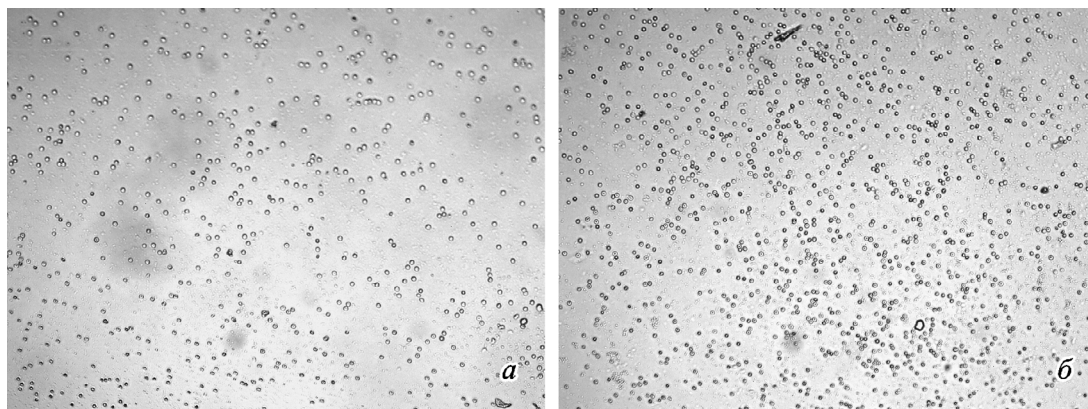


Рис. 1. Микрофотография гепатоцитов мышей CD-1, адсорбированных на 2D-матрице на основе силикатного стекла.  
*a* — клетки на контрольном гладком стекле, *б* — клетки на стекле, обработанном ионами аргона в вакууме. Об. 40×.

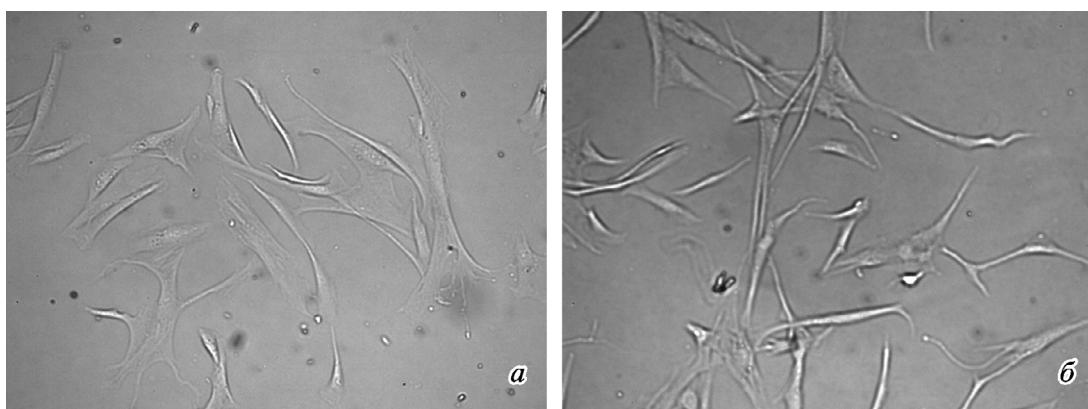


Рис. 2. Микрофотография фибробластов человека, адсорбированных на 2D-матрице на основе силикатного стекла.  
*a* — клетки на контрольном гладком стекле, *б* — клетки на стекле, обработанном ионами аргона в вакууме. Об. 40×.

лунки вносили по 3 мл DMEM, содержащей пенициллин, стрептомицин и L-глутамин. В опытные лунки вносили модифицированное стекло размером 2.5×2.5 см. В контрольные лунки помещали немодифицированные стеклянные образцы. Планшеты помещали в атмосферу 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °C на 1 сут, после чего анализировали клеточные популяции на контрольных и модифицированных стеклах.

## Результаты и обсуждение

Матрицы 2D, которые используют для получения монослойных культур, имеют ряд преимуществ: они требуют меньшего количества клеток, позволяют наблюдать морфологические изменения и не требуют сложных систем культивирования (Freshney, Freshney, 2002; Tandon et al., 2009). Клетки в монослое секретируют в среду белки внеклеточного матрикса, позволяющие им расплываться на субстрате и осуществлять различные физиологические функции.

Гепатоциты мышей CD-1 прикреплялись на модифицированном и контрольном стеклах. Количество клеток на опытных матрицах было в  $2.8 \pm 0.2$  раза больше, чем на контрольном гладком стекле (рис. 1, *a*, *б*). Известно, что при культивировании на 2D-матрицах клетки контак-

тируют с матрицей только частью мембраны (Wheeldon et al., 2011). Многие типы клеток становятся более плоскими, нерегулярно делятся и теряют свои морфофизиологические особенности. Примером этого явления могут служить хондроциты, меняющие округлую форму на фенотип, подобный фибробластам. Однако для других клеток, таких как эндотелиальные и фибробласты, планарная геометрия субстрата является максимально приближенной к условиям *in vivo*, не оказывая на них какого-либо нежелательного влияния и не вызывая изменения фенотипа (Baker, Chen, 2012).

Фибробласты человека прикреплялись и к модифицированному, и к гладкому (контрольному) стеклам (рис. 2, *a*, *б*). Следует отметить, что фибробласты на модифицированном стекле имели нормальную для этого типа клеток конфигурацию. На модифицированных стеклах количество клеток в  $1.5 \pm 0.5$  раза было больше, чем на контрольных гладких стеклах. Возможно, что бомбардировка ионами аргона поверхности силикатного стекла не только стабилизирует заряд на поверхности стекла, но и образует бороздки и неровности, позволяющие клеткам адсорбироваться. 2D-матрица на основе модифицированного стекла экологически безопасна, не требует дорогих методов стерилизации. В дальнейшем мы предполагаем создать условия для образования ткани на 2D-матрице и разработать протокол биохимического и генетического

контроля качества ткани, культивируемой на матрице на основе модифицированного стекла.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственной программы поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

#### Список литературы

*Baker B. M., Chen C. S. 2012.* Deconstructing the third dimension — how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J. Cell Sci.* 125 : 3015—3024.

*Freshney R., Freshney M. 2012.* Isolation and culture of animal and human hepatocytes. In: *Culture of epithelial cells*. Second Edition. New York: Wiley-Liss Press. 1 : 365.

*Tabata Y. 2011.* Biomaterials design of culture substrates for cell research. *Inflamm. Regener.* 31 : 137—145.

*Tandon N., Cannizzaro C., Chao P. H., Maidhof R., Marsano A., Au H. T., Radisic M., Vunjak-Novakovic G. 2009.* Electrical stimulation systems for cardiac tissue engineering. *Nature Protocols.* 4 : 155—173.

*Ventre M., Causa F., Netti P. A. 2012.* Determinants of cell-material crosstalk at the interface: towards engineering of cell instructive materials. *J. R. Soc. Interface.* 9 : 2017—2032.

*Wheeldon I., Farhadi A., Bick A. G., Jabbari E., Khademhosseini A. 2011.* Nanoscale tissue engineering: spatial control over cell—materials interactions. *Nanotechnology.* 22 : 1—28.

*Zinger O., Zhao G., Schwartz Z., Simpson J., Wieland M., Landolt D., Boyan B. 2005.* Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. *Biomaterials.* 26 : 1837—1847.

Поступила 4 II 2014

#### HUMAN AND ANIMAL CELLS ADHESION ON THE MODIFIED GLASS

*A. N. Fattakhova,<sup>1,\*</sup> A. Yu. Khranova,<sup>1</sup> M. A. Belinite,<sup>1</sup> R. N. Kashapov,<sup>1</sup> N. F. Kashapov<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Institute of Fundamental Medicine and Biology of the Kazan (Volga Region) Federal University and <sup>1</sup> Institute of Physics, Kazan;

\* e-mail: afattakh@rambler.ru

2D matrix for cells cultivation has been created using ionic plasma processing of silicate glass. We have shown that the CD-1 mouse hepatocytes are adsorbed on the modified and the control glass after 24 h cultivation. Number of these cells on the modified glass was 2.8—0.2 more as compared with that in control on a smooth glass. Human fibroblasts adsorbed on a modified glass matrix had normal configuration and their number was  $1.5 \pm 0.5$  times greater than the number of cells in the control of smooth glass matrix.

**Key words:** cell cultivation, 2D matrix, ionic plasma processing glass.