

ВПЛИВ МОДИФІКОВАНИХ ПОВЕРХОНЬ СКЛА НА АДГЕЗІЮ ТА ПРОЛІФЕРАЦІЮ КЛІТИН МЕЛАНОМИ МИШІ ЛІНІЇ B16F10

О. Штапенко¹, С. Федорова¹, І. Гевкан¹, Ю. Стецишин², О. Жолобко², М. Огар²

¹Інститут біології тварин НААН

²Національний університет «Львівська Політехніка»

У статті описано вплив щільно запакованих наночарів альбуміну на скляних поверхнях, модифікованих декстраном у різних комбінаціях на проліферативний ріст, адгезію та процеси апоптозу в культурі клітин мієломи миші B16F10. Показано позитивний ефект (середня кількість клітин, проліферативна активність, низький апоптичний індекс) за культивування клітин на поверхнях скло+АПТЕС та скло+АПТЕС+декстран.

Ключові слова: МОДИФІКОВАНІ ПОВЕРХНІ, ДЕКСТРАН, АЛЬБУМІН, КУЛЬТУРА КЛІТИН, ПРОЛІФЕРАТИВНИЙ РІСТ, АДГЕЗІЯ

Багато клітин ссавців, до того як почати проліферувати і утворити клітинний моношар, повинні прикріпитись до субстрату та розпластатись на ньому. У зв'язку з цим постає питання про матеріал, з якого складається поверхня культуральної посудини. Первинна поведінка клітини на поверхні біоматеріалу у значній мірі визначає всі подальші процеси диференціації, проліферації та формування міжклітинного матриксу. Хімічний та фазовий склад поверхні, її топографія — головні фактори, які регулюють ріст клітин та їх функціональну здатність. Розуміння механізмів взаємодій клітинних мембран з поверхнями культуральних посудин — одна із головних проблем у практичній біології та медицині. Створення стійких наночарів білків на поверхнях матеріалів має велике значення при розробці імплантатів та біосенсорних систем. Основний метод створення наночарів білків — це їхня специфічна та неспецифічна адсорбція на поверхні. Бичачий сироватковий альбумін (BSA) є найцікавішим білком для створення біосумісних поверхонь і біосенсорних систем [1–3].

Дослідженню закономірностей його адсорбції на поверхнях різного типу присвячено низку публікацій [4–8]. Проте, дослідження в цьому напрямі є актуальними і мають наукову та практичну цінність, оскільки варіантів модифікацій є необмежена кількість і кожен тип клітин вимагає особистого підходу із врахуванням унікальних, властивих тільки йому фізіологічних та біохімічних особливостей.

Матеріали і методи

В експериментах використовували клітини лінії B16F10, які культивували на поживному середовищі RPMI 1640 з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки (Gibco, США), пеніциліну (100 ед/мл) та стрептоміцину (100 мкг/мл) (Gibco, США) в атмосфері, яка містила 5 % CO₂ при 37°C протягом 72 год. Клітини висівали з початковою концентрацією 100 тис. клітин у краплі середовища об'ємом 200 мкл на предметні скельця, модифіковані наночарами у різних комбінаціях.

Модифікацію поверхонь скелець проводили шляхом обробки скляних пластин 3-амінопропіл(триетоксі)силаном (АПТЕСом), після чого на них іммобілізувались первинні аміногрупи. За участі цих аміногруп до поверхні модифікованого скла прививали дигальдегіддекстран [1–2], який отримували частковим окисненням декстрана періодатною кислотою (рис. 1) [1–2]. Крім цього, на поверхні «чистого скла» адсорбували наночар бичачого сироваткового альбуміну (BSA).

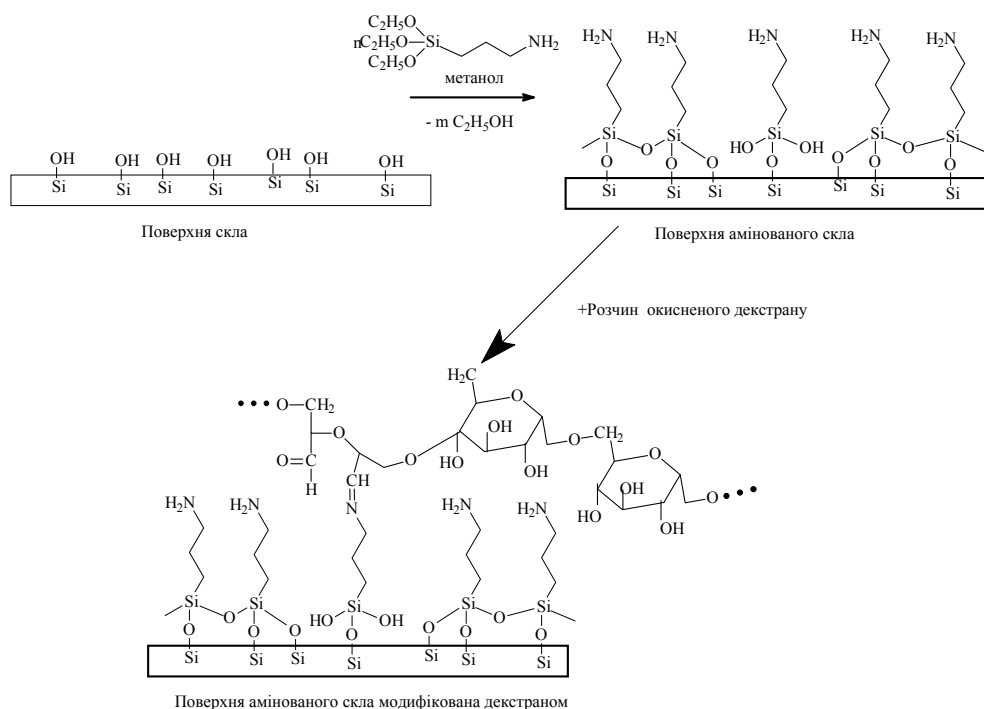


Рис. 1. Схема модифікації поверхні скла.

Таким чином, були сформовані чотири групи: група 1 («чисте скло») — контрольна група, група 2 (скло+АПТЕС), група 3 (скло+АПТЕС+декстран), група 4 (скло+БСА).

Проліферативний ріст культури клітин лінії В16F10 оцінювали підрахунком кількості клітин у камері Горяєва кожні 24 год культивування. Життєздатність клітин оцінювали фарбуванням їх вітальним фарбником трипановим синім.

Результати й обговорення

У ході експерименту на 24 год культивування клітин, у всіх групах спостерігався незначний проліферативний ріст культури у порівнянні з ростом клітин на поверхні «чистого скла» (контрольна група). Високий проліферативний ріст на 48 год культивування спостерігався у 2 та 3-й дослідних групах — на поверхнях скло+АПТЕС та скло+АПТЕС+декстран — кількість клітин в цих групах становила 2,8 та 3,2 $\times 10^6$ кл/мл, відповідно. Однак, при цьому в цих групах було відзначено зростання апоптичного індексу.

На 72 год культивування відмічено інтенсивний проліферативний ріст аналогічно до 48-годинної точки, і в той же час спостерігалось збільшення апоптичного індексу у 2–2,5 рази. Слід зазначити, що в контрольній групі, де клітини культивувались на «чистому склі», проліферативний ріст у точках 48 та 72 год був найнижчим у порівнянні з дослідними групами (рис. 2).

Порівнюючи дані проліферативного росту культур на поверхнях з різноманітними модифікаціями скла можна стверджувати, що найбільше пригнічення клітинного росту культури спостерігали в групі, клітини якої культивувались на поверхні скло+БСА.

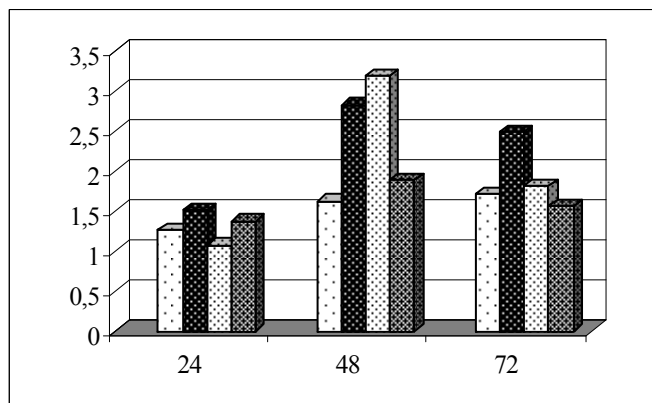


Рис. 2. Проліферативний ріст культури клітин лінії В16F10 на модифікованих поверхнях протягом 72 год культивування. По лінії абсцис — час культивування (год), по лінії ординат — кількість клітин ($\times 10^6$ кл/мл). З ліва на право: дослідні групи 1,2,3,4.

Висновки

Аналіз отриманих даних показав кореляцію між поверхневими властивостями модифікованих матеріалів та рівнем проліферативного росту культури клітин лінії B16F10. Найвищі біологічні параметри реакції клітинних структур (середня кількість клітин, проліферативна активність, низький апоптичний індекс) спостерігались при культивуванні клітин на поверхнях скло+АПТЕС та скло+АПТЕС+декстран. Культивування клітин на цих поверхнях прозводило до посилення процесів адгезії та підвищення рівня проліферації клітин на нанощарах даних біоматеріалів.

Перспективи подальших досліджень. Оскільки використання модифікованих поверхонь для культивування клітин є актуальним напрямом у дослідженнях з клітинної біології та хімії органічного синтезу, ми плануємо у майбутньому їх продовження з використанням різних біоматеріалів як штучного, так і природного походження. Застосування таких модифікованих типів покриття культурального посуду значно підвищить вихід життєздатних клітин, які можуть використовуватись як для подальших наукових досліджень, так і практично застосовуватись у трансплантації тощо.

O. Shtapenko, S. Fedorova, Y. Stetsyshyn, O. Zolobko, M. Ogar

INFLUENCE OF MODIFIED GLASS SURFACES ON ADHESION AND PROLIFERATION OF MOUSE BLACK CANCER CELLS LINE B16F10

S u m m a r y

This article describes the effects of tightly packed nanolayers' albumin on glass surfaces, modified dextran in various combinations to proliferative growth, adhesion and apoptosis of mouse myeloma cells culture B16F10. Positive effects are shown (the average number of cells, proliferative activity, and low apoptosis) in cultured cells on the surfaces of glass and APTES glass and dextran.

О. Штапенко, С. Фёдорова, Ю. Стецишин, О. Жолобко, М. Огар

ВЛИЯНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОВЕРХНОСТЕЙ СТЕКЛА НА АДГЕЗИЮ И ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ МЫШИ ЛИНИИ B16F10

А н н о т а ц и я

В данной статье описано влияние плотно упакованных нанослоев альбумина на стеклянных поверхностях, модифицированных декстраном в различных комбинациях на пролиферативный рост, адгезию и процессы апоптоза в культуре клеток миеломы мыши B16F10. Показано позитивный эффект (среднее количество клеток, пролиферативная активность, низкий апоптический индекс) при культивировании клеток на поверхности стекло+АПТЕС и стекло+ АПТЕС +декстран.

1. *Brynda E.* Albumin and heparin multilayer coatings for blood-contacting medical devices / E. Brynda, M. Houska, M. Jirouskova et al. // J. of Biomed. Mat. Res. — 2000. — Vol. 51. — P. 249–257.
2. *Brynda E.* Ordered multilayer assemblies: Albumin/heparin for biocompatible coatings and monoclonal antibodies for optical immunosensors / E. Brynda, M. Houska // In: Lvov Y, Mohwald H editors. Protein Architecture: Interfacing Molecular Assemblies and Immobilization Technology. New York: Marcel Dekker. — 2000. — P. 251–286
3. *Yu S. Y.* Stable and pH-sensitive nanogels prepared by selfassembly of chitosan and ovalbumin / S. Y. Yu, J. H. Hu, X. Y. Pan et al. // Langmuir. — 2006. — Vol. 22. — P. 2754–2759.
4. *Ladam G.* Protein adsorption onto auto-assembled polyelectrolyte films / G. Ladam, P. Schaaf, G. Decher et al // Biomolecular Engineering. — 2002. — Vol. 19. — P. 273–280.
5. *Rabe M.* Surface-induced spreading phenomenon of protein clusters / M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger // Soft Matter — 2009. — Vol. 5. — P. 1039–1047.
6. *Sapsford K. E.* Real-time analysis of protein adsorption to a variety of thin films / K. E. Sapsford, F. S. Ligler // Biosensors and Bioelectronics. — 2004. — Vol. 19. — P. 1045–1055.
7. *Miksa D.* Dextran Functionalized Surfaces via Reductive Amination: Morphology, Wetting, and Adhesion / D. Miksa, E. R. Irish, D. Chen et al. // Biomacromolecules. — 2006. — Vol. 7. — P. 557–564.
8. *Стецишин Ю.* Дослідження адсорбції альбуміну на поверхні модифікованого скла методом еліпсометрії / Ю. Стецишин, А. Коструба, Х. Гаргай та ін. // Вісник Львівського Національного університету ім. І. Франка.— 2010. — № 54. — С. 51–58. — [Серія біологічна].

Рецензент: завідувач лабораторії фізіології та патології відтворення тварин, доктор сільськогосподарських наук, с. н. с. Шаран М. М.