



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ "СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ"

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА "ЦИТОЛОГИЯ, ХИСТОЛОГИЯ И ЕМБРИОЛОГИЯ"

Светлана Иванова Иванова

КЛЕТЪЧЕН БИОСЕНЗОР

ЗА ОЦЕНКА НА ПОВЪРХНОСТНА БИОСЪВМЕСТИМОСТ

АВТОРЕФЕРАТ

за присъждане на образователната и научна степен "доктор"

Професионално направление: 4.3. Биологически науки
Докторска програма: Клетъчна биология

София, 2017 г.



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ "СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ"

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА "ЦИТОЛОГИЯ, ХИСТОЛОГИЯ И ЕМБРИОЛОГИЯ"

Светлана Иванова Иванова

КЛЕТЪЧЕН БИОСЕНЗОР

ЗА ОЦЕНКА НА ПОВЪРХНОСТНА БИОСЪВМЕСТИМОСТ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

за присъждане на образователната и научна степен "доктор"

Професионално направление: 4.3. Биологически науки
Докторска програма: Клетъчна биология

Научни ръководители: чл.-кор. проф. дбн Румен Панков
доц. д-р Стоян Чакъров

София, 2017 г.

Дисертацията е написана на 132 страници и включва 34 фигури и 5 таблици. Библиографската справка съдържа 239 литературни източника.

Докторантът е зачислен в докторантура на самостоятелна подготовка към Катедра "Цитология, хистология и ембриология" при Биологически факултет на СУ "Св. Климент Охридски".

Изследванията по дисертационния труд са извършени с финансовата подкрепа на Фонд „Научни изследвания“ по договор № Д01-1261/19.12.2007, проект "Клетъчни адхезивни контакти - потенциален сензорен елемент за оценка на повърхностна биосъвместимост".

Използвани съкращения

CnI	Колаген тип I (<u>C</u> ollagen <u>en</u> type I)
ECM	Извънклетъчен матрикс (<u>E</u> xtrac <u>e</u> llular <u>m</u> atrix)
FA	Фокални адхезии (<u>F</u> ocal <u>a</u> dhesions)
FbA	Фибриларни адхезии (<u>F</u> ibrillar <u>a</u> dhesions)
Fn	Фибронектин (<u>F</u> ibronect <u>in</u>)
GFP	Зелен флуоресциращ протеин (<u>G</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein)
Ln	Ламинин (<u>L</u> amin <u>in</u>)
PAA	Полиакриламид (<u>P</u> oly <u>a</u> cryl <u>a</u> mide)
PDMS	Полидиметилсилоксан (<u>P</u> oly <u>d</u> imethylsiloxane)
PDMS-PAA	Поли(диметилсилоксан- <i>b</i> -акрилова киселина) (<u>P</u> oly(<u>d</u> imethylsiloxane- <u>b</u> - <u>a</u> crylic <u>a</u> cid))
PDMS-PVP	Поли(диметилсилоксан- <i>b</i> -винилпиролidon) (<u>P</u> oly(<u>d</u> imethylsiloxane- <u>b</u> - <u>v</u> inylpyrrolidone))
PXN	Паксилин (<u>P</u> axill <u>in</u>)
TNS	Тенсин (<u>T</u> ens <u>in</u>)
VCL	Винкулин (<u>V</u> incul <u>in</u>)
Vn	Витронектин (<u>V</u> itronect <u>in</u>)

ВЪВЕДЕНИЕ

Съвременното предизвикателство пред тъканното инженерство и регенеративната медицина е реконструкцията на увредени тъкани и органи с пълно възстановяване на техните структурни и функционални характеристики. Докато биологично инертните простетични импланти трябва да останат "невидими" за гостоприемника, други се проектират, така че в максимална степен да имитират характеристиките на естественото извънклетъчно обкръжение. Създаваните нови биомиметични материали предлагат все по-обещаващи възможности, но поставят и необходимостта от разработване на методи за оценка на качествата и биосъвместимостта им.

Стандартните тестове за биосъвместимост се ограничават до изключване на рисковете от токсичност, като цитотоксичност, сенсibiliзация, раздразнение, генотоксичност, карциногенно действие и др. Те трябва да бъдат допълнени от анализи, които да осигурят изчерпателна биологична оценка на потенциала на биоматериалите да поддържат процесите на клетъчна адхезия, пролиферация и диференциация и възможността им да стимулират една цялостна регенерация.

Успешната имплантация на биомиметичните материали предполага въвличане на клетките в неизбежни взаимодействия, което без съмнение се проявява с формиране на адхезивни контакти. Типът, морфологичните характеристики и площта на адхезивните контакти както и морфологията на клетките могат да се приложат като критерии за функционалното им състояние и оттам като инструмент за оценка на повърхностните свойства на материалите.

В настоящата дисертация представяме биосензор на основата на живи клетки, който експресира хибридни флуоресцентно белязани белтъци за проследяване на клетъчните адхезивни контакти. Той се базира на фибробластната клетъчна линия NIH/3T3, която е генетично модифицирана да

експресира стабилно mCherry-винкулин (характерен за фокалните адхезии) и GFP-тенсин (характерен за фокалните и фибриларните адхезии).

За разлика от молекулните биосензори, чийто потенциал е ограничен до детекцията на действието на една прицелна молекула, клетъчните биосензори едновременно регистрират, процесират и реагират на присъствието и нивата на множествени стимули. Възможността за обработка на информацията от въздействието на многобройни и разнообразни сигнали като адхезивност, химичен състав, еластичност и топология превръщат клетъчния биосензор в изключително подходящ инструмент за изследване на биологичната съвместимост на нови материали.

Предлагаме и набор от *in vitro* тестове за количествена стандартна универсална оценка на адхезивните свойства на биоматериали. Той включва съвкупност от методи за охарактеризиране на взаимодействията между клетките и тяхното микрообкръжение посредством анализ на фокалните и фибриларните адхезивни контакти, както и промяната в клетъчната морфология, изразена с разстилането и поляризацията на клетките.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертация е да се създаде подходящ клетъчен биосензор, чрез който да се провери хипотезата, че клетъчните адхезивни контакти и морфологията на клетките могат да се използват за стандартизирана оценка на повърхностна биосъвместимост на материали за нуждите на регенеративната медицина.

За постигане на тази цел си поставихме следните **задачи**:

1. Да се създаде биосензор на основата на живи клетки, който устойчиво експресира хибридни флуоресцентно белязани белтъци от клетъчните адхезивни контакти - тенсин и винкулин и/или тенсин и паксилин;

2. Да се подберат критерии, създаващи възможност за обща оценка на повърхностната биосъвместимост на естествени и изкуствени клетъчни субстрати;

3. Да се намери способ за количествено преобразуване на получената при микроскопски анализ образна информация в числов вид;

4. Да се извърши стандартизиране на поведението на биосензора върху естествени ECM субстрати чрез снемане на референтни стойности за подбрани ECM белтъци;

5. Да се изпита и анализира поведението на биосензора при култивиране върху субстрат с неизвестни свойства и да се изготви оценка за адхезивните качества на материала;

6. Да се изследва поведението на биосензора при култивиране върху субстрати с вариращи механични свойства.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

За изпълнение на поставените в дисертационния труд цел и задачи използвахме следните материали и методи:

- Подготовка и трансформация на компетентни клетки *E. coli* XL1-Blue MRF⁺;
- Пречистване и анализ на плазмидни ДНК конструи pRKGFP-Tensin, pmCherry-Vinculin и pmCherry-Paxillin;
- Конвенционално клетъчно култивиране на фибробластни клетки NIH/3T3;
- Трансфекция с липофилни агенти и електропорация;
- Получаване на стабилно експресиращи клетки с антибиотична селекция и клониране по метода на крайното разреждане;
- Флоуцитометричен анализ и сортиране на клетки;
- *Western* имуноблот и денситометричен анализ;
- Определяне на оптимално количество субстрат и коатиране на повърхности с белтъци на извънклетъчния матрикс;
- Коатиране с полидиметилсилоксан базирани субстрати (PDMS-PAA и PDMS-PVP);
- Определяне на модул на еластичност и подготовка на коатирани 2D субстрати с променлива твърдост;
- Микроскопски анализ (вкл. флуоресцентен) и документация;
- Адхезивни тестове за оценка на клетъчната морфология и адхезивни контакти;
- Софтуерна обработка и анализ на микроскопски изображения;
- Статистически анализ.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Принципна постановка на експеримента

Разработването на оптимални биосъвместими скелети за целите на тъканното инженерство налага задълбочено изследване и разбиране на отношенията между клетките и извънклетъчния матрикс (ЕСМ). Първите събития при контакта на изкуствените материали с живите клетки са именно взаимодействията между биологично активните стимули от средата с адхезивните молекули от повърхността на клетъчната мембрана. Стабилното прикрепване на клетките към субстрата е от съществено значение, но само по себе си не е достатъчно за оценка на адхезивния потенциал на материалите. Всъщност едно прекалено здраво и продължително първоначално прикрепване ще ограничи възможността на клетките за свободно придвижване, като след време може да завърши дори с тяхната смърт. Адхезивните процеси включват поредица от динамични обратими събития, нужни за нормалния растеж на клетките, за пролиферацията и за диференциацията им. Съдбата на клетките се предопределя от адхезивните им взаимоотношения с извънклетъчната среда и свързаните с тях процеси на формиране на клетъчни контакти, организация на актомиозиновия цитоскелет, придвижване в пространството, изграждане и реорганизация на ЕСМ. Ето защо пълното охарактеризиране на потенциала на биомиметичните скелети да провокират реконструктивно ремоделиране на тъканите налага по-продължително и обстойно изследване на адхезивните взаимодействия и поведението на клетките.

Контактите, които формират клетките могат най-общо да се разделят на две големи групи: контакти между отделните клетки и контакти, които клетките формират с извънклетъчния матрикс. Фибробластите преференциално формират адхезивни взаимодействия с молекули от ЕСМ. Предмет на настоящата работа е

именно моделът на поведение на клетките в тяхното микрообкръжение, което ни насочи към избора на адхезионната клетъчна линия NIH/3T3. Тя е добре охарактеризирана типична фибробластна линия, която лесно се отглежда при стандартни култивационни условия и е податлива на трансфекция.

В условия *in vitro* фибробластните клетки формират няколко основни типа адхезивни контакти клетка-матрикс, като обект на изследване в настоящия труд бяха фокалните (FA) и фибриларните интегринови адхезии (FbA). Сглобяването и организацията на фокалните адхезии се модулират от молекулния състав на ЕСМ и механичния стрес, приложен директно върху интегрините. Общата форма на клетките и цитоскелетът обаче също играят важна роля в определянето на големината, разпределението и посоката на вътреклетъчното напрежение и оттам контролират асоциацията и динамиката на фокалните адхезии. И обратно размерът и плътността на фокалните адхезии, обусловени от биохимичните и физичните свойства на ЕСМ, директно влияят върху размера и морфологията на клетките. Разстилането е критичен фактор, който определя растежа и съдбата на клетките (живот или смърт; пролиферация или състояние на покой) в много по-голяма степен, отколкото самото прикрепване. Броят или общата площ на фокалните адхезии отразяват здравината на прикрепване на клетките към субстрата и дават цялостна представа за физиологичното им състояние.

Трансформацията на фокалните във фибриларни адхезии, от своя страна, също зависи от актомиозиновата контрактилност и от външни фактори и се регулира от твърдостта на извънклетъчния матрикс. Появата на контакти от фибриларен тип е свидетелство за наличие на процеси на фибрилогенеза и отлагане на собствен ЕСМ. Събития, които се наблюдават с клетъчното ремоделиране на средата при тенденция за трайното ѝ населяване. Засиленото присъствие на фибриларните адхезии е индикация за понижена подвижност на клетките и не е свойствено за бързо мигриращи клетки.

Клетъчните адхезивни контакти се отличават с двойствена физиологична функция - чисто физична опорно-структурна роля и регулаторна сигнална роля, която активира каскада от събития. При наличие на подходящите биоиндуктивни сигнали от средата се активират трансмембранните интегринови рецептори и започва сглобяването на адхезомните комплекси. Те модулират множество основни клетъчни, тъканни и органни функции като миграция, пролиферация, диференциация, клетъчен поляритет, генна експресия, сигнална трансдукция, растеж, апоптоза, ембрионално развитие, морфогенеза, органогенеза, имунен отговор, възстановяване на увредени тъкани, формиране на рѐбцова тъкан. Интегриновите адхезии осъществяват важна двупосочна и съгласувана връзка между извънклетъчния матрикс и клетките. Самите те възприемат и реагират както на най-леките колебания в микрообкръжението си, така и на най-малките промени във физиологичното състояние на клетките и пътищата на сигнална трансдукция, от които всъщност са част. Интегриновите адхезии са и инструментът, с който клетките преустройват околната среда и я превръщат в пригодна за съществуването им място. Извънклетъчният матрикс оказва пряко влияние върху формирането на фокалните и фибриларните адхезии. Техните морфологични характеристики (вид, големина, разположение), съответно, отразяват неговото функционално състояние. Способността на клетъчните адхезивни контакти да обработват комплексна информация от средата определя и практическото им приложение като сензорен елемент за оценка на качествата и биосъвместимостта на биомиметични простетични материали.

Белтъците, които са идентифицирани като компоненти на комплексните структури на адхезивните контакти са многобройни. Тези, които подбрахме за проследяване са свойствените за фокалните адхезии - винкулин (VCL), паксилин (PXN) и тенсин (TNS). От трите посочени във фибриларните адхезии се локализира само тенсин, което позволява и разграничаването на двата типа адхезии. Комбинациите от флуоресцентно белязани хибридни молекули, които

използвахме бяха винкулин-тенсин и паксиллин-тенсин. Едновременното присъствие на винкулин/паксиллин и тенсин е индикация за FA, докато регистрацията само на тенсин без детекция на винкулин/паксиллин е сигнал за наличие на FbA. Така, на основата на различията в специфичната им локализация, едновременната експресия на флуоресцентно маркираните винкулин/паксиллин и тенсин може да се използва за едновременната детекция на FA и FbA посредством конвенционална флуоресцентна микроскопия.

Така формулирани поставените цел и задачи наложиха едновременно маркиране на два клетъчни белтъка с два различни флуорохрома. Изборът ни се спря на червения (DsRed) и зеления (GFP) флуоресцентен протеин и по-конкретно на подобрените им варианти - mCherry и EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein). Дължините на вълните на светлината на възбуждане (587 и 488 nm) и емисия (610 и 509 nm) на двата белтъка не се припокриват и позволяват едновременна детекция на сигналите.

Хибридният флуоресцентен белтък от клетъчните адхезивни контакти бяха въведени във фибробластните клетки NIH/3T3 посредством векторите pmCherry-Vinculin, pmCherry-Paxillin и pRKGF-Tensin (фиг. 1). При тези вектори поликлонинг сайтът беше разположен *downstream* спрямо гените за флуоресцентните протеини. По този начин клонираните кодиращи последователности попадаха в рамка на четене след гените на mCherry/EGFP, при което се експресираща химерните белтъци mCherry-винкулин, mCherry-паксиллин и GFP-тенсин.

За котрансфекция на клетките бяха използвани следните четири комбинации от експресионни конструкции: pmCherry-Vinculin/pRKGF-Tensin; pmCherry-Vinculin/pRKGF-Tensin/pHA262 Puro A; pmCherry-Paxillin/pRKGF-Tensin и pmCherry-Paxillin/pRKGF-Tensin/pHA262 Puro A. Стабилни трансфектанти бяха получени чрез антибиотична селекция, които след това бяха подложени на клониране по метода на крайното разреждане.

Поведението на клетките в многоклетъчните организми е строго направлявано от извънклетъчното микрообкръжение. Разтворими пептидни растежни фактори и ECM белтъци играят съществена роля в много биологични процеси като адхезия, пролиферация, диференциация, морфогенеза, миграция и зарастване на рани. В настоящия дисертационен труд, за да охарактеризираме адхезията на клетките, ние използвахме някои от основните компоненти на ECM, а именно фибронектин (Fn), витронектин (Vn), ламинин-111 (Ln-111) и колаген тип I (CnI) като моделни субстрати за оценка на адхезивните контакти. Друг ECM белтък, който изследвахме беше ламинин-521 (Ln-521). Той е един от първите белтъци, който се експресира във вътрешната клетъчна маса на бластоцистите и е известно, че със своите превъзходни адхезивни качества поддържа самообновяването и плурипотентността на стволови клетки *in vitro*.

Натрупаните данни използвахме като референтна база за анализ на адхезивните качества на изкуствени кополимерни материали, базирани на полидиметил-силоксан с обещаващи приложения в медицината и тъканната регенерация.

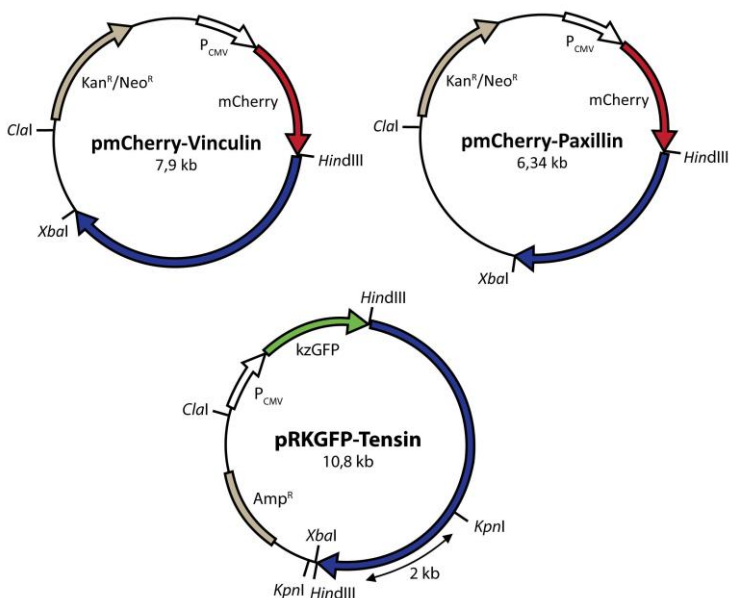
Адхезивните контакти са многобелтъчни структури, които не само отговарят на биохимичния състав на ECM, но чрез своите механосензорни свойства реагират на топографските характеристики и геометрията на микрообкръжението. Освен да изпълняват своята структурна роля интегриновите адхезии направляват процеса на поляризация съобразно твърдостта на средата. Ето защо в това изследване също така оценихме модела на формиране на FA и FbA в отговор на фибронектинови лиганди, но при варираща ригидност (5 и 40 kPa) или при вариращи механични свойства на средата.

2. Създаване на биосензор на основата на живи клетки

2.1. Експресионни векторни конструкции

За създаването на биосензора на основата на живи клетки бяха използвани експресионните конструкции pmCherry-Vinculin, pmCherry-Paxillin и pRKGFP-Tensin

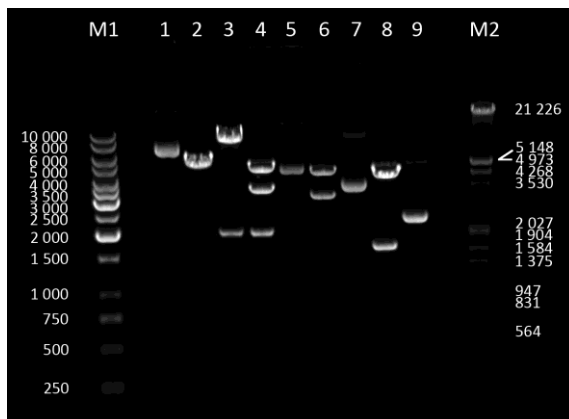
(фиг. 1). Векторите са от т.нар. тип совалкови (*shuttle*) и кодират пълноразмерните кДНК последователности на гените за тенсин, винкулин и паксилин, съответно. Използван беше и четвърти вектор (pHA262 Puro A), който осигурява устойчивост към антибиотика пурамицин за допълнителен селективен натиск. Всички вектори бяха любезно предоставени от д-р Kenneth M. Yamada (Laboratory of Cell and Developmental Biology, National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).



Фиг. 1. Схематично представяне на експресионните вектори pmCherry-Vinculin, pmCherry-Paxillin и pRKGFP-Tensin. Със синя маркировка са означени кодиращите последователности на гените за винкулин (3,2 kb), паксилин (1,64 kb) и тенсин (5,4 kb); гените за mCherry и GFP са съответно в червено и зелено, а гените, обуславящи резистентност към антибиотици (канамицин/неомицин и ампицилин) са оцветени в кафяво.

Клетки *E. coli* XL1-Blue MRF['] бяха трансформирани с трите експресионни конструкта по стандартните протоколи за получаване на компетентни клетки и трансформация на *Inoue*. От получените колонии бяха изготвени ДНК препарати на аналитична скала за утвърдителен рестрикционен анализ на векторите с

ензимите, използвани при клониране (фиг. 1). Векторите pmCherry-Vinculin и pmCherry-Paxillin бяха хидролизирани с *HindIII* и *XbaI*. След рестрикция при всеки от тях с помощта на електрофоретичен анализ в агарозен гел беше потвърдено присъствието на вектора pmCherry (ивица с дължина 4,7 kb; фиг. 2, пътеки 6 и 8), както и гените за съответните белтъци - винкулин (големина на фрагмента 3,2 kb; фиг. 2, пътека 6) и паксилин (1,64 kb; фиг. 2, пътека 8). При вектор pRKGFP-Tensin генът за тенсин е клониран при лигиране на еднакви 5`-стърчащи краища, което не позволява задаване на посока на гена спрямо регулаторните елементи на транскрипцията на експресионния вектор. Това от своя страна наложи провеждането на допълнителни контролни реакции за потвърждаване на ориентацията му. Инсертът беше успешно отделен от вектора след хидролиза само с ензима *HindIII*, но тъй като и двата са с дължина 5,4 kb, в гел се визуализираха като една ивица (фиг. 2, пътека 2). Посоката на гена за тенсин беше доказана след хидролиза с *KpnI* и *XbaI* и получаването на три продукта с големина 8,58 kb, 2 kb и 0,2 kb (фиг. 2, пътека 3), както е и посочено на схемата на фиг. 1. Допълнително потвърждение на ориентацията на гена на тенсина във вектора осъществихме след рестрикция с *KpnI* и *HindIII*. Според схемата на фиг. 1 очакваните продукти трябва да са четири и големината им е 5,18 kb, 3,4 kb, 2 kb и 0,2 kb. Именно тяхното присъствие беше установено при електрофоретичния анализ (фиг. 2, пътека 4). Анализът с рестрикционни ендонуклеази доказва, че експресионните конструкции съдържат клонираните гени за белтъците от клетъчните адхезивни контакти, точно както е илюстрирано на съответните схеми (фиг. 1) и се очаква успешната им експресия като хибридни молекули заедно с флуоресцентните mCherry и EGFP. Експресионните конструкции бяха изолирани на препаративна скала, оценени отново с електрофоретичен, спектрофотометричен и рестрикционен анализ, и подготвени за трансфекция на клетъчна линия NIH/3T3.



Фиг. 2. Рестрикционен анализ на експресионните конструкции за потвърждаване на присъствието на клонираните гени. Електрофоретичното разделяне на продуктите беше извършено в 1% агарозен гел с обем на стартовете 8 μ l при 3 V/cm за един час. M1 – 1000 kb; 1 - pRKGF-Tensin; 2 - pRKGF-Tensin \downarrow HindIII; 3 - pRKGF-Tensin \downarrow KpnI/XbaI; 4 - pRKGF-Tensin \downarrow KpnI/HindIII; 5 - pmCherry-Vinculin; 6 - pmCherry-Vinculin \downarrow HindIII/XbaI; 7 - pmCherry-Paxillin; 8 - pmCherry-Paxillin \downarrow HindIII/XbaI; 9 – pHA262 Puro A; M 2 - λ ДНК \downarrow EcoRI/HindIII.

2.2. Трансфекция и първична оценка с флуоресцентен микроскопски анализ

Трансфекцията на клетъчна линия NIH/3T3 беше извършена чрез електропорация и посредством включване в липозомни структури. В процеса на оптимизация при вариране на различните параметри бяха генерирани множество смесени популации от трансфектирани клетки. Комбинациите от вектори, използвани за трансфекция и получените смесени популации са посочени в таблица 1. Вектор pmCherry съдържа генът *Neo*, който осигурява устойчивост на клетките към антибиотика G418 (генетицин), вектор pHA262 Puro A, кодира ген за резистентност към антибиотика пуромицин и дава възможност за допълнително засилване на селективния натиск, докато вектор pRKGF не позволява селекция в еукариотни клетки.

При интеграция на експресионните конструкции в генома на клетката гостоприемник цикличната молекула на вектора се хидролизира в случайно място от ензимите на клетката, което, в случай че се намира в кодиращата

последователност на целевия ген, води до загуба на неговата експресия. Предварителна обработка с рестрикционна ендонуклеаза с разпознавателно място встрани от гените увеличава вероятността за получаване на стабилни трансфектирани клетки, експресиращи желаните гени. В настоящата работа проведохме трансфекции с линеализирани с ензима *Clal* вектори (фиг. 1) за всяка от двете комбинации на маркираните белтъци - винкулин-тенсин и паксилин-тенсин.

Времето, необходимо на клетката да експресира новите за нея белтъци, обикновено е 24-48 часа. Ето защо първоначалната оценка за степента на трансфекция беше извършена след едно денонощие с микроскопски анализ с епифлуоресценция.

Таблица 1. Трансфектирани популации клетки NIH/3T3, метод и вектори за трансфекция, приложена селекция.

#	Попу- лация	1 ^{ви} вектор	2 ^{ри} вектор	3 ^{ти} вектор	Селекция	Метод на трансфекция
1	L1	pRKGFP-Tensin	pmCherry-Vinculin	pHA262 Puro A	пурамицин	липофилен агент
2	E1	pRKGFP-Tensin	pmCherry-Vinculin	pHA262 Puro A	G418 пурамицин	електропорация
3	E2	pRKGFP-Tensin	pmCherry-Vinculin	N/A	G418	електропорация
4	E3	pRKGFP-Tensin	pmCherry-Vinculin	N/A	G418	електропорация
5	E4	pRKGFP-Tensin	pmCherry-Paxillin	N/A	G418	електропорация
6	E5	pRKGFP-Tensin	pmCherry-Paxillin	N/A	G418	електропорация
7	E6	pRKGFP-Tensin	pmCherry-Vinculin	N/A	G418	електропорация
8	E7	pRKGFP-Tensin	pmCherry-Paxillin	N/A	G418	електропорация
9	E8	pRKGFP-Tensin	pmCherry-Paxillin	pHA262 Puro A	G418 пурамицин	електропорация
10	E9	pRKGFP-Tensin ↓ <i>Clal</i>	pmCherry-Vinculin ↓ <i>Clal</i>	N/A	G418	електропорация
11	E10	pRKGFP-Tensin	pmCherry-Vinculin	N/A	G418	електропорация
12	E11	pRKGFP-Tensin ↓ <i>Clal</i>	pmCherry-Paxillin ↓ <i>Clal</i>	N/A	G418	електропорация

Обичайно средата, която се използва за електропорация е културална среда без серум, както и фосфатни или HEPES буфери, в които е добавена захароза в изоосмотична концентрация. В нашите експерименти с NIH/3T3 фибробласти използвахме среда DMEM и фосфатен буфер с ниска йонна сила, която намалява

затопянето на клетъчната суспензия при протичане на електричен ток, с което се повишава преживяемостта на клетките. В буфера допълнително присъстваше $MgCl_2$, който от своя страна подпомага свързването на ДНК към повърхността на клетките и по този начин увеличава ефективността на трансфекция. Първоначално оптималните условия на електропорация на клетките бяха определени със серия от контролни експерименти в присъствие на пропидиев йодид (интеркалиращ агент, който оцветява нуклеиновите киселини, но не прониква през интактни мембрани). Процентът на успешно пермеабелизираните, както и процентът на преживелите клетки, определехме с флоуцитометричен анализ, като целта беше да се намерят условията, при които се постигат $\approx 50\%$ пермеабелизация и $\approx 50\%$ преживяемост. Първите електропорации с експресионни конструкции бяха извършени при работа в режим на експоненциална зависимост (популация E1 и E5, табл. 1), но степента на трансфекция беше недостатъчно задоволителна. Следващите експерименти бяха проведени в режим на правоъгълна зависимост (популации E2-4 и E6-11, табл. 1), който дава възможност за по-строг контрол върху параметрите (напр. времетраене на прилагането на електрически импулс) при поддържане на постоянно напрежение. Резултатите, които получихме при този подход на работа определено показаха значително повишение на нивата на трансфекция. Като цяло електропорацията се оказа по-удачният метод за въвеждане на експресионните вектори в клетките в сравнение с липофилните агенти. При трансфекция с Lipofectamine (популация L1, табл. 1) се наблюдаваше значителен процент клетки, експресиращи хибридните белтъци при прекалено високи нива, които често бяха и с неправилна локализация.

2.3. Селекция и клониране. Получаване на клонове, които стабилно експресират хибридните флуоресцентни белтъци

След трансфекция преобладаващата част от експресионните конструкции се намират в епизомално състояние, което позволява нормалната експресия на

кодираните в тях гени - т.нар. преходна (временна, транзиентна) трансфекция. С времето обаче тази чужда за клетката ДНК бива унищожена или постепенно отпада с деленето на клетките и се изгубва за цялата трансфектирана популация. В незначителна част от клетките ($1 \cdot 10^{-3}$ - $1 \cdot 10^{-4}$ клетки) ДНК на векторите се интегрира в генома на гостоприемника и се реплицира с всяко следващо клетъчно делене. Отбор на тези клетки може да се осъществи например чрез селективен натиск с антибиотици, при което оцеляват само онези, при които чуждите ДНК последователности са интегрирани в генома и кодираните в тях гени се експресират устойчиво.

Едно денонощие след трансфекция, време достатъчно за експресия на чуждите белтъци, клетките бяха поставени в селективна среда. Те бяха култивирани в присъствие на G418 и/или пуромицин (табл. 1) до получаване на добре диференцирани единични колонии от клетки, в които гените, които осигуряваха резистентност към действието на антибиотиците (както и хибридните белтъци), бяха трайно интегрирани в генома. След десет денонощия от началото на селекцията бяха формирани първите колонии от устойчиви към антибиотиците (устойчиво трансфектирани) клетки, които носеха новите гени. Общото време за селекция и натрупване на маса от резистентни клетки беше две до четири седмици.

Трансфекцията или по-точно методите, които се прилагат за въвеждане на чужд ДНК материал в клетки се базират на природни явления, но точните механизми на тези процеси все още не са напълно изяснени. Малко или много, настъпващите събития са със случаен характер и въпреки удовлетворителните и информативни резултати голяма част от промените остават частично охарактеризирани. Например не е известен броят на молекулите векторна ДНК, които навлизат в клетките, както и съотношението между различните молекули при котрансфекция. Броят на вмъкнатите копия при интеграция на векторите също не може да се регулира.

Получаването на биосензорни клетки с приложение в оценката на биосъвместимост поставя като изискване еднаквост в нивата на експресия на маркерните белтъци, което би могло да се осигури с клониране на трансфектираните клетки. Ето защо и следващата стъпка от процеса на създаване на биосензора беше клониране по метода на крайното разреждане. То позволява получаването на популация от клетки с идентични характеристики или клон от една единствена родителска клетка.

Клонирането беше извършено след задължителен микроскопски контрол на степента на трансфекция на смесената популация. В някои случаи преди клониране беше извършено насищане на популацията с експресиращи клетки посредством сортирането им по флуоресцентен белег GFP. По-голямото предимство на сортирането беше обогатяването и поддържането на популацията с клетки с еднакви оптимални (средни) нива на експресия на флуоресцентните белтъци.

Най-добри резултати бяха получени при клонирането на популации E6-8, които бяха електропорирани именно при подбраните оптимални условия за работа в режим на правоъгълна зависимост. Анализи на клонове VT6 (винкулин и тенсин), PT7 и PT8 (паксилин и тенсин) от тези популации са представени по-долу. За съжаление при три от популациите (E2, E5 и E11) въобще не бяха получени двойно експресиращи клонове. При трансфекцията с линеализирани вектори, особено при популация E11, бяха получени забележителен брой клонове (323). Изненадващо обаче едва пет от тях експресираща mCherry-паксилин и при нито един клон не беше забелязано присъствието на GFP-тенсин. Интеграцията на ДНК в генома на клетката гостоприемник от ензимните системи за ДНК репарация или рекомбинация на самата клетка може да бъде обратимо събитие. Непосредствено след трансфекция вмъкнатите копия са нестабилни и могат да претърпят пренареждане. Къси повторени последователности в местата на свързване при рекомбинацията могат да бъдат причина за отхвърляне на

интегрираната ДНК посредством механизмите на нехомоложна рекомбинация. Клонирането е трудоемък метод, който обаче дава предимството да бъдат отсяти именно клетките, които са загубили част или цялата интегрирана след процеса на трансфекция ДНК. Задължителен етап на клонирането обаче остават и анализите на експресията на чуждите за клетките белтъци, описани в следващите т. 2.4., 2.5 и 2.6.

2.4. Подбор на клонове и определяне нивата на експресия на хибридните флуоресцентни белтъци

Първичният контрол на клоновете за експресия на белязаните белтъци отново беше извършен с микроскопски епифлуоресцентен анализ. Това беше най-простият и невреемък метод за скриниране на клетките, които експресираха хибридните молекули от множеството генерирани клонове. От анализиранияте 1 224 микроскопски препарата бяха идентифицирани общо 185 клона, от които за следващи анализи бяха подбрани 122 клона, които експресираха mCherry-винкулин и GFP-тенсин и 38 клона с mCherry-паксиллин и GFP-тенсин.

Следващата стъпка беше верифициране на експресията на хибридните белтъци при одобрените клонове, която беше извършена посредством имунохимична детекция със специфични антитела (*Western* имуноблот). Тя позволи едновременното проследяване както на ендогенните за клетката белтъци от клетъчните адхезивни контакти, така и на въведените при трансфекцията хибридни флуоресцентни молекули. Молекулната маса на винкулина е ≈ 117 kDa, докато тази на хибридния белтък (mCherry-винкулин) вече е ≈ 147 kDa. И съответно паксилинът е с молекулна маса ≈ 68 kDa, а mCherry-паксилинът - ≈ 98 kDa. Разликата в молекулните маси на ендогенните и хибридните белтъци беше достатъчна за електрофоретичното им разделяне в гел,

като при визуализацията на сигнала върху рентгенова плака ясно се отдиференцираха като два отделни банди (фиг. 3).

За съжаление не успяхме да намерим добре "работещо" анти-тенсин антитяло, така че детектирахме присъствието само на хибридният тенсин, като използвахме анти-GFP антитяло, но не и това на ендогенния белтък (фиг. 4). С антителата срещу тенсин, които използвахме (клонове H-300 и R-19, Santa Cruz) не успяхме да получим задоволителен резултат, който недвусмислено да покаже присъствието на тенсин (ендогенен и хибриден) в клетките. Допълнително потвърждение на присъствието на GFP-тенсин обаче и оценка на броя на клетките, които го експресират извършихме с флоуцитометричен анализ (фиг. 5).

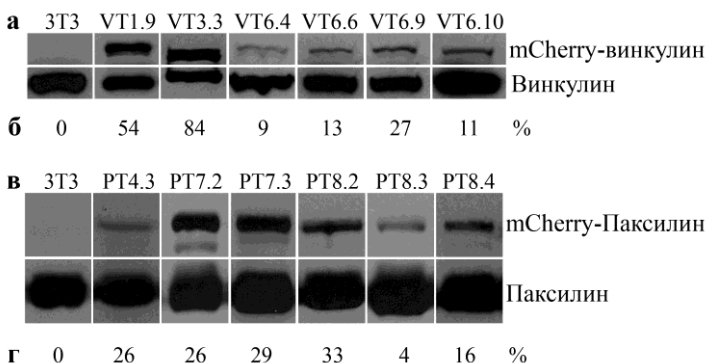
При одобрените на този етап клонове определянето на нивата на експресия на mCherry-винкулин и mCherry-паксилон в съпоставка с ендогенните им аналози беше осъществено след денситометричен анализ. Той даде възможност за количествено определяне на оптичната плътност, изразена като брой точки (пиксели) за дадена повърхност. Анализът беше извършен върху резултатите от имуноблотите с помощта на софтуера *ImageJ*, с който беше изчислена площта на бандовете. Количеството на експресирания хибридни белтъци беше изразено като процент спрямо количеството на ендогенните им аналози, прието за 100%.

$$E_{\text{хр}} = \frac{ДС(\text{ХБ})}{ДС(\text{ЕБ})} \cdot 100,$$

където $E_{\text{хр}}$ е нивото на експресия на хибридният белтък в %, ДС (ХБ) - денситометрираната стойност на хибридният белтък, а ДС (ЕБ) - денситометрираната стойност на ендогенния белтък. На фиг. 3б и 3г са представени резултатите от денситометричния анализ на избрани клонове.

За оптимално приложение на трансфектираната клетъчна линия като биосензор беше необходимо експресията на хибридните флуоресцентни белтъци да бъде в определени граници. Нива на експресия на хибридните белтъци, които надвишаваха нивата на експресия на ендогенните белтъци или бяха съпоставими

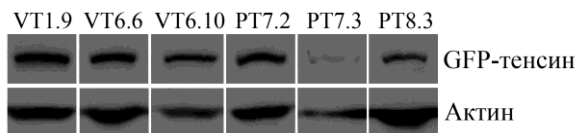
с тях не биха били подходящи. Възможно беше прекомерно високи количества да окажат влияние върху поведението на комплекса от белтъци, който участва в образуването на клетъчните адхезивни контакти и да повлияят нормалното им формиране и функциониране. Прекалено ниски нива от своя страна щяха да затруднят детекцията на флуорохромните молекули и съответно щяха да внесат съмнения при оценката на поведението на биосензорната клетъчна линия при култивиране върху субстрат.



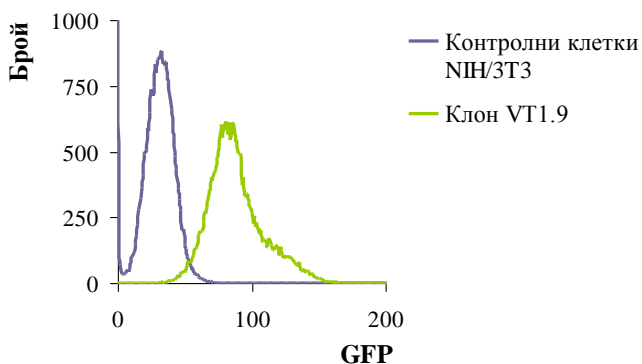
Фиг. 3. Фибробластната клетъчна линия NIH/3T3 беше котрансфектирана да експресира хибридни белтъци GFP-тенсин едновременно с mCherry-винкулин или mCherry-паксиллин. След антибиотична селекция клетките бяха клонирани по метода на крайното разреждане. За по-нататъшния подбор на клонове, които експресират флуоресцентни хибридни белтъци на средни нива, бяха изпълнени имуноблотове (панели а и в). Нивата на експресия на фузионните белтъци (панели б и г) в съпоставка с ендогенните им аналози бяха изчислени посредством денситометричен анализ, извършен с програмата *ImageJ*. mCherry-винкулин беше детектиран като ивица с големина ≈ 147 kDa с анти-винкулин антитяло (клон VIN-11-5), която беше по-висока в сравнение с ивицата на ендогенния винкулин (≈ 117 kDa) (а). При скриниране за присъствие на паксиллин (68 kDa) с анти-паксиллин антитяло (клон 349/Paxillin) бяха идентифицирани две ивици, от които по-високата (98 kDa) беше хибридният mCherry-паксиллин (в). Върху панелите са отбелязани идентификационните имена на клоновете, а контролни нетрансфектирани клетки NIH/3T3 са представени на първата пътека.

За подходящи нива, които да осигурят достатъчен интензитет на флуоресцентния сигнал и да позволят регистрацията му, бяха определени стойности между 10% и 60%. Само клонове с подобни експресионни нива и

правилна локализация и функционално поведение на белтъците при флуоресцентен анализ бяха подбрани за по-нататъшни изследвания.



Фиг. 4. Три от клоновете, които експресират mCherry-винкулин и GFP-тенсин (VT1.9, VT6.6, VT6.10) и три от клоновете, които експресират mCherry-паксиллин и GFP-тенсин (PT7.2, PT7.3, PT8.3), скринирани с анти-GFP антитяло за верификация на присъствието на GFP-маркирани хибридни белтъци. Размерът на ивиците беше приблизително 230 kDa.



Фиг. 5. Присъствието на зеления флуоресцентен белтък беше също така потвърдено с флоуцитометричен анализ, като броят на клетките, които експресираха GFP беше определен на повече от 90%. На графиката са представени резултатите за клон VT1.9 (експресира mCherry-винкулин и GFP-тенсин).

При анализа на клоновете за присъствие на екзогенните хибридни белтъци чрез *Western* блот беше наблюдаван клон със стабилен сигнал за хибриден mCherry-винкулин (VT3.3). Неочаквано обаче при този клон след неколккратно повторен микроскопски анализ, червен флуоресцентен сигнал не беше регистриран. Вероятно при него е настъпило нарушение в посттранслационните модификации и нагъването на белтъчната молекула, което обяснява и отклонението в електрофоретичната ѝ подвижност (фиг. 3).

2.5. Проверка на функционалната активност на екзогенните хибридни флуоресцентно белязани белтъци

2.5.1. Определяне на степента на фосфорилиране на хибридните белтъци

Допълнително потвърждение на функционалната стабилност на хибридните белтъци беше извършено чрез скриниране за присъствие на посттранслационни модификации на молекулите им. Винкулинът, паксилинът и тенсинът се подлагат на обратимо фосфорилиране, което е свързано с осъществяване на функциите им в клетъчните адхезивни контакти. Установена е съществена роля на фосфорилирането на паксила в зреенето и динамиката на адхезивните контакти. Тази модификация при паксила е пряко свързана с привличане на молекули винкулин към фокалните адхезии. Фосфорилирането на винкулина от своя страна се асоциира с отслабване на афинитета на домените на главата и опашката един към друг и преминаване на молекулата към активна конформация. Фосфорилиране на тенсина се наблюдава с разстилането на клетките, което се увеличава със засилване на взаимодействието интегрини-ECM. Забележимо повишаване на фосфорилирането му се наблюдава след посяване на клетки върху фибронектин, ламинин и витронектин. Правилното поведение на хибридните белтъци в клетката изисква модифицирането им да бъде в степен, сравнима с тази на фосфорилиране на ендогенните им аналози.

Определянето на степента на фосфорилиране може да бъде осъществено след имунопреципитация на пула от фосфорилирани белтъци в клетката с фосфоспецифични антитела и последващ имуноблот със специфични към винкулин, паксилин и тенсин антитела или директно с имунохимична детекция с антитела срещу фосфорилираните белтъци. От двете възможности се спряхме на директната детекция, при което се избягва допълнителната стъпка на имунопреципитация. За съжаление не разполагахме с комерсиално анти тяло срещу фосфорилираните форми на пилешки тенсин, както и срещу самия тенсин и

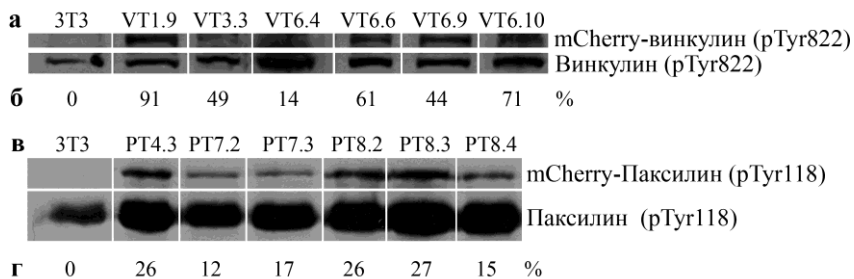
не успяхме да анализираме този протеин. Оценка на поведението на хибридният тенсин направихме с флуоресцентна микроскопия, с което анализирахме способността му да се локализира във фокалните адхезии, а с напредване на процесите на фибрилогенеза и способността му да се транслоцира към фибриларните адхезии (т. 2.5.2.).

За да детектираме фосфорилираните форми на mCherry-винкулин и mCherry-паксиллин, извършихме имуноблот с анти-фосфотирозин антитела (фиг. 6). Беше проведен денситометричен анализ на блотовете и бяха определени нивата на фосфорилиране на хибридните белтъци спрямо техните ендогенни аналози съгласно следното уравнение:

$$pExp = \frac{ДС (pXB)}{ДС (pEB)} \cdot 100,$$

където pExp е нивото на фосфорилиране на хибридният белтък в %, ДС (pXB) - денситометрираната стойност на фосфорилирания хибриден белтък и ДС (pEB) - денситометрираната стойност на фосфорилирания ендогенен белтък. Количеството на фосфорилираните форми на хибридните белтъци беше изразено като процент от количеството на техните фосфорилирани ендогенни аналози, което беше прието за 100% (фиг. 6). Бяха идентифицирани няколко клона, които експресираха фосфорилирани белтъци на задоволителни нива. При анализа на повечето клонове, които експресираха хибриден паксиллин не се наблюдава значително отклонение в нивата на фосфорилиране спрямо тези на ендогенния белтък в сравнение с нивата на експресия на белтъците като цяло (т. 2.4.). Изключение например имаше при клон PT8.3 (фиг. 3 и 6), при който разликата в нивата беше повече от 6 пъти. За разлика от mCherry-паксиллина при хибридният винкулин беше наблюдавано по-често повишаване на нивата на фосфорилиране. Вероятно при винкулина присъствието на допълнителна хибридна аминокиселинна последователност в молекулата повлиява доменната

организация на белтъка и предизвиква конформационни промени, които стимулират фосфорилирането на тирозиловите остатъци.

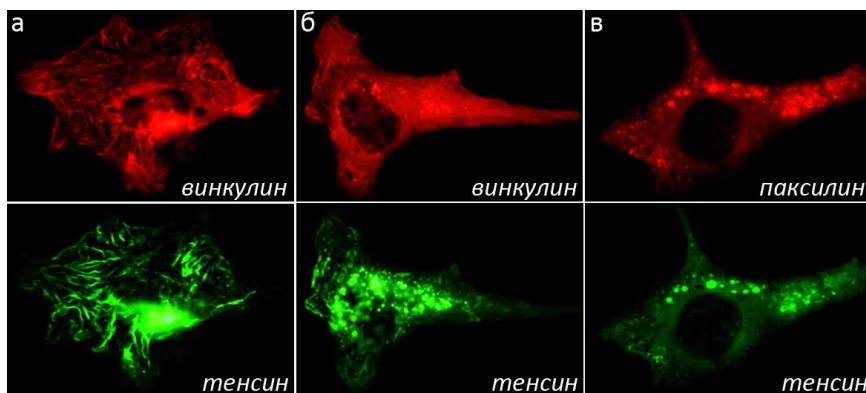


Фиг. 6. Посттранслационното фосфорилиране на mCherry-винкулин (а) и mCherry-паксилин (в), като доказателство за запазената им функционалност, беше демонстрирано чрез имуноблотове с анти-фосфотирозин антитела, специфични към определени модифицирани аминокиселинни остатъци в молекулите на винкулина и паксилена. Фосфорилираните фузионни белтъци бяха регистрирани като втора по-висока ивица в сравнение с фосфорилираните ендогенни белтъци. И по-конкретно тирозин-фосфорилираният mCherry-винкулин беше около 147 kDa, pTyr-винкулин - ≈ 117 kDa, pTyr-mCherry-паксилин - ≈ 98 kDa и pTyr-паксилин - ≈ 68 kDa. Нивата на фосфорилиране на фузионните белтъци в съпоставка с ендогенните белтъци беше оценено чрез денситометричен анализ на имуноблотове и изразено като процент (панели б и г).

След проведените тестове и анализи за нивата на експресия на хибридните белтъци и техните фосфорилирани форми бяха подбрани по два и три клона от двете различни комбинации хибридни маркерни протеини - VT1.9 и VT6.9, които експресираха mCherry-винкулин и GFP-тенсин и PT7.3, PT8.2 и PT8.4, които експресираха mCherry-паксилин и GFP-тенсин. Разликата в нивата на експресия и нивата на фосфорилиране на хибридните белтъци спрямо естествените им аналози при подбраните клонове беше около един до два пъти. Дали това разминаване щеше да повлияе нормалното функциониране на хибридните белтъци можеше да се определи само след флуоресцентен микроскопски анализ на поведението им в клетката. Това беше и следващата стъпка за охарактеризиране на клоновете и избора на най-подходящия от тях за биосензорна клетъчна линия.

2.5.2. Анализ на локализацията на хибридните белтъци

Известно е, че свръхекспресията на много клонирани белтъци може да доведе до нарушение в тяхната вътреклетъчна локализация и функциониране. Възможност за бърза и адекватна оценка при анализа на флуоресцентните mCherry-винкулин, mCherry-паксиллин и GFP-тенсин в конкретния случай предложи флуоресцентният микроскопски анализ. Още при първичния микроскопски анализ на генерираните клонове (т. 2.4.) беше определено освен присъствието на хибридните белтъци и тяхната локализация в структурите на клетъчните адхезивни контакти.



Фиг. 7. Примерни клонове с аберантно поведение на хибридните белтъци. Най-често се наблюдаваха клонове със свръхекспресия на хибридните белтъци (а), а при някои бяха детектирани винкулин и тенсин с неспецифично цитоплазмено разположение (б). Също често се срещаха и клонове, при които флуоресцентните белтъци бяха разположени във вакуоли из цитоплазмата (в), което беше особено присъщо за mCherry-винкулина.

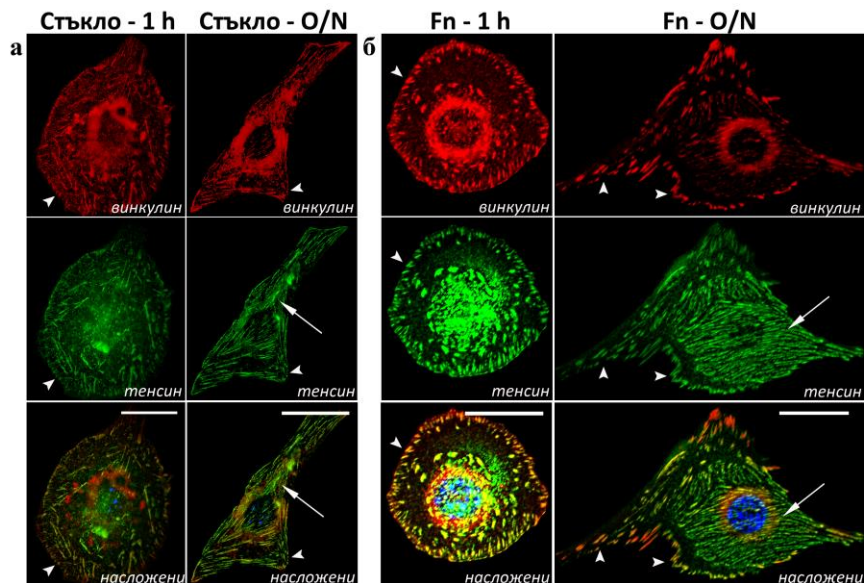
Бяха наблюдавани много клонове с изменено поведение на флуоресцентните екзогенни белтъци (фиг. 7). Много от тях се експресираща на прекалено високи или прекалено ниски нива. mCherry-белязаните белтъци често се детектираха в състава на големи вакуоли. При някои клонове маркираните белтъци (особено GFP-тенсин) се регистрираха като участници в структури, които бяха с морфология, различна от характерната за адхезивните контакти - овално-

елипсоидна за FA и фибриларна за FbA. Наблюдавани бяха и клетки, при които екзогенните белтъци се експресираха, но бяха хаотично разположени в цитоплазмата.

Допълнителен контрол върху функционирането и локализацията на белтъците извършихме като проследихме поведението им в различни етапи от адхезията на клетките. Известно е, че първоначалното прикрепване на клетките към субстрат се осъществява с формиране на фокалните адхезивни контакти, които се концентрират основно в периферната област на клетките. За да докажем едновременната локализация на трите анализирани хибридни протеина единствено в тези плътни и здрави места на свързване, наблюдавахме формирането на FA при клетки, които бяха култивирани в продължение само на един час (фиг. 8). След няколко часа от стабилните FA, започва образуването на фибриларните адхезии, при което активирани $\alpha_5\beta_1$ интегрини се придвижват по стресовите фибрили от периферията на клетката към централните ѝ участъци. Едновременно с транслокацията им се увеличава и количеството на асоциирания с тях тенсин. Присъствието единствено на тенсин в тези контакти потвърдихме след култивиране на клетките за цяла нощ (фиг. 8).

В заключение може да посочим, че измежду всички изследвани клонове при избора на биосензор се спряхме на клон VT1.9, който експресира хибридните mCherry-винкулин и GFP-тенсин и е устойчив на G418 и пурамицин. Този клон показва най-добри резултати по отношение на анализирания показател. При него нивата на експресия на хибридните флуоресцентни белтъци бяха оптимални - достатъчно високи, за да осигурят силен и ясен флуоресцентен сигнал за продължително наблюдение при микроскопски анализ и в същото време не прекалени, така че да повлияят нормалното им функциониране и това на ендогенните белтъци. Посттранслационните модификации при mCherry-винкулина, изразени с нивата на фосфорилиране на молекулите, бяха 1,7 пъти по-

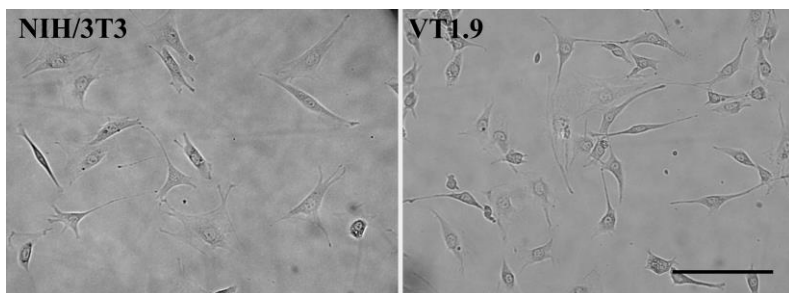
високи от нивата на експресия на белтъка като цяло. Тяхната молекулна структура, фолдинг и функции при формирането и функционирането на адхезивните контакти беше съхранена, което беше доказано с анализ на поведението на хибридни белтък в клетката. При флуоресцентния микроскопски анализ едновременно хибридните белтъци винкулин и тенсин показаха правилна локализация в структурите на клетъчните адхезивни контакти при сила на сигнала, която позволи безпроблемното им регистриране и документация.



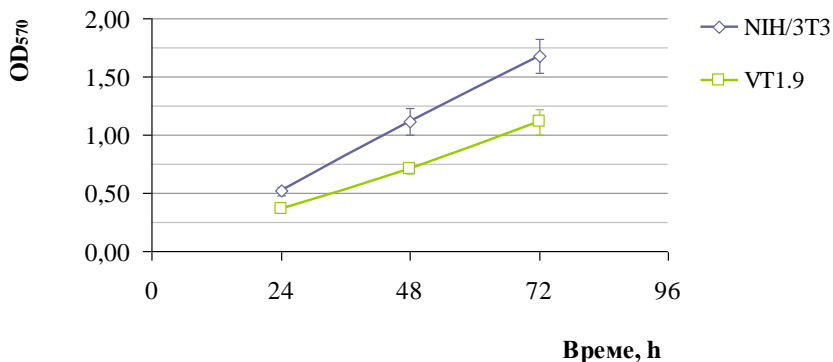
Фиг. 8. mCherry-винкулин беше локализиран само във FA, докато GFP-тенсин беше детектиран както във FA (глави на стрелки), така и във FbA (обикновени стрелки) при изследване с конвенционална флуоресцентна микроскопия. Съвместното разпределение на адхезивните белтъци може да се наблюдава в панел "насложен образ". В местата, където червения и зеления флуоресцентен сигнал съвпадат, цветът се променя в жълто. На фигурата са представени примерни образи на клетки от клон VT1.9, култивирани върху нетретирана повърхност на покривни стъкла (а) и върху стъкла, коатирани с фибронектин (б) за един час и за цяла нощ. Мащабната линия на всеки образ е 20 μm .

2.6. Сравнение на биосензора с родителската клетъчна линия NIH/3T3

Финалните тестове за потвърждение на нашия избор на клон включваха сравнение на поведението на генетично модифицираните клетки спрямо родителската клетъчна линия като доказателство за запазените типични характеристики и жизнеспособност на фибробластните клетки NIH/3T3. Микроскопски анализ при бяла светлина показва, че клетъчната морфология на трансфектираните клетки, експресиращи флуоресцентно белязаните белтъци не беше засегната (фиг. 9). Клетъчната жизненост и пролиферация изследвахме със стандартен МТТ тест (фиг. 10). Броят на жизнеспособните биосензорни клетки, отчетен с колориметричния тест в три последователни дни, беше по-малък от този на нетрансфектираните фибробласти. Скоростта на удвояване на клетките през отделните дни обаче беше съпоставима и тези различия нямаше да повлияят функционирането на биосензора. За да потвърдим подобно допускане обаче, проведохме допълнителни тестове на адхезивния потенциал на клетките.

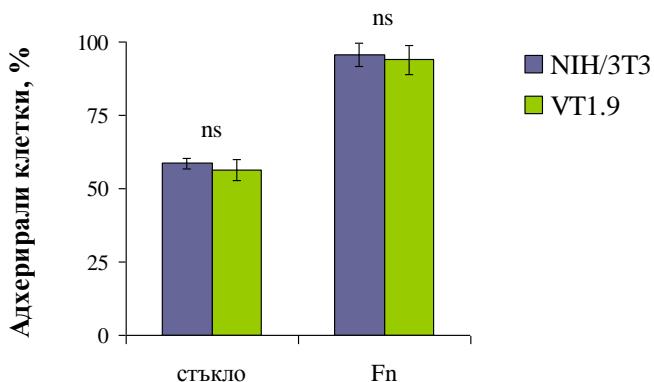


Фиг. 9. Микроскопия при бяла светлина на нетрансфектирани и трансфектирани биосензорни клетки показва, че морфологичните характеристики на клетките бяха непроменени след трансфекцията. Мащабна линия - 300 μm .



Фиг. 10. Пролиферация на клетъчна линия NIH/3T3 и клон VT1.9 (mCherry-винкулин/GFP-тенсин), анализирана със стандартен МТТ тест. Посочените резултати са получени от три независими експеримента, всеки от които в трикратно повторение, като отсечките отразяват стандартната грешка. Статистическата значимост на разликите между средните стойности беше оценена с t-тест на Стюдънт за сравнение на две независими извадки. Нивото на значимост (*) беше отчетено като значително ($p < 0,05$).

Основно изискване към трансфектираните фибробластни клетки за целите на настоящата работа са запазените им адхезивни свойства. За да оценим възможността на биосензорните клетки да разпознават и да се прикрепват върху субстрат, проведохме адхезивни тестове върху нетретирана стъклена повърхност и върху фибронектин (фиг. 11). Нетрансфектирани NIH/3T3 фибробласти и клетки от биосензора VT1.9 бяха оставени да адхерират върху тези повърхности в продължение на един час, след което бяха оцветени с кристал виолет и анализирани колориметрично. Броят на прикрепените клетки върху повърхност, коатирана с фибронектин, разбира се, значително превишаваше броят на клетките върху стъкло. Различията между родителските и биосензорните клетки за двата отделни субстрата не бяха статистически значими. Тези резултати недвусмислено показаха, че химерните белтъци не повлияваха естествените адхезивни способности на клетките.



Фиг. 11. Адхезивният потенциал на биосензорните клетки беше съпоставен с нетрансфектирани NIH/3T3 фибробласти. Клетките бяха оставени да адхерират върху нетретирана стъклена повърхност и върху покривни стъкла, коатираны с фибронектин ($2,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) в 24-ямови плаки за един час при $37^\circ\text{C}/5\text{-}10\% \text{CO}_2$. Прикрепените клетки са представени като процент от всички инокулирани клетки, определен след оцветяване с кристал виолет. Посочени са стандартните отклонения от три независими експеримента, всеки от които беше проведен в три повторения. Статистическата значимост беше оценена с t-тест на Стюдънт за сравнение на две независими извадки със софтуера *InStat*. Не бяха наблюдавани статистически значими различия (ns - $p>0,05$).

3. Оценка на биосъвместимост

3.1. Подбор на критерии за оценка на повърхностните качества на субстрат

Началните етапи на взаимодействие на клетките със субстрат са свързани с прикрепването и разстилането им. В тези първи минути на контакт те формират ламелиподии и извършват многобройни контрактилни движения, осъществени от актомиозиновия цитоскелет, при което "сондира" повърхността за подходящи лиганди, към които да се прикрепят. Процесът е съпроводен с преминаване на сферичните в суспензия към плоските върху подложка клетки и формиране на фокални комплекси, които бързо прерастват в по-стабилни и организирани структури - фокални адхезии. Компоненти на FA, както споменахме, са множество закотвящи цитоскелетни и адапторни молекули, между които и двата постоянно свойствени за тях белтъка - винкулин и тенсин. Първоначално те са изолирани

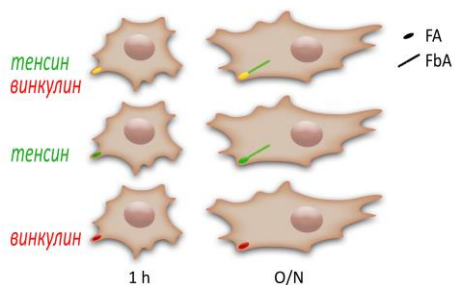
едновременно от пилешка гладкомускулна тъкан, но все още не е открито директно взаимодействие между тях. Винкулинът участва в зреенето на фокалните адхезии с роля на посредник при взаимодействието между талин и актин. Свързването му с талина, който от своя страна се свързва с интегрините, предизвиква тяхното активиране и кластериране. Така, макар и непряко, винкулинът свързва интегриновите адхезии с контрактилния актомиозинов цитоскелет и допринася за стабилността на фокалните адхезии, като контролира силите на напрежение. В допълнение винкулинът взаимодейства с множество други белтъци като α -актинин, паксилин, VASP и др. и изпълнява възлова регулаторна функция в структурите на фокалните адхезии. Тенсинът се свързва едновременно с интегрините и актина като формира мост, с който поддържа напрежението между тях. В същото време участва в пътищата на сигнална трансдукция и представлява структурна платформа, където се извършва регулацията на сглобяването на адхезивните комплекси и процеси като клетъчна миграция и тъканна реконструкция. Известно е, че количеството или общата площ на фокалните адхезии, в които се наблюдават и винкулин и тенсин, се увеличава правопрпорционално спрямо разстилането на клетките. Доколко един субстрат е подходящ за прикрепване може да се прецени чрез увеличението в размерите на клетките с разстилането им и с проследяване на броя и/или площта на формираните фокални адхезии. През първите 30-60 минути, когато се формират FA, те могат да се идентифицират с едновременната детекция (колокализация) на винкулин и тенсин - mCherry-позитивни/GFP-позитивни участъци (фиг. 12).

При подходящи качества на средата след стабилното прикрепване и разстилане на клетките се инициира образуването на фибриларните контакти. То започва няколко часа след посяване и е пряко асоциирано с процесите на фибрилогенеза, които се ръководят от пространствената координация и организацията на микротубулите и актомиозиновата контрактилност. Фибронектиновата фибрилогенеза се направлява от механични сили, приложени

върху извънклетъчния фибронектин през интегриновите адхезии. Връзката между FbA и фибрилогенезата е отдавна установена, но въпреки това все още не е изяснена функционалната йерархия между тях. Не е известно дали първо се формират фибриларните контакти и след това започва организацията на фибронектиновия матрикс или е обратно. Със сигурност, обаче, образуването на издължените FbA започва от закотвящите структури на FA с центростремително придвижване на $\alpha_5\beta_1$ интегрини по протежение на актиновите филаменти, като към тях постоянно се привличат нови молекули тенсин. И тъй като от двата анализирани белтъка само тенсинът, но не и винкулинът, се локализира във FbA, това води до разделяне на зеления и червения сигнал на GFP-тенсин и mCherry-винкулин в пространството и позволява разграничаването на фибриларните от фокалните адхезии - mCherry-негативни/GFP-позитивни участъци (фиг. 12).

Като конститутивен участник във FA винкулинът е един от най-разпространените белтъци за визуализацията им. Освен добре установената му локализация в клетъчните матриксни адхезии, винкулинът играе и важна роля в апоптозата, навлизането на *Shigella* в клетките гостоприемници, кадхерин базираните адхезии клетка-клетка и може да бъде установен в различни клетъчни локализации, както и в нелокализирана клетъчна форма. Двойното белязване на FA с mCherry-винкулин и GFP-тенсин като допълнителен маркер ни позволи да изключим фалшиво позитивните сигнали, които се получават поради наличието на свободен цитоплазмен винкулин - mCherry-позитивни/GFP-негативни участъци.

Наред с охарактеризирането на FA, FbA и разстилането на клетките информация за биосъвместимостта на материалите може да се получи и от анализа на промяната в морфологията им и по-конкретно на тяхната поляризация.



Фиг. 12. Схематична илюстрация на разпределението на флуоресцентните хибридни молекули mCherry-винкулин (червен сигнал) и GFP-тенсин (зелен сигнал). Посочени са овалните до елипсоидни FA, регистрирани след култивиране за един час и цяла нощ, както и зърнистите и удължени FbA при клетки, отглеждани за цяла нощ. В местата на FA, в които се локализира и двата белтъка след наслагане на червения и зеления сигнал се получава оцветяване в жълто.

Миграцията на клетките съобразно присъствието на разнородни по природа стимули се извършва с придвижването им в съответното направление. Насочено движение обаче се постига едва след формиране на преден и заден край на клетките, което задава нужната посока. Придвижването е мащабен процес и изисква координираните дейности и на трите основни типа клетъчни филаменти, както и на множество цитоскелетни адапторни и моторни белтъци. Главна движеща сила за поляризацията на клетките е взаимодействието между микротубулите и актиновия цитоскелет, както и непрекъснато сглобяване и разпадане на фокалните адхезии. Освен при миграторните процеси поляризация на клетките може да се наблюдава и в резултат на механична индукция. От ключово значение за клетъчна реорганизация в този случай е движението и сигналната регулация на интегриновите адхезии, активацията на Rho ГТФазите и актомиозиновата система, а не толкова динамичната мрежа от микротубули, която е от съществена важност при миграцията.

Поляризацията на клетките започва веднага след прикрепването и разстилането им. Многократно е документирано, че те добиват антеро-постериорен поляритет в отговор на анизотропния характер на извънклетъчното

обкръжение както *in vivo*, така и *in vitro*. А в изотропна среда, например върху субстрат с равномерна твърдост, претърпяват спонтанна поляризация. При поляризацията се осъществява подравняване на цитоскелета, удължаване на клетките и развитие на дълги стабилни краища. Свойствено за фибробластите е формирането на издължени актомиозинови снопове (стресови фибрили) по протежение на главната (по-дългата) ос на клетката и съответно увеличение в съотношението на надлъжната и напречната клетъчна ос. Промяната в морфологията на клетките е процес, който протича съгласувано с поведението на адхезивните контакти. Установено е например, че удължаването на клетките се предхожда от подравняване на фокалните адхезии, което вероятно определя и посоката на дългата ос.

Морфологичните изменения на клетката и формирането на адхезивните контакти имат пряко отношение към основните физиологични процеси. Така например, за да се случи насочената миграция, която играе критична роля при ембрионалното развитие, възстановяването и ремоделирането на наранени тъкани и т.н., е необходимо да се генерира и поддържа поляризация на клетката. Координацията на процесите на поляризация, както и на разстилането, се извършва от структурите на фокалните адхезии. Тя се осъществява благодарение на интегриновата сигнализация, с която се постига динамичен и прецизен пространствен и времеви контрол между най-отдалечените точки в клетката. Повишаване на количеството на фибриларните адхезии, от друга страна, се свързва с ограничаване на подвижността на клетките и начало на интензивно ремоделиране на средата. Всички тези процеси се инициират от различни стимули като разтворими и неразтворими биохимични фактори на средата, топография, еластичност и механично напрежение. Ето защо фокалните и фибриларни адхезии и динамиката на разстилане и поляризация на клетките отразяват функционалното състояние на извънклетъчния матрикс и съответно могат да се използват за оценка на степента на неговата биосъвместимост.

За да оценим взаимодействията клетка-субстрат дефинирахме шест измерими параметъра, групирани в две тройки. Първата тройка на т.нар. морфологични критерии ни позволи да представим адхезивните качества на различни субстрати като проследим динамиката на разстилане и поляризацията на клетките и включваше следните три критерия: (1) степен на *разстилане*, която беше оценена посредством промяната (увеличението) на средната клетъчна площ един час след посяване върху субстрат с контролирани адхезивни свойства; (2) степен на *поляризация*. Този критерий беше охарактеризиран чрез анализ на промяната във формата на клетките, дефинирана на базата на индекс на кръглост, три часа след посяване; (3) *поляризация във времето*, проследена с промяна във формата на клетката (отново индекс на кръглост) във времето - за един, два и три часа.

Следващата тройка критерии беше използвана за оценка на формирането и зреенето на клетъчните контакти: (4) *колокализация* на двата изследвани белтъка винкулин и тенсин, които са характерни за фокалните адхезии един час след посяване; (5) инициация на *фибрилогенезата* след четири часа култивиране, определена от разликата в нивата на флуоресцентните сигнали на маркираните винкулин и тенсин; (6) *цялостна оценка на клетъчните адхезии* след напълно завършена адхезия при инкубация в продължение на цяла нощ.

3.2. Трансформация на информацията от микроскопските изображения в количествен вид

Обработката на дигиталните фотодокументационни материали от микроскопирането на клетките и изчислението на количествените параметри бяха осъществени със свободно достъпния софтуер *ImageJ*. Анализите и интерпретацията на информацията от обработката на образите беше извършена със софтуер за работа с числови данни *MS Office Excel*.

При всички случаи изображенията бяха конвертирани от сива в бинарна (черно-бяла) скала. С това преобразуване беше зададен праг, с който бяха дефинирани зоните на интерес или точките от изображенията, които подлежат на анализ. Софтуерът предлага възможност за автоматично изчисление на площ на обект спрямо предварително зададена калибрационна скала. Тази функция беше използвана, за да се определи критерия *разстилане* на клетките (увеличение на площта им), както и да се проследи състоянието на адхезивните контакти (*колокализация, фибрилогенеза и цялостна оценка на клетъчните адхезии*). Количеството или площта на адхезивните контакти бяха изразени като обща площ на флуоресцентните сигнали за клетка.

Удължената морфология на NIH/3T3, характерна за фибробластния тип клетки, позволи приложението на т.нар. индекс на кръглост (*circularity*) като дефинитивен показател при определяне на поляризацията им. Той се изчислява по формулата $4\pi S/P^2$, където S е площта на клетката, а P - периметърът. Стойност 1,0 е показател за перфектен кръг. Стойност, която приближава 0,0 е индикация за изключително удължена форма. При прилагане на анализа за определяне на критериите *поляризация* и *поляризация във времето* беше прието, че клетки, които са със стойност на индекса на кръглост по-малка или равна на 0,5 са загубили кръглата си форма и се считат за поляризирали. Резултатите от изчислението на индекса на кръглост или дефиниране на всяка клетка като поляризирана или неполяризирана бяха представени като процент на всички поляризирали клетки от общия брой клетки, анализирани за всеки конкретен случай.

3.3. Подготовка на субстрати

3.3.1. ECM субстрати с контролирани адхезивни свойства

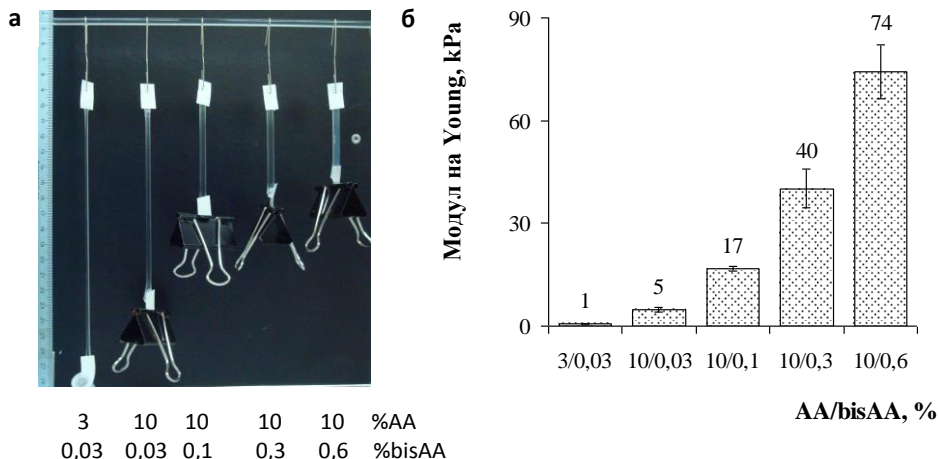
Адхезията на клетките беше изследвана и оценявана върху субстрати от ECM, нанесени върху повърхността на култивационни съдове или покривни стъкла.

Първоначално беше определен прагът на количеството субстрат, при което се формира пълно насищане на свързващите места на повърхността. Известно е, че прекалено високи концентрации могат да изкривят достоверността на резултатите, поради наличието на неспецифични фактори, които оказват влияние върху процесите на адхезия. Анализите бяха извършени с т.нар. адхезивен тест, при който се установява прикрепването, но не и разстилането на клетките. За работно количество бяха избрани стойности, които са малко по-ниски от минималното количество на насищане, а именно $2,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ фибронектин, $2,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ витронектин, $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ламинин-111, $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ламинин-521 и $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ колаген тип I.

Култивирането на клетките върху субстрати с контролирани адхезивни свойства или прилагането на естествените ECM белтъци в количества, при което се постига насищане на култивационната повърхност, ни позволи да уеднаквим условията и напълно да редуцираме флукутацията на адхезията при изследване на поведението на клетките.

3.3.2. Субстрати с вариращи механични свойства

Отговорът на клетките към вариращи механични свойства на субстрата изследвахме върху еластични повърхности от полиакриламидни гелове (ПАА), които допълнително бяха коатирани с фибронектин. Предимство на полиакриламидните гелове е контролираната твърдост на повърхностите, която лесно се настройва чрез съотношението на мономерите и степента на омрежване. Еластичността на гелове определехме посредством модула на *Young* при пет различни концентрации на компонентите, от които подбрахме един пластичен или мек субстрат (5 kPa - 10% w/v акриламид и 0,03% w/v bis-акриламид) и един ригиден или твърд субстрат (40 kPa - 10% w/v акриламид и 0,3% w/v bis-акриламид) (фиг. 13).



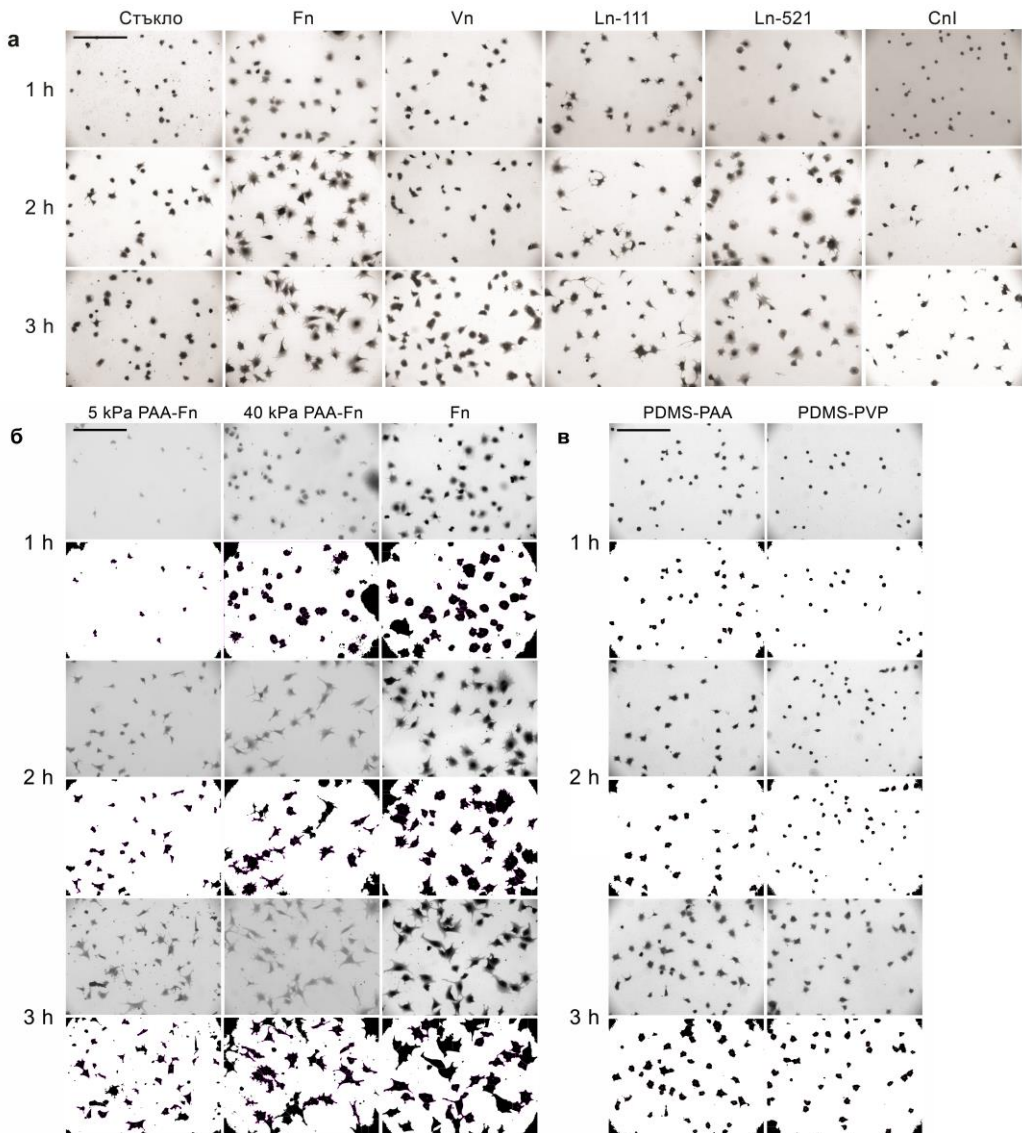
Фиг. 13. Определяне на механичните характеристики на полиакриламидните субстрати. След полимеризация на гелове, подготвени в инсулинови спринцовки при различно съотношение на акриламид/бисакриламид, те бяха фиксирани за единия край, а към другия беше приложена сила на тежестта с известна големина (а). Промяната в дължината им след разтягане беше определена върху фотографски изображения със софтуера *ImageJ*, след което беше изчислен модула на *Young* в kPa (б). Отсечките на графиката представят стандартните отклонения.

3.4. Стандартизиране на поведението на биосензора върху субстрати с контролирани адхезивни свойства

Разбирането на механизмите, по които клетките взаимодействат с естественото им обкръжение, е съществено за рационалното създаване на биомиметични скелети и микросредини за целите на тъканното инженерство. Известно е, че свойствените за извънклетъчния матрикс компоненти, участват в поддържането на хомеостазата, както и в процесите, нужни за възстановяването на тъканите след увреждане. Това, разбира се, ги прави и едни от първите компоненти, използвани при конструирането на биомиметични материали. И до днес, наред с широкото им приложение в експерименталната практика и фундаменталните изследвания, най-често използвани при изработката на биоматериали остават фибронектинът, колагените, ламинините, витронектинът,

фибринът, хиалуроновата киселина, еластинът и др.. Стандартизирането на поведението на клетъчния биосензор върху субстрати от естественото за клетките микрообкръжение дава точната отправна точка за съпоставка и анализ на адхезивните качества на нови материали. Ето защо в настоящата работа като моделни субстрати използвахме четири от най-разпространените матриксни компоненти - фибронектин, колаген тип I, витронектин и ламинин-111.

Ln-111 е изоформа на ламинина от базалната мембрана, която се наблюдава в ранното ембрионално развитие, а по-късно при някои епителиални типове клетки, както и мишата саркома Engelbreth-Holm-Swarm, откъдето и се получава в големи количества. Сигналните пътища, които индуцира Ln-111, участието му в ремоделирането на матрикса, адхезивните качества и способността му да поддържа добро разстилане на клетките се изучават от десетилетия. Освен него в стандартизирането на биосензора включихме и друга изоформа на ламинините - ламинин-521. Ln-521 заедно с Ln-511 са първите молекули на извънклетъчния матрикс, които се експресират в ранното ембрионално развитие (стадий четири клетки). За разлика от Ln-111, за който е известно, че инициира диференциацията на клетките, Ln-521 (наред с Ln-511) изпълнява напълно противоположна роля. Установено е, че в *in vitro* условия те поддържат оцеляването, самообновяването и плурипотентността на стволовите клетки, а също така ограничават апоптозата им. Приложението на стволовите клетки в клетъчно-базираните терапии поставят изискването отглеждането им да се осъществява в условия и среди, в които не присъстват животински продукти. Изследвания през последните години доказват, че култивирането им за клинична употреба върху рекомбинантен човешки ламинин-521 е перспективно решение. Отличните адхезивни качества на Ln-521 и различния ефект, който има върху поведението на клетките в сравнение с Ln-111 ни насочиха да включим и този протеин като допълнителен контролен субстрат в настоящата работа.



Фиг. 14. Клетки от биосензорния клон VT1.9 бяха култивирани върху повърхности с различни адхезивни свойства: (а) контролна нетретирана стъклена повърхност, пет естествени белтъка на ECM с известни повърхностни свойства (Fn, Vn, Ln-111, Ln-521 и CnI); (б) повърхности с различни механични свойства, коатирани с Fn ("мека" - 5 kPa и "твърда" - 40 kPa) и (в) повърхности, покрити с кополимери на полидиметилсилоксана (PDMS-PAA и PDMS-PVP). Клетките бяха култивирани в продължение на 1, 2 и 3 часа, след което фиксирани в параформалдехид, оцветени с Coomassie Brilliant Blue R-250 и монтирани за

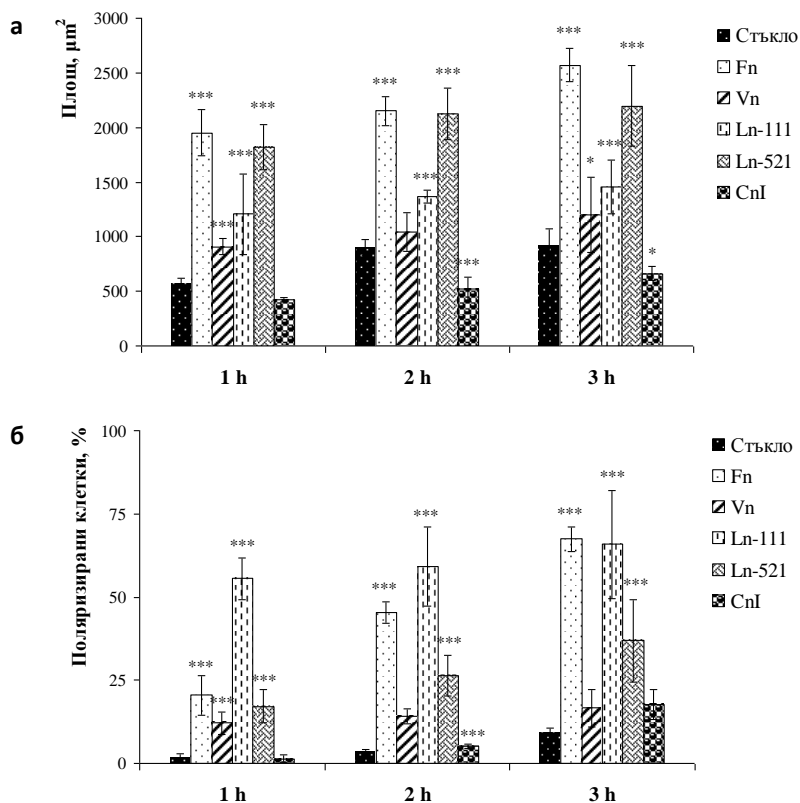
микроскопски анализ. На панел б и в са показани и клетките след обработка със софтуера *ImageJ*, като включените в анализите клетки са оградени с лилави линии. Впечатление прави активната поляризация на клетките върху Ln-111, както и големите различия при култивиране на клетките върху еластична и ригидна повърхност. Машабна линия - 300 μm .

При култивиране на клетките в присъствие на серум те често се прикрепват към серумните белтъци витронектин и фибронектин, които от своя страна неспецифично се адсорбират към повърхността на съдовете. Това наложи провеждането на всички тестове, при които се оценява поведението на клетките като функция от наличието и количеството на тези субстрати, да бъде провеждано в отсъствие на серум. Друг фактор, който беше взет под внимание в текущите анализи беше конfluентността на културите. Тъй като акцентът тук падна именно върху изследване на контактите клетка-матрикс, то тестове бяха проведени при ниска плътност на културите с цел да се ограничат взаимодействията клетка-клетка и усилването на общата адхезия.

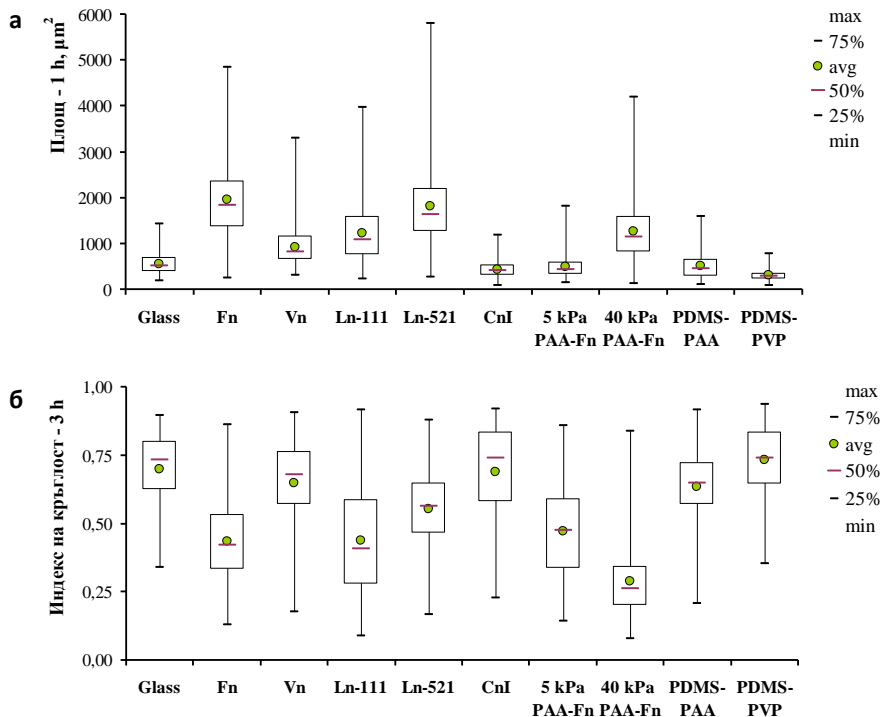
3.4.1. Разстилане и поляризация

Както се и очакваше, повечето естествени субстрати индуцираха по-добро разстилане на клетките от нетретираната контролна стъклена повърхност. При клетки, култивирани върху петте ECM белтъка за 1 h, 2 h и 3 h бяха наблюдавани съществени различия в площта им (фиг. 14, 15 и 16). Най-интензивно разстилане на клетките беше наблюдавано върху повърхност, коатирана с Fn и Ln-521 (почти 2000 μm^2 след един час култивиране), следвани от Ln-111 и Vn. Изненадващо разстилането на клетките съвсем слабо се благоприятстваше от присъствието на CnI (по-малко от 500 μm^2 след един час), дори в сравнение с контролната повърхност.

Увеличението в клетъчната площ върху Vn беше по-малко от очакваното (около 1000 μm^2 и при трите инкубационни времена), а върху Ln-111 също не бе-



Фиг. 15. Биосензорните клетки VT1.9 бяха култивирани върху пет различни ECM белтъка (Fn, Vn, Ln-111, Ln-521 и CnI). След 1, 2 и 3 часа на инкубация клетките бяха фиксирани, оцветени с Coomassie Brilliant Blue R-250 и монтирани за микроскопия при бяла светлина. (а) Клетъчната площ беше определена със софтуера *ImageJ* и използвана като мярка за разстилане. Резултатите показаха, че ECM белтъците индуцираха разстилане с различен интензитет и той беше в следния ред: Fn > Ln-521 > Ln-111 > Vn > CnI. (б) Резултати за поляризацията на клетките, представени като процент на поляризираните клетки от общата популация на клетките. Тя беше оценена посредством индекса на кръглост отново със софтуера *ImageJ*, като стойност от 0,5 беше зададена като праг за загуба на кръгла форма. От графиката е видно, че Ln-111 иницира активно поляризацията след един час на инкубация, но при клетки, култивирани за три часа, Fn показва по-добри адхезивни качества. Отсечките представят стандартните отклонения. За всеки субстрат при дадено време статистически значимите различия в сравнение с нетретираната контролна стъклена повърхност са отбелязани с * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) и *** ($p < 0,001$).



Фиг. 16. Резултатите от анализа на разстилане и поляризация на биосензорните клетки, представени като *box plots*, като с – са маркирани най-ниските, средните и най-високите наблюдавани стойности, с ● са отбелязани стойностите, отчетени при половината от клетките за всеки от случаите, а правоъгълниците оградят стойностите, които се срещат при 25 до 75% от анализираниите клетки. (а) Оценка на адхезивните свойства на субстратите въз основа на средна площ на клетките един час след посяване. (б) Оценка на адхезивните свойства на субстратите на базата на индекс на кръглост три часа след посяване. Резултатите са представени директно чрез индекса на кръглост на клетките, които бяха анализирани за всеки контролен субстрат.

ше особено изразено ($\approx 1300 \mu\text{m}^2$, също без чувствителна промяна за първия, втория и третия час). От друга страна поляризацията на клетките и формирането на филоподии върху Ln-111 бяха наистина бързи (повече от половината клетки още след първия час) (фиг. 14, 15 и 16). Те значително надминаваха тези при клетки, култивирани за един час върху Fn и Ln-521 (едва $\approx 20\%$), но не се променяха особено с времето. За разлика от тях промяната във формата на

клетките във времето при Fn беше значително по-голяма (почти 70% след три часа). Поляризацията върху CnI започна много несигурно (1%), но след три часа култивиране (18%) беше доказано, че това е предпочитаният субстрат в сравнение с нетретираната стъклена повърхност (9%) и дори Vn (17%).

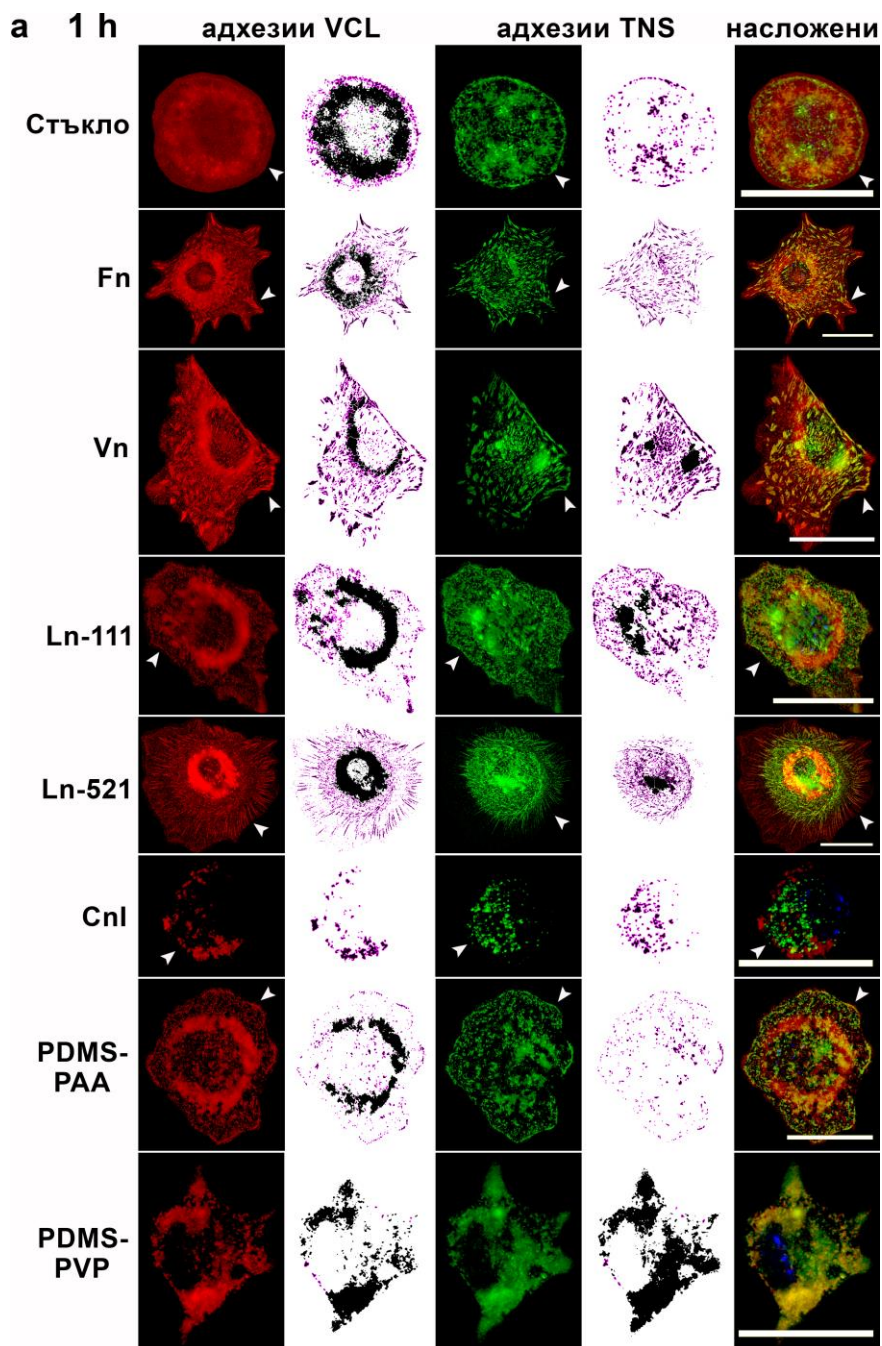
Резултатите, представени в графичен вид на фиг. 15 и 16 бяха получени след анализ на 200 отделни клетки от три независими експеримента за всеки изследван субстрат. На фиг. 16 се вижда, че диапазонът на стойностите на площта е доста широк и максималните стойности значително превишават средните за анализираната популация. Така например при двата най-предпочитани за разстилане субстрата се наблюдават клетки, чиято площ достига почти 5000 μm^2 (при Fn) и дори 6000 μm^2 (при Ln-521). При тях, както и при Ln-111 от 25 до 75% от клетките имат стойности за индекс на кръглост, близки до средните за целия диапазон за разлика от клетките, култивирани върху Vn, CnI и стъкло, при които преобладаващият брой е от неполяризиращи клетки.

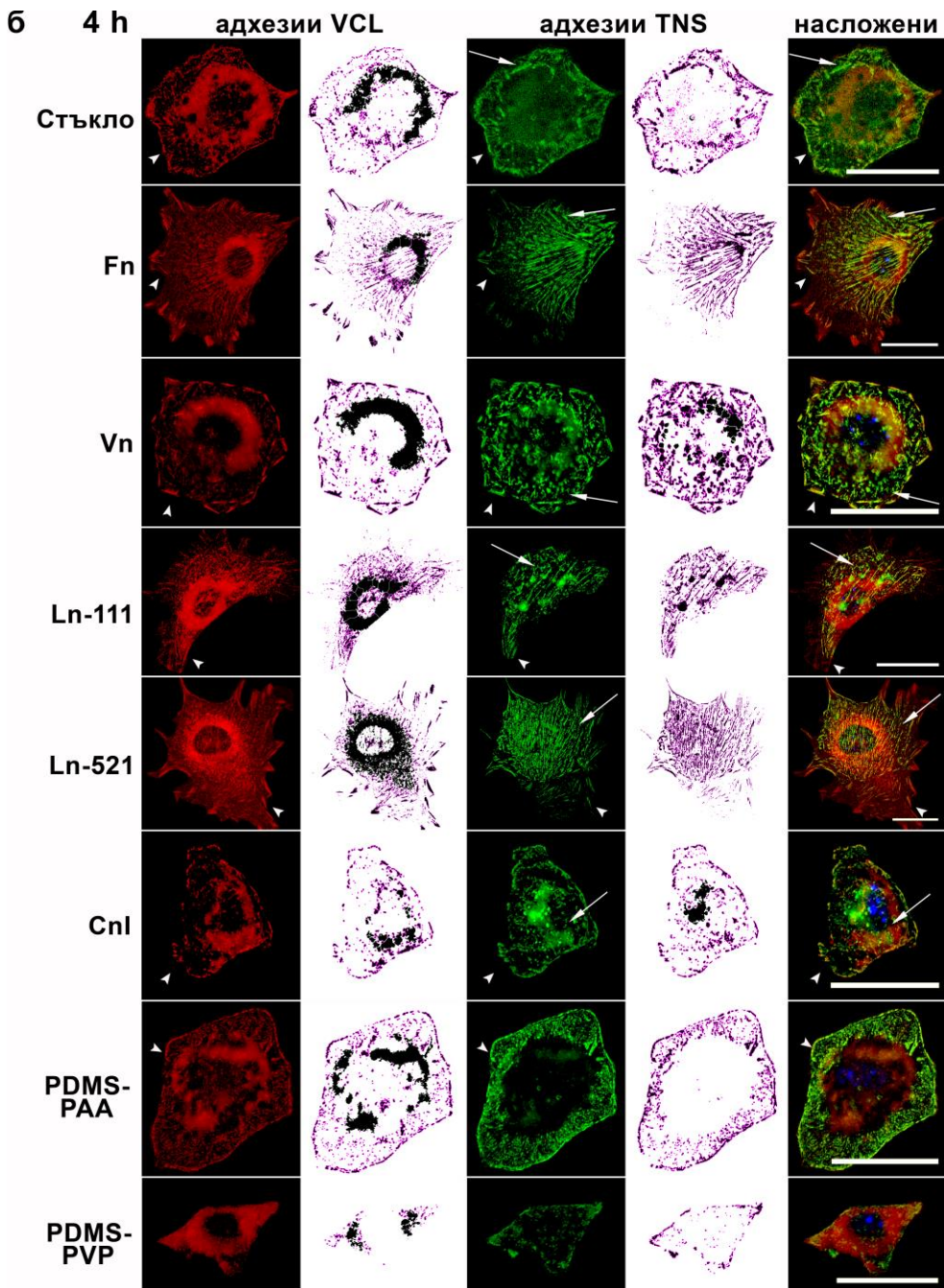
3.4.2. Фокални и фибриларни адхезивни контакти

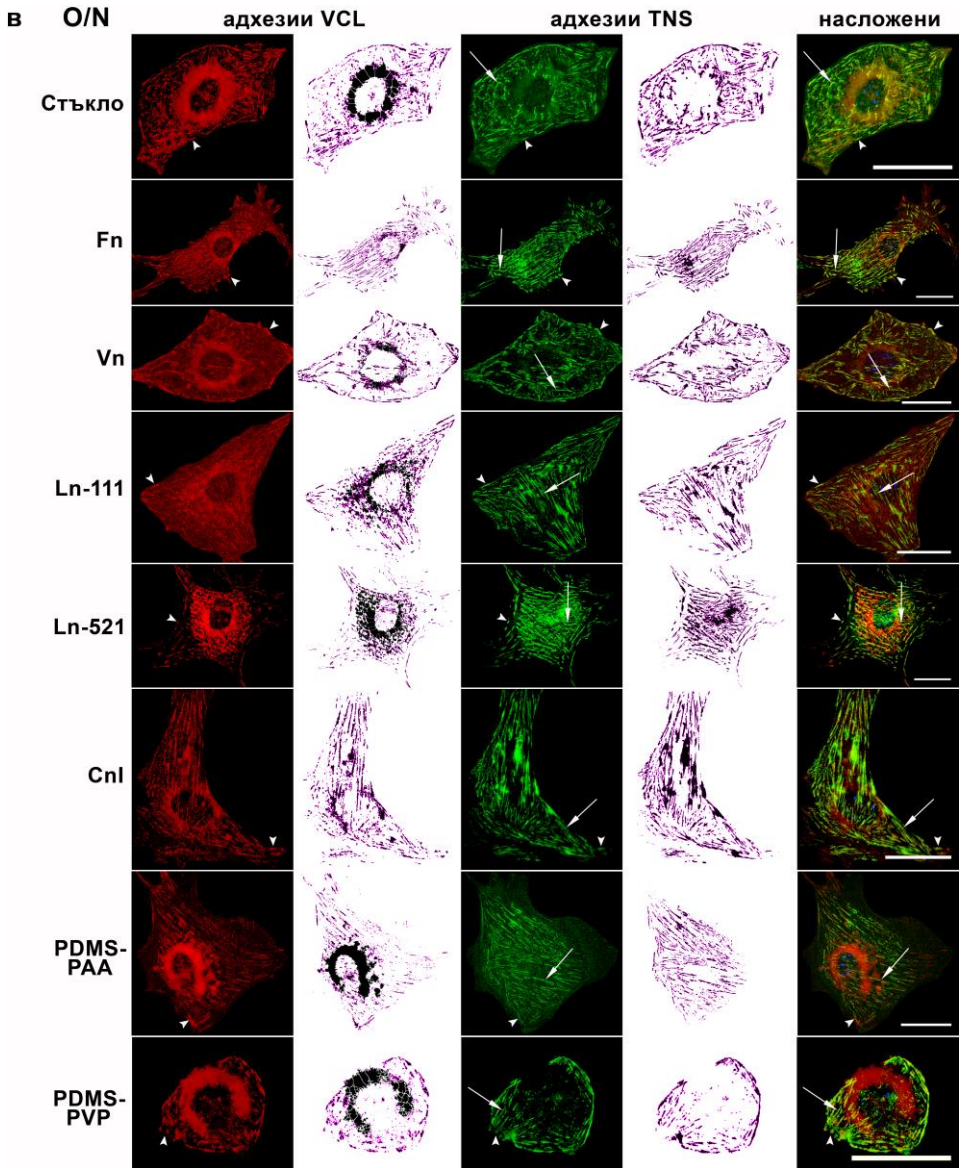
Фокалните и фибриларните адхезивни контакти, които биосензорната линия VT1.9 формира, бяха изследвани върху петте различни ECM белтъка (Fn, Vn, Ln-111, Ln-521 и CnI). Оценката на контактите с флуоресцентен микроскопски анализ беше извършена на клетки, култивирани за един, четири часа и за цяла нощ (фиг. 17 и 18). FA бяха регистрирани като пространствено припокриване на червения и зеления флуоресцентен сигнал и при трите инкубационни времена - mCherry-позитивни/GFP-позитивни участъци. При клетки, фиксирани на първия час, локализацията на двата белтъка (*колокализация*), измерена чрез общата им повърхност, беше съпоставима, ако не еднаква. Площта на FA в клетки, култивирани върху коатирани стъкла (с изключение при коатиране с CnI) беше по-голяма в сравнение с клетките върху стъкло (четири до девет пъти повече при Fn и Ln-521). Разположението на фокалните адхезии върху Ln-521 беше необичайно.

При много от анализирани клетки бяха наблюдавани голям брой удължени и изтънени контакти, които бяха ориентирани радиално. Както се очакваше, при клетки, култивирани за четири часа с напредване на процесите на фибрилогенеза площта на флуоресцентните сигнали започна да се различава с преобладаване на зеления сигнал, тъй като само тенсинът се транслоцираше към FbA - mCherry-негативни/GFP-позитивни участъци (фиг. 17, 18 и 19). Отново върху CnI и върху стъкло площта на формираните FA не се отличаваше съществено, нито разликата в площта на червения и зеления сигнал, която указваше наличието на FbA, беше статистически значима. За разлика от тях при клетки върху Fn и особено при Ln-521 беше наблюдавано чувствително увеличение на адхезивната площ (около 200-250 μm^2 при VCL и 250-350 μm^2 при TNS) и съответно интензификация на фибрилогенезата. При клетки, култивирани за цяла нощ (фиг. 17 и 18) тенденцията на нарастване на площта беше запазена с ясно предпочитание на Fn и Ln-521 като субстрати ($\approx 250 \mu\text{m}^2$ при VCL и 300-450 μm^2 при TNS). Този път обаче резултатите за CnI бяха подобни на тези за Vn и Ln-111 (около 150-200 μm^2 при VCL и 200-250 μm^2 при TNS) и по-добри в сравнение с тези върху стъкло (100/150 μm^2 за VCL/TNS), а количеството на транслоцирания тенсин действително беше значително (разликата между площите на VCL и TNS при CnI беше 90 μm^2).

На фиг. 18 е представена общата площ на червения и зеления сигнал за клетка. Оценени бяха адхезивните контакти в пет представителни клетки от три независими експеримента, като са посочени усреднените стойности за всички анализирани клетки.

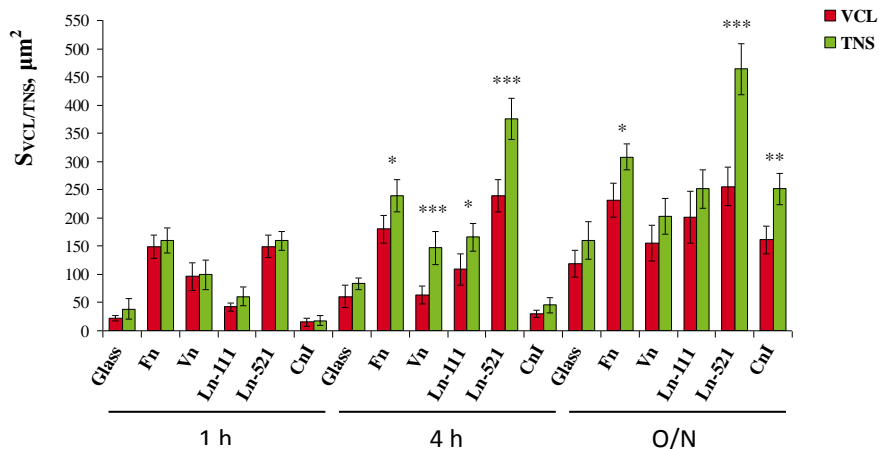




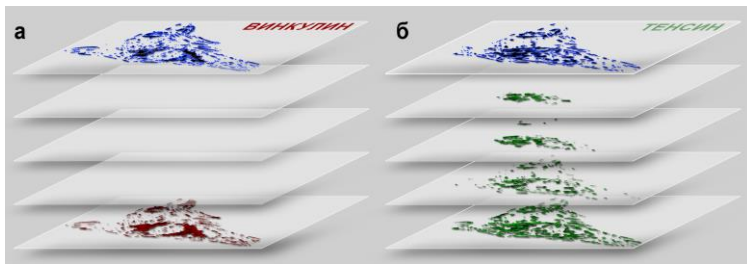


Фиг. 17. Клетки от биосензорния клон VT1.9, които експресират хибридните флуоресцентни белтъци mCherry-винкулин и GFP-тенсин бяха посяти върху стъклени покривни стъкла, покрити с Fn, Vn, Ln-111, Ln-521, Cnl, PDMS-PAA и PDMS-PVP, както и върху нетретирана контролна стъклена повърхност. Клетките бяха култивирани в продължение на един час (а), четири часа (б) и цяла нощ (в), след което фиксирани и монтирани за микроскопски анализ. FA (посочени с глави на

стрелки) бяха идентифицирани с едновременната регистрация на сигналите от червения и зеления белтък (mCherry-позитивни/GFP-позитивни участъци), докато FbA (обикновени стрелки) бяха локализирани по присъствието единствено на зеления флуоресцентен белтък (mCherry-негативни/GFP-позитивни участъци). Общото разпределение на флуоресцентните сигнали е показано при насложените образи. Представени са и обработените със софтуера *ImageJ* клетки (втора и четвърта колона), използвани за изчисляване на площта на адхезивните контакти, при които участъците, включени в изчисленията са оградени с лилави линии. При изображенията с червен светлинен филтър ясно се вижда нелокализираният цитоплазмен винкулин, струпан основно около ядрата на клетките (mCherry-позитивни/GFP-негативни участъци). Площта на сигнала на цитоплазмения винкулин беше изключена от калкулацията на общата площ на червения сигнал. За определяне на критериите *колокализация*, *фибрилогенеза* и *цялостна оценка на клетъчните адхезии* бяха използвани изображенията на пет представителни клетки за всяко експериментално условие. Мащабната линия на всеки образ е 20 μm .



Фиг. 18. Средната площ на червения и зеления флуоресцентен сигнал при биосензорната клетъчна линия VT1.9, която експресира mCherry-винкулин и GFP-тенсин, беше измерена посредством софтуера *ImageJ*. Клетките бяха култивирани върху нетретирана контролна стъклена повърхност, Fn, Vn, Ln-111, Ln-521, CnI за 1 h, 4 h и за цяла нощ. Колоните представляват средните стойности \pm SD. За всеки субстрат при определено време статистически значимите различия между VCL и TNS ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$) са отбелязани с една, две и три звезди.



Фиг. 19. Обичайно фокалните и фибриллярните контакти на адхезия лежат в различни равнини на фокусиране. За разлика от mCherry-винкулина (а), който е характерен само за фокалните адхезии, GFP-тенсинът (б) се локализира едновременно и в двата типа контакти. Това от своя страна наложи при обработката на резултатите от зеления флуоресцентен сигнал сливане на два или повече образа в двумерно изображение. Най-отгоре са представени клетките след обработка със софтуера *ImageJ*.

3.5. Изпитване на PDMS материали

През последните години за нуждите на регенеративната медицина и тъканното инженерство се разработват редица нови биоматериали, но приложението им в практиката остава ограничено поради недостига на адекватни методи и подходи за изпитването им. Темповете, с които се създават съвременните биомиметични скелети, изпреварват въвеждането на средствата за анализ на биосъвместимостта и възможностите им да поддържат прикрепването, растежа на клетките и тъканната морфогенеза. В зависимост от типа си биоматериалите могат да притежават различни качества, но при всички случаи ключови техни характеристики са повърхностните свойства, механичните свойства и биоразградимостта. Разработени са множество химични и физични методи, с които да се тества тяхната еластичност, хидрофилност, термични свойства, адсорбционни свойства, химичен състав и др. Що се касае обаче до оценката на способността им да провокират реакция от живите клетки и да поддържат основните физиологични процеси на живите системи възниква необходимостта от подходящи клетъчно и молекулярно биологични методи.

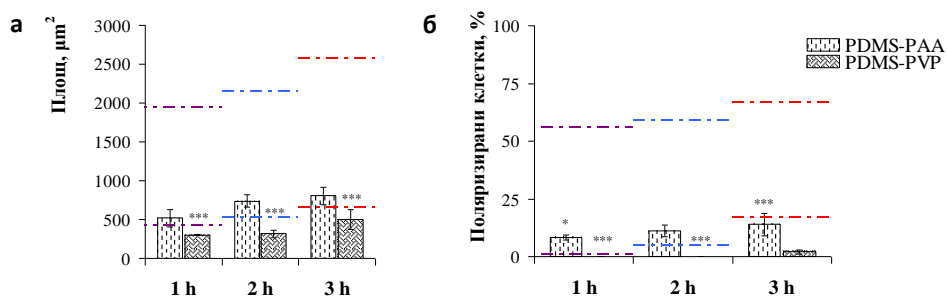
Такива са тук представените анализи на фокалните и фибриларните адхезивни клетъчни контакти и общата морфология на клетките.

В настоящата дисертация демонстрирахме приложението на създадения биосензор VT1.9 на практика. За целта анализирахме адхезивните свойства на два синтетични блок-кополимера на полидиметилсилоксана - PDMS-PAA (поли(диметилсилоксан-*b*-акрилова киселина)) и PDMS-PVP (поли(диметилсилоксан-*b*-винилпиролидон)). PDMS кополимерите са химично модифицирани чрез добавяне на нови функционални групи върху скелета за подобряване на повърхностните им качества. Те са биоактивни, прозрачни, евтени, пропускливи за газове, податливи на повърхностни модификации и което е по-важно - притежават механични свойства, близки до тези на човешките тъкани. Перспективно е бъдещето им като част от т.нар. композитни материали, които обикновено са съставени от синтетични съединения и компоненти на ECM.

PDMS базираните субстрати доказаха своята биосъвместимост, но показаха слаби адхезивни качества. След един час инкубация клетките адхерираха и върху двете повърхности, но спредирането беше по-изразено върху PDMS-PAA. Средната площ на клетките, култивирани върху PDMS-PAA беше с около 70% по-висока от тази върху PDMS-PVP и много подобна до тази върху нетретирано стъкло. Тези различия бяха статистически значими при PDMS-PVP ($p < 0,001$) за всички периоди на култивиране, които бяха анализирани (фиг. 20a). Неспособността на биосензорните клетки да спедират върху PDMS-PVP се отрази и на поляризацията им. Докато три часа след посяване върху PDMS-PAA, клетките развиха удължена морфология с добре изразени ламелиподии, клетките върху PDMS-PVP имаха предимно кръгла форма и многобройни малки филоподии (фиг. 14в). Тези наблюдения бяха потвърдени и от измерването на индекса на кръглост или броя поляризирали клетки (фиг. 20б).

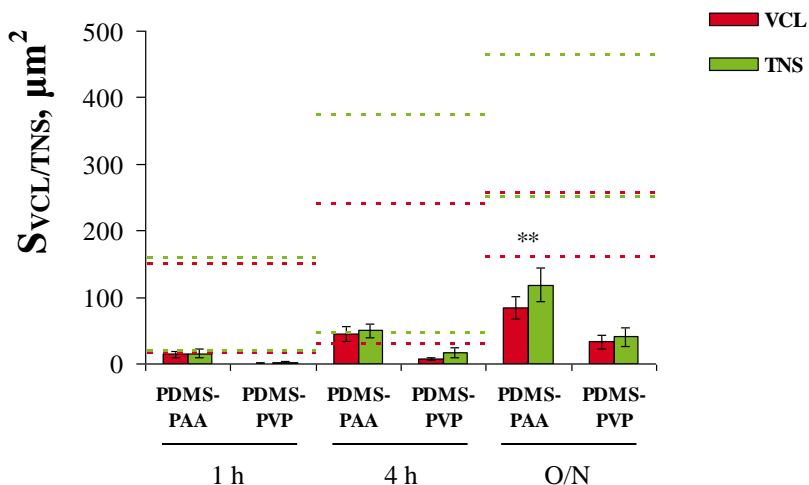
След първия час на инкубация върху PDMS-PAA се формираха малки точковидни FA, маркирани от колокализацията на винкулин и тенсин. Те бяха по-

добре развити след четвъртия час, а след инкубация за цяла нощ имаха морфология на типични FA. Едновременно с тях бяха детектирани и многобройни дълги фибриларни адхезии (фиг. 17). За разлика от PDMS-PAA обаче, PDMS-PVP не осигури подходящи условия за организация на клетъчните адхезии в ранните етапи на култивиране. Винкулинът и тенсинът като цяло останаха неорганизирани и можеха да се детектират в адхезивните сайтове само след инкубация за цяла нощ (фиг. 17). Въпреки че адхезивните свойства на PDMS-PAA и PDMS-PVP не могат да бъдат сравнявани с тези на ECM белтъците (фиг. 20 и 21), те показаха, че могат да бъдат адекватни субстрати за клетъчна адхезия и дори индуцираха процеси на фибрилогенеза при клетки, култивирани за цяла нощ. И фокалните и фибриларните адхезии бяха по-големи при клетки, култивирани върху PDMS-PAA



Фиг. 20. Морфологично сравнение на биосензорните клетки VT1.9 при култивиране върху двата кополимера на полидиметилсилоксана - PDMS-PAA и PDMS-PVP спрямо анализираните по-горе белтъци от ECM (Fn, Vn, Ln-111, Ln-521 и Cn1). Клетките бяха инкубирани в продължение на 1, 2 и 3 часа, след което фиксирани, оцветени с Coomassie Brilliant Blue R-250 и монтирани за микроскопски анализ. (а) Разстилане на клетките, представено на базата на площта им. (б) Поляризирали клетки като процент от общата популация на клетките. Определянето им беше извършено посредством индекса на кръглост (при стойност $\leq 0,5$ клетките бяха дефинирани като поляризирали). Пунктирните линии маркират най-ниските и най-високите стойности, наблюдавани при стандартизиране на биосензора върху петте естествени белтъка. Отсечките представят стандартните отклонения. За всеки субстрат при дадено време статистически значимите различия в сравнение с нетретираната контролна стъклена повърхност са отбелязани с * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) и *** ($p < 0,001$).

в сравнение с PDMS-PVP. Това може да се дължи на инкорпорираните COOH групи, за които има данни, че подпомагат формирането на фибриларните адhezии и фибронектиновата фибрилогенеза.



Фиг. 21. Средна площ на адхезивните контакти на клетка, представена с площта на сигнала от mCherry-винкулин и GFP-тенсин. Клетки VT1.9 бяха култивирани в продължение на един час, четири часа и цяла нощ върху PDMS-PAA и PDMS-PVP. На графиката с пунктирни линии са представени минималните и максималните референтни стойности на адхезивните контакти, получени при стандартизирането на биосензорните клетки върху петте естествени за ECM белтъка Fn, Vn, Ln-111, Ln-521 и СnI. Посочени са стандартните отклонения и статистически значимите различия между средната площ за VCL и TNS (** - $p < 0,01$).

3.6. Субстрати с вариращи механични свойства

Взаимодействието на клетките с извънклетъчния матрикс включва два съвместни сигнални пътя: сигнализация, индуцирана от лиганди или ECM-зависими биологични стимули и механично индуцирана сигнализация, която, разбира се, се определя от механични стимули. Клетките детектират механичните свойства на субстрата и модулират поведението си спрямо неговата вискоеластичност. Промените в механиката на клетките, от своя страна, се отразяват върху тяхната миграция и пролиферация. Най-общо върху меки

еластични субстрати клетките мигрират по-бързо, а върху твърди субстрати преференциално пролиферират.

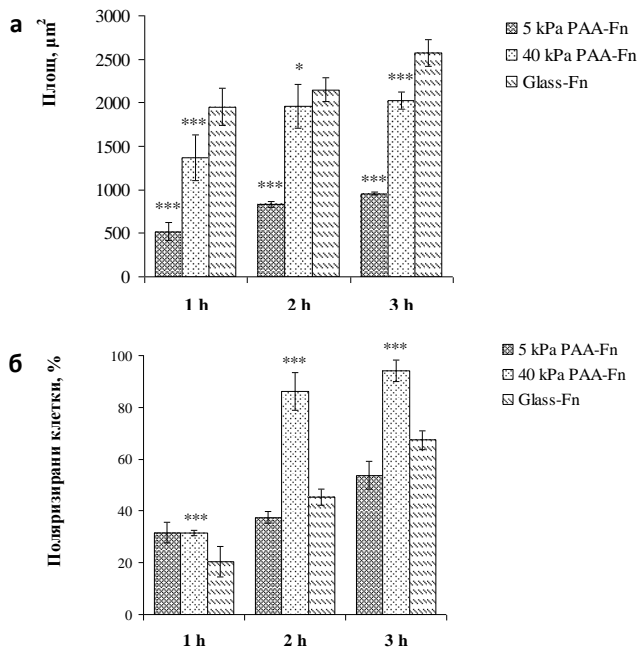
Миграцията и пролиферацията са критични функции по време на тъканната поправка, като те включват силите на разтягане, упражнявани от клетките върху средата. При заздравяване на рани, например, фибробластите мигрират бързо към мястото на нараняване върху първоначално мекия матрикс от фибрин/фибронектин. След това лизират формирания съсирек и започват да отлагат втори матрикс, който съдържа хиалуронан/фибронектин. След като покрият цялата повърхност на увредения участък клетките започват да отделят колаген и да пролиферират активно върху вече по-твърдия субстрат от хиалуронан/фибронектин и колаген/фибронектин.

Известно е, че вътреклетъчно генерираните контрактилни сили се предават на адхезивните комплекси клетка-субстрат посредством актиновия цитоскелет и упражняват върху субстрата разтягане. Реципрочно увеличаването на твърдостта на матрикса оказва влияние върху актомиозиновата контрактилност, размера и морфологията на клетките и води до увеличаване на броя и размера на адхезивните контакти.

В настоящата работа изследвахме поведението на биосензора VT1.9 при променливо механично напрежение на границата клетка-субстрат. При анализа се спряхме на мека и твърда повърхност с модул на еластичност от 5 и 40 kPa, които са с близки до тези на живите тъкани характеристики. Така например модулът на еластичност на мозъчната тъкан е 0,1-1 kPa, на белодробната тъкан - 5-30 kPa, на мускулната тъкан - 8-17 kPa, а на костната тъкан - 25-40 kPa.

Разстилането на клетките върху коатиран с F_n твърд (40 kPa) субстрат, което наблюдавахме беше два до три пъти по-високо от това върху мек (5 kPa), но по-слабо от увеличението на клетъчната площ при субстрат с безкрайна твърдост (F_n коатирани покривни стъкла) (фиг. 14б, 16а и 22а). Напротив поляризацията на клетките върху твърд субстрат след един час (32%) значително надхвърляше тази

върху безкрайна твърдост (21%) и особено при култивиране за два и три часа (1,5 до 2 пъти). При култивиране върху мек субстрат за един час поляризацията на клетките беше идентична с тази върху твърд субстрат, но с течение на времето не се наблюдаваше съществена промяна (фиг. 14б, 16б и 22б).

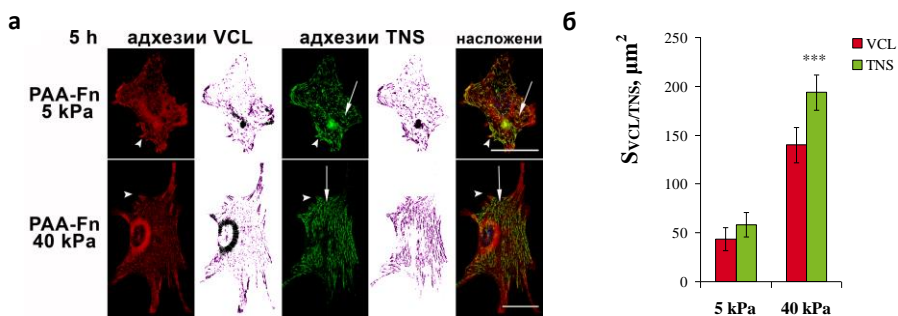


Фиг. 22. Биосензорните клетки VT1.9 бяха култивирани върху коатиран с Fn "мек" субстрат (5 kPa) и "твърд" субстрат (40 kPa) в продължение на 1, 2 и 3 часа, след което фиксирани и оцветени с Coomassie Brilliant Blue R-250. (а) Площ на клетките, определена със софтуера *ImageJ* и използвана като мярка за разстилане. (б) Поляризация на клетките, определена на базата на индекса на кръглост, изчислен след обработка на микроскопските изображения с *ImageJ*. Поляризираните клетки са представени като процент от общата популация на клетките. Отсечките на колоните представят стандартните отклонения. Статистическата значимост е изчислена спрямо контролни стъкла, коатирани с Fn (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$).

По-твърдите повърхности (40 kPa) по-добре подпомагаха формирането на адхезивни контакти в сравнение с по-меките (5 kPa) (фиг. 23). Пет часа след

инокулиране общата площ на сигналите от VCL и TNS върху 40 kPa PAA беше повече от три пъти по-голяма в сравнение с 5 kPa PAA.

Анализът на клетъчната морфология и флуоресцентно маркираните белтъци при клетки, култивирани върху коатирани с Fn еластични субстрати, ясно показва способността на биосензора да диференцира адхезивните качества на повърхности с променлива твърдост. Чувствителността на биосензора към механичните сигнали на средата го прави подходящ инструмент за оценка и на механичните свойства на изпитвани материали.



Фиг. 23. Клетки от биосензора бяха култивирани при променлива твърдост на средата в продължение на пет часа. Вариабилността в еластичността на субстратите беше осигурена с помощта на полиакриламидни хидрогелове (5 kPa и 40 kPa). Повърхността на гелове беше допълнително коатирана с фибронектин, чиито доказани адхезивни качества дават възможност акцентът в експеримента да се измести към анализ на силите на напрежение. (а) Флуоресцентен микроскопски анализ на клетките. На фигурата FA са обозначени с глави на стрелки, а FbA - с обикновени стрелки. Отново площта на сигнала на цитоплазмения винкулин беше изключена от калкулацията на общата площ на червения сигнал – участъците, които не са оградени с лилави линии. Мащабна линия - 20 μm. (б) Изчислената с *ImageJ* площ на флуоресцентните сигнали, усреднена за анализираниите клетки. Посочени са стандартните отклонения и статистически значимите различия между VCL и TNS (***) - $p < 0,001$).

3.7. Интерпретация и анализ

Подготовката на биосензора за практическото му приложение в оценката на нови материали с неизвестни качества започна със стандартизирането му спрямо естествените извънклетъчни субстрати. За целта извършихме

количествено охарактеризиране на двете групи параметри – морфологичните критерии и клетъчните адхезивни контакти.

Тези параметри са взаимосвързани и всеки от тях отразява важни събития в процеса на възникване на контактите между закотвящо-зависимите клетки и субстрата. Те започват с първоначално пасивните взаимодействия, направлявани от физико-химичните свойства на субстрата и клетъчната повърхност (заряд, вискозитет на ектоплазмата и т.н.) и продължават с по-активните процеси като активация на интегриновите рецептори, организация и въвличане на актиновия цитоскелет, активация на специфични сигнални пътища и изграждане на многокомпонентни адхезивни сайтове. Въпреки че дефинираните параметри не осигуряват специфична информация за случващите се събития, те позволяват да се получи обща представа за адхезивните свойства на субстратите и предлагат сравнително прост начин за оценка на повърхностната биосъвместимост на нови материали.

Резултатите показаха, че един час след посяване върху естествените белтъци от ECM клетките отговориха на предпочитаните адхезивни сигнали с по-интензивно разстилане ($F_n > L_n-521 > L_n-111 > V_n$) (фиг. 15а) и формиране на повече FA ($F_n = L_n-521 > V_n > L_n-111 > \text{стъкло} > CnI$) (фиг. 18). Това беше демонстрирано с увеличение на площта на клетките (критерий *разстилане*) и адхезивната площ на FA (критерий *колокализация*).

Растежът и стабилизирането на FA изискват сили на напрежение. Активирането на RhoA стимулира Rho киназата, което води до фосфорилиране на леките вериги на миозина и по този начин увеличава контрактилната активност на миозин-II в стресовите фибрили. Ето защо и субстрати като F_n и L_n-111, които активират RhoA, се очаква да стимулират формирането на FA, както и установихме. Въпреки това този общ механизъм не беше достатъчен да обясни резултатите върху всички тествани субстрати. Например за L_n-521 е известно, че преференциално активира Rac, но не и RhoA, посредством $\alpha\beta 1$ интегрин-

зависими пътища. При все това този субстрат демонстрира стимулиране на големи FA в нашите експерименти. Очевидно формирането на FA е комплексен процес, който включва други допълнителни важни фактори, сред които кластерирането на интегрините, интегритета на ядрената ламина, състава на двойната фосфолипидна мембрана и регулираното им разпадане.

Получените резултати недвусмислено доказаха, че върху повърхности с добри адхезивни качества поляризацията на клетките беше иницирана по-рано във времето ($Ln-111 > Fn > Ln-521$) (фиг. 15б). Процесът на растеж на FbA и фибронектиновата фибрилогенеза бяха интензифицирани, като капацитетът на различните субстрати да поддържат формирането на FbA намаляваше в следния ред - $Ln-521 > Vn > Fn > Ln-111$ (фиг. 18). Тези процеси бяха идентифицирани чрез индекса на кръглост (критерий *поляризация*) и разликата в количеството на червения и зеления сигнал (критерий *фибрилогенеза*).

Тази последователност беше сравнима с получената за формирането на FA. Тъй като FbA се създават от тенсин-зависима $\alpha 5\beta 1$ интегринова транслокация от FA по дължината на актиновите снопове, то е очаквано субстрати, които поддържат формирането на FA, да поддържат и формирането на FbA.

Придобиването на антеро-постериорен поляритет от клетките е комплексен процес, ръководен от Rho-медираната клетъчна контрактилност, която подлежи на различна регулация в различните клетки. При фибробласти тя включва рецептор-медирана ендоцитоза, реорганизация на апарата на Голджи, микротубулите и твърдостта на субстрата, кавеолин-1 и др. Въпреки сложната организация на процеса все пак основната движеща сила, която направлява поляризацията, наред с формирането на FA, остава Rho-медираната клетъчна контрактилност. Както споменахме малко по-горе, RhoA се активира от Fn и Ln-111, което може да обясни и силната поляризация в нашите експерименти.

По-нататъшно охарактеризиране на общия адхезивен статус на биосензорните клетки за илюстриране на пълния потенциал на адхезивните

белтъци беше постигнато чрез анализ на индукцията на клетъчната поляризация във времето - след един, два и три часа на инкубация - измерена посредством индекса на кръглост (критерий *поляризация във времето*) (фиг. 15б и 16б). Промяната на клетъчната площ според продължителността на култивиране не беше значителна и беше приета за недостатъчно информативна. Финалната стъпка от оценката на структурните и сигналните свойства на анализираниите субстрати беше изследване на общата повърхност на FA ($Ln-521 > Fn > Ln-111 > CnI > Vn$) и FbA ($Ln-521 > CnI > Fn > Ln-111 > Vn$) за клетка след инкубация за цяла нощ (критерий *цялостна оценка на клетъчните адхезии*).

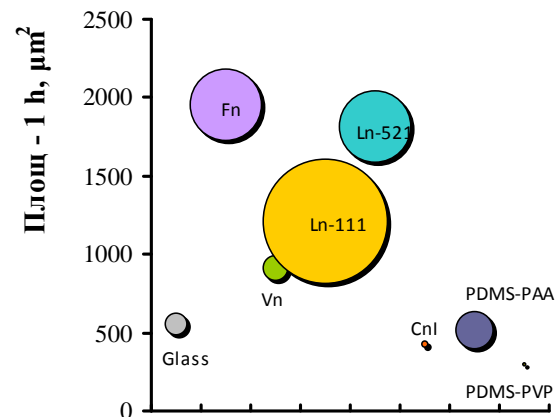
Въпреки че при почти всички опити фибронектинът и двата ламинина показаха най-добри адхезивни свойства, не открихме строга количествена връзка между шестте параметъра. Fn стимулираше най-силното разстилане (фиг. 15а, 16а), но беше по-малко ефективен от Ln-521 по отношение на формираните FA и FbA (фиг. 18), а върху Ln-111 поляризацията беше най-бърза. Най-изненадващи бяха резултатите за CnI, който най-слабо благоприятстваше разстилането, поляризацията и формирането на FA. Въпреки факта, че колагенът се произвежда от фибробласти и е основен компонент на нативния им извънклетъчен матрикс, някои проучвания показват ограничено разстилане при *in vitro* експерименти. Вероятно обяснение на този резултат може да е високата плътност на коатиране, която използвахме в експериментите. Gaudet *et al.* показаха, че над определен праг CnI се превръща в инхибиращ фактор за разстилане на фибробластите. За да се свържат с многобройните близко разположени колагенови лиганди, интегриновите рецептори се концентрират в по-малка площ от клетъчната мембрана, което от своя страна води до по-слабото ѝ разгръщане. И тъй като определихме концентрацията на коатиране на базата на клетъчното прикрепване, $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ може би надхвърля плътността на коатиране с CnI за оптимално разстилане.

Колагенът обаче беше втори след Ln-521 в организацията на фибриларните адхезии (фиг. 18). Възможно обяснение на този резултат може да бъде установеното свързване и коопериране на CnI и Fn в организацията на ECM. Определени конформации на CnI могат да стимулират секрецията на Fn от фибробласти. Тъй като нашите експерименти бяха проведени в отсъствие на серум, организацията на фибронектиновите фибрили и формирането на FbA изцяло зависеха от Fn, който секретираха биосензорните клетки при инкубация за цяла нощ. Така стимулираното от CnI увеличение на секрецията на Fn, може да допринесе за уголемяване на FbA.

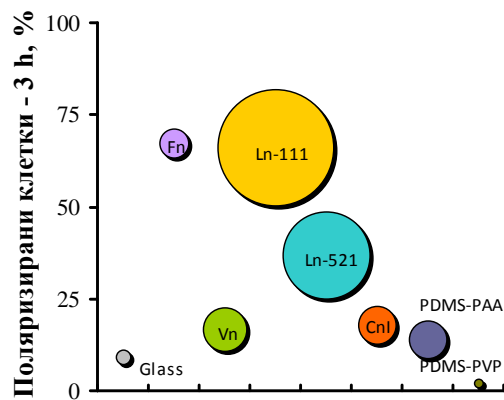
Трудно може еднозначно да се определи кой е субстратът с най-добри адхезивни свойства. Известно е, че при прикрепването върху различни белтъци от ECM участват различни интегринови рецептори и съответно се активират различни сигнализационни пътища. Това определя и нееднаквото поведение на клетките върху повърхности, покрити със специфични биохимични индукционни лиганди. Различия в морфологията на клетките и адхезивните контакти се наблюдават дори и върху отделните изоформи на ламинините. Така например върху ламинини в състава, на които присъства $\alpha 1$ верига, фибробластите развиват предимно филоподии, каквито наблюдавахме и ние (фиг. 14a). Формирането на различни мембранни структури се обуславя от вариации в организацията на актиновия цитоскелет, които също така оказват влияние и върху комплексите на фокалните адхезии. Например $\alpha 3$ ламинините инициират асемблирането на дълги ивици от точковидни фокални адхезии. Подобна морфология на контактите наблюдавахме и ние, само че при култивиране на клетките върху ламинин-521 ($\alpha 5\beta 2\gamma 1$) (фиг. 17b).

Липсата на количествена връзка в поведението на субстратите от ECM най-вероятно отразява факта, че всеки от изучаваните параметри представя различни аспекти от процесите на клетъчна адхезия и всички те трябва да бъдат взети под внимание при охарактеризирането на нови материали.

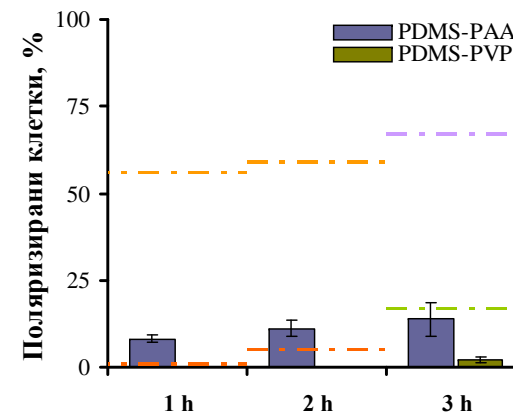
А. Разстилане



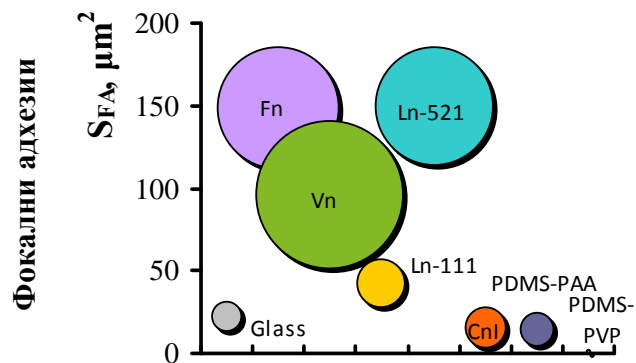
Б. Поляризация



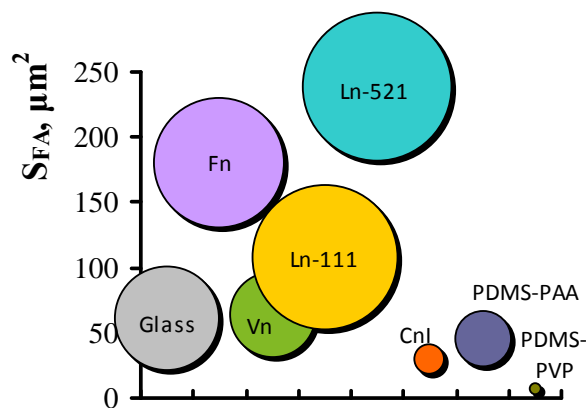
В. Поляризация във времето



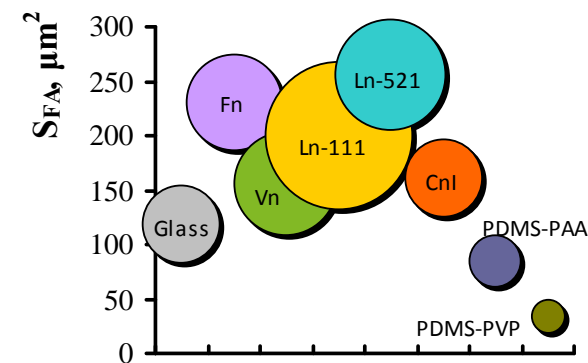
Г. Колокализация



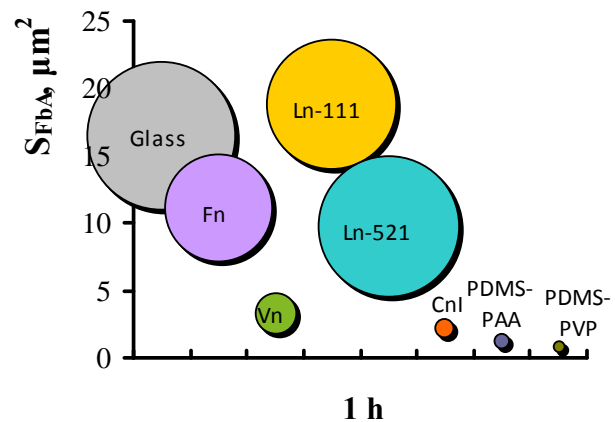
Д. Фибрилогенеза



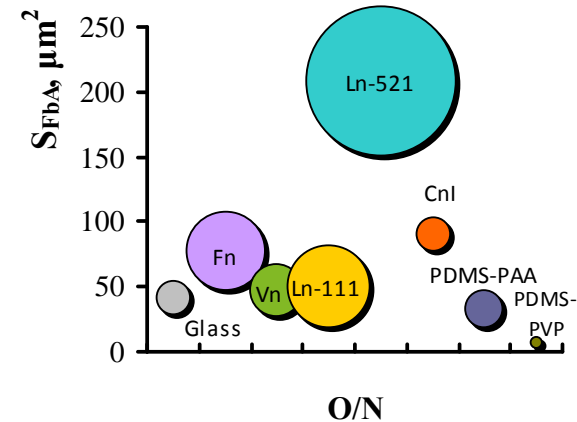
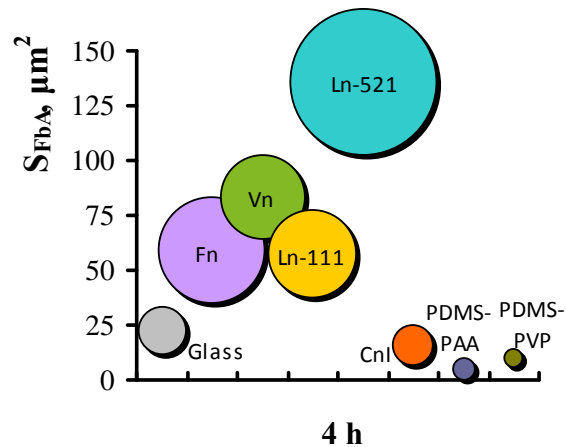
Е. Цялостна оценка на клетъчните адхезии



Фибриларни адхезии



Фибрилогенеза



Фиг. 24. Карта на адхезивния потенциал и оценка на повърхностна биосъвместимост на PDMS-базирани биоматериали на базата на шестте дефинирани критерия. На картата са посочени средните стойности на клетъчната повърхност след един час култивиране (А), броя поляризиращи клетки след три часа култивиране (Б), броя поляризиращи клетки във времето (В), фокалните и фибриллярните контакти след култивиране за един час (Г), за четири часа (Д) и за цяла нощ (Е). Радиусът на мехурчетата представя стандартното отклонение. В панел В с пунктирни линии са маркирани минималните и максималните референтни стойности, наблюдавани при стандартизиране на биосензора върху петте естествени за ECM белтъка Fn, Vn, Ln-111, Ln-521 и CnI. Отсечките представят стандартните отклонения.

Като цяло определянето на стойностите за разстилане, поляризация, площ на FA и FbA за изучените субстрати с контролирани адхезивни свойства ни позволи да определим стандартното поведение на биосензорните клетки. Получените стойности използвахме като референтни точки за определянето на повърхностната биосъвместимост на нови изкуствени материали. Резултатите от изпитването на биосензора върху стандартните субстрати от ECM синтезирахме в т.нар. *карта на адхезивния потенциал*. На нея са представени разстилането на клетките след един час култивиране (фиг. 24а), поляризацията след три часа култивиране (фиг. 24б), поляризацията, наблюдавана във времето през един час култивиране (фиг. 24в), формираните фокални и фибриллярни адхезивни контакти след култивиране за един час (фиг. 24г), за четири часа (фиг. 24д) и за цяла нощ (фиг. 24е). Като се има предвид, че mCherry-винкулинът се локализира само във FA, а GFP-тенсинът – във FA и FbA, площта на FbA изчислихме като разлика между общите площи на зеления и червения флуоресцентен сигнал за всяка клетка, усреднена за всички анализирани клетки.

Повърхностните свойства на изкуствените материали, базирани на PDMS кополимери бяха оценени в съпоставка с референтните данни от *картата на адхезивния потенциал* (фиг. 24). Както и се очакваше, въпреки че въвеждането на нови функционални групи може да преодолее недостатъците на немодифицирания полидиметилсилоксан, амфибилните блок кополимери PDMS-РАА и PDMS-PVP не можеха да се състезават с естествените ECM белтъци. Въпреки

това беше наблюдавано значително различие между двата кополимера и полиакриловата киселина се доказва като полимера, който предлага много благоприятстващи адхезията свойства в сравнение с поливинилпиролонидона. Според *картата на адхезивния потенциал* PDMS-PAA се приближаваше до естествените субстрати по отношение на поддържане на разстилането ($PDMS-PAA > CnI$) и поляризацията ($PDMS-PAA \approx Vn$ и CnI), но и двата PDMS-базирани субстрата не бяха така ефективни по отношение на поддържането на клетъчните адхезии. Съпоставката спрямо биосензора доказва, че най-голямата слабост на PDMS-PAA беше силата на клетъчната адхезия, вследствие на недостатъчно формиране на FA. Въпреки че PDMS-PAA индуцираше по-добро разстилане от колагена и близка до Vn и CnI поляризация, изчислените стойности на общата повърхност на FA и FbA бяха извън стандартните стойности, определени върху естествените субстрати. По този начин използването на стандартизиран биосензор ни позволи не само да демонстрираме адхезивните качества на два нови материала, но също така извършихме директна съпоставка спрямо естествените субстрати с помощта на *картата на адхезивния потенциал*. На базата на получените резултати можем да очакваме, че с правилните повърхностни модификации и нива на омрежване с биоактивни лиганди тези кополимери ще придобият много повече "приятелски" за адхезията качества.

Наред с оценката на адхезивните качества на субстратите също така демонстрирахме, че биосензорът VT1.9 може да се използва и за охарактеризиране на механичните им свойства. Напълно в съгласие с резултатите от предходни изследвания клетъчната поляризация върху твърди субстрати беше ускорена, докато върху меки повърхности удължаването на клетките беше много по-бавно. Процесите на фибрилогенеза, които се асоциират с намаляване на подвижността на клетките и ремоделиране на средата при дълготрайно населяване на пространството, също преобладаваха върху твърди субстрати.

ОБОБЩЕНИЕ

В последните години непрекъснато се разработват нови биомиметични скелети на основата на естествени извънклетъчни матрикси, както и изкуствени порьозни или фибрилари матрикси. Дали обаче клетките ще се прикрепят и развият върху тези материали може да бъде преценено единствено след прекия им контакт с живи клетки. Първата стъпка в този често доста продължителен процес, включва *in vitro* култивиране на клетки върху повърхността на изкуствения материал и оценка на тяхното поведение. С помощта на разнообразни клетъчно и молекулярно биологични методи се преценява способността на изкуствените материали да осигурят на клетките подходяща адхезивност, да обезпечат тяхната пролиферация и да способстват отлагането на собствен извънклетъчен матрикс - качества, които са задължителни за успешното вграждане на импланта в живия организъм. Разработени са няколко метода за оценка на биосъвместимост, базирани на количествено определяне на адхезиите. При тях обаче се използват различни клетъчни линии и различни протоколи и е трудно да се направи съпоставка на получените резултати. Докато повечето проучвания изучават адхезивните свойства на новите материали с тестове за цитосъвместимост, фокусирани само върху формирането на фокалните адхезии, ние включихме в анализа и фибриларните адхезии като допълнителен важен фактор. Като показател за способността на клетката да изгражда свой собствен ЕСМ добре развитите FbA могат да се считат за положителен знак за интеграцията на новите материали в тъканите на гостоприемника.

Прегледът на литературата показва, че към момента не съществуват биосензори за оценка на клетъчните адхезивни контакти като инструмент за анализ на повърхностните взаимодействия на клетките със средата. Представената дисертация е посветена на проучване на възможностите за създаване на такъв биосензор. Резултатите, описани в настоящия дисертационен

труд, демонстрираха приложимостта на представения подход за повърхностна оценка на нови биомиметични материали. Този подход включва биосензор на основата на живи клетки NIH/3T3 и набор от шест измерими параметъра (*разстилане, поляризация, поляризация във времето, колокализация, фибрилогенеза и цялостна оценка на клетъчните адхезии*).

Биосензорът VT1.9 експресира стабилно mCherry-винкулин и GFP-тенсин и позволява детекцията не на един единствен сигнал, а на комплексен анализ. А именно способността на дадена повърхност да поддържа развитието на клетъчните адхезии. Комплексността на анализа се определя от факта, че клетките отговарят различно на различни физико-химични свойства на адхезивната повърхност. Неведнъж е доказано, че омокряемостта, твърдостта, топографията, релефът на адхезивните повърхности повлияват клетъчното поведение. В допълнение също така е демонстрирано, че присъствието на различни химични функционални групи (CH_3 , OH , COOH и NH_2) и плътността на лигандите оказват силно влияние върху клетъчната адхезия. За да анализираме толкова много фактори едновременно, използвахме присъщата способност на закотвящо-зависимите клетки да обработват сигнали от околната среда и да реагират спрямо тях.

Доколкото ни е известно, това е първият флуоресцентен биосензор, при който отчитането се базира на топологията на сигналите, а не на промяната в интензитета или дължината на вълната на излъчената флуоресцентна светлина. Флуоресцентните биосензори обикновено се базират на промяна в дължината на вълната или преминаване между включено и изключено състояние на флуорофора. За разлика от тях биосензорът, който представяме се основава на постоянни сигнали, емитирани от двата флуоресцентно белязани белтъка, които се локализируют в различни клетъчни контакти – фокалните и фибриларните адхезии.

Биосензорът успешно премина през серия от изпитвания. Правилната локализация на хибридните белтъци в структурите на адхезивните контакти беше демонстрирана чрез флуоресцентни микроскопски анализи; експресията на белтъците и посттранслационната им модификация като индикатор за запазената им функционалност бяха потвърдени с имунохимични техники. Жизнеността и пролиферацията на биосензорните клетки беше потвърдена в съпоставка спрямо нетрансфектирани клетки, наред с клетъчната им морфология. Извършените изследванията недвусмислено показаха, че формирането на клетъчни адхезивни контакти не беше повлияно от екзогенните хибридни белтъци и че създадената биосензорна клетъчна линия може успешно да се използва като моделна система за анализ на клетъчни адхезии.

Средните стойности на шестте параметъра, които проследихме бяха определени за пет естествени клетъчни субстрата (фибронектин, витронектин, ламинин-111, ламинин-521 и колаген тип I) и са представени върху *картата на адхезивния потенциал*. Използването на стабилна клетъчна линия и дефинирани параметри гарантират възпроизводителността и съпоставимостта на резултатите, получени при различни експерименти и позволяват директно сравнение при изпитването на адхезивните свойства на нови материали.

В бъдеще представеният систематичен подход и *картата на адхезивния потенциал* могат да се развият с включването на нови типове естествени субстрати, а също и три-дименсионални субстрати. На базата на изградената стратегия могат да бъдат създавани допълнителни и по-специализирани биосензори на основата на живи клетки. Те може да са предназначени за изпитване на нови материали, създадени за конкретни цели, като например ендотелиални биосензори за изкуствени кръвоносни съдове, биосензори, базирани на костни клетки за тестване на материали за създаване на изкуствени костни тъкани и т.н. Подобни подходи могат да помогнат за ускоряването на скрининга на биосъвместимост на стотици нови материали, създавани всяка

година за нуждите за регенеративната медицина. Цитологичните техники са трудоемки и нелеки за интерпретация, но ако тестовете за адхезивните качества се приложат в началните етапи от разработката на нови биомиметични материали може да се спести ценно време и средства. Считаме, че потенциалните ползи от предсказването на адхезивните качества на материалите ще надделят над изразходваните ресурси и ще се превърнат в незаменим етап от оценката за биосъвместимост.

В допълнение към изследване на биосъвместимостта на биомиметични материали създаденият биосензор се очаква да намери други потенциални приложения например в *real-time* експерименти, *time-lapse* флуоресцентна микроскопия, микроскопски изпитвания на живи клетки, различни практически и фундаментални изследвания на адхезивните контакти и значението им за клетъчни процеси, като миграция, пролиферация, изучаване на механосензорните функции на клетъчната адхезома, ракова инвазия, ангиогенеза и метастазиране и т.н.

ИЗВОДИ

Въз основа на получените резултати можем да посочим следните изводи:

1. Едновременната експресия на хибридните флуоресцентно маркирани винкулин и тенсин на нива, които обезпечават правилното им функциониране и локализация в NIH-3T3 фибробласти, е подходящ подход за едновременното визуализиране и околичествяване на фокалните и фибриларните адхезивни контакти в една и съща клетка. Използването на този подход позволява създаването на клетъчен биосензор за оценка на повърхностна биосъвместимост;

2. Комбинацията от параметрите разстилане, поляризация, площ на фокалните и фибриларните адхезии предоставя информация за различни аспекти

от взаимодействието клетка-субстрат и е подходяща за обща оценка на субстратна биосъвместимост;

3. Снемането на параметрите на поведение на биосензора върху естествени белтъци от извънклетъчния матрикс позволява разработване на стандарт (*карта на адхезивния потенциал*), който е приложим за систематична оценка на адхезивните свойства на нови материали;

4. PDMS базираният кополимер поли(диметилсилоксан-*b*-акрилова киселина) има значително по-добра повърхностна биосъвместимост от PDMS базирания поли(диметилсилоксан-*b*-винилпирилодон);

5. Разработеният биосензор демонстрира чувствителност и към еластичността на субстрата, което позволява приложението му и при оценка на материали с вариращи механични свойства.

ПРИНОСИ

1. Разработен е нов тип флуоресцентен биосензор, при който отчитането се базира на топологията на сигналите, а не на промяната в интензитета или дължината на вълната на излъчената флуоресцентна светлина. За разлика от класическите новият биосензор се основава на постоянни сигнали, емитирани от два флуоресцентно белязани белтъка, които се локализируют в различни клетъчни контакти - фокалните и фибриларните адхезии;

2. За пръв път е разработен систематичен подход за обща оценка на повърхностната биосъвместимост на биоматериали. Той е основан на комбинираното използване на жив клетъчен биосензор, набор от измерими параметри на клетъчната адхезия и *карта на адхезивния потенциал*, състояща се от средните стойности на тези параметри, измерени за пет естествени клетъчни субстрата.

ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

- **Ivanova S.I.**, Chakarov S., Momchilova A. and Pankov R. Live-cell biosensor for assessment of adhesion qualities of biomaterials. *Materials Science and Engineering: C*. 2017, 78: 230-238. **IF (2016) 4.164.**
- **Ivanova S.I.**, Chakarov S.A. and Pankov R.G. Formation of fibrillar adhesions correlate with spreading but does not depend on cell polarization. *Comptes Rendus de L'Académie Bulgare des Sciences*: in press. **IF (2016) 0.251.**

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ

- **Ivanova S.**, Chakarov S. and Pankov R. Quantitative Evaluation of Adhesion Qualities of Biomimetic Materials. *Първа национална конференция по Биотехнология „30 години Биотехнология в България“*, ISBN 978-954-07-3774-4, 17-18 октомври 2014, стр. 83;
- **Ivanova S.**, Chakarov S. and Pankov R. A Biosensor for Assessing Compatibility of New Materials in Regenerative and Reparative Medicine. *Младежка научна конференция „Климентови дни“*, ISSN: 1314-4960, 22-23 ноември 2012, стр. 51.

ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТИРАНИЯ

Ivanova S.I., Chakarov S., Momchilova A. and Pankov R. *Materials Science and Engineering: C*. 2017, 78: 230-238.

Цитирана от:

- **Catauro M., Tranquillo E., Illiano M., Sapio L., Spina A. and Naviglio S.** The Influence of the Polymer Amount on the Biological Properties of PCL/ZrO₂ Hybrid Materials Synthesized via Sol-Gel Technique. *Materials*. 2017, 10(10): 1186.