

УДК 616-092

Исследование адгезии эндотелиоцитоподобных клеток EA.hy926 к различным подложкам, используемых в методе мягкой литографии для создания микрофлюидных чипов

Колесов Д.В.^{1,2}, Ерофеев А.С.³, Московцев А.А.^{1,2,5}, Власенкова Н.К.⁶,
Горелкин П.В.³, Мыльникова А. Н.^{1,4}, Кубатиев А.А.^{1,5}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² ООО «Микрофлюидные технологии».

115088, Москва, ул. Машиностроения 1-я, д.10, оф. 304

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «Московский институт стали и сплавов».

119049, Москва, Ленинский проспект, д. 4

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Российский химико-технологический университет имени Д.И.Менделеева».

125047, г. Москва, Миусская площадь, д. 9

⁵ Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская Академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

123995, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1

⁶ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н.Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

115478, Москва, Каширское ш., д. 23

Адгезия клеток к субстрату является одним из ключевых факторов, влияющих на клеточные функции и их жизнеспособность. Для адекватного биомоделирования многоклеточных тканевых структур *in vitro* необходим тщательный подбор используемых в качестве подложки для клеток материалов. В работе мы исследовали адгезию эндотелиоцитоподобных клеток EA.hy926 к стеклу и полимерным материалам, часто применяемых в микрофлюидике для моделирования тканевых структур. Методом конфокальной сканирующей микроскопии было показано, что различные виды полидиметилсилоксана (ПДМС) характеризуется низкой адгезией клеток по сравнению со стеклом и специально подготовленным полистиролом (ПС). При этом обработка кислородной плазмой не оказывает существенного влияния на адгезию. Обработка коллагеном I, напротив, существенно улучшает адгезию. Белковый гель достаточно хорошо покрывает как гидрофильную поверхность стекла, так и гидрофобную поверхность полимера. Методом сканирующей зондовой микроскопии были также исследованы особенности расщепления отдельных клеток на поверхности субстрата.

Ключевые слова: клеточная адгезия; полидиметилсилоксан; эндотелиоциты; коллаген.

Для цитирования: Колесов Д.В., Ерофеев А.С., Московцев А.А., Власенкова Н.К., Горелкин П.В., Мыльникова А.Н., Кубатиев А.А. Исследование адгезии эндотелиоцитоподобных клеток EA.hy926 к различным подложкам, используемых в методе мягкой литографии для создания микрофлюидных чипов. *Патогенез*. 2018; 16(4): 81-89

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.04.81-89

Для корреспонденции: Колесов Дмитрий Валерьевич, e-mail: maedros@bk.ru

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 20.09.2018

Study of adhesion of endothelial-like cells EA.hy926 to various substrates

Kolesov D.V.^{1,2}, Erofeev A.S.³, Moskovtsev A.A.^{1,2,5}, Vlasenkova N.K.⁶,
Gorelkin P.V.³, Mylnikova A.N.^{1,4}, Kubatiev A.A.^{1,5}

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

² Microfluidic Technologies LLC, Str. Mashinostroeniya 1st 10, of. 304, Moscow 115088, Russian Federation

³ National University of Science and Technology «Moscow State Institute of Steel And Alloys», Leninskij prospekt 4, Moscow 119049, Russian Federation

⁴ D.I.Mendeleev Russian University of Chemical Technology, Miusskaya Ploshchad 9, Moscow, 125047, Russian Federation

⁵ Russian Medical Academy of Continuing Vocational Education, Barrikadnaya Str. 2/1, Moscow 123995, Russian Federation

⁶ N.N.Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Kashirskoe Shosse 23, Moscow 115478, Russian Federation

Cell-substrate adhesion is a key factor affecting the cell functionality and fate. Therefore, for adequate biomodeling of cellular structures *in vitro*, it is necessary to carefully select the materials used. In this study, we evaluated adhesion of endothelial-like cells EA.hy926 to polymeric materials and glass, which are used in microfluidics to model blood vessels. It was shown that different types of polydimethylsiloxane (PDMS) provided low cell adhesion compared to glass and specially prepared polystyrene (PS). The treatment with

oxygen plasma did not exert a significant effect on adhesion. Covering with collagen I, on the contrary, significantly improved adhesion. The protein gel quite well covered both the hydrophilic surface of the glass and the hydrophobic surface of the polymer. The features of individual cells spreading on the substrate surface were also studied using scanning probe microscopy.

Key words: cell adhesion; polydimethylsiloxane; endothelial cells; collagen.

For citation: Kolesov D.V., Erofeev A.S., Moskvitsev A.A., Vlasenkova N.K., Gorelkin P.V., Mylnikova A.N., Kubatiev A.A. [Study of adhesion of endothelial-like cells EA.hy926 to various substrates]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2018; 2018; 16(4): 81-89 (In Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.04.81-89

For correspondence: Kolesov Dmitry Valerievich, e-mail: maedros@bk.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 20.09.2018

Введение

В организме человека клетки функционируют в комплексной среде, что порождает множество проблем для адекватного биомоделирования. В условиях *in vivo*, для формирования тканей, поддержания их целостности и правильного функционирования необходим целый ряд типов взаимодействия клеток со своим микроокружением [1]. При выделении из тканей организма и переносе в условия *in vitro*, клетки могут терять специфическую дифференцировку и соответствующие функции из-за отсутствия эквивалентной тканевой архитектуры и важных химических сигналов [2]. Таким образом, чтобы поддерживать клеточный фенотип *in vitro*, необходимо обеспечить среду, эквивалентную по ключевым параметрам условиям в ткани.

Краеугольным камнем в процессе создания адекватного микроокружения для роста и функционирования клеток *in vitro* является поверхность, или субстрат для их прикрепления и роста [3]. Большая часть клеточных типов в организме человека является адгезивными, т.е. функционирует в прикрепленном к внеклеточному веществу и другим клеткам виде. В случае, если адгезивные клетки не могут найти подходящие сайты для адгезии, они подвергаются апоптозу. Таким образом, поверхность имеет решающее значение для выживания и дальнейшей судьбы клеток.

Клетки взаимодействуют не непосредственно с поверхностью из искусственного материала, а с предварительно адсорбированным слоем внеклеточных макромолекул, в основном белков внеклеточного матрикса (ВКМ). Таким образом, адсорбция белков ВКМ на поверхности является первой предпосылкой для обеспечения соответствия условий *in vitro* физиологической среде. Однако, когда искусственный материал приводится в контакт с биологической жидкостью (например, кровью, лимфой или ростовой средой для культивирования клеток), поверхность первоначально взаимодействует с молекулами воды. Они быстро связываются с поверхностью, образуя моно- или бислои. Конкретное расположение молекул воды зависит от свойств поверхности на атомарном уровне. Высокоактивные поверхности приводят к диссоциации молекул H_2O , при этом они гидроксилируются, т.е. обогащаются ОН-группами. Менее реакционноспособные поверхности могут устанавливать с молекулами H_2O водородные связи, оставляя воду в виде недиссоциированных молекул. Поверхности, которые

характеризуются одним из таких вариантов поведения, называются смачиваемыми, или гидрофильными. Поверхности со слабой тенденцией для связывания H_2O – несмачиваемые, или гидрофобные.

После образования в течение наносекунд адсорбированного слоя воды, в него включаются гидратированные ионы, такие как Cl^- и Na^+ . Особенности расположения этих ионов и их водных оболочек сильно зависят от свойств поверхности. Затем на поверхности адсорбируются белки из жидкости в результате сложной серии событий, включая начальную их адсорбцию, конформационные изменения и, в конечном итоге, замену меньших белков более крупными. В экспериментах *in vitro* эти белки происходят из ростовой среды, содержащей сыворотку, и / или синтезируются и секретируются самими клетками. В зависимости от свойств поверхности полученная смесь белков на поверхности, их конформационное состояние и ориентация будут разными [4]. Смачиваемость рассматривается как один из наиболее важных свойств поверхности, определяющих адсорбцию белка. Гидрофильные и гидрофобные поверхности связывают белки по-разному: белки могут адсорбироваться интактными или могут разворачиваться – терять нативную конформацию для минимизации свободной энергии системы. Водорастворимые белки в физиологической среде обычно имеют глобулярную форму с гидрофобным ядром и гидрофильными и заряженными боковыми цепями аминокислот, экспонированными в раствор. Таким образом, на гидрофильных поверхностях адсорбция белка происходит через полярные и ионные взаимодействия. Конформационные изменения белков, как правило, при этом не индуцируются, и белки связываются в их нативной конформации с интактными водными оболочками. Это приводит к довольно слабой, в основном обратимой, адсорбции белка.

На гидрофобных поверхностях белки необратимо связываются из-за дегидратации границы раздела и отсутствия промежуточных гидратных оболочек. Дегидратация как субстрата, так и поверхности белка обеспечивает энтропия-обусловленную адсорбцию на гидрофобных поверхностях. Это неизбежно приводит к значительным перестройкам конформаций белков с частичным или полным их разворачиванием. Гидрофобные аминокислоты белкового ядра формируют гидрофобные взаимодействия с поверхностью подложки, при этом большинство полярных и заряженных аминокислот

кислотных остатков ориентированы в сторону водного раствора. Степень конформационных изменений поверхностных белков отражает баланс между силой взаимодействия белок-поверхность и конформационной стабильностью белка. Адсорбированный слой белка образуется в течение первых нескольких секунд контакта между поверхностью и раствором и определяет релевантность поверхности последующему прикреплению и распластыванию клеток.

После адсорбции белков инициируются прикрепление и распластывание клеток благодаря неспецифическим взаимодействиям между клетками и поверхностью, декорированной белком. Они включают электростатическое, электродинамическое, стерическое и энтропийное взаимодействия [5]. Первые два основаны на наличии фиксированных зарядов и диполей как на поверхности клетки, так и на поверхности субстрата. С другой стороны, тесная адгезия между клеткой и поверхностью требует сжатия гликокаликса и поверхностного слоя белка на клеточной мембране, который вызывает стерическое и энтропийное отталкивание. Как только баланс неспецифических взаимодействий обеспечивает достаточную близость клетки к поверхности, происходят специфические взаимодействия между рецепторами клеточной поверхности и иммобилизованными на поверхности белками, что обеспечивает механическое закрепление клеток к подложке. Наиболее известный класс рецепторов клеточной поверхности, участвующих в адгезии и распластывании клеток – это семейство интегринов.

Стабильная фиксация клеток к подложке зависит от экспрессии интегринов, и их сродства к внеклеточным белкам, предварительно адсорбированным на поверхности, а также состава белкового слоя на поверхности и конформации адсорбированных белков [6]. Эти условия в конечном итоге определяют судьбу клеток, седиментирующих на поверхности *in vitro*: клетки могут плотно прикрепляться и распластываться, максимизируя площадь контакта с поверхностью или могут сохранять «ошаренную» морфологию, оставаясь плохо прикрепленными и неспособными к распластыванию. В последнем случае специфические взаимодействия не могут быть сформированы, и клетки, зависящие от субстрата, будут погибать. В целом, гидрофильные поверхности способствуют адгезии клеток из-за покрывающего их слоя нативных белков, гидрофобные же поверхности, покрытые слоем белка с ненативными конформациями, часто препятствуют клеточной адгезии, поскольку специфические последовательности таких внеклеточных белков недоступны рецепторам на клеточной поверхности.

Таким образом, для построения эффективных клеточных биомоделей чрезвычайно важно обеспечение биоэквивалентных поверхностей для клеточной адгезии. В соответствии с этим, нами были проведены исследования адгезии клеток на нескольких типах поверхностей, применяемых при производстве микрофлюидных систем, являющихся перспективным инструментом биомоделирования [7]. Мы использовали различные варианты полидиметилсилоксана (Sylgard 184, Dow Corning) и стекло, нами также применялась процедура

активации поверхности кислородной плазмой. Мы сопоставили эффективность адгезии клеток на указанных материалах, обработанных и не обработанных плазмой, а также провели сравнение со специально подготовленным полистиролом, традиционно используемым для культивирования субстратзависимых, адгерентных клеток. Предварительные эксперименты показали, что адгезия клеток на ПДМС была сравнительно низкой, и для повышения ее эффективности нами была применена обработка коллагеном I типа (Sigma-Aldrich), в связи с чем в сравнение были добавлены соответствующие поверхности, покрытые коллагеном. Кроме того, впервые был исследован новый вид полидиметилсилоксана, обладающий большей жесткостью (MS-1002, Dow Corning).

Исследования проводили методом оптической конфокальной микроскопии, позволяющей оценивать степень распластывания клеток по доле поверхности, занятой клетками. Также был применен метод зондовой микроскопии, позволяющий наблюдать характеристики отдельных клеток на различных поверхностях.

Материалы и методы исследования

Клетки. В работе была использована линия эндотелиоцитоподобных адгерентных клеток EA.hy926. Для культивирования EA.hy926 была использована среда DMEM с добавлением 4,5 г/л глюкозы, 10% инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки, 50 мкг/мл гентамицина, 2 ммоль/л L-глутамина, 1% NEAA и фактора роста HAT. Культивирование проводилось в культуральном инкубаторе («Sanyo», Япония) при 37°C в воздушной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Субкультивирование осуществлялось по достижении конfluence в пластиковых матрасах площадью 75 см². При субкультивировании клеточный монослой открепляли от поверхности культурального сосуда при его обработке 0,25% раствором трипсина в ЭДТА в течение 3 минут, после чего полученную суспензию осаждали центрифугированием на скорости 200 г в течение 5-10 минут, ресуспендировали в малом объеме среды и проводили подсчет и оценку жизнеспособности клеток. Жизнеспособность клеток оценивали методом исключения витального красителя трипанового синего. После подсчета, клеточную суспензию разводили питательной средой до плотности 5×10^4 клеток/мл, после чего помещали в новые матрасы 75 см². Субкультивирование проводилось с частотой раз в 2-3 дня.

Образцы для оптической микроскопии. Для оценки степени адгезии клеток к различным подложкам были приготовлены образцы из следующих материалов:

- а) Полидиметилсилоксан (ПДМС, Dow Corning, США);
- б) ПДМС, обработанный плазмой кислорода;
- в) MS-1002 (Dow Corning, США);
- г) MS-1002, обработанный плазмой кислорода;
- д) Стекло;
- е) Стекло, обработанное плазмой кислорода.

Также были исследованы те же материалы, покрытые коллагеном I.

Образцы представляли собой круглые пластины диаметром 16 мм. Стекланные образцы представляли собой

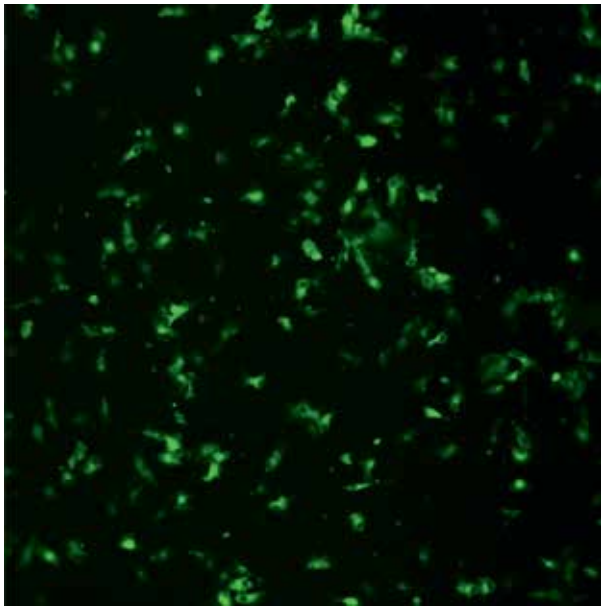


Рис. 1. Конфокальное изображение клеток EA.hy926, меченных FITC на подложке из MS-1002, модифицированной коллагеном.

покровные стекла, аналогичные тем, которые используются в качестве подложек для микрофлюидных чипов. Полимерные пластины были вырезаны из предварительно изготовленной полимерной мембраны.

Образцы помещали в лунки 12-луночного культурального планшета и стерилизовали ультрафиолетом в течение не менее 30 минут. Для модификации коллагеном часть образцов инкубировали в 0,01% растворе коллагена I с содержанием 0,01 М уксусной кислоты при температуре 37°C в течение 2 часов, после чего лунки были отмыты фосфатно-солевым буфером (ФСБ). Клеточную суспензию в концентрации 100 тыс./мл разносили по лункам. Планшеты с клетками EA.hy926 инкубировали в течение двух часов во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂ при 37°C. После 2 часовой инкубации пробы фиксировали 1% раствором параформальдегида в фосфатно-солевом буфере.

Для оценки площадей, занимаемых клетками на субстратах, нами было применено тотальное мечение белков красителем ФИТЦ. Образцы с клетками после фиксации отмывали 2 раза ФСБ, и вносили в каждую лунку 12-луночного планшета по 1 мл буфера и 10 мкл стокового раствора ФИТЦ до конечной концентрации 1 мкг / мл, после чего инкубировали 10 минут. После инкубации образцы отмывали 2 раза ФСБ и делали микрофотосъемку с использованием конфокальной микроскопии на микроскопе Eclipse TE с контроллером C1 с лазером 488 нм и ФЭУ-детектором 515/30 нм (Nikon, Япония). Объекты выделяли на микрофотографиях с применением пороговой фильтрации, и оценивали суммарную площадь, занимаемую клетками.

Образцы для зондовой микроскопии. Для исследования методом ион-проводящей микроскопии были отобраны следующие поверхности, показавшие наилучшую адгезию клеток при исследовании на оптическом микроскопе:

- а) Стекло;
- б) Стекло, обработанное раствором коллагена;
- в) ПДМС, обработанный раствором коллагена.

В качестве основы образцов для зондовой микроскопии были взяты тонкие (около 1 мм) пластины ПДМС отлитые на гладкой поверхности чашки Петри. Пластины помещали в чашки Петри диаметром 60 мм гладкой стороной вверх. На пластину клали круглое покровное стекло диаметром 16 мм. Пластины и стекло выдерживали в растворе коллагена I в течение 2 часов, а затем тщательно промывали ФСБ. Рядом с первым стеклом помещали второе и весь образец стерилизовали под УФ в течение не менее 15 минут. Таким образом получался образец, содержащий все три типа поверхности, выбранных для исследования. Адгезия клеток происходила из эмульсии, содержащей 300 тыс. клеток EA.hy926 в течение 2 часов при 37°C во влажной атмосфере с содержанием 5% CO₂. Затем образцы с клетками фиксировали 1% раствором параформальдегида в фосфатно-солевом буфере, тщательно промывали и заливали БФС. Исследование проводили непосредственно в буфере на сканирующем ион-проводящем микроскопе (ICAPPIC, Великобритания) размещённом на оптическом микроскопе Eclipse Ti (Nikon, Япония) на базе ЦКП МИСиС.

Результаты исследования и обсуждение

Исследование методом оптической конфокальной микроскопии. На полученных на конфокальном микроскопе изображениях окрашенных клеток (рис. 1) выделяли объекты методом пороговой фильтрации. Затем были посчитаны площади объектов, соответствующих адгезировавшим клеткам. Для сравнения площадей, занятых адгезировавшими клетками, на поверхностях на основе разных материалов использовался медианный тест и критерий Краскела-Уоллиса с поправками на множественное сравнение.

Нами были исследована адгезия клеток к поверхностям следующих материалов: ПДМС (PDMS); ПДМС, активированному кислородной плазмой (PDMS+plasma); ПДМС, покрытому коллагеном (PDMS+coll); ПДМС, активированному кислородной плазмой и покрытому коллагеном (PDMS+plasma+coll); стеклу (GLASS); стеклу, активированному кислородной плазмой (GLASS+plasma); стеклу, покрытому коллагеном (GLASS+coll); стеклу, активированному кислородной плазмой и покрытому коллагеном (GLASS+plasma+coll); полидиметилсилоксану MS-1002 (MS); MS-1002, активированному кислородной плазмой (MS+plasma); MS-1002, покрытому коллагеном (MS+coll); MS-1002, активированному кислородной плазмой и покрытому коллагеном MS-1002 (MS+plasma+coll); полистиролу (Plastic); полистиролу, покрытому коллагеном (Plastic+coll). В скобках указано обозначение материала на графиках и в таблицах далее.

Согласно полученным данным, адгезия клеток как к ПДМС, так и к новому типу силоксана MS-1002, невелика и существенно уступает полистиролу (рис. 2, табл. 1). Стекло также оказывается более оптимальным субстратом для клеточной адгезии по сравнению с ПДМС ($p\text{-val} = 0,07$).

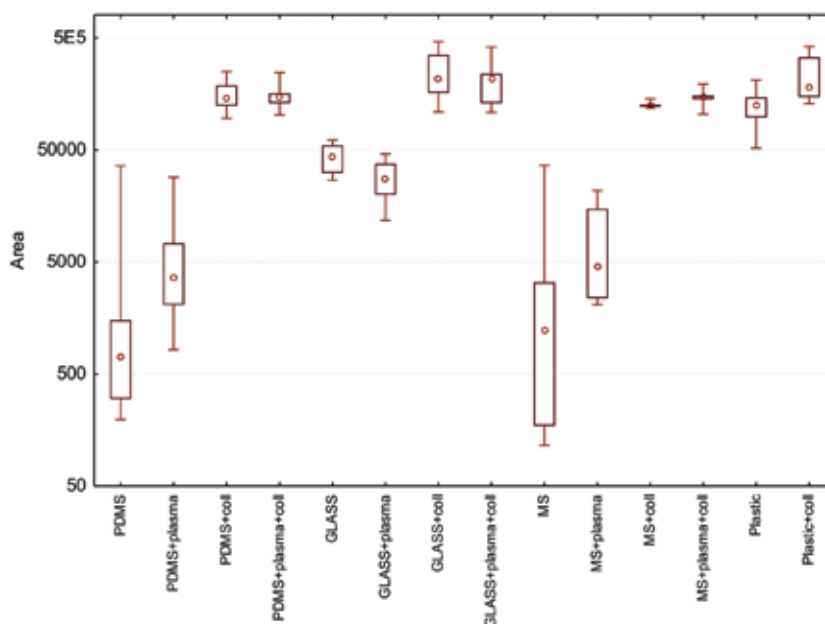


Рис. 2. Площадь, занимаемая клетками, адгезировавшими к поверхности различных материалов. Данные представлены в виде медианы и межквартирного размаха.

Сравнение поверхностей на основе ПДМС показало, что обработка плазмой достоверно не меняет площадь, занимаемую адгезированными клетками в отличие от обработки коллагеном, существенно увеличивающей клеточную адгезию (табл. 2).

Испытанный нами впервые полимер MS-1002 продемонстрировал схожие с ПДМС свойства в качестве подложки для клеточной адгезии: обработка плазмой не меняла эффективность адгезии, и лишь обработка коллагеном ее значительно повышала.

Как следует из полученных данных, стекло является более оптимальным субстратом для адгезии клеток EA.hy926 по сравнению с силоксанами. Однако, обработка плазмой приводила к небольшому снижению площади, занимаемой адгезированными клетками. Коллаген, как и во всех других случаях, увеличивал адгезивную площадь.

Следует отметить, что обработка коллагеном полистирола также заметно увеличивала медиану величины площади, занимаемой клетками.

Исследование методом зондовой микроскопии. Метод оптической микроскопии даёт представление об общем распределении клеток на подложке и степени их распластанности, однако не даёт информации

Таблица 1.

Сравнение площадей, занятых адгезировавшими клетками, на поверхностях на основе различных материалов. Медианный тест и Kruskal-Wallis тест ($H(3, n = 34) = 26,839, p < 0,001$).

	PDMS	GLASS	MS-1002	Plastic
PDMS		0,070765	1,000000	0,000019
GLASS	0,070765		0,251063	0,166614
MS	1,000000	0,251063		0,000763
Plastic	0,000019	0,166614	0,000763	

о состоянии отдельных клеток. Для исследования характеристик и топологии отдельных клеток на различных подложках нами был применён метод сканирующей зондовой микроскопии, а именно сканирующей ион-проводящей микроскопии (СИПМ, рис. 3). Данный метод основан на сканировании топологии поверхности образца с помощью измерения ионного тока через сверхтонкий капилляр [8]. Режим сканирования организован как приближение капилляра к поверхности в последовательности точек над образцом. При сближении капилляра с объектами на поверхности образца просвет капилляра «затыкается» и ионный ток снижается. Преимуществом данного метода по сравнению

Таблица 2.

Сравнение площадей, занятых адгезировавшими клетками, на поверхностях на основе ПДМС. Медианный тест и Kruskal-Wallis тест ($H(3, n = 39) = 29,867, p < 0,001$).

	PDMS	PDMS+plasma	PDMS+coll	PDMS+plasma+coll
PDMS		1,000000	0,000094	0,000079
PDMS+plasma	1,000000		0,007275	0,006337
PDMS+coll	0,000094	0,007275		1,000000
PDMS+plasma+coll	0,000079	0,006337	1,000000	

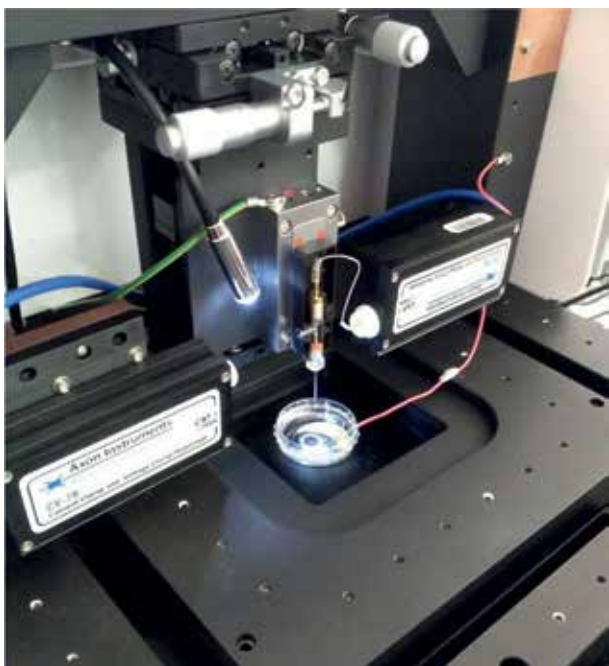


Рис. 3. Исследование адгезии клеток на сканирующем ион-проводящем микроскопе

с другими методиками зондовой микроскопии является то, что можно осуществлять исследования биологических объектов, таких как белки и клетки, в жидкой среде, естественной для подобных объектов. Кроме того, не происходит непосредственного контакта зонда с поверхностью, т.к. регистрируется чрезвычайно малое снижение тока (0,04%), которое достигается на достаточном удалении от поверхности.

Были отсняты изображения клеток на трёх разных подложках – ПДМС обработанный коллагеном (PDMS+Col), стекло, обработанное коллагеном (Glass+Col) и чистое стекло (Glass). Изображения были обработаны путём выравнивания по строкам (квадратам), т.к. сканирование происходит по квадратам и базовый уровень новой строки квадратов может не совпадать с предыдущим из-за программных особенностей, а также путём вычитания общего наклона (при наличии), возникающего из-за неравномерности толщины подложки или закрепления образца. Другой обработки, влияющей на размеры объектов, не производилось. Далее были проведены измерения высот объектов (клеток) по различным построенным сечениям. Также оценивалась общая форма клеток на поверхности.

На ПДМСе обработанном коллагеном клетки имеют распластанную форму, часто вытянутую в нескольких

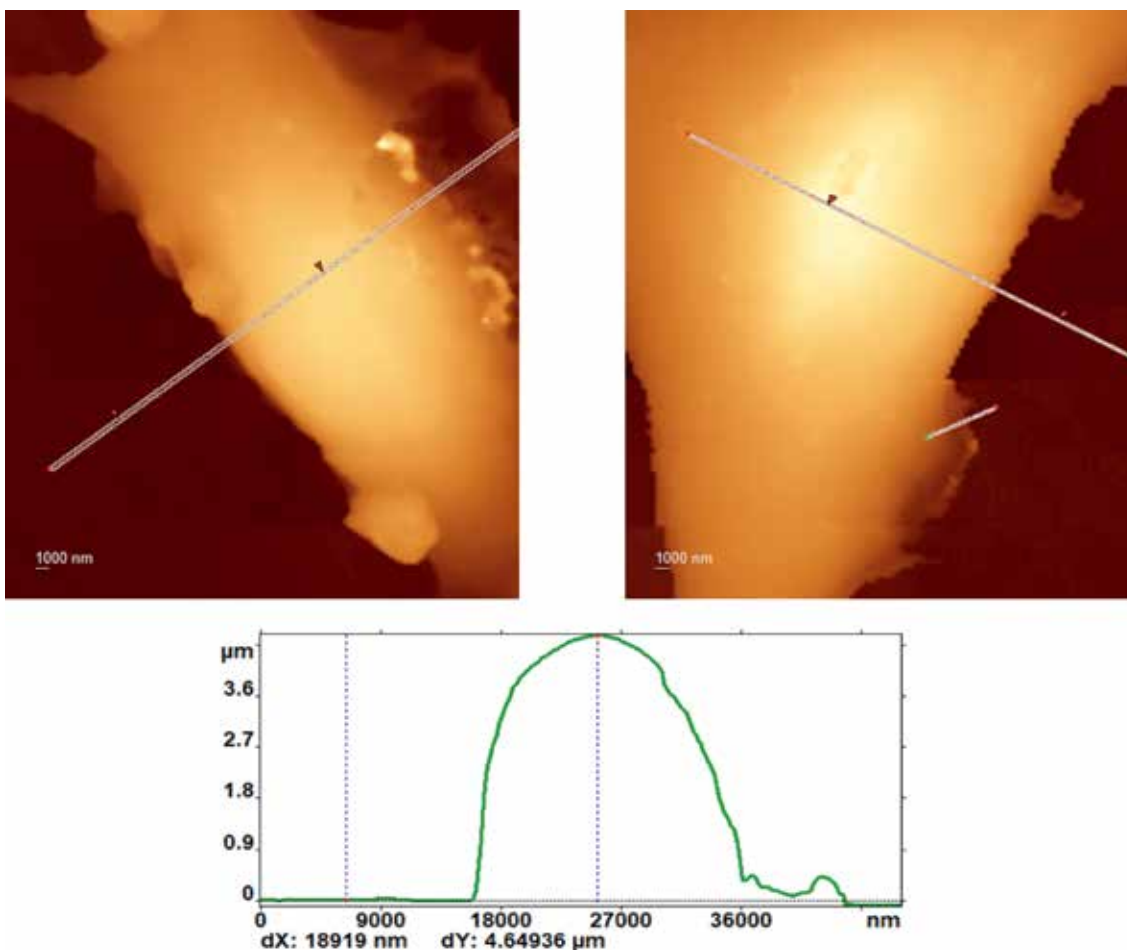


Рис. 4. Топография и профиль сечения клеток EA.hy 926 на поверхности ПДМС обработанного коллагено

направлениях (рис. 4). Высота клетки в ядерной, самой высокой части, составила 4,0-4,6 мкм. Характерным [9] также является наличие ярко выраженных филоподий (рис. 5). Это свидетельствует о способности клеток к миграции по подложке.

На стекле, обработанном коллагеном клетки, также имеют распластannую форму с выростами в разных направлениях. Высота клеток также составила 3,7-4,5 мкм (рис. 6). Для обеих подложек, обработанных коллагеном, характерным является наличие «юбки» в некоторых областях вокруг клетки высотой 100-400 нм.

На чистом стекле клетки выглядят немного иначе. Их максимальная высота составляет 6,0-6,5 мкм. Клетки более округлые и имеют ярко выраженное направление, при этом «спереди» и «сзади» наблюдается плавный подъём, а с боков клетка имеет резкую границу (рис. 7). Такая форма может быть характерна для движения клетки в шарообразном состоянии в поисках благоприятного места для распластывания. Очевидно, что чистая поверхность стекла является менее благоприятной для адгезии клеток и процесс полной адгезии занимает больше времени, что обуславливается необходимостью наработки белков внеклеточного матрикса.

Заключение

По результатам проведённых исследований адгезии клеток EA.hy926 методами оптической и зондовой микроскопии можно сделать следующее заключение. Необработанный ПДМС продемонстрировал низкую способность к адгезии клеток, что мы связываем с его гидрофобностью. При этом полимер не оказывал какого-либо токсического действия. Обработка плазмой с длительностью, достаточной для ковалентной пришивки ПДМС к стеклу, не приводила к существенному увеличению клеточной адгезии. Нами было отмечено некоторое снижение адгезии клеток к стеклу, обрабо-

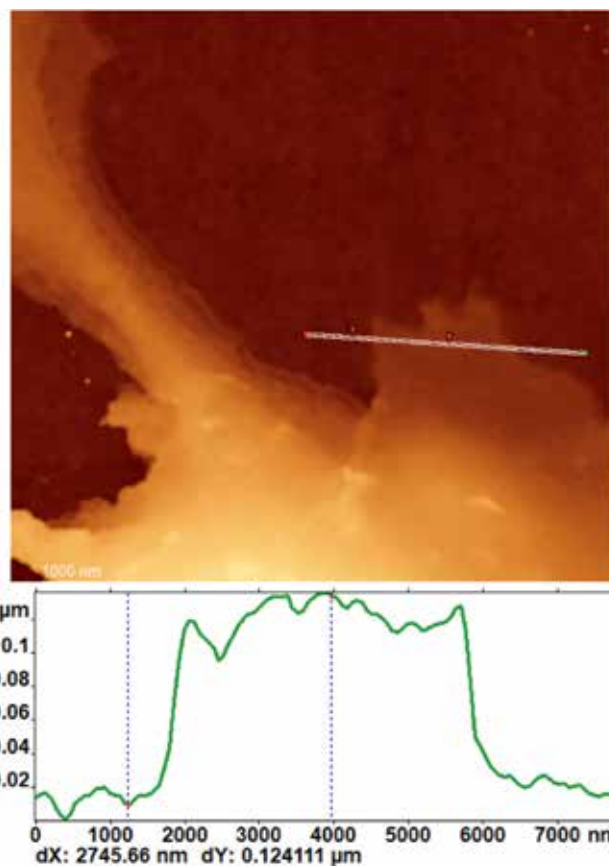


Рис. 5. Формирование псевдоподий на обработанной коллагеном поверхности

танному кислородной плазмой. Обработка коллагеном существенно увеличивала адгезию клеток ко всем субстратам, в значительной степени нивелируя их исходные различия по способности вызывать адгезию кле-

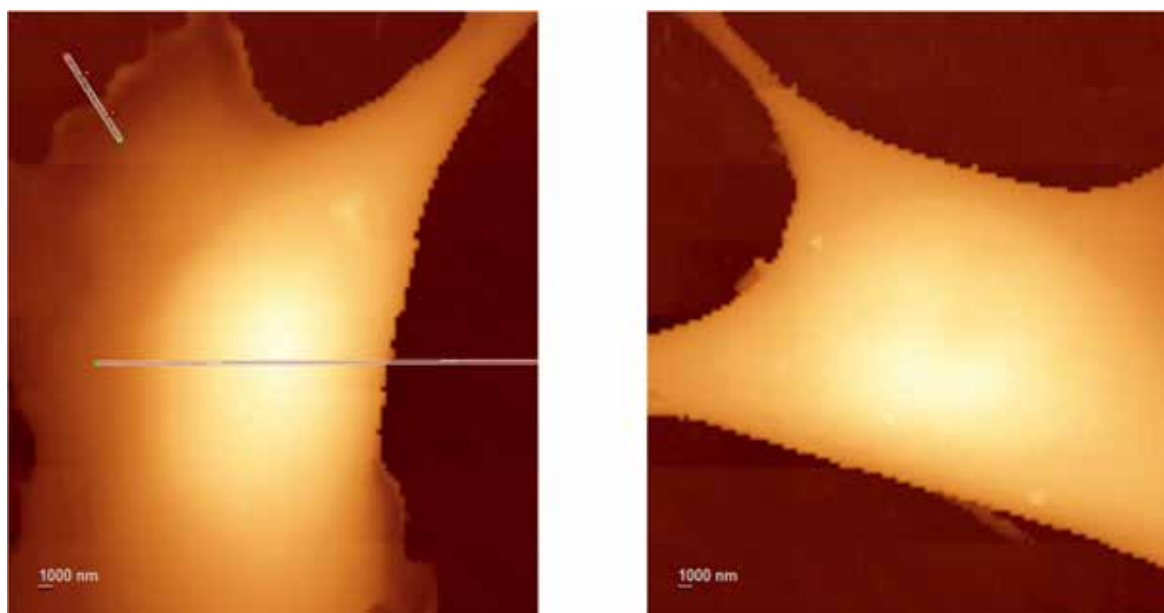


Рис. 6. Топография клеток EA.hy 926 на поверхности стекла обработанного коллагеном

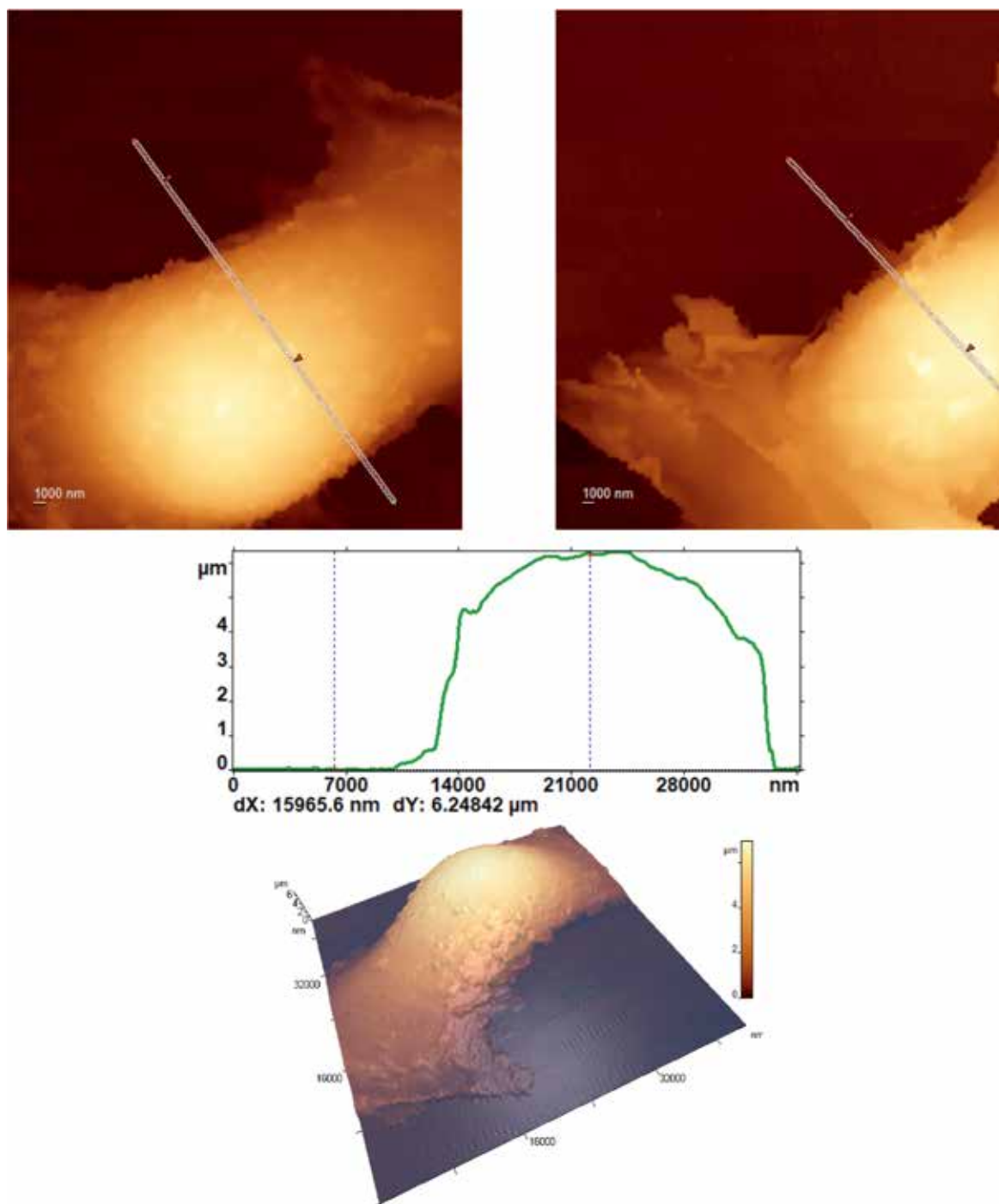


Рис. 7. Топография, профиль сечения и трёхмерная реконструкция клеток EA.hy 926 на поверхности стекла

ток. Тем не менее, адгезия клеток на стекле, покрытом коллагеном, была более выражена, что согласуется с исходной его гидрофильностью, которая, по-видимому, способствует сохранению нативных конформаций адсорбируемых стеклом белков. Данные по исследованию адгезии подтверждаются не только по количеству адсорбированных клеток, но и степени их расплывчатости, а также наличию характерных элементов, таких, как псевдоподии.

Список литературы

1. Bloom A.B., Zaman M.H. Influence of the microenvironment on cell fate determination and migration. *Physiol. Genomics*. 2014; 46(9): 309-314. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00170.2013
2. Lacorre D., Baekkevold E.S., Garrido I.M., Brandtzaeg P.E., Haraldsen G., Amalric F., Girard J. Plasticity of endothelial cells: rapid dedifferentiation of freshly isolated high endothelial venule endothelial cells outside the lymphoid tissue microenvironment. *Blood*. 2004; 103 (11): 4164-4172. DOI: 10.1182/blood-2003-10-3537
3. Khalili A.A., Ahmad M.R. A Review of Cell Adhesion Studies for

- Biomedical and Biological Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16(8): 18149-18184. DOI:10.3390/ijms160818149
4. Lu D.R., Park K. Effect of surface hydrophobicity on the conformational changes of adsorbed fibrinogen. *J. Colloid Interface Sci.* 1991; 144(1): 271-281. DOI: 10.1016/0021-9797(91)90258-A
 5. Bell G.I., Dembo M., Bongrand P. Cell adhesion. Competition between nonspecific repulsion and specific bonding. *Biophys. J.* 1984; 45(6): 1051-1064. DOI: 10.1016/S0006-3495(84)84252-6
 6. Streuli C.H. Integrins and cell-fate determination. *J. Cell Sci.* 2008; 122(Pt 2): 171-177. DOI: 10.1242/jcs.018945
 7. Колесов Д. В., Московцев А. А., Мыльникова, А. Н., Савина, Г. Д., Соколовская, А. А., Кубатиев, А. А. Биомоделирование микрососуда в микрофлюидном чипе. *Патогенез.* 2016; 14(4): 4-8.
 8. Korchev Y.E., Bashford C.L., Milovanovic M., Vodyanoy I., Lab M.J. Scanning ion conductance microscopy of living cells. *Biophys. J.* 1997; 73(2): 653-658. DOI: 10.1016/S0006-3495(97)78100-1
 9. Jacquemet G., Hamidi H., Ivaska J. Filopodia in cell adhesion, 3D migration and cancer cell invasion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2015; 36: 23-31. DOI: 10.1016/j.ceb.2015.06.007
- cells: rapid dedifferentiation of freshly isolated high endothelial venule endothelial cells outside the lymphoid tissue microenvironment. *Blood.* 2004; 103 (11): 4164-4172. DOI: 10.1182/blood-2003-10-3537
3. Khalili A.A., Ahmad M.R. A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16(8): 18149-18184. DOI:10.3390/ijms160818149
 4. Lu D.R., Park K. Effect of surface hydrophobicity on the conformational changes of adsorbed fibrinogen. *J. Colloid Interface Sci.* 1991; 144(1): 271-281. DOI: 10.1016/0021-9797(91)90258-A
 5. Bell G.I., Dembo M., Bongrand P. Cell adhesion. Competition between nonspecific repulsion and specific bonding. *Biophys. J.* 1984; 45(6): 1051-1064. DOI: 10.1016/S0006-3495(84)84252-6
 6. Streuli C.H. Integrins and cell-fate determination. *J. Cell Sci.* 2008; 122(Pt 2): 171-177. DOI: 10.1242/jcs.018945
 7. Kolesov D.V., Moskovtsev A. A., Mylnikova, A. N., Savina, G. D., Sokolovskaya, A. A., Kubatiev, A. A. [Biomodelling of the microvessel in a microfluidic chip]. *Patogenez. [Pathogenesis].* 2016; 14 (4): 4-8. (in Russian)
 8. Korchev Y.E., Bashford C.L., Milovanovic M., Vodyanoy I., Lab M.J. Scanning ion conductance microscopy of living cells. *Biophys. J.* 1997; 73(2): 653-658. DOI: 10.1016/S0006-3495(97)78100-1
 9. Jacquemet G., Hamidi H., Ivaska J. Filopodia in cell adhesion, 3D migration and cancer cell invasion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2015; 36: 23-31. DOI: 10.1016/j.ceb.2015.06.007

References

1. Bloom A.B., Zaman M.H. Influence of the microenvironment on cell fate determination and migration. *Physiol. Genomics.* 2014; 46(9): 309-314. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00170.2013
2. Lacorre D., Baekkevold E.S., Garrido I.M., Brandtzaeg P.E., Haraldsen G., Amalric F., Girard J. Plasticity of endothelial

Сведения об авторах:

Колесов Дмитрий Валерьевич – научный сотрудник лаборатории функциональной ангиопротеомики и метаболомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; директор ООО «Микрофлюидные технологии»

Ерофеев Александр Сергеевич – кандидат физико-математических наук, научный сотрудник лаборатории «Биомедицинские наноматериалы» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «Московский институт стали и сплавов»»

Московцев Алексей Александрович – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции агрегатного состояния крови Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; сотрудник ООО «Микрофлюидные технологии»; доцент кафедры общей патологии и патофизиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Власенкова Наталья Кирилловна – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н.Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Горелкин Пётр Владимирович – кандидат физико-математических наук, научный сотрудник Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «Московский институт стали и сплавов»»

Мыльникова Алёна Николаевна – младший научный сотрудник лаборатории регуляции агрегатного состояния крови Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; аспирантка Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И.Менделеева»

Кубатиев Аслан Амирханович – доктор медицинских наук, академик РАН, научный руководитель Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; заведующий кафедрой общей патологии и патофизиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства Здравоохранения Российской Федерации