Сравнительное исследование поведения клеток спинального ганглия крысы и линии PC12 на поверхностях, модифицированных биоадгезивными полимерами

Л.Д. Якунина, Р.А. Курбанов, О.В. Бондарь, Т.И. Абдуллин

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Comparative study of an activity of rat spinal ganglion cells and PC12 cells on the surfaces modified with bioadhesive polymers

L.D. Yakunina, R.A. Kurbanov, O.V. Bondar, T.I. Abdullin

Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan

Методом динамического рассеяния света исследована адсорбция на полистироле биоадгезивных полимеров (полиорнитина, желатина, ламинина), оценен их вклад в дзета-потенциал модифицированной поверхности. В присутствии сыворотки клетки PC12 не проявляют избирательной адгезии. При культивировании в бессывороточной среде с фактором роста нервов полистирол с адсорбированным полиорнитином способствует первичной адгезии клеток PC12. Последующая адсорбция ламинина индуцирует распластывание и дифференцировку клеток в нейрональном направлении. Первичные нейроны, выделенные из спинальных ганглиев крысы, прикрепляются предпочтительно к поверхности, модифицированной полиорнитином. На поверхности полиорнитин-ламинин нейроны интенсивно образуют нейриты, что коррелирует с пролиферацией глиальных клеток, позитивных по белку S100. Результаты показывают, что клетки PC12 и первичные нейроны проявляют сходный отклик на материал поверхности, однако последние клетки значительно более чувствительны к этому фактору. Выделенная клеточная культура позволяет исследовать взаимосвязь процессов образования нейритов и пролиферации шванновских клеток на различных биоматериалах.

Ключевые слова: клеточные модели, периферический нерв, регенерация, клетки PC12, биоматериалы, биоадгезивные полимеры.

We studied the adsorption of bioadhesive polymers (polyornithine, gelatin, laminin) on polystyrene surface by the use of dynamic light scattering. The contribution of biopolymers to resulting zeta potential of the modified surface was assessed. PC12 cells do not exhibit selective adhesion in the presence of foetal bovine serum. Polystyrene with adsorbed polyornithine promotes primary adhesion of PC12 cells cultured in serum-free medium with nerve growth factor. Subsequently adsorbed laminin induces spreading and differentiation of the cells into neuronal direction. Primary neurons isolated from rat spinal ganglion adhere preferentially on the polyornithine-modified surface. On the polyornithine-laminin surface neurons intensively form neuritis that correlates with proliferation of glial cells positive for S100 protein. The results show that PC12 cells and primary neurons exhibit similar response to surface material with the latter cells being more sensitive to this factor. Isolated cell culture can be used to study the relationship between neurite outgrowth and Schwann cells proliferation on different biomaterials.

Key words: cell models, peripheral nerve, regeneration, PC12 cells, biomaterials, bioadhesive polymers.

Создание информативных in vitro моделей на основе клеток для исследования действия лекарств и материалов является актуальной задачей клеточной биологии, фармакологии и тканевой инженерии. Подобные модели востребованы для продуктивного скрининга биологической безопасности и активности веществ, а их применение позволяет сократить эксперименты с лабораторными животными [1].

Клетки нервной системы являются важными объектами, на основе которых моделируются ростовые, патологические и регенеративные процессы в нервных тканях [2]. Актуальной проблемой является создание моделей для исследования восстановления периферического нерва. При значительных повреждениях нервные волокна не способны к восстановлению функции в отсутствие тканеинженерных матриксов, которые благоприятствуют пролиферации и(или) росту нервных клеток и одновременно направляют эти процессы в пространстве для воссоединения нервного проводника [3].

Общепринятым и достаточно эффективным способом лечения травмы периферического нерва является микрохирургическая аутотрансплантация донорского участка нерва (аутонервная вставка) в место повреждения и(или) разрыва [4], которая, однако, имеет принципиальные недостатки [5]. Перспективным подходом является замена аутографта на искусственные кондуиты на основе биодеградируемых полимерных материалов, которые должны обеспечивать восстановление нерва с высокой эффективностью [6, 7]. В качестве структурной основы для получения кондуитов применяют, в частности, биополимеры: коллаген [8], хитозан [9], альгинат [10], а также синтетические полимеры: полиэфиры [11], полигликолевую кислоту [12]. Для усиления адгезии и роста нервных клеток подобные (био-)полимеры комбинируют с факторами адгезии, такими как фибронектин, ламинин и их фрагменты [13].

Подобные биоматериалы in vitro тестируют с использованием шванновских клеток [14], различных

e-mail: oxanav.bondar@gmail.com

нейрональных линий [15], а также клеток, выделенных из нервных ганглиев [16]. Информативность используемых культур клеток и корреляция их отклика при взаимодействии с материалами остается важным вопросом для тканевой инженерии. Нами проведено сравнительное исследование поведения первичных клеток, выделенных из спинномозговых ганглиев, и клеток феохромоцитомы крысы (линия PC12) на различных полимерных покрытиях. Предложенные подходы представляют интерес для in vitro скрининга регенеративного потенциала полимерных (био-)материалов.

Материал и методы

Культивирование клеток PC12. Клетки PC12 культивировали в стерильных условиях при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в среде DMEM, содержащей 10% сыворотки крови плода коровы, 2 мМ L-глутамина, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина. Для пассирования клетки промывали раствором Хэнкса, обрабатывали 0,05% раствором трипсина с ЭДТА и подсчитывали в камере Горяева. Мертвые клетки выявляли путем их окрашивания трипановым синим.

Выделение клеток из спинальных ганглиев крысы. 10-дневную белую крысу усыпляли в CO_2-камере, под стереомикроскопом Stemi DV4 (Carl Zeiss, Германия) извлекали позвоночник с последующей диссекцией ганглиев и удалением нервных волокон. Ганглии диссоциировали раствором коллагеназы, диссоциированные клетки сепарировали и очищали центрифугированием, осадок клеток суспендировли в среде Neurobasal (Invitrogen, США).

Модификация культуральной посуды. В качестве модельных биоадгезивных полимеров исследовали фибронектин (Биолот, Россия), ламинин, полиорнитин и желатин (Sigma-Aldrich, США). Аликвоту раствора биополимера вносили в лунки полистироловой планшеты, инкубировали 3 ч при 37°C для адсорбции биополимера на поверхности с последующей промывкой фосфатно-солевым буфером (ФСБ). Для послойной модификации процедуру повторяли с использованием другого полимера.

Анализ адсорбции биополимеров методом динамического светорассеяния. В качестве модели поверхности использовали полистироловые наночастицы (Malvern, США), на которые последовательно адсорбировали исследуемые биополимеры. Гидродинамический диаметр и дзета-потенциал наночастиц регистрировали с использованием анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern, США). Измерения проводили в U-образной кювете с позолоченными электродами при pH 7,0 и температуре 25°C. Результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения Dispersion Technology Software 6.2 (Malvern, США).

Культивирование клеток на модифицированных поверхностях. Клетки PC12 и первичные нервные клетки культивировали в стандартных условиях в среде DMEM, содержащей 1% ЭБС, а также бессывороточной среде Neurobasal, содержащей добавку B-27. В обе среды вносили фактор роста нервов (Invitrogen, США) в концентрации 50 нг/мл.

Визуализация и анализ нервных клеток. Цитоплазму клеток окрашивали прижизненным флуорофором кальцеином-AM и ядерным красителем Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, США). Клетки фотографировали в прижизненных условиях на инвертированном микроскопе AxioObserver.A1 (Carl Zeiss, Германия) в режимах светлого поля и флуоресценции. Для выявления шванновских клеток культуру последовательно обрабатывали первичными антителами кролика к белку S100 и вторичными ослиными антителами к кроличьим иммуноглобулинам, меченными FITC согласно рекомендациям производителя (Invitrogen, США).

Результаты и обсуждение

На первом этапе методом динамического светорассеяния исследованы процессы адсорбции биополимеров на полистироловых наночастицах (ПСЧ), использованных в качестве модели (табл.). Установлено, что полиорнитин и желатин адсорбируются на ПСЧ в виде слоя толщиной около 3,6 и 19,3 нм, соответственно. При адсорбции желатина происходит уменьшение отрицательного дзета-потенциала поверхности ПСЧ с -61 до -16,5 мВ, а в случае поликатиона полиорнитина происходит перезарядка частиц до дзета-потенциала +41,9 мВ. Адсорбция ламинина на модифицированных полиорнитином ПСЧ сопровождается агрегацией наночастиц (см.табл.).

Значения гидродинамического диаметра и дзета-потенциала полистироловых наночастиц после адсорбции биополимеров

Материал	Гидродинам. диаметр, нм	Дзета-потенциал, мВ	PDI
ПС	188,6	-61,0	0,030
ПС + ПОР	199,2	+41,9	0,029
ПС + ПОР + ЛМ	271,6	+21,0	0,567
ПС + ЖЕЛ	207,9	-16,5	0,012
ПС + ЖЕЛ + ПОР	201,9	+11	0,183
ПС + ЖЕЛ + ЛМ	301,7	-14,5	0,257
ПС + ЖЕЛ + ПОР + ЛАМ	1058,0	-2,2	0,445

Примечание: ПСЧ — полистироловые наночастицы; ПОР — полиорнитин; ЛМ — ламинин; ЖЕЛ — желатин; PDI — индекс полидисперсности.

Было показано, что исследуемые биополимеры связывались с поверхностью полистирола и формировали модифицирующие слои различной толщины. Результирующий заряд поверхности зависит от изоэлектрической точки (заряда) адсорбированных биополимеров. Сходным образом биополимеры адсорбировались в различных комбинациях на полистироловых планшетах. Вначале исследовали поведение клеток PC12 — линии, выделенной из хромаффинной опухоли надпочечников крысы. В присутствии фактора роста нервов эти клетки дифференцируются в нейроноподобные клетки, способные образовывать аксоноподобные отростки (нейриты).

Выяснено, что в среде DMEM с 1% ЭБС клетки PC12 адгезируются сходным образом как на чистом полистироле, так и на модифицированном различными биополимерами (данные не показаны). По-видимому, это обусловлено присутствием в ЭБС факторов адгезии, которые, адсорбируясь на поверхности, не позволяют оценить влияние исследуемых биополимеров на поведение клеток. В бессывороточной среде Nerobasal взаимодействие клеток PC12 с модифицированными поверхностями было иным. В частности, в этих условиях клетки не прикреплялись к поверхности чистого полистирола и модифицированного желатином (данные не показаны), но сохраняли жизнеспособность и формировали плавающие агрегаты (рис. 1А). К поверхности полиорнитина клетки прикреплялись, однако не распластывались. В присутствии ламинина клетки распластывались на поверхности, приобретая веретеновидную и звездчатую форму, очевидно, в результате того, что специфическое взаимодействие мембранных рецепторов с ламинином индуцирует дифференцировку клеток PC12 в нейрональном направлении.

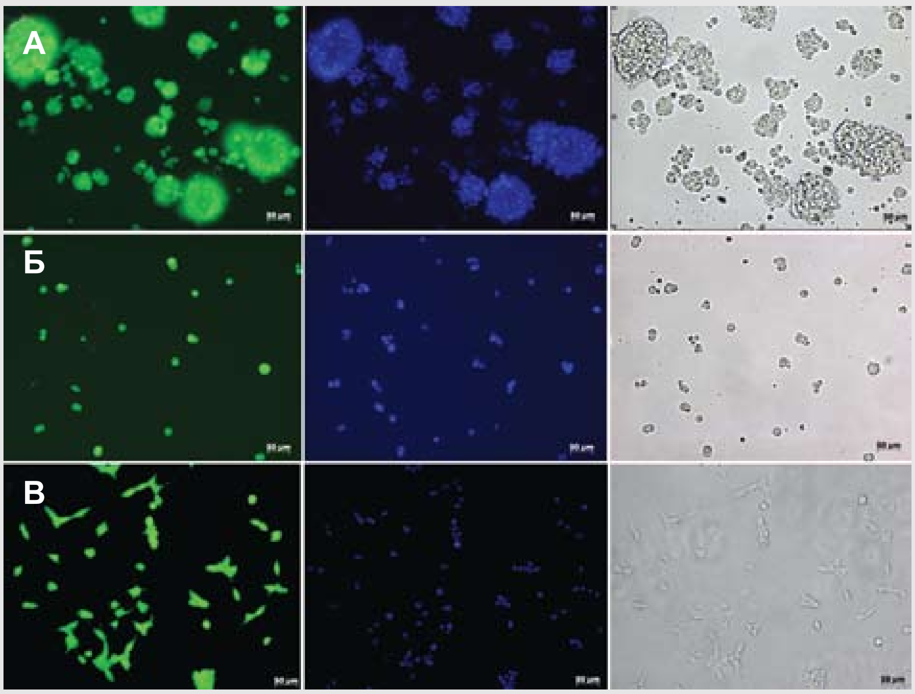

*Рис. 1.
Культуры клеток PC12 на различных поверхностях в среде Neurobasal:
А – чистый полистирол;
Б – полистирол + полиорнитин;
В – полистирол + полиорнитин + ламинин.
Слева направо: кальцеин–АМ, Hoechst 33342, светлое поле.
Флуоресцентная и светлопольная микроскопия*

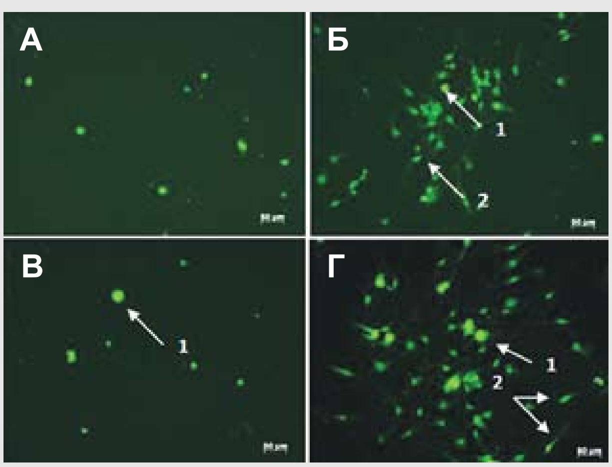

*Рис. 2. Клетки спинномозговых ганглиев крысы на различных поверхностях:
А – полистирол + полиорнитин;
Б – полистирол + полиорнитин + ламинин;
В – полистирол + желатин;
Г – полистирол + желатин + полиорнитин + ламинин.
1 – нейроны;
2 – шванновские клетки.
Флуоресцентная микроскопия*

В отличие от ламинина, фибронектин не обладал подобной активностью, в значительно меньшей степени стимулируя распластывание клеток на фоне полиорнитина (не показано).

Наряду с клетками PC12 представляло интерес исследовать поведение клеток, изолированных из спинальных ганглиев крысы. Были выделены нейроны с примесью глиальных клеток, которые культивировали на модифицированных поверхностях в тех же условиях, что и клетки PC12 (бессывороточная среда Neurobasal + фактор роста нервов).

Было установлено, что первичные нейроны не закреплялись на чистом полистироле, но хорошо адгезировались к поверхности адсорбированного полиорнитина и, в меньшей степени, к поверхности желатина (рис. 2). На поверхности из полиорнитина и ламинина наблюдалась быстрая пролиферация сопутствующих клеток (рис. 2Б), которые, по данным иммунофлуоресцентного анализа, экспрессировали белок S100 – маркер шванновских клеток.

Одновременно с пролиферацией шванновских клеток наблюдался рост отростков нейронов. Очевидно, что поверхность, последовательно модифицированная полиорнитином и ламинином, благоприятствует клеточным процессам, участвующим в восстановлении периферического нерва, что согласуется с данными литературы [17]. Быструю скорость пролиферации шванновских клеток и роста нейритов также наблюдали на модифицированной поверхности, которая наряду с полиорнитином и ламинином содержала желатин (рис. 2Г).

Результаты показывают, что клетки PC12 и выделенная из спинальных ганглиев культура первичных клеток характеризуются сходным откликом на материал поверхности в присутствии фактора роста нервов. В то время, как положительно заряженная поверхность способствует первичной адгезии клеток, адсорбция ламинина усиливает их дифференцировку, образование нейритов, а также пролиферацию шванновских клеток. В отличие от первичных нейронов, клетки PC12 претерпевают относительно слабые цитоморфологические изменения при культивировании в присутствии ламинина.

Благодарности

Работа софинансировалась в рамках выполнения ФЦП Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашения № 14.А18.21.0113 и № 14.А18.21.1236) и ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (проект по созданию Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Sarmento B., Andrade F., Silva S.B. et al. Cell-based in vitro models for predicting drug permeability. Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol. 2012; 5: 607–21.
2. Beaulieu M.M., Tremblay P.L., Berthod F. Tissue-engineered models of the nervous system. Med. Sci. 2009; 25(III): 288–92.
3. Pfister L.A., Papaloizos M., Merkle H.P. et al. Nerve conduits and growth factor delivery in peripheral nerve repair. J. Peripher. Nerv. Syst. 2007; 12: 65–82 .
4. Schmidt C.E., Leach J.B. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. Biomed. Eng. 2003; 5: 293–347.
5. Pollock M. Nerve regeneration. Curr. Opin. Neurol. 1995; 8: 354–8.
6. Челышев Ю.А., Богов А.А. Экспериментальное обоснование применения кондуитов нерва. Неврологический вестник 2008; 101–9.
7. Tsai E.C., Dalton P.D., Shoichet M.S. et al. Matrix inclusion within synthetic hydrogel guidance channels improves specific supraspinal and local axonal regeneration after complete spinal cord transaction. Biomaterials 2006; 27: 519–33.
8. Archibald S.J., Krarup C., Shefner J. et al. A collagen-based nerve guide conduit for peripheral nerve repair: an electrophysiological study of nerve regeneration in rodents and nonhuman primates. J. Comp. Neurol. 1991; 306: 685–96.
9. Haipeng G., Yinghui Z., Jianchun L. et al. Studies on nerve cell affinity of chitosan-derived materials. J. Biomed. Mater. Res. 2000; 52: 285–95.
10. Matyash M., Despang F., Mandal R. Novel soft alginate hydrogel strongly supports neurite growth and protects neurons against oxidative stress. Tissue Eng. 2012; 18(I–II): 55–66.
11. Tse K.H., Sun M., Mantovani C. et al. In vitro evaluation of polyester-based scaffolds seeded with adipose derived stem cells for peripheral nerve regeneration. J. Biomed. Mater. Res. 2010; 95(III): 701–8.
12. Nakamura T., Inada Y., Fukuda S. et al. Experimental study on the regeneration of peripheral nerve gaps through a polyglycolic acid-collagen (PGA-collagen) tube. Brain Res. 2004; 1027: 18–29.
13. Zhang J., Oswald T.M., Lineaweaver W.C. et al. Enhancement of rat sciatic nerve regeneration by fibronectin and laminin through a silicone chamber. J. Reconstr. Microsurg. 2003; 19(VII): 467–72.
14. Weinstein D.E. Review: The role of schwann cells in neural regeneration. Neuroscientist 1999; 5: 208–16.
15. Bledi Y., Domb J.A., Linial M. Culturing neuronal cells on surfaces coated by a novel polyethyleneimine-based polymer. Brain Res. Protoc. 2000; 5(III): 282–9.
16. Corey J.M., Lin D.Y., Mycek K.B. et al. Aligned electrospun nanofibers specify the direction of dorsal root ganglia neurite growth. J. Biomed. Mater. Res. A. 2007 Dec 1; 83(III): 636–45.
17. Chen Y.S., Hsieh C.L., Tsai C.C. et al. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. Biomaterials 2000; 21(XV): 1541–7.

Поступила 24.09.2012