

ОСОБЕННОСТИ РОСТА И МОРФОЛОГИИ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА, КУЛЬТИВИРОВАННЫХ НА ПОДЛОЖКАХ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ НАНОРАЗМЕРНЫМИ ВОЛОКНАМИ КОЛЛАГЕНА И ХИТОЗАНА

© 2017 г. Р.А. Морозов, А.В. Никитина*, А.В. Ромашкин, И.А. Суетина**,
М.В. Мезенцева**, В.К. Неволин

*Национальный исследовательский университет «Московский институт электронной техники»,
124498, Москва, Зеленоград, пл. Шокина, 1*

E-mail: vkn@miee.ru

**ООО «НИОБИС», 124498, Москва, Зеленоград, проезд 4806, 5/23*

E-mail: info@bio-nano.ru

***Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ,
123098, Москва, ул. Гамалеи, 16*

E-mail: cells@rambler.ru

Поступила в редакцию 19.02.16 г.

После доработки 30.09.16 г.

Проведено исследование взаимосвязи морфологии клеток с топографией и составом материала покрытия подложек на основе наноразмерных волокон коллагена и хитозана при культивировании клеточной культуры нормальных фибробластов эмбриона человека. С применением методов атомно-силовой микроскопии на субмикронном уровне изучены особенности морфологии клеток, выращенных на модифицированных подложках, в частности количества ресничек и жгутиков диаметром до 100 нм, в сравнении с их пролиферативной активностью на стеклянных подложках. Предложены способы управления ростовой активностью путем изменения структуры и состава материала покрытия. Изучено влияние сниженного рН поверхности материала покрытия на ростовую активность и морфологию клеток. Предложены способы аэрозольного нанесения коллоидных растворов биополимеров.

Ключевые слова: коллаген, хитозан, альбумин, фибробласты, пролиферация, морфология клеток.

В настоящее время активно ведутся работы по созданию различных клеточных каркасов из природных биополимеров, способствующих более интенсивной адгезии, миграции и пролиферации клеточных культур [1]. С позиций современной медицины важны разработка и расширение спектра имплантируемых материалов на основе биополимерных матриц, содержащих стимулирующие добавки, обладающих биосовместимыми, биodeградируемыми свойствами и способствующих росту и развитию различных типов клеток и направленной регенерации целевых (поврежденных) тканей, что обусловлено спецификой применения таких изделий, которые, как правило, соприкасаются с

двумя–тремя типами тканевых структур в месте своего применения и должны обеспечивать лишь восстановление определенного типа тканей, не способствуя образованию спаек между различными органами и тканями организма [2].

Биологические исследования опираются в основном на оптические методы оценки роста клеточных культур и тканей [1], в то время как механизмы взаимодействия с волокнами биорезорбируемых материалов, очевидно, лежат на существенно более низкоразмерном уровне клеточных структур и молекул. С другой стороны, применение методов атомно-силовой микроскопии (АСМ) позволяет изучать одновременно как морфологию клетки в целом, так и морфологию подложки, содержащей микро- и наноструктуры, а следовательно, и изучать результаты их взаимного влияния в совокупности со статистическими методами оценки пролиферативной активности клеточных культур. При

Сокращения: АСМ – атомно-силовая микроскопия, ФЭЧ-Г – нормальные фибробласты эмбриона человека, МТТ-тест – колориметрический тест с тетразолиевым красителем, БСА – бычий сывороточный альбумин.

этом использование АСМ, в отличие от сканирующей электронной микроскопии, позволяет одинаково хорошо визуализировать слабопроводящие структуры, к которым, несомненно, следует отнести как сами разрабатываемые биосовместимые материалы, так и выращенные на них клеточные культуры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оценки влияния на ростовую активность клеток модификации поверхности подложек на основе волокон коллагена и хитозана, формирующих покрытие (клеточный каркас), была использована клеточная культура нормальных фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ-Т) из коллекции культур клеток Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ. Для культивирования клеток использовали стандартную питательную среду производства Московского института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова с 10%-й эмбриональной телячьей сывороткой («ПанЭко», Россия). Определение точного количества клеток, взятого в эксперимент, проводили непосредственно перед посевом свежеприготовленной культуральной смеси в лунки с образцами с помощью автоматического счетчика клеток Scepter Millipore (Merck KGaA, Германия). Клетки вносили в концентрации 100–250 тыс. кл./мл и культивировали в течение 48 ч в термостате с атмосферой CO₂ при 37°C на модифицированных и контрольных чистых стеклянных подложках размером 24 × 24 мм в шестиугольных планшетах (Costar, США), в каждом из которых было по два контрольных образца. Затем стеклянные подложки вынимали и помещали в чистые лунки планшетов, где с ними проводили МТТ-тест (колориметрический тест с тетразолиевым красителем для оценки метаболической активности клеток) [3]. Оценку индекса пролиферации, под которым будем понимать увеличение клеточной массы относительно контроля, проводили по методу МТТ путем измерения оптической плотности контрольных (выросших на чистой подложке) и полученных в результате роста клеток на модифицированных подложках препаратов на микропланшетном фотометре ImmunoChem-2100 (High Technology Inc., США) на длине волны 545 нм. Кроме МТТ-метода, также дополнительно проводили оптический контроль морфологии выросших клеток.

Для модификации поверхности покровных стекол использовали хитозан (Acros Organics, США) в виде порошка, содержащего волокна длиной около 3–7 мкм и диаметром в диапазоне

20–100 нм (по данным предварительного исследования морфологии подложек в АСМ), с молекулярной массой 600–800 кДа и степенью деацетилирования более 80%; коллаген (в основном первого типа) в виде хлопьев, произведенный из говяжьих шкур с сохранением волокнистой нативной трехцепочечной структуры (ОАО Лужский завод «Белкозин», Россия), с диаметром волокон около 20–40 нм (по данным предварительного исследования морфологии подложек в АСМ); бычий сывороточный альбумин (БСА) фракции V с молекулярной массой около 68 кДа (AppliChem, Германия).

Для формирования пленки на поверхности подложек применяли осаждение коллоидного раствора на основе коллагена и хитозана, содержащего также альбумин, выполняющий роль стабилизирующего коллоидный раствор вещества. Соотношение компонентов раствора было выбрано на основе визуального наблюдения за седиментацией раствора, исходя из обеспечения наибольшего времени, требуемого для формирования осадка и расслоения раствора. Массовая концентрация компонентов коллагена, хитозана и БСА составила соответственно 1,2, 0,6 и 0,4 мг на 1 г воды. Перед добавлением хитозана осуществляли ультразвуковую обработку коллоидного раствора коллагена в ультразвуковой ванне с частотой ультразвука 30 кГц в течение 15 мин, затем добавляли хитозан и БСА с последующим перемешиванием в магнитной мешалке при 1000 об/мин в течение 15 мин. В случае формирования коллаген-модифицированных подложек использовали аналогичную методику и, соответственно, 1,2 мг коллагена на 1 г воды, а в случае хитозан/БСА-модифицированных подложек – 0,6 мг хитозана и 0,4 мг БСА на 1 г воды. Подложки формировали путем осаждения на покровные стекла размером 24 × 24 мм приготовленного раствора объемом около 50 мкл с равномерным распределением раствора по площади подложки при помощи стержня, смачиваемого раствором без контакта с поверхностью, в сочетании с нагревом при 60°C, который, с одной стороны, не приводит к изменениям структуры коллагена [4], альбумина [5] и тем более хитозана, обладающего существенно большей температурной стабильностью [6], а с другой – обеспечивает приемлемое время сушки и уход воды из структуры материала покрытия [7]. Кроме того, для сравнительного анализа морфологии формируемых пленок был также использован метод пневматического аэрозольного нанесения с использованием волокон из коллоидных растворов с аналогичной

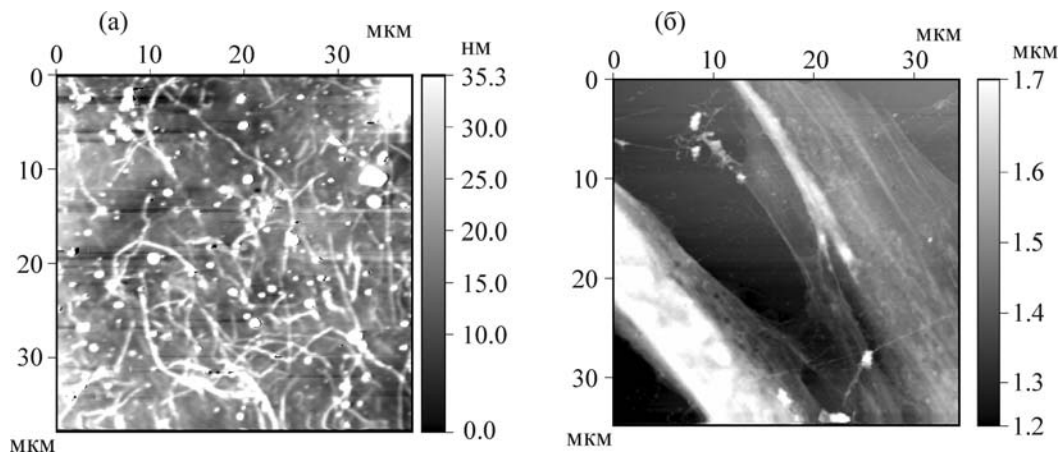


Рис. 1. (а) – АСМ-топография коллагеновой пленки до культивирования на ней клеток ФЭЧ-Т; (б) – АСМ-топография отдельной клетки ФЭЧ-Т и коллагеновой пленки после культивирования на ней клеток в течение 48 ч.

концентрацией и аналогичным нагревом поверхности.

Для проведения АСМ-исследований клетки на подложках после проведения роста фиксировали 2,5%-м глутаральдегидом с последующей дегидратацией в спирту, аналогично ранее использованной методике [8]. Исследование средствами АСМ морфологии клеток и топографии подложки проводили в полуконтактном режиме на сканирующем зондовом микроскопе Solver Pro (ЗАО «НТ-МДТ», Зеленоград, Россия) с неконтактным кремниевым кантилевером серии NSG с резонансной частотой около 150 кГц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования влияния отдельных компонентов материала, в частности коллагена и хитозана, были сформированы соответствующие покрытия, модифицированные коллагеновыми волокнами и хитозановыми волокнами в сочетании с БСА, функция которого в случае работы с хитозаном обуславливалась увеличенной в два–три раза стабильностью раствора относительно времени образования осадка. Были проведены АСМ-исследования в совокупности с экспериментами по культивированию клеток на коллаген- и хитозан/БСА-модифицированных подложках.

При формировании пленки на поверхности стекла образуется слой (толщиной порядка 150–300 нм) материала, представлявшего собой достаточно равномерную сетку коллагеновых волокон (см. рис. 1а), которая существенно деградирует в течение 48 ч, что обусловлено как биodeградацией, так и действием питательной

среды. Это способствует достаточно быстрому размягчению пленки вследствие набора материалами коллагена и хитозана воды (более 200% по массе) [9].

В результате после культивирования клеток на образцах в течение 48 ч и последующей фиксации количество наблюдаемых в АСМ волокон, особенно большого диаметра, существенно меньше исходного (см. рис. 1б, это наблюдение коррелирует с результатами других работ [10]), что в свою очередь и обуславливает необходимость введения в материал покрытия более стабильных хитозановых волокон.

В случае хитозан/БСА-модифицированных подложек на поверхности стекла формируется слой (толщиной порядка 150–300 нм) материала, представлявшего собой достаточно равномерную сетку хитозановых волокон (см. рис. 2а), которая также существенно уменьшается по плотности после проведения роста клеток в течение 48 ч (см. рис. 2б). Светлые области на рис. 2б обусловлены наличием БСА, скрывающего часть волокон хитозана с малым диаметром.

Колориметрическим МТТ-методом оценена величина индекса пролиферации по соотношению оптической плотности при длине волны 545 нм клеток ФЭЧ-Т, выросших на обоих типах модифицированных подложек, в сравнении с контрольными образцами в виде чистых покровных стекол. Для коллагеновой пленки величина оптической плотности равна 1,94 (ошибка измерения менее 0,07), что на 23–47% больше, чем на двух контрольных стеклах (среднее значение 1,45). Для хитозан/БСА-пленки величина оптической плотности равна 0,94 (ошибка измерения менее 0,03), что на 25–45%

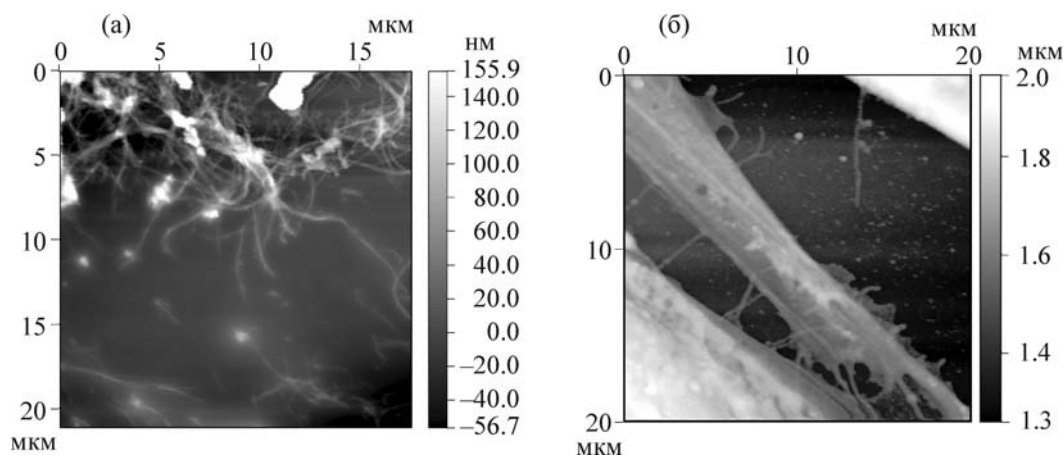


Рис. 2. (а) – АСМ-топография пленки хитозан/БСА до культивирования на ней клеток ФЭЧ-Т; (б) – АСМ-топография отдельной клетки ФЭЧ-Т и пленки хитозан/БСА после культивирования на ней клеток в течение 48 ч.

больше, чем на двух контрольных стеклах (среднее значение 0,70). Во всех вариантах модификации подложек наблюдался полный монослой из однотипных, характерных для исходной культуры ФЭЧ-Т, фибробластоподобных клеток с ядрами овальной формы и мелкосетчатой цитоплазмой, а индекс пролиферации составил около 30%. Различие в значениях оптической плотности контрольных образцов при сравнении двух экспериментов обуславливается меньшей посевной дозой в случае экспериментов с хитозан/БСА (90 тыс. кл./мл) в сравнении с коллагеном (250 тыс. кл./мл). Причина такого отличия заключалась в некотором разбросе в количестве выращенной культуры клеток в подготовительном к эксперименту этапе, поскольку эксперименты были поставлены на разных типах подложек в сильно разнесенных по времени экспериментах; также была необходима проверка возможности формирования монослоя клеточной культуры на модифицированной поверхности подложки даже при уменьшении посевной дозы.

На основании этих экспериментов с учетом большей удельной прочности и длины волокон хитозана, большей стабильности в жидкой среде и большего времени резорбции хитозана, а также материалов коллаген/хитозан в отношении уже 7/3 [11], была выбрана оптимальная концентрация компонентов раствора для потенциального обеспечения приемлемой прочности и стабильности материала в водной среде для последующего применения в медицинских целях. При этом применение БСА и коллагена позволяет получить большую однородность и распределение тонких волокон менее 100 нм по площади подложки, а также большую стабильность коллоидного раствора. В результате

на покровных стеклах были сформированы пленки композита коллаген/хитозан/БСА, играющего роль матрикса или каркаса для роста клеток, и проведено исследование их топографии в АСМ (см. рис. 3а), показавшее, что полученный раствор формирует на поверхности подложки равномерную сетчатую структуру из взаимодействующих друг с другом волокон, а также исследование морфологии выращенных на них клеток (см. пример на рис. 3б).

Образцы с пленками композита коллаген/хитозан/БСА показали аналогичные результаты по морфологии клеток на микро- и наноразмерном уровне с формированием монослоя клеток при аналогичных условиях культивирования, однако МТТ-тест на этих образцах не проводился, и они исследовались лишь средствами АСМ-микроскопии. Тем не менее схожие результаты по МТТ-методу, полученные отдельно для подложек модифицированных планками коллагеновых волокон и материалом хитозан/БСА, позволяют в сочетании с аналогичной морфологией и количеством выращенных клеток (на основании оптического контроля) предположить увеличенную относительно контроля ростовую активность клеток, культивированных на пленках композита коллаген/хитозан/БСА.

Для анализа морфологии клеток на наноразмерном уровне (в оптический микроскоп отличия не наблюдались) был проведен подсчет наноразмерных по высотам отростков клеток – жгутиков и ресничек – на модифицированных и контрольных подложках. Подсчет ресничек/жгутиков осуществлялся по принципу их ориентации относительно нормали к краю клетки (в диапазоне $\pm 5^\circ$) с учетом возможной длины и постоянства толщины ресничек/жгу-

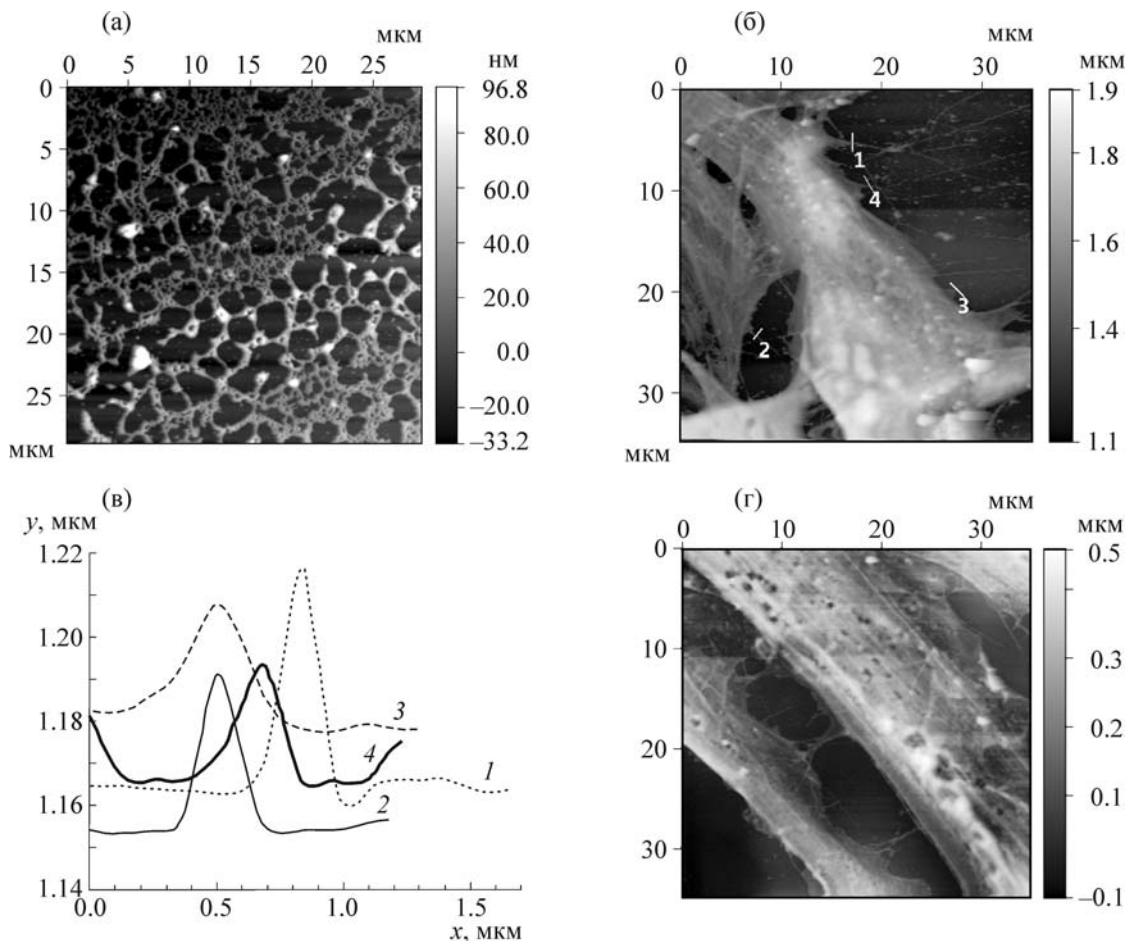


Рис. 3. (а) – Морфология пленки материала коллаген/хитозан/БСА; (б) – морфология клеток ФЭЧ-Т, выращенных на материале коллаген/хитозан/БСА; (в) – соответствующие профили сечений жгутиков/ресничек, отмеченные линиями с цифрами на рис. 3б; (г) – морфология клеток ФЭЧ-Т, выращенных на чистых стеклах в течение 48 ч.

тиков, обусловленной их внутренним строением, а также преимущественной прямолинейностью и наличием сглаженности линии края клетки, плавно переходящей в отросток, что в совокупности факторов служило отличием между оставшимися волокнами материала и жгутиками клетки.

В процессе роста клетки поглощают исходную структуру, в результате чего на образце остаются лишь отдельные волокна, что позволяет сделать вывод о биологическом разложении материала в ходе клеточного роста. Данный процесс может обеспечивать ускоренный рост новой ткани в организме. Кроме того, в результате физического взаимодействия волокон каркаса с поверхностью клеток происходит направленное движение клеток, являющееся ключевым событием, без которого ускоренное заполнение клетками поверхности и успешная регенерация тканей также невозможна. При этом ключевым фактором для адгезии клеток

и их миграции, а также процессов обмена веществ со средой является не только состав материала подложки, но и его морфология на микро- и наноуровне [12]. Способность к направленному перемещению обусловлена наличием у клеток специальных органов движения – жгутиков и ресничек, осуществляющих вращательные движения, и существенно зависит от их количества. Таким образом, наличие большого числа отростков позволяет клетке двигаться с большей скоростью.

Из сравнения рис. 3б и 3г видно, что реснички клеток в случае отсутствия коллаген/хитозановых волокон присутствуют в основном только в пространстве между клетками, в то время как при наличии на подложке волокон они равномерно распределены по всему периметру. Высота ресничек и жгутиков на фиксированных клетках составила около 25–50 нм, что находится в том же диапазоне, что и характерные размеры волокон и рельефа мате-

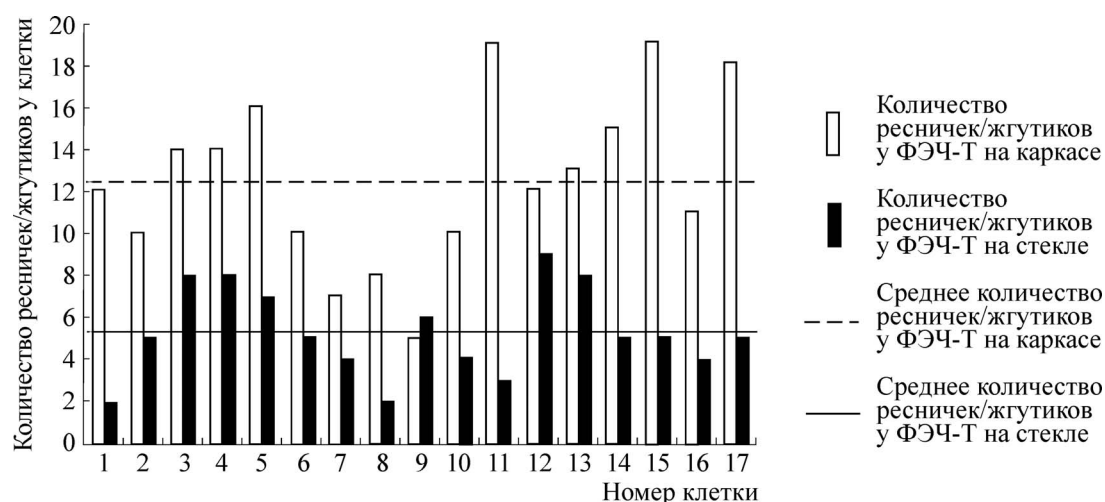


Рис. 4. Сравнение количества жгутиков/ресничек клеток ФЭЧ-Т, культивированных на чистых стеклах и на каркасе в течение 48 ч.

риала покрытия коллаген/хитозан/БСА (см. шкалу высот рис. 3а и 3в). Наблюдаемое соответствие размеров благоприятно влияет на клеточную фиксацию, миграцию и рост.

Средствами АСМ было исследовано большое количество подложек (более десяти), с проведением анализа морфологии более 40 клеток, на основании чего было проведено сравнение числа ресничек/жгутиков у клеток, выращенных на каркасе, с количеством ресничек/жгутиков у клеток, выращенных на контрольных образцах. Гистограмма распределения и сравнение среднего количества приведена на рис. 4.

Среднее для клеток ФЭЧ, выращенных на каркасе, составляет 12 ресничек/жгутиков на клетку, в то время как выросшие на контрольных образцах клетки имеют в среднем пять ресничек/жгутиков на клетку. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что поверхность культивирования значительно влияет на количество клеточных отростков, что в совокупности с данными по ускоренной пролиферации указывает на ускорение не только миграции клеток в процессе роста, но и ускорение ключевых внутриклеточных процессов. Увеличение числа ресничек и жгутиков у клеток не только способствует большей миграции клеток, но и увеличению передачи сигналов между клетками благодаря наличию на мембране ресничек специфических рецепторов [13]. Можно полагать, что подобная передача сигналов [14] может влиять на ускоренную пролиферацию и ускоренное зарастивание клетками имеющейся поверхности для роста, благодаря более быстрому определению для каждой клетки как уже занятого соседними клетками пространства, так и еще свободных мест для активации деления.

Однако для проверки этого требуются дополнительные исследования на различных временах культивирования при сравнении с контрольными образцами, а также анализ средних размеров клеток.

Для проверки влияния на рост клеток присутствия коллагеновых и хитозановых волокон в структуре покрытия подложки покрытия на основе хитозан/БСА были изготовлены с добавлением в осаждаемый раствор хитозана аскорбиновой кислоты 0,25% по массе раствора. Хитозан имеет в своей структуре аминокислоты. Наличие аминокислот означает, что изменение рН раствора существенно изменяет зарядовое состояние и свойства хитозана [15]. При низком рН (уже около 6,0) эти аминокислоты становятся протонированными, что делает хитозан водорастворимым, при высоком рН – наоборот. При добавлении кислоты хитозановые наноразмерные волокна в растворе изменяют свои свойства и при получении пленки на стеклянной подложке формируют однородную пленку, теряя волокнистую структуру. При этом рН поверхности такой пленки ниже (рН использованных 0,25 % по массе растворов аскорбиновой кислоты и хитозана находился в диапазоне 5,4–5,6 ед.), чем в случае покрытия, сформированного из растворов в отсутствие применения кислоты (рН растворов в диапазоне 6,8–7,0).

На приготовленных образцах материала покрытия хитозан/БСА, полученных из слабого раствора аскорбиновой кислоты (0,25 %), был осуществлен рост культуры клеток нормальных фибробластов ФЭЧ-Т. Индекс пролиферации относительно контроля практически не отличался, т.е. ускоренного роста уже не наблюдалось, так же как и существенного снижения

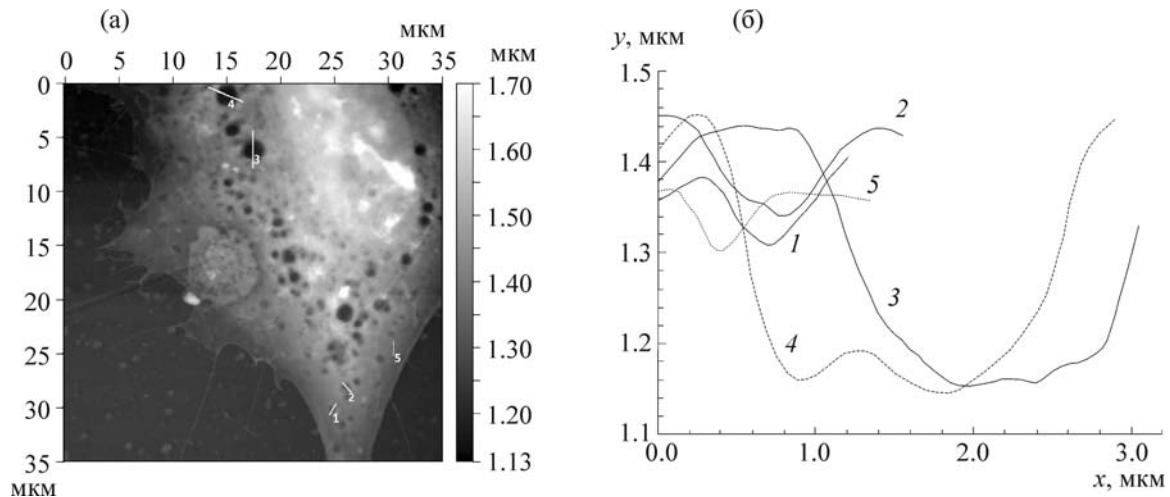


Рис. 5. (а) – АСМ-топография клеток ФЭЧ-Т, культивированных на пленке коллаген/хитозан/БСА с добавлением аскорбиновой кислоты, после фиксации; (б) – соответствующие профили сечений пор, отмеченные линиями с цифрами на рис. 5а.

ростовой активности клеток на материале покрытия. Однако по результатам изучения морфологии клеток в АСМ можно сделать вывод о том, что часто применяемая в качестве сшивающего волокна хитозана агента кислота неблагоприятно влияет на клеточную морфологию (см. рис. 5а). При добавлении кислоты в мембранах фиксированных выращенных клеток наблюдаются большие поры, диаметр которых достигает нескольких мкм (см. рис. 5б). Это указывает на существенные изменения в структуре оболочки клеток в процессе их роста, выявляемые, вероятно, при их фиксации перед проведением АСМ-исследования. Кроме того, изменение рН может также вызывать изменение потенциала мембран клеток и соответственно изменение транспорта веществ через мембрану, а с другой стороны, существенно изменять параметры биодеградации структуры материала покрытия, что, предположительно, в совокупности и приводит к отсутствию ускоренного роста клеток в случае материала покрытия хитозан/БСА, осажденным из раствора с использованием аскорбиновой кислоты.

Таким образом, уже ограниченное добавление кислоты не вызывает ускорения в ростовой активности клеток, притом что остальные компоненты материала покрытия не изменялись. При этом морфология клеток существенно отличалась от контроля или образцов клеток коллаген-хитозанового покрытия в отсутствие кислоты, что указывает на существенные отличия в составе клеточных мембран и в их жизнедеятельности, а также демонстрирует влияние на индекс пролиферации и морфологию клеток сниженного рН поверхности материала под-

ложки, а также структуры самой поверхности материала – наличия/отсутствия наноразмерных волокон. Данное обстоятельство может иметь и положительное значение. Этот фактор может быть использован при создании хирургических материалов, которые на одной из своих поверхностей должны обеспечивать ускоренный рост клеток, а на другой не должны срастаться с другими тканями организма, т.е. не образовывать так называемых спаек с соседними органами в процессе ранозаживления (клетки соседних органов не имеют потенциала к ускоренному делению на этом слое). При сниженной для различных типов клеток пролиферативной активности модифицированной кислотой поверхности материала коллаген/хитозан/БСА этот нежелательный процесс вблизи такой поверхности может быть существенно нивелирован, в то время как обратная сторона материала будет, наоборот, способствовать росту клеток.

Несмотря на положительные результаты культивирования клеток на модифицированных подложках, морфология пленок, сформированных методом высушивания капли в сочетании с раскатыванием, дает приемлемую однородность распределения волокон не на всей поверхности подложки, что видно, например, на рис. 2а. Метод же нанесения аэрозольным распылением раствора позволил существенно улучшить однородность распределения волокон (см. рис. 6а и 6б) в сочетании с возможностью формировать покрытия на большой площади и сокращением времени нанесения ввиду большей скорости испарения воды при высыхании микрокапель и многостадийном процессе формирования слоев.

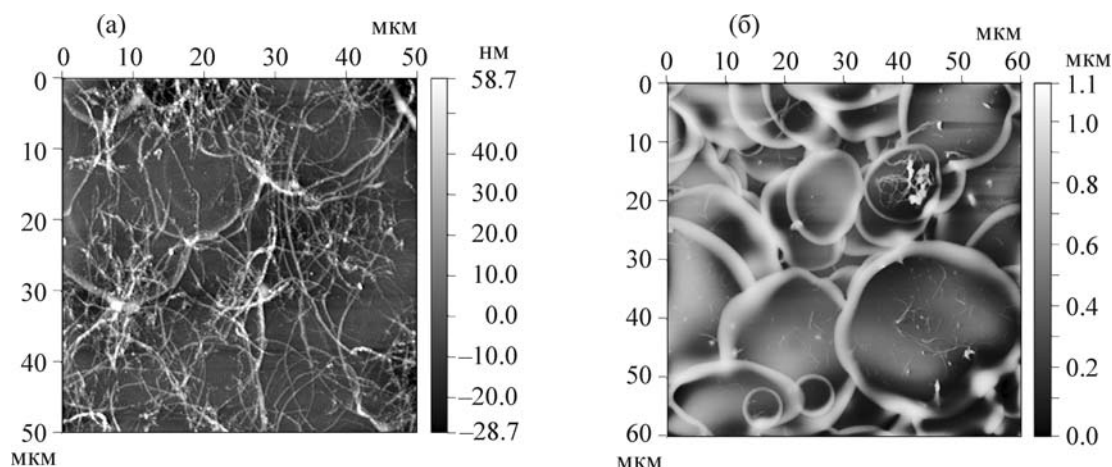


Рис. 6. АСМ-топография пленки, полученной методом аэрозольного нанесения: (а) – из волокон хитозана, (б) – из волокон хитозана с добавлением БСА в соотношении 1 : 1.

Величина микрокапель, исходя из данных АСМ (рис. 6б), составила от 5 до 20 мкм при давлении сжатого воздуха 2 атм и скорости нанесения около 0,5 мл раствора в минуту. Наиболее нестабильным коллоидным раствором был раствор хитозана, седиментация которого, однако, в присутствии БСА замедлялась, что позволило сформировать методом аэрозольного нанесения пленки хитозан/БСА без снижения скорости нанесения, обусловленной в случае наличия в коллоиде лишь хитозановых волокон их коагуляцией на стенках распылительного сопла. С другой стороны, необходимо отметить, что водорастворимый БСА в случае высыхания микрокапель при малой температуре подложки и значительной концентрации (уже более чем 1 : 1 к хитозану), обволакивая волокна хитозана, стремится ввиду сил смачивания распределиться по периметру исходной жидкой капли на поверхности, что может приводить к существенной неоднородности распределения материала на субмикронном уровне и отсутствию на поверхности отдельных волокон, что по результатам культивирования клеток является важным параметром, несоблюдение которого не позволяет обеспечить ускоренную ростовую активность клеток.

Таким образом, применение аэрозольного нанесения имеет свои особенности и требования к концентрации компонентов, при правильном выборе которых позволяет осуществлять формирование покрытий из нестабильных коллоидных растворов биополимеров, что может найти широкое применение при создании биodeградируемых материалов, необходимых для ускоренного ранозаживления при хирургических операциях на внутренних органах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, экспериментально было показано, что коллаген-хитозановый каркас является биологически эффективным для адгезии, роста и развития клеток. Это свойство является одним из ключевых в процессе восстановления поврежденной ткани – высокая ростовая активность нормальных клеток способствует ускоренному ранозаживлению. Обобщая полученные данные, можно сказать, что развитая морфологическая структура тонких слоев каркаса обеспечивает оптимальную среду для миграции и ориентированного роста клеток и может способствовать ускоренной регенерации поврежденных внутренних органов в зоне хирургической операции. При этом изменением рН слоев материала покрытия можно в контролируемой степени подавлять рост клеток вне целевой зоны восстановления поврежденных тканей. Полученные результаты, в том числе применение аэрозольного нанесения коллоидных растворов волокон биополимеров, могут найти свое применение при формировании многослойных биodeградируемых имплантатов для хирургических операций на внутренних органах, а также для разработки методов анализа активности клеток на микро- и наноразмерном уровне.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы Министерства образования и науки на 2014–2020 гг., соглашение №14.578.21.0113 от 27.10.2015 г., уникальный идентификатор RFMEFI57815X0113.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ch. Heinemann, S. Heinemann, A. Bernhardt, et al., *Biomacromolecules* 9 (10), 2913 (2008).

2. Y. C. Cheong, S. M. Laird, T. C. Li, et al., *Hum. Reprod. Update* **7** (6), 556 (2001).
3. T. Mossman, *J. Immunol. Methods* **65**, 55 (1983).
4. L. Bozec and M. Odlyha, *Biophys. J.* **101** (1), 228 (2011).
5. A. Michnik, K. Michalik and Z. Drzazga, *J. Therm. Anal. Calorimetry* **80** (2), 399 (2005).
6. C. G. T. Neto, J. A. Giacometti, A. E. Job, et al., *Carbohydrate Polymers* **62**, 97 (2005).
7. I. Mesropyan, T. V. Burdzhnadarze, Sh. G. Barbakadze, et al., *Biophysics* **51** (1) 120 (2006).
8. I. I. Bobrinetskiy, A. S. Seleznev, I. A. Gayduchenko, et al., *Biophysics* **58** (3), 409 (2013).
9. N. Krkic, V. Lazic, L. Petrovic, et al., *Food Technol Biotechnol.* **50** (4), 483 (2012).
10. В. Б. Гаврилюк, В. К. Иванов, А. В. Куликов и др., *Цитология* **55** (8), 593 (2013).
11. C. Tangsadthakun, S. Kanokpanont, N. Sanchavanakit, et al., *J. Metals, Materials and Minerals* **16** (1), 37 (2006).
12. K. M. Hakkinen, et al., *Tissue Eng. Part A* **17** (5–6), 713 (2010).
13. Q. Hu, L. Milenkovic, H. Jin, et al., *Science* **329** (5990), 436 (2010).
14. S. T. Christensen, I. R. Veland, A. Schwab, et al., *Methods Enzymology*, Ed. by W. F. Marshall (Acad. Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokio, 2013), Vol. 525, pp. 45–58.
15. H. Yi, L.-Q. Wu, W. E. Bentley, et al., *Biomacromolecules* **6** (6), 2881 (2005).

Features of Growth and Morphology of Human Fibroblasts, Cultured on Substrates, Modified by Nanoscale Fibers of Collagen and Chitosan

R.A. Morozov*, A.V. Nikitina**, A.V. Romashkin*, I.A. Suetina***,
M.V. Mezentseva***, and V.K. Nevolin*

*National Research University of Electronic Technology, pl. Shokina 1, Zelenograd, Moscow, 124498 Russia

**LLC "NEOBIS", proezd 4806, 5/23, Zelenograd, Moscow, 124498 Russia

***Ivanovsky Institute of Virology, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician Gamalei, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Gamalei 16, Moscow, 123098 Russia

A study of the relationship of morphology of cell structures with the topography and the composition of the coating material of substrates based on nano-sized fibers of collagen and chitosan by culturing cell culture of normal human embryonic fibroblasts was carried out. Using the methods of atomic force microscopy the morphology of cells grown on modified substrates at the submicron level was studied, in particular the number of cilia and flagella, up to 100 nm in diameter, in conjunction with their proliferative activity in comparison with the glass substrates. The methods of managing growth activity by altering the structure and composition of the coating material were proposed. The effect of a lower pH of the surface of coating material on growth activity and morphology of the cells was studied. Spray coating methods of colloidal solutions of biopolymers was proposed.

Keywords: collagen, chitosan, albumin, fibroblast, proliferation, cell morphology