

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ - ИНСТИТУТ ПО  
БИОФИЗИКА И БИОМЕДИЦИНСКО ИНЖЕНЕРСТВО**

---

Анелия Стефанова Костадинова

**Модулиране взаимодействие на клетки с полимерни  
повърхности и мембрани**

**Автореферат**

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна  
степен  
„Доктор”

Професионално направление: Биологични науки, шифър 4.3 (стар  
шифър 01.06.08 – Биофизика)

**Научен ръководител:** проф. д-р Георги Алтънков, д.б.н.

**Научен консултант:** проф. Яна Цонева, д.б.н.

София, 2011

Дисертационният труд съдържа 118 страници, 32 фигури и 6 таблици. Цитирани са 169 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден на разширен семинар на секция «Електроиндуцирани и адхезивни свойства» при Института по биофизика и биомедицинско инженерство – БАН на 25. 07. 2011 г. и е насочен за защита пред специализирано научно жури.

Защитат на дисертационния труд ще се състои на .....2011 г. от..... часа в залата на Института по физиология на растенията и генетика - БАН, София 1113, ул. «Акад. Г. Бончев», бл. 21, ет. 2.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в канцеларията на ИБФБМИ, БАН, ул. Акад. Г. Бончев”, бл. 105, София.

Оформянето на материалите по дисертацията и афторефератите са с финансовата подкрепа на договор ДО 02/178 на МОМН.

## Списък на използваните съкращения

---

АА – акрилна киселина

АН - акрилнитрил

АСМ – атомно силова микроскопия

АМПС - 2-акриламидо-2-метил пропан сулфонова киселина

АН /АМПС - смес от акрилнитрил и 2-ариламидо-2-метил пропан сулфонова киселина

ДМФ - диметилформаид

иРНК - информационна рибонуклеинова киселина

ПАН - полиакрилнитрил

ПДМС – полидиметилсилоксан

ПЕГ – полиетиленгликол

ПЕИ - полиетеримин ПЕИ/ПЕГ-полиетеримид/полиетиленгликол

ПП – полипептидни вериги

ПХМС – полихидроксиметилсилоксан

ФН – фибронектин

ФДА - Флуоресцеин-диацетат

## УВОД

Използването на един полимер като биоматериал, т.е. като материал, контактуващ с тъкани, кръв, белтъци и други биологични течности, вътре или вън от човешкото тяло, изисква решаването на сериозни проблеми, свързани с биосъвместимостта. В миналото, изборът на материал за дадено медицинско изделие се е базирал на общите му физични свойства като здравина, еластичност, химическа инертност и др. Постепенно се налага схващането, че междуфазовите проблеми при контакт с живи субстанции могат да се сведат до минимум чрез подходящо инженерство на повърхността на биоматериала. Ето защо много изследвания през последните десетилетия бяха насочени към изучаване на химията на полимерните повърхности и възможностите за контролираното им изменение с оглед на контакта с живите системи.

Изучаването на взаимодействието клетка - повърхност е важно за създаването, както на биоинертни, така и на хибридни материали, жизнено необходими за медицината. Въпреки положените досега големи усилия, механизмът на това въздействие все още не е изяснен напълно. Всъщност клетките не могат да взаимодействат с биоматериалите. Те не ги разпознават, тъй като нямат рецептори за тях (Алтънков, 2006). Клетките, обаче разпознават веднага адсорбираните белтъци на ЕЦМ и се свързват специфично с тях (Grinnell and Feld, 1986). Това е клетъчната адхезия-феномен, наподобяващ взаимодействието на клетките с ЕЦМ, който лежи в основата на биологичната съвместимост на материалите. Функционализирането на повърхностите е подход, използван системно за модулиране взаимодействието им с живите клетки. Това е основния подход и при нашите изследвания, даващ възможност да се надникне дълбоко в механизмите и да се разбере ролята на повърхностните свойства на биоматериалите за тяхното успешно взаимодействие с клетки.

Бурно развиващата се напоследък биоинженерна наука обуславя нарастващ интерес към биоматериалите. Тя се основава на два подхода; първия: посяване на клетки *in vitro* в биореактор и втория: посяване на клетките върху подложка наречена скафолд (Алтънков, 2004), имплантираща се на подходящо място в човешкия организъм. Често подложката е от полимерен биоматериал, който трябва да стимулира закрепването и диференцирането на клетки, както и образуването на екстрацелуларен матрикс, специфичен за регенериращата се тъкан.

От гледна точка на взаимодействията с клетки, биоматериалите понастоящем се разделят на три типа (Bachasova et al., 2004): 1) биоинертни, които не позволяват адсорбцията на протеини и адхезията на клетки, включително на тромбоцити и клетки на имунната система; 2) биоматериали, позволяващи адсорбция на белтъците на екстрацелуларния матрикс, разпознавани от адхезивните рецептори на клетката и 3) биоспецифични или биомиметични материали, състоящи се от биоинертна среда, обогатена изкуствено с лиганди за клетъчните адхезивни рецептори – това обикновено са къси аминокиселинни последователности като Arg-Gly-Asp или въглехидрати, често допълнени с хормони, ензими или растежни фактори. Тези биоактивни молекули могат да контролират адхезията, растежа и диференцирането на клетките.

Биосъвместимостта, както и редица други специфични за биоматериалите свойства, като адхезия, омекряне, износоустойчивост, биоразградимост и дори външния вид, могат да се оптимизират чрез модификация на полимерната повърхност и това е предмет на активни изследвания през последните години.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се проучат някои нови възможности за подобряване на взаимодействието на живите клетки с полимерни повърхности чрез вграждането на елементи от екстрацелуларния матрикс.

**За постигане на тази цел са поставени следните задачи:**

1. Изследване взаимодействието на човешки фибробласти с ПЕГ полимерни повърхности
2. Изследване взаимодействието на човешки фибробласти с модифицирани ПДМС повърхности (присаждане на акрилова киселина и активиране с аргонска плазма).
3. Биофункционализиране на ПДМС чрез имобилизиране на колаген, моделиращо взаимодействието на клетките с компоненти на екстрацелуларния матрикс
4. Изследване взаимодействието на хепатоцити с различни синтетични мембрани, моделиращи тяхното прикрепване върху базалните мембрани
  - Влияние на повърхностните свойства на мембраните върху клетъчното взаимодействие (хидрофилност, пропускливост, грапавост)
  - Влияние на химически модификации на мембраните върху клетъчното взаимодействие.
  - Модулиране състава на мембраните за оптимизиране на взаимодействието с хепатоцити - стъпка напред в изграждането на биохибриден черен дроб

## **МЕТОДИ**

За реализирането на поставените задачи бяха използвани следните съвременни химични, биофизични, биохимични и цитологични методи и подходи:

### **Синтез на полимерни повърхности**

- Приготвяне на ПЕГ покрития
- Приготвяне на ПДМС и обработка с аргон
- Химично свързване на ПДМС (полидиметилсулфон) с колаген IV
- Приготвяне на 2-акрилоамидо-2-метил пропан сулфонова киселина (АМПС)

### **Физикохимичен анализ и модификация на получените повърхности**

- Изследване на повърхностния химичен състав чрез рентгенова фотоелектронна спектроскопия (XPS)
- Атомно силова микроскопия (АСМ)
- Измервания на контактни ъгли
- Модификация на повърхности с адхезивни протеини
- Получаване на фибронектин
- Покриване на материалите с фибронектин (coating)

### **Клетъчни култури**

- Клетъчно култивиране на С3А клетки и човешки кожни фибробласти

### **Изследване взаимодействието на клетки с биоматриали**

- Витално оцветяване с флуоресцеиндиацетат (ФДА)
- Измерване на протеиновата адсорбция
- Имунофлуоресценция

### **Функционални изследвания**

- Фибронектинов синтез
- Цитохром Р-450 активност
- Измерване клетъчната пролиферция с ЛДХ тест
- Измерване клетъчната пролиферция с МТТ тест

## РЕЗУЛТАТИ

### **Взаимодействие на човешки фибробласти с ПЕГ модифицирани повърхности**

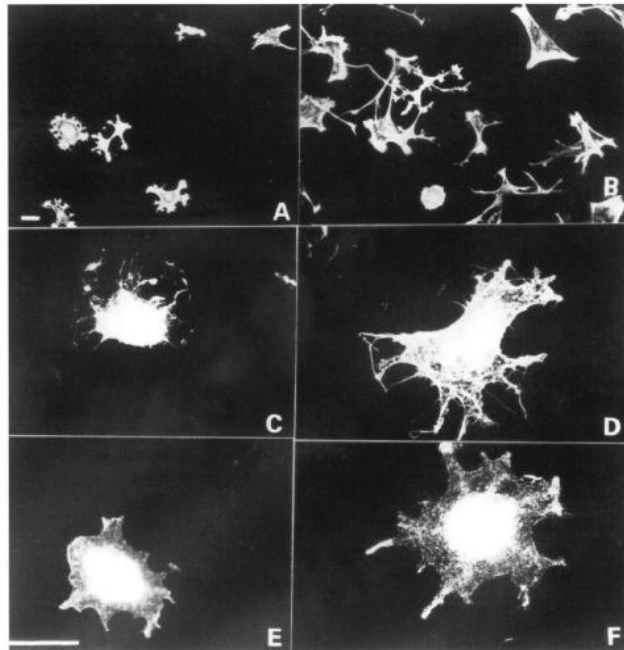
Съществуват различни подходи за подобряване биосъвместимостта на материалите, например чрез промяна на тяхната хидрофилност/хидрофобност, модулиране на техния повърхностен заряд – отрицателно, положително заредени или незаредени полимерни повърхности, промени в топографията и много други (Golander, 1986). В частност, разработването на силно хидрофилните ПЕГ - покрития предизвиква голям интерес, поради техните уникални свойства, водещи до широк спектър от биомедицински приложения (Harris, 1992). Най-общо, такива повърхности показват ниска адсорбция на протеини и задържат голямо количество вода, което е предпоставка за добра биосъвместимост (Golander, 1986), но и за слабо клетъчно взаимодействие.

От няколко години съвместно с лабораторията на Проф. Владкова (ХТМУ – София) ние, както и други автори (Harris, 1992; Malmsten and Van Aktin, 1996) работим по създаването на такива повърхности, използвайки различни техники за отлагане на ПЕГ веригите. Усилията на нашите колеборатори бяха насочени върху създаването на ПЕГ слоеве с оптимална верижна организация, плътност на слоя, гъстота и инфраструктура. Заслугата на нашата лаборатория, както и на автора на този дисертационен труд, се състои в изследването на взаимодействието на тези ПЕГ покрития с живи клетки. Ще отбележа, че тези покрития всъщност бяха предназначени за минимална протеинова адсорбция и съществено клетъчно прикрепване не се очакваше. Полученият резултат, обаче до някъде изненадващ, стана повод за планирането на по-сериозно проучване в тази насока, детайли от което ще изложим в този раздел.

Общоприето е, че клетките се прикрепват по-лошо върху хидрофобни повърхности (Malmsten and Aktin, 1996; Kish et al., 1987; Grinnell et al., 1972; Grinnell et al., 1973). Причината за това все още не е напълно ясна, но се допуска, че е свързана със специфичната конфигурация на адсорбираните протеини (Kish et al., 1987; Grinnell et al., 1972). Тъй като фибронектинът (ФН) е един от основните адхезивни фактори на серума, подпомагащ клетъчната адхезия и спрединг (или разстилане) (Altankov et al., 1996; Altankov and Groth, 1994), логично бе това да се свърже с неговата различна адсорбция към хидрофилните и хидрофобни повърхности (Altankov et al., 1996; Klebe, 1974). Предходни изследвания на нашата група в тази насока потвърдиха това схващане и показаха, че човешките фибробласти са една удобна моделна система, позволяваща бърза оценка на клетъчния отговор към пре-адсорбиран ФН (Altankov et al., 1996). На практика, ние продължихме тези изследвания, включвайки и ПЕГ повърхности, представляващи интерес с тяхната извънредно ниска протеинова адсорбция. За да научим повече за началните етапи на взаимодействието клетка-материал, ние изследвахме общата клетъчна морфология и разстилането на фибробласти, прикрепени към тези повърхности, в условията на краткосрочни култури, както и организацията на ФН-рецептор (бета-1 интегрин) и актиновия цитоскелет. Една от основните цели на това изследване беше да проучим по-детайлно клетъчното взаимодействие с ПЕГ повърхности с различна дължина и структура (линейна или разклоняваща се) на оксиетиленовата верига. Използвахме три вида ПЕГ - ПЕГ 1500 и ПЕГ 6000, които бяха линейни, но с различни дължини на веригите и ПЕГ 12500, който е с разклонена верига.

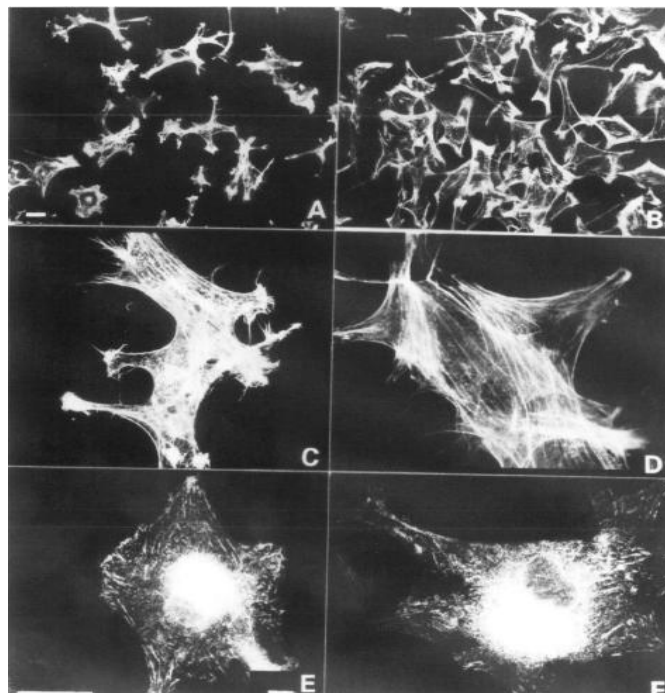
### Сравнителна оценка на общата клетъчна морфология

ПЕГ с различна дължина на веригата беше нанесен върху силициева подложка, която инкубирахме с човешки фибробласти за 2 часа. Половината от пробите бяха преадсорбирани с ФН, като получените резултати са представени на Фиг.1-3.



**Фиг.1.** Морфология на човешки фибробласти, адхезирани към чист ПЕИ/ ПЕГ 1500 (A, C, E) и към такъв, след преадсорбиране на фибронектин (B, D, F). Оцветяване за актин (A-D) и бета-1 интегрин (E, F). Бар=10 $\mu$ м

За да предотвратим ефекта на други прикрепващи фактори, проведохме изследванията при отсъствие на серум в средата.

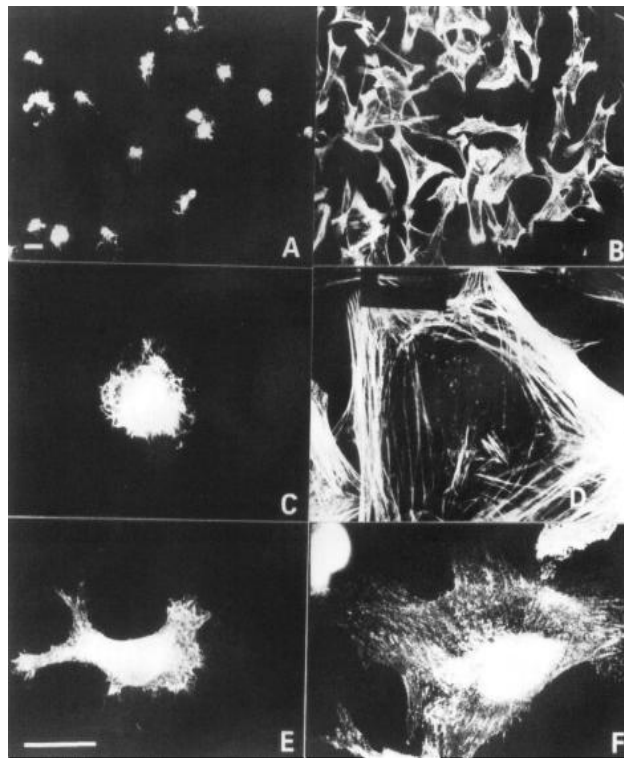


**Фиг.2.** Морфология на човешки фибробласти, адхезирани към ПЕИ/ ПЕГ 6000 в отсъствие (A, C, E) и в присъствие на адсорбиран фибронектин (B, D, F). Бар=10 $\mu$ м



В тези изследвания общата клетъчна морфология беше визуализирана чрез имунофлуоресценция за актин (FITC - фалоидин).

От фигури 1, 2 и 3 се вижда, че клетките се разстилат по-лошо върху чистите повърхности, особено на ПЕГ 1500 (Фиг.1А) и ПЕГ 12500 (Фиг.3А), като изненадващо добро прикрепване се наблюдава при ПЕГ 6000 (Фиг.2А). Присъствието на ФН закономерно подобрява прикрепването (Фиг.1-3 А, С, Е), но ефекта му беше най-силно изразен при ПЕГ 12500 (Фиг.3) и почти липсващ при ПЕГ 1500 (Фиг.1). Най-добре тези разлики се виждат на малкото увеличение (А, В). При ПЕГ 6000 и ПЕГ 12500 фибробластите показаха не само по-добра адхезия, но и развитието на типичната за тях асиметрично-разстлана морфология, с добре развити актинови стрес-фибри (В, С) и фокални адхезионни контакти, богати на бета-1 интегрин (D, E), но тези структури са слабо развити при ПЕГ 1500.



**Фиг.3.** Морфология на човешки фибробласти адхезирани към ПЕИ/ ПЕГ 12500 в отсъствие (А, С, Е) и присъствие на фибронектин (В, D, F). Бар=10μм

Покриването на пробите с ФН индуцира развитието на нормална фибробластна морфология. Ефектът на ФН е най-добре изразен при ПЕГ 12500 (фиг.3), и много по-малко при ПЕГ 1500 повърхности (фиг.1). За ПЕГ 6000, може да се каже, че ФН подобрява клетъчната морфология (фиг.2), но в относително по-малка степен, поради високата изходна адхезивност.

Различната клетъчна адхезия към тези повърхности беше потвърдена количествено от МТТ анализа, който измерва способността на живите клетки да конвертират багрилото във фармазан. Както е показано в Таблица 1, при чистите повърхности най-висок сигнал беше получен за ПЕГ 6000 и ПЕГ 12500, но статистически не различаващи се един от друг, но и двете, статистически значимо по-високи от ПЕГ 1500 ( $p < 0.05$ ). Покритите с фибронектин ПЕГ 12500 и ПЕГ 6000 повърхности също показват по-високи стойности на клетъчен растеж, в сравнение с ПЕГ 1500 ( $p < 0.05$ ). От друга страна обаче, не беше намерена разлика в клетъчния растеж между ФН-покритите и чистите (непокрити с ФН) повърхности, въпреки ясните морфологични признаци. Това

показва, че колориметричните методи, въпреки че са количествени, често са недостатъчни, затова е необходимо да се комбинират с паралелно изследване на морфологията на клетките, която е по-важния критерий за оценка взаимодействието на клетки с биоматериалите (Altankov et al., 1996).

**Таблица 1.** Клетъчна адхезия върху различни PEG повърхности, измерени чрез МТТ

Повърхност	Клетъчна адхезия ( E <sub>540nm</sub> )	
	Непокрити повърхности	Фибронектин-покрити повърхности
ПЕИ/ПЕГ 1500	0.722±0.11	0.7920±.21
ПЕИ/ПЕГ 6000	0.9740±.09*	0.897±0.18
ПЕИ/ПЕГ 12500	1.0320±.10*	0.9940±.24

*p*\* < 0.05

В резюме, нашите резултати показаха следното: ПЕГ 6000 покрита повърхност е най-предпочитаната по отношение на спонтанното клетъчно взаимодействие (без адсорбцията на адхезивен белтък), като цялостната клетъчна морфология е почти нормална и без преадсорбция на ФН, но все пак ФН допълнително подобрява клетъчната морфология и разстилане; ПЕГ 12500 повърхност показва относително слабо спонтанно взаимодействие с клетки, но адсорбцията на ФН напълно възстановява нормалната клетъчна морфология, включително организацията на актиновия цитоскелет и образуването на фокални адхезионни кълъстери на ФН рецептор ( $\beta_1$  интегрин); и ПЕГ 1500 следва да бъде разглеждана като най-лошото покритие, тъй като показва най-ниска начална клетъчна адхезия, като преадсорбцията с ФН не възстановява нормалната фибробластна морфология.

### Протеинова адсорбция

Резултатите, отнасящи се до адсорбцията на някои биологично активни протеини към различните PEG повърхности, измерени чрез елипсометрия, са показани в Таблица 2. Данните в таблицата ясно показват много ниска адсорбция ( $\tilde{A}$ ) към всички PEG повърхности на човешки серумен албумин, имуноглобулини (IgG), фибриноген, C3, както и C1q компонентите на комплемента.

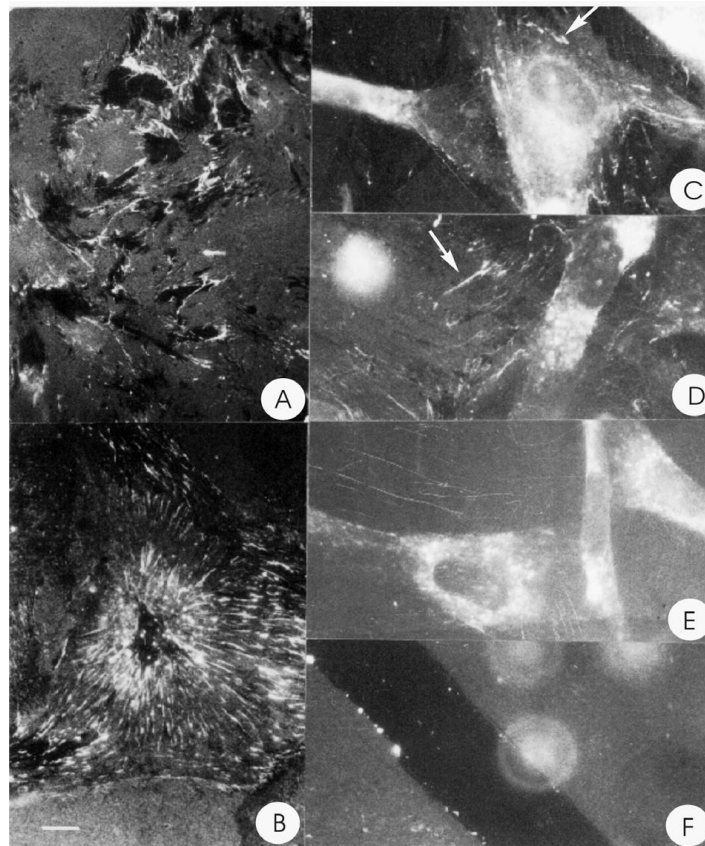
**Таблица 2.** Протеинова адсорбция върху различните PEG покрития (mg/m<sup>2</sup>) измерена чрез елипсометрия

Повърхност	$\tilde{A}$ албумин	$\tilde{A}$ IgG	$\tilde{A}$ фибриноген	$\tilde{A}$ фибронектин	$\tilde{A}$ C3	$\tilde{A}$ C1q
Стъкло	0.35	1.10	2.90	1.90	3.10	1.90
ПЕИ/ПЕГ 1500	-	<0.05	<0.05	-	-	-
ПЕИ/ПЕГ 6000	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
ПЕИ/ПЕГ 12 500	-	<0.05	<0.05	<0.05	-	-

Въз основа на очевидния репелентен ефект на PEG покритията по отношение на протеини, ние допуснахме, че нашия ефект се дължи само на следи от преадсорбиран

ФН, но все пак беше необходимо да се докаже съществуването му върху субстрата. За да покажем това, решихме да използваме флуоресцентно белязан протеин, като за целта инкубирахме пробите с 40  $\mu\text{g/ml}$  FITC-ФН, който съгласно наши предишни изследвания (Altankov et al., 1996) е достатъчен да се види адсорбирания ФН под флуоресцентен микроскоп. Използвайки този чувствителен метод, ние установихме, че нашите повърхности показват относително слаба (в сравнение с чисто стъкло), но видима зелена флуоресценция, когато микроскопа е фокусиран на повърхността. Флуоресценцията беше най-силна при ПЕГ 12500, следвана от ПЕГ 6000 и най-слаба при ПЕГ 1500 повърхността. Тези данни не са документирани количествено, но тези разлики може да се видят на следващата Фиг.4 С, D и E съответно, отразяващи по-нататъшните ни изследвания върху реорганизацията на ФН.

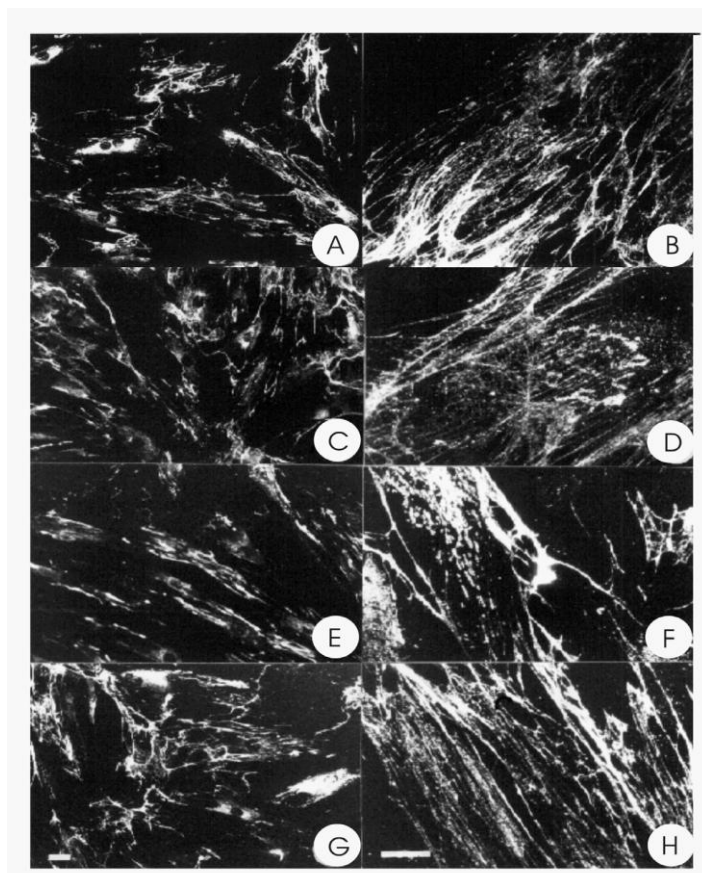
Тези допълнителни изследвания целяха по-пълната оценка на ПЕИ/ПЕГ повърхностите по отношение на тяхната способност да подпомагат формирането на „ранен“ и „късен“ ФН матрикс от фибробласти. Предварителни изследвания на нашата група, проведени съвместно с Хумболдтовия Университет в Берлин (Д-р Томас Грот), показаха, че тази способност на ПЕГ покрития да подпомагат формирането на матрикс има отношение към биологичната съвместимост на материалите (Altankov et al., 1996).



**Фиг.4.** Реорганизация на адсорбиран флуоресцентен фибронектин от фибробласти, култивирани върху различни ПЕГ повърхност: (A, B) позитивна контрола - хидрофилно стъкло; (C) ПЕГ 1500, (D) ПЕГ 6000, (E) ПЕГ 12500, (F) механична драскотина, доказваща фибронектиновото покритие върху ПЕГ 12500. Увеличение 63x

За изследването на „ранния“ ФН матрикс култивирахме клетките върху горните повърхности, предварително покрити с FITC-ФН. Като позитивна контрола използвахме хидрофилно стъкло. Резултатите от флуоресцентно-микроскопските

изследвания са представени на Фиг.4. Частична фибронектинова реорганизация се наблюдава върху всички ПЕГ повърхности Фиг.4 (С, D, E), но тя е най- добре изразена върху ПЕИ/ПЕГ 6000 (Da), където зоните от реорганизиран FITC-ФН са показани със стрелка. Тъмните зони показват местата, от които клетката е “взела” ФН за да го реорганизира във фибриларна, матрикс-подобна структура (стрелка). От представените морфологични данни се вижда, че фибробластите реорганизируют фибронектина най-ефективно върху стъкло (Фиг.18 А, В), което не е изненадващо, тъй като от предишни изследвания на групата, беше известно, че колкото по-слабо е свързан ФН със субстрата, толкова по-добре той се реорганизира от клетките (Altankov and Groth, 1996). Обратно, почти пълна липса на реорганизация се наблюдава върху ПЕГ 12500 (Фиг.4 E), въпреки наличието на достатъчно преадсорбиран ФН, доказващо се от механичното надраскване върху повърхността (виж черната ивица, нанесена с пинсета на (F)).



**Фиг.5.** „Късен” фибронектинов матрикс, формиран от фибробласти върху позитивната контрола –стъкло (A, B), и различните ПЕГ покрития (C, D) ПЕГ 1500; (E, F) ПЕГ6000; (G,H) ПЕГ12500. (A, C, E, G - увеличение 20x); (B, D, F, H - увеличение 100x).

Способността на фибробластите да формират „късен” ФН матрикс „*in vivo*” е един друг подход, позволяващ оценка на биосъвместимостта на повърхностите (Altankov and Groth, 1996). Той се състои във визуализирането на ендогенния ФН, секретирани от клетките и депозиран върху субстрата след 3-4 дневно култивиране. Резултатите от изследването на горните ПЕГ покрития са показани на Фиг.19. Най-общо, не бяха намерени съществени различия в организацията на ФН-ия матрикс между различните ПЕГ повърхности (Фиг.5 С-Н), както и спрямо контролата – стъкло. Но все пак, ФН-ия матрикс върху ПЕГ 12500 (Фиг.5 G, H) изглеждаше по-фин и богато депозиран, дори в сравнение с контролата (Фиг.5 А, В), което може да се обясни с по-голямата дължина на ПЕГ веригите. Доброто формиране на „късен” ФН матрикс върху всички ПЕГ

покрития е един интересен феномен, очевидно свързан със спецификата на това покритие. Ще отбележим, че повечето от досега изследваните химични модификации затрудняват организацията на ФН матрикс. Очевидно, създадената нова химична композиция, представляваща една положително заредена полимерна повърхност способна да задържа голямо количество вода, оказва благоприятно влияние върху формирането на екстрацелуларен матрикс. Това от своя страна показва, че ПЕГ покритията са с подчертана биосъвместимост.

### **Изследване взаимодействието на човешки фибробласти с модифицирани ПДМС повърхности (присаждане на акрилова киселина и активиране с аргонска плазма)**

Омреженият ПДМС, известен повече като силиконов каучук, е един от най-широко използваните полимери като биоматериал за сензори, микрочипове, подложки за култивиране на клетки, импланти и др., както поради сравнително добрата му биоинертност, мекота, стабилност и прозрачност, така и поради това, че механичните му свойства лесно могат да се модулират в съответствие с изискванията на физиологичната среда (Grinnell, 1987). За съжаление, клетките не взаимодействат добре със силоксановия каучук, защото той е силно хидрофобен (Lotters et al., 1997). Това поражда необходимост от модификация на повърхността му, с цел подобряване на клетъчното взаимодействие. Отсъствието на активни функционални групи, както и силно хидрофобният характер на този полимер, допълнително затрудняват химичната модификация на повърхността му и налагат предварителното ѝ активиране.

Имобилизирането на биоактивни молекули като пептиди, протеини и други върху полимерната повърхност е друг начин за подобряване взаимодействието на клетките с биоматериали, което е от огромно значение при клетъчното култивиране и тъканното инженерство. Имобилизацията на биомолекули върху полимерни повърхности може да бъде постигнато с различни техники, основани на физическа адсорбция или ковалентно свързване. Прякото ковалентно свързване на биомолекули с повърхността на химически инертни полимери като полидиметилсилоксан (ПДМС) е трудно. Затова в рамките на съвместна разработка с нашата лаборатория, групата по биоматериали на Проф. Владкова се зае с разработването на една многостъпкова процедура за повърхностна биофункционализация на ПДМС, чрез обработка в  $Ag^+$  плазма, следвано от присаждане на акрилова киселина (АК) и гъвкав спейсър (гъвкава връзка) от  $diNH_2$ -PEG, играещ ролята на потенциална връзка между ПДМС и някаква биомолекула. Както ще видим по-долу, тази система беше приложена успешно за имобилизация на колаген тип I. Нашата роля в този проект се състоеше в биологичното характеризиране на отделните стъпки от този процес на химическа модификация на ПДМС.

Химичното присаждане на ПЕГ вериги към различни повърхности най-често се основава на карбоксил - аминокиселина, аминокиселина - алдехидно или аминокиселина - епоксидно присъединяване към предварително активирана (обикновено чрез химично окисляване или окислително обработване в плазма) полимерна повърхност. Молекулната маса на ПЕГ влияе пряко върху активността на имобилизирания протеин (Engvall and Rouslahtty, 1977).

### **Промяна в хидрофилно/хидрофобния баланс на ПДМС в хода на функционализацията с $Ag$ плазма, акрилова киселина и ПЕГ**

Ъгълът на омокряне с вода на силно хидрофобния ПДМС ( $\theta_{H_2O} = 101.9^\circ$ ) се понижава значително на всеки етап от модификацията му и повърхността става повече или по-малко омокряема в зависимост от природата на съответното обработване или покритие (Таблица 3, ред 1 в сравнение с всички други). Повърхностното напрежение и

полярността на немодифицирания ПДМС нарастват главно поради нарастване на полярната компонента на повърхностното напрежение, което зависи от същите фактори.

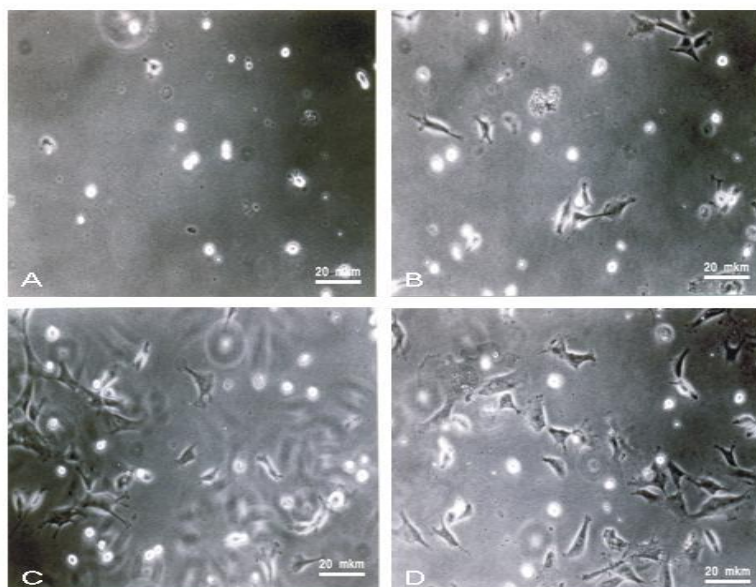
**Таблица 3.** Промени в ъгъла на омокряне ( $\theta$ ) в хода на модификацията на ПДМС

Проба	$\theta_{H_2O}, ^\circ$	$\theta_{CH_2I_2}, ^\circ$
ПДМС, немодифициран	101.9°	70.2°
ПДМС, обработен в $Ag^+$ плазма (1200W/1мин)	60.8°	49.5°
ПДМС, обработен в $Ag^+$ плазма (1200W/1мин) и присаден с АК (1 ч.)	73°	55°
ПДМС, обработен в $Ag^+$ плазма (1200W/1мин), присаден с АК (1 ч.) и свързан с ди-NH2-ПЕГ 2000	20.1°	43.2°
ПДМС, обработен в $Ag^+$ плазма (1200W/1мин), присаден с АК (1 ч.) и свързан с ди-NH2-ПЕГ 6000	15.9°	54.8°
ПДМС, обработен в $Ag^+$ плазма (1200W/1мин), присаден с АК (1 ч.) и свързан с ди-NH2-ПЕГ 20000	10.6°	64.5°
ПДМС, обработен в $Ag^+$ плазма (1200W/1мин), присаден с АК (12 ч.) свързан с ди-NH2-ПЕГ 2000 и имобилизиран с колаген	40.0°	51.0°
ПДМС, обработен в $Ag^+$ плазма (1200W/1мин), присаден с АК (12 ч.), свързан с ди-NH2-ПЕГ 6000 и имобилизиран с колаген	46.7°	78.1°
ПДМС, обработен в $Ag^+$ плазма (1200W/1мин), присаден с АК (12 ч.), свързан с ди-NH2-ПЕГ 20000 и имобилизиран с колаген	47.5°	66.6°

От таблицата се вижда, че силно хидрофобния ПДМС рязко повишава ъгъла си на омокряне при обработка с  $Ag^+$  плазма, т.е. повърхността се хидрофилизира. От изходната стойност  $101.9^\circ$   $\theta$  достига  $60,8^\circ$ , която е в оптимума за клетъчно взаимодействие. Последващата обработка с АК показва известно хидрофобно отместване ( $73.6^\circ$ ). Най-силно изразен ефект на хидрофилизация се наблюдава при присаждането на ПЕГ, където той достига стойности на  $\theta_{H_2O}$   $10.6^\circ$  и това зависи и от дължината на ПЕГ веригата като варира от  $20.1^\circ$  за ПЕГ 2000 до  $10.9^\circ$  за ПЕГ 20000.

### Клетъчно взаимодействие с модифицирания ПДМС

Фиг. 6 отразява ефекта от третирането на ПДМС с  $Ag^+$  плазма при различна мощност на разряда. Вижда се, че стойности над 1200 W, но не 100 W, са достатъчни за да подобрят съществено клетъчното взаимодействие.



**Фиг.6.** Обща морфология на човешки фибробласти, адхезирали на повърхността на ПДМС, обработен в  $Ar^+$  плазма, в зависимост от мощността на разряда: (A) немодифициран ПДМС и модифициран чрез обработване в  $Ar^+$  плазма при мощност на разряда (B) 100 W, (C) 1200 W и (D) 2500 W. Бар=20µm

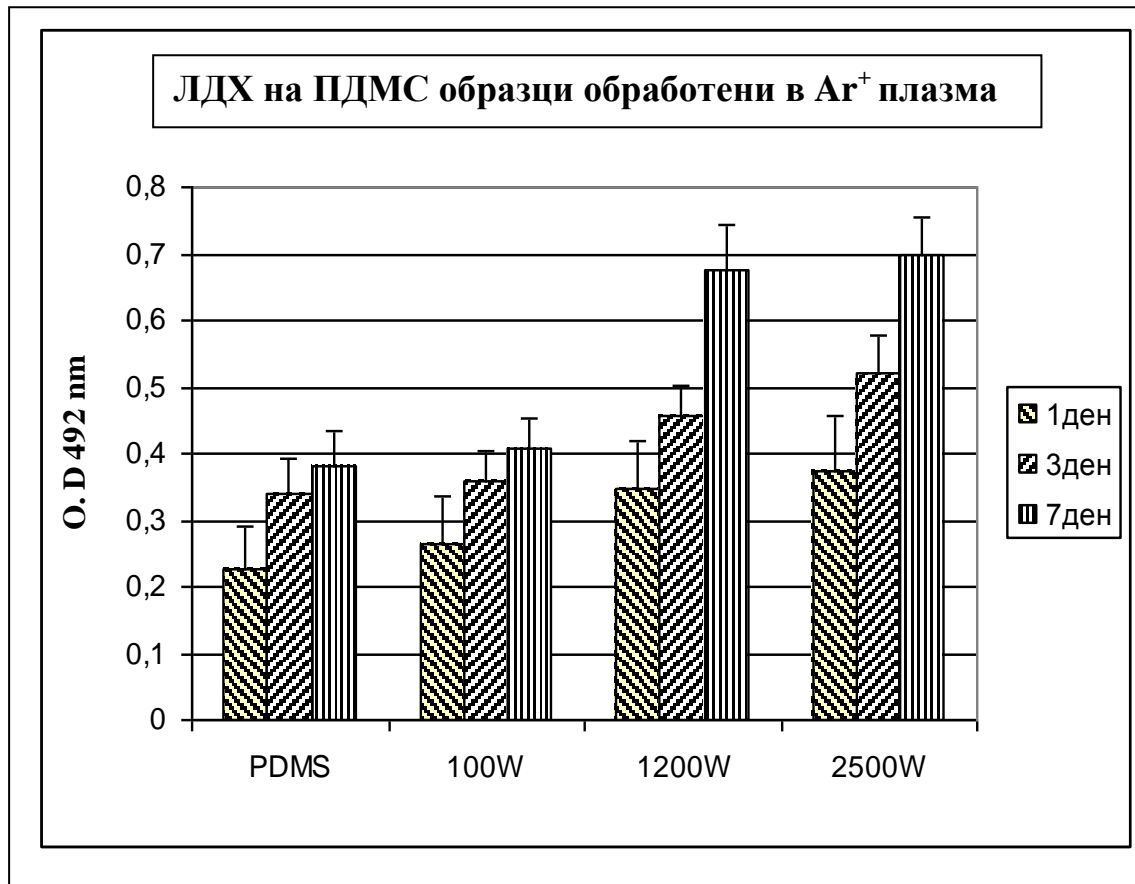
На практика ние показахме, че обработката на ПДМС за 1 мин. с плазма при стойности на разряда 1200 W осигуряват достатъчно добро клетъчно взаимодействие. Броят на клетките тук е значително по-голям в сравнение с 100 W и относителното количество на неспредиралите фибробласти е съвсем малко. За отбелязване е, че от четирите изучавани повърхности, третираната с 2000 W повърхност се характеризира с най-малък ъгъл на омокряне с вода  $\theta_{H_2O}=39.4^{\circ}$ , но това не повлиява съществено клетъчния отговор (тези данни не са представени в таблицата). Според някои автори (Altankov, 2004), най-добро клетъчно взаимодействие би могло да се очаква при повърхности с ъгъл на омокряне около  $60^{\circ}$ . Следователно, клетъчните взаимодействия с модифицираната ПДМС повърхност, приготвена чрез обработване в  $Ar^+$  плазма за 1 мин. при мощност на разряда 2500 W ( $\theta_{H_2O}=39.4^{\circ}$ ) е логично да не са по-добри в сравнение с тези на приготвената чрез обработване с мощност на разряда 1200 W ( $\theta=60.8^{\circ}$ ).

### Клетъчен растеж

Способността на ПДМС-повърхност да подпомага клетъчния растеж преди и след обработването и в  $Ar^+$  плазма беше оценена с помощта на ЛДХ тест, след инкубиране в продължение на 1, 3 и 7 дни. Както е показано на Фиг.6, модификацията на повърхността на ПДМС води до съществено повишаване на клетъчния растеж. Този ефект очевидно зависи от условията на обработване на ПДМС: той е най-слабо изразен при образеца, приготвен чрез обработване в  $Ar^+$  плазма при мощност на разряда 100 W, и нараства с нарастване на мощността до 2500 W. Сигналът е значително по-голям след 3 и 7 дневно инкубиране на клетките и е достоверно по-висок при повърхностите приготвени чрез обработване при мощност на разряда 1200 W и 2500 W (Фиг.7, последните две групи колони). Това до някъде подкрепя наблюдаваното по-добро начално клетъчно взаимодействие, в частност на пробата обработена при мощност на разряда 2500 W. Ето защо е основателно да се приеме, че успешното начално клетъчно

взаимодействие със субстрата са предпоставка за генерирането на адекватни сигнали към вътрешността на клетката, което привежда в действие и механизмите за репликация на ДНК.

Клетъчният растеж очевидно е подтиснат върху немодифицираната ПДМС повърхност, което е в съгласие с литературни данни (Керанов, 2008) и загатва за факта, че е намерен един нов и успешен подход за обработване на повърхността. Но отново не се вижда корелация с ”оптималната” умокряемост на повърхността ( $\theta_{H_2O}=50-60^\circ$ ).



**Фиг.7.** Способност на ПДМС повърхности (немодифицирана и модифицирани чрез обработване в Ag<sup>+</sup>плазма при различна мощност на разряда - 100, 1200 и 2500 W) да подпомагат клетъчния растеж за период от 7 дни, оценена с ЛДХ тест.

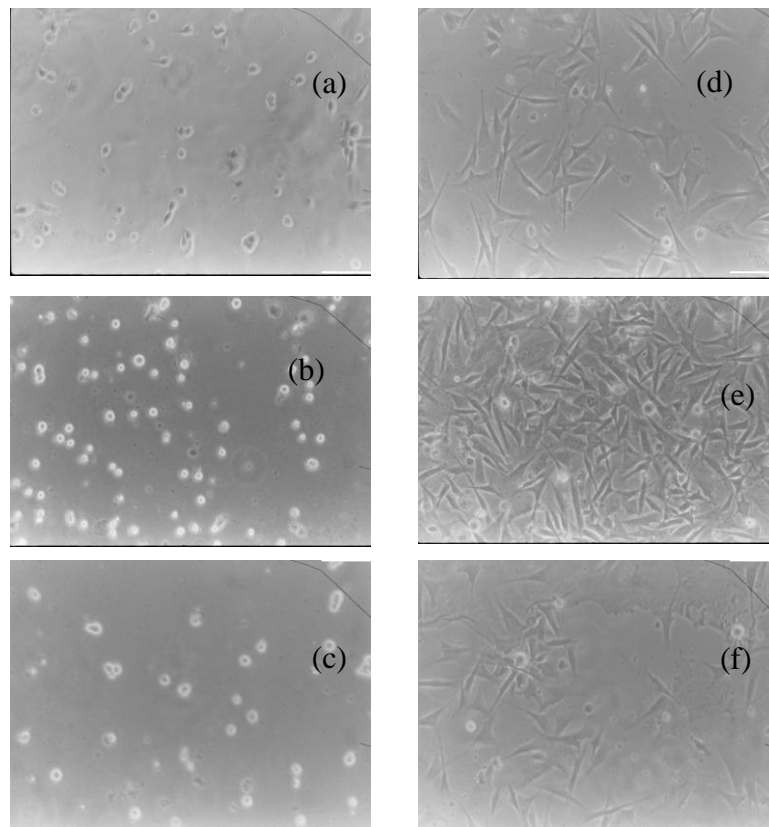
### **Биофункционализиране на ПДМС чрез имобилизиране на колаген. Взаимодействие, моделиращо взаимодействието на клетките с компоненти на екстрацелуларния матрикс**

Важна особеност в строежа на макромолекулата на колагена е наличието на аминокиселини като: метионин (Met), глутамин (Glu), диаминоаргинин (Arg), лизин (Lis) и хидроксиаминокиселината тирозин (Tyr), обуславящи отнасянията му като полиамфолит и същевременно, явяващи се носители на свободни amino - и карбоксилни групи в страничната верига, които обикновено се използват за химичното имобилизиране на колагена към различни повърхности (Altankov et al., 1996). Изключително важно, при това е запазването на биологичната активност на белтъка след свързването му с полимерната повърхност. Ето защо, твърде често свързването на протеина към полимера се прави чрез гъвкав спейсер, а често като такъв се използват ПЕГ-вериги, имащи активен свободен край, способен да взаимодейства с активен край на протеина.



За да се изучи ефекта от дължината на веригата на този гъвкав спейсер върху поведението на имобилизирания колаген, както и клетъчния отговор на така пригответените модифицирани повърхности, са използвани три диамино-ПЕГ с различна дължина на веригата, а именно с молекулна маса съответно 2000, 6000 и 20000 Da. Очаквайки, че дълговерижният гъвкав спейсер би могъл да осигури по-голяма конформационна свобода на имобилизирания протеин, избраните от нас ПЕГ-ове са със сравнително дълга верига – по-дълга от обикновено използваната от други изследователи (от няколко стотин до 2000 Da) (Altankov et al., 1996).

За да потвърдим биологичната съвместимост на ПЕГ покритията ние изследвахме общата клетъчна морфология на фибробласти, адхезирали за 2 часа върху ПДМС повърхности, свързани с ди-NH<sub>2</sub>-ПЕГ 2000, ди-NH<sub>2</sub>-ПЕГ 6000 и ди-NH<sub>2</sub>-ПЕГ 20000, както и ефекта на последващото имобилизиране на колаген. Резултатите са представени на Фиг.23. Вижда се обаче, че най-общо броят на фибробластите върху трите ПЕГ повърхности е значително по-малък, в сравнение с този на съответните повърхности, имобилизирани с колаген с изключение на - ди-NH<sub>2</sub>-ПЕГ 6000.



**Фиг.8.** Обща клетъчна морфология на човешки фибробласти върху активирани в Ag<sup>+</sup> плазма ПДМС повърхности при 1200 W/1 мин, присадени с АК (12 ч.), свързани с гъвкав спейсер: (a) - ди-NH<sub>2</sub>-ПЕГ 2000; (b) - ди-NH<sub>2</sub>-ПЕГ 6000; (c) - ди-NH<sub>2</sub>-ПЕГ 20 000 и имобилизирани с колаген: (d) - ди-NH<sub>2</sub>-ПЕГ 2000/колаген; (e) - ди-NH<sub>2</sub>-ПЕГ 6000/колаген и (f) - ди-NH<sub>2</sub>-ПЕГ 20000 колаген. Бар=20μм.

Освен това, фибробластите върху свързаните с ПЕГ повърхности имат окръглена форма (Фиг.8. а - с), което би могло да се обясни със силно репелентния ефект на тези повърхности, по отношение на адхезивните протеини, които обуславят клетъчното взаимодействие. Тези адхезивни белтъци могат да дойдат от серума и дори да се секретират от клетките, с което се обяснява все пак наличното клетъчно прикрепване

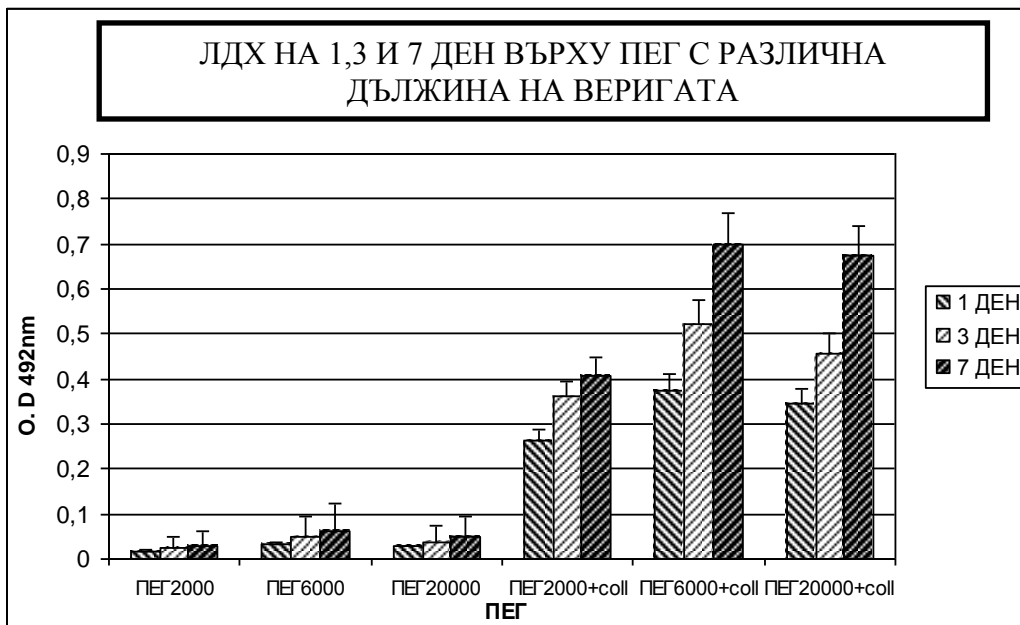
(McDonald, 2000). Добре известно е (Vaquero et al., 1999), че силно хидрофилните повърхности могат да затруднят началното взаимодействие с клетки, което се обяснява именно с репелентния ефект.

Поведението на клетките е напълно различно след имобилизирането на колаген I върху функционализираната ди-NH<sub>2</sub>-ПЕГ ПДМС повърхност. Очевидно, адхезията и разстилането на фибробластите върху трите имобилизирани с колаген повърхности са много по-добри в сравнение с тези върху повърхностите, свързани с ди-NH<sub>2</sub>-ПЕГ, като този ефект зависи от дължината на веригата на гъвкавия ПЕГ спейсер. Както се вижда от Таблица 3, дължината на веригата на ПЕГ влияе слабо върху хидрофилността на имобилизираните с колаген ПДМС повърхности (ъгълът на омокряне с вода варира в областта от 40.00 ÷ 47.50). Умерената хидрофилност, приемаща се като важна предпоставка за доброто взаимодействие с живи клетки (Altankov, 2003), би могла да бъде една от причините за наблюдаваното подобрене на началната клетъчна адхезия на фибробластите върху имобилизираните с колаген ПДМС повърхности. Освен това, трябва да се има предвид, че имобилизирането на колагена е осъществено през гъвкава ПЕГ връзка, която би могла да обезпечи подходяща конформация на колагена за експониране на неговите разпознаващи се от интегрините секвенции и така да доведе до по-добро взаимодействие с клетките. Очевидно, съществува оптимална дължина на веригата на гъвкавия спейсер, при която конформационната свобода на колагеновите молекули е оптимална за експониране на тези секвенциите, осигуряващо оптимално взаимодействие с фибробластите. Най-голям е броят на добре разстлалите се фибробласти, когато имобилизирането на колагена е осъществено през ди-NH<sub>2</sub>-ПЕГ6000 като гъвкав спейсер т.е оптималната дължина на веригата на ПЕГ в нашия случай е 6000 Da.

### **Клетъчен растеж**

Поведението на фибробластите върху свързаните с ди-NH<sub>2</sub>-ПЕГ и имобилизирани с колаген повърхности е охарактеризирано и чрез измерване на тяхната пролиферация. Получените резултати са представени на Фиг.9.

Както се вижда от тази фигура, активността на клетките върху всички изучавани повърхности (свързаните с ди-NH<sub>2</sub>-ПЕГ, както и тези, свързани с ди-NH<sub>2</sub>-ПЕГ и имобилизирани с колаген) нараства в хода на инкубирането им до 7 дни. Свързаните с ди-NH<sub>2</sub>-ПЕГ ПДМС повърхности (ПЕГ 2000, ПЕГ 6000 и ПЕГ 20000) показват много слабо изразена пролиферация, в съответствие с репелентния ефект на ПЕГ. Така, резултатите от ЛДХ теста за 1, 3 и 7 ден съответстват с описаните по-горе наблюдения върху общата клетъчна морфология. Пролиферативната активност на клетките очевидно нараства върху всички ПДМС повърхности, имобилизирани с колаген в хода на инкубирането до 7 ден, но все пак е най-висока, когато имобилизирането на колагена е осъществено през ди-NH<sub>2</sub>-ПЕГ 6000. Ще отбележим, че подобен резултат е получен по-рано за покрити с ПЕИ/ПЕГ 6000 повърхност (Altankov et al., 1996), което потвърждава, че оптималната дължина на веригата на ПЕГ е 6000 Da.



**Фиг.9.** Способност на ПДМС повърхности, свързани с ди-NH<sub>2</sub>-ПЕГ, както и свързани с ди-NH<sub>2</sub>-ПЕГ и имобилизирани с колаген да подпомагат клетъчния растеж за период от 7 дни, оценена с ЛДХ тест.

От направените до тук изследвания може да се заключи, че предлаганата от колектива на Проф. Владкова многоетапна процедура за биофункционализиране на силно хидрофобни и химично инертни полимерни повърхности може да намери приложение за управление на клетъчни взаимодействия, в това число и на силиконовия каучук. Това демонстрира неговия потенциал за приложение в тъканното инженерство, като добре биоинтегриращ се биоматериал.

### Модификации на мембрани за изкуствени органи

Едно от направленията на сътрудничество с Института по Химия при GKSS, Телтов, Германия бяха изследванията ни върху биологичните свойства на някои полимерни мембрани, създадени от техния колектив. Главната цел на тези изследвания беше да се създадат мембрани, притежаващи необходимите характеристики за приложение в биохибридните органични технологии.

Мембраните, върху които бяха концентрирани изследванията на автора на този дисертационен труд, представляват ко-полимери на **акрилонитрил (АН)** и **2-акрилоамид-2-метил-пропансулфонова киселина (АМПС)**, за които беше показано предварително, че силно стимулират оцеляването и функционалната активност на първични хепатоцити (Krasteva et al., 2004). Този ко-полимер съдържа излишък от сулфатни групи, но притежава и много азотни групи, за които се предполага че повлияват неговата биоактивност. В цитираните изследвания обаче, чистият АН АМПС беше показал слаби мембрано-формиращи свойства, още повече че изисква добавянето на опорна полимерна подложка, която води до сравнително ниска водопропускливост ( $<0.5 \text{ l m}^{-2}\text{h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$ ), както и понижена граница за пропускане (cut-off) на молекули над 40 kDa.

Конкретно в нашите изследвания количеството на ПАН (P) и АН АМПС (A) в ко-полимера варираше, както следва: чист ПАН (P/A-100/0), смес от P/A-75/25 и P/A-50/50, както и чист АН АМПС (P/A-0/100), където цифровите стойности указват % съдържание на съответния компонент.

За биологично характеризиране беше използвана хепатобластомната клетъчна линия СЗА, поради широката и популярност като модел за оценка поведението на хепатоцити. На практика отчитаме клетъчното прикрепване, жизнеспособността, растежа и метаболитната активност на клетките. От нашите партньори в GKSS беше показано, че смесването на АН АМПС и ПАН в съотношение (P/A-50/50) води до оптимална пропускливост на мембраната, докато ние показахме, че тази комбинация стимулира и прикрепването, растежа и функционалната активност на СЗА клетките. Получените мембрани съчетаваха добра пореста структура, хидрофилно/хидрофобен баланс и пропускливост (Liekens et al.,1999), което ги определяше като подходящи за използване в биореакторите за временна чернодробна замяна. Тук ще представим някои детайли от това проучване.

Преди всичко акцентирахме на влиянието на отделните физикохимични параметри върху поведението на СЗА клетките. Както уточнихме по горе предварително беше показано, че модификации в съдържанието на АН-АМПС повлиява пропускливостта на мембраната (Scofield et al.,1976), както и поведението на първични хепатоцити (Groth et al., 2005; Grant et al., 2005). Варирането само на АМПС, обаче е неефективно поради лошите механични качества по отношение на поръзността, затова при това изследване АН-АМПС ко-полимер беше смесен с поли(акрилонитрил) (ПАН) хомополимер. Ще отбележим, че за разлика от предишни изследвания в GKSS, Телтов (осъществени без наше участие) с първични хепатоцити (Groth et al., 2005), тук беше използвана СЗА хепатобластомната клетъчна линия, позволяваща по-добра оценка на пролиферативната активност, както и по-детайлно изследване на клетъчните взаимодействия. Общата клетъчна морфология и пролиферация бяха изследвани чрез витално оцветяване с FDA и колориметричен МТТ анализ, докато за функционална активност на клетките съдехме по експресията на цитохром Р-450 и ФН синтез. Резултатите от измерванията на водопроницаемостта са дадени в Таблица 4. Най-общо, мембраните от АН-МПС притежават сравнително ниска водопрпускливост, която чувствително намалява с нарастването на парциалната концентрация на полимера в разтвора.

**Таблица 4.** Характеристика на мембранната пропускливост на ПАН/АН-АМПС ко-полимерни мембрани.

<i>Мембранна композиция</i>	<i>Полимерна концентрация в изходния разтвор [wt. %]</i>	<i>Водно пропускане [lm-2h-1kPa-1]</i>	<i>Предел за пропускане (Cut-off) [kDa]</i>
АН-АМПС	22.5	0.01	7
АН-АМПС	20	0.08	19
АН-АМПС	17.5	0.16	23
АН-АМПС	15	0.22	40
ПАН/АН-АМПС 1:1	15	0.7	40
ПАН/АН-АМПС1:1	13	1.1	320
ПАН/АН-АМПС1:1	12	1.6	270
ПАН/АН-АМПС1:1	10	3.2	470

Получените мембрани показаха предел за пропускане > 40 kDa, което ги определяше като недостатъчно пропускливи за биохибриден черен дроб, тъй като албумин-свързаните токсини не могат да бъдат пропуснати. По-нататъшна редуция на кополимерната концентрация обаче не беше възможна поради лошите механични свойства на получените мембрани. Освен това се оказа, че чистите АН-АМПС мембрани имат гел-подобно поведение и поради това не представляваха интерес. Като алтернативен подход беше използвано добавянето ПАН хомополимер, притежаващ по-добри механични свойства. Както е показано в Таблица 4, при смесване АН-АМПС кополимер с ПАН хомополимер се повлиява и пропускливостта, което даде възможност да бъде получена мембрана с оптимална пропускливост и механична здравина.

Химичният състав на мембранните повърхности беше изучен чрез XPS. Както се вижда от Таблица 5, нашите наблюдения показаха, че елементният състав на повърхността не е еднакъв с теоретичния състав на полимерния комплекс, което е индиректно доказателство за нехомогенност на разтвора и наличието на фазова сепарация на ПАН. Р/А-50/50 мембраната показва много близък повърхностен състав до този на Р/А-0/100.

**Таблица 5.** Действителна и теоретична композиция на химичните елементи (атом % в полимера) върху повърхността на различните ПАН/АН-АМПС мембрани, изследвани чрез XPS

Мембрани	Химичен състав на мембраните									
	Действителен					Теоритичен				
	C	N	O	S	Si	Cl	C	N	O	S
<b>Р/А -100/0</b>	75.2	23.2	1.4			0.2	75.00	25.00		
<b>Р/А -75/25</b>	75.4	22.8	1.5	0.3			74.45	24.63	0.74	0.18
<b>Р/А - 50/50</b>	76.0	19.9	3.4	0.3	0.3		73.91	24.27	1.46	
<b>Р/А -0/100</b>	75.2	21.2	3.2	0.3			72.4	23.63	2.74	0.69

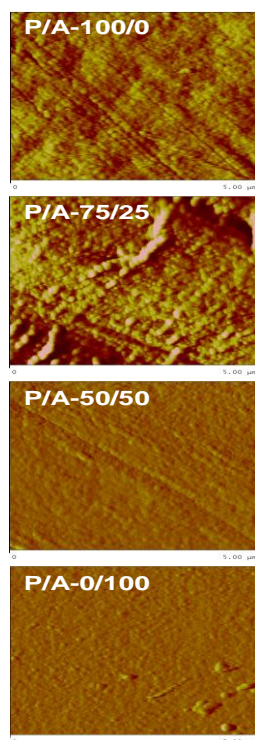
Изненадващо, чистият поли(акрилонитрил) Р/А-0/100 показва съдържание на кислород, което вероятно се дължи на замърсяване, но може да е и показател за окисляване на някои от азотните групи по време на съхраняването на мембраните във вода. От друга страна, очакваното нарастване на сяра не беше наблюдавано - 0.3% сяра беше измерена за всички АНПС съдържащи мембрани, което може да се дължи на ограничената чувствителност на XPS измерванията.

Резултатите от измерванията на водния контактен ъгъл, характеризиращ хидрофилността на мембраните, са показани в Таблица 6. Сравнен с чистия ПАН (Р/А-100/0), АН-АМПС (Р/А-0/100) показва значително повишена повърхностна омокряемост, което е видно от редуцирания воден контактен ъгъл. Междинните полимерни композиции не бяха изследвани.

**Таблица 6.** Водни контактни ъгли, получени чрез изследване на мембраните по метода на висящата водна капка.

<i>Мембрани</i>	<i>Контактен ъгъл (°)</i>	
	<i>Настъпващ</i>	<i>Отстъпващ</i>
<b>P/A-100/0</b>	<b>59,5 ± 3,1</b>	<b>43,0 ± 2,9</b>
<b>P/A-75/25</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>P/A-50/50</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>P/A-0/100</b>	<b>47,3 ± 1,7</b>	<b>13,8 ± 1,9</b>

Резултатите от Атомно силовата микроскопия (АСМ) показаха (виж. Фиг.10), че мембраните с по-високо АН-АМПС съдържание (P/A-50/50 и P/A-0/100) са по-гладки от чистия ПАН и P/A 75/25. Тези данни потвърждават и измерванията от водния контактен ъгъл: най-гладките мембрани показаха по-висока хидрофилност – качество, което би могло да подобри взаимодействието с клетки.

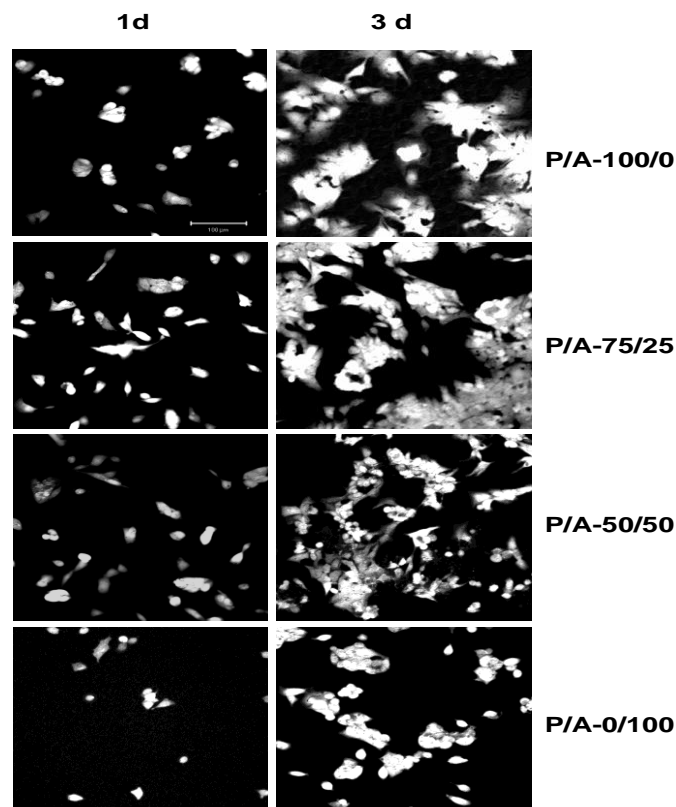


**Фиг.10.** Морфологията на повърхностите на изследваните мембрани, получени чрез атомно-силов микроскоп. Размер на сканиращата повърхност 5x5  $\mu\text{m}$ .

### **Клетъчна морфология**

Общата клетъчна морфология на живите СЗА клетките, култивирани върху различни ПАН/АН-АМПС мембрани е визуализирана чрез оцветяване с виталната ФДА боя и е показана на Фиг.11. Хепатоцитите бяха култивирани за 1 ден (ляв панел) и 3 дни (десен панел). Вижда се, че върху чистия ПАН клетките се прикрепват добре към

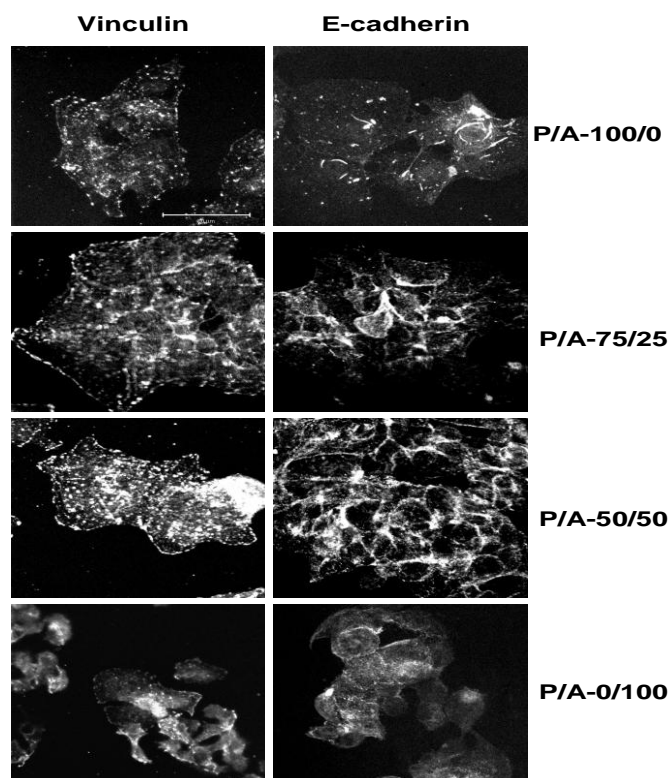
мембраните, образувайки малки агрегати, докато върху останалите мембрани преобладаваха единичните клетки. Върху P/A-75/25 и P/A-50/50 клетките показват добре разстлана морфология, докато върху чистия АН-АМПС (P/A-0/100), обаче клетките бяха малко на брой и окръглени, което говори за лошото им прикрепване. Цялостната морфология на СЗА клетките претърпява значителни промени на 3-тия ден. Тук те са разстлани по-добре, като броя им значително нараства. Общата морфология е по-добра, особено върху чистия ПАН и P/A-75/25, но тенденцията към формиране на агрегати също нараства. Очевидно клетките проявяват склонност към растеж в хомотипни агрегати и тяхното различно количество върху мембраните е следствие от различията в първоначалното клетъчно прикрепване (адхезия).



**Фиг.11.** Витално оцветяване с ФДА на СЗА клетки на 1-ви (ляв панел) и 3-ти (десен панел) ден от култивирането им върху различните полимерни мембрани. Бар=100μм

### Имунофлуоресценция за Е-кадхерин и винкулин

Адхезивните взаимодействия и силата на прикрепване на СЗА клетки към субстрата могат да бъдат характеризирани по развитието на фокалните адхезионни комплекси, визуализирани чрез винкулин, докато за формирането на междуклетъчните контакти може да се съди по експресията за Е-кадхерин. В нашето изследване тези две структури бяха визуализирани на 3-тия ден (Фиг.12), тъй като предварителните ни изследвания показаха, че те са слабо изразени на 1-вия ден. Добро адхезивно взаимодействие беше наблюдавано върху P/A-75/25 и 50/50 мембраните (Фиг.12 ляв панел), демонстриращо се с развитието на типични винкулинови струпвания, визуализиращи фокалните адхезионни контакти, видими най-добре в периферията на клетъчните агрегати. Най-силно експресирани са тези структури върху P/A-50/50 мембрана, следвано от P/A-75/25 мембраната. Върху чистия ПАН (P/A-100/0) и чистия АН (P/A-0/100) експресията им, обаче видимо намалява.



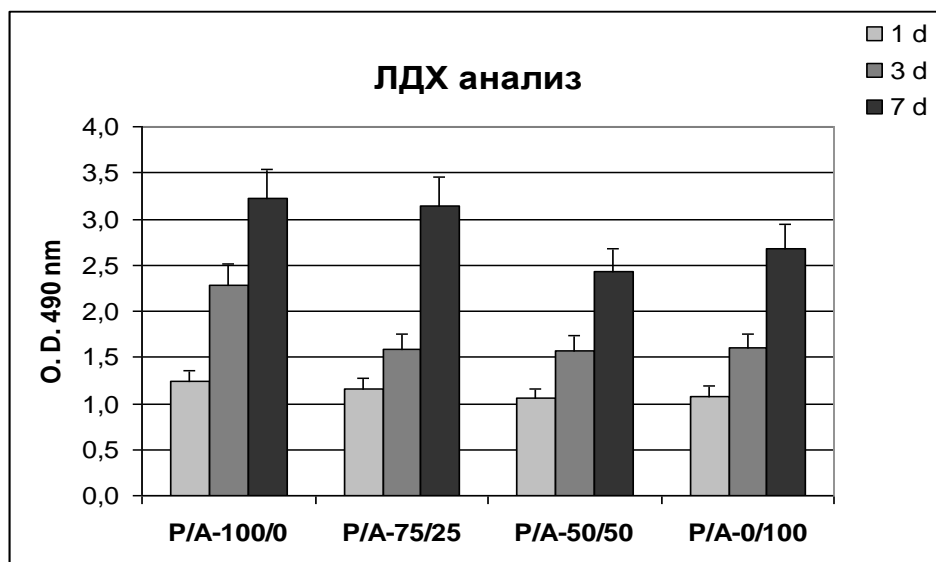
**Фиг.12.** *Формиране на фокални адхезионни комплекси (ляв панел) и междуклетъчни контакти (десен панел) от СЗА клетки на третия ден от култивирането им върху различни АН-АМПС мембрани. Визуализация чрез имунофлуоресценция съответно за винкулин и Е-кадхерин. Бар=50µм*

Фиг.12 (десен панел) демонстрира формирането на междуклетъчни контакти между СЗА клетките, визуализирано чрез имунофлуоресценция за Е-кадхерини. Междуклетъчните контакти, обаче почти отсъстват върху чистия ПАН (P/A-100/0), въпреки наличието на агрегати. С увеличаване съдържанието акрилонитрила в полимера започват да се формират контакти, като Е-кадхерина се концентрира в границите между клетките и най-добре е изразено при P/A-50/50 мембраната. Върху чистия АН-АМПС кополимер (P/A 0/100), обаче се наблюдава разпръснатата експресия и слаба организация на тези адхезивни структури.

### **Количествено характеризирание на клетъчния растеж**

Способността на различни мембрани да подпомагат растежа на СЗА клетките за период от 7 дни беше характеризирана чрез ЛДХ – анализ. Както е показано на Фиг.13, клетките растят добре върху всички мембрани, като количеството на ЛДХ нараства монотонно в 7 дневния период. Значителни различия в сигнала бяха открити при мембраните с ниско АМПС съдържание (P/A-100/0 и P/A-75/25), където ЛДХ показва по-високи стойности, сравнено с P/A-50/50 и P/A-0/100. Тази разлика продължава да е на лице и на 3 и 7 ден, въпреки липсата на статистическа достоверност, което подсказва, че вероятно е резултат от различното първоначално клетъчно прикрепване.

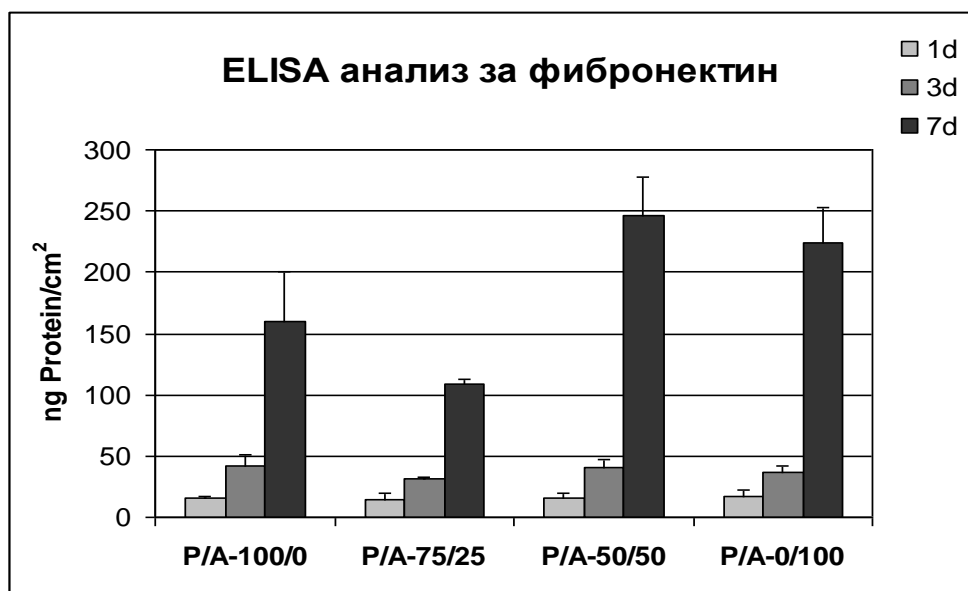




Фиг.13. ЛДХ тест на 1, 3 и 7 ден от култивиране на СЗА клетки върху различните АМПС мембрани.

### Фибронектинов синтез

Фибронектинът е основния адхезивен протеин в биологичните течности, който се синтезира главно в черния дроб. В тази връзка беше интересно да проследим секрецията му *in vitro*, когато СЗА клетки са в контакт с различните АН-АМПС мембрани, което би се отразило на тяхното функционално състояние. Както е показано на Фиг.14, количеството на секретирани ФН значително варира между отделните мембрани и тези различия са най-силно изразени на 7-мия ден, когато намерихме достоверно повишение в средата ( $p < 0.05$ ) при Р/А-50/50 и Р/А-0/100 мембраните, без достоверна разлика помежду им ( $p > 0.05$ ).



Фиг.14. Фибронектинов синтез на СЗА клетки върху различните АМПС мембрани

В резюме, нашите резултати показаха, че ко-полимерните мембрани на Р/А-50/50, предоставящи желаните подобрени транспортни свойства, се съчетават с един ефект на подобро клетъчно и междуклетъчно взаимодействие. Функционалната активност на клетките също е задоволителна. В допълнение на предходни изследвания,

показващи добрата клетъчна (Grant et al., 2005) и кръвна съвместимост (Paneva et al., 2003) на АМПС мембраните, нашите резултати показваха, че тази мембранна композиция е изключително подходяща и за колонизация с хепатоцити и може да бъде използвана при биохибридните чернодробно-заместващи техники.

## ДИСКУСИЯ

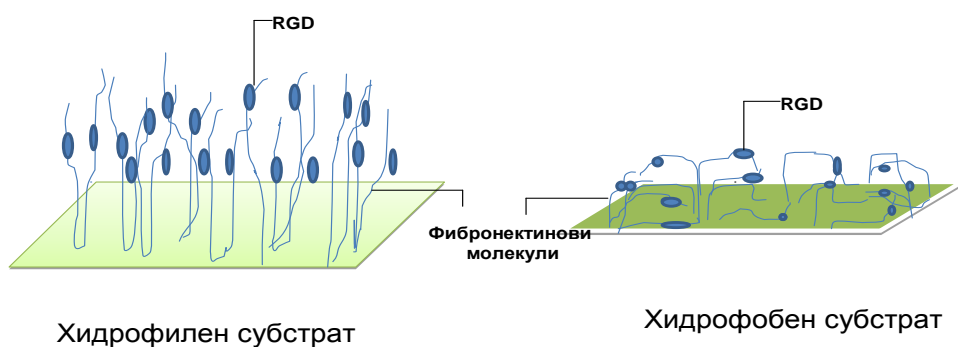
Използването на един полимерен материал, контактуващ с тъкани, кръв, белтъци и други биологични течности, изисква решаването на сериозни проблеми, свързани с биосъвместимостта му.

Регулирането на взаимодействието материал – жива материя (тъкани, кръв, клетки и др.) е най-сериозния проблем на съвременното тъканно инженерство. Това взаимодействие в повечето случаи се съпровожда от нежелани реакции, водещи до възпалителни процеси и некрози, коагулация (съсирване) на кръвта, образуване на тромби или реакция на отхвърляне на импланта. Биосъвместимостта, както и специфичността на биовзадействието, адхезията и омокрянето, износоустойчивостта и външния вид биха могли да се оптимизират чрез модификация на полимерната повърхност. Опитите за функционализиране на повърхността са подход, използван системно в работата на много изследователи, изучаващи взаимодействието на клетки с биоматериали. Това е основния подход и при нашите изследвания, тъй като дава възможност да се надникне по-дълбоко в механизмите на клетъчното прекрепване към полимерни повърхности и да се разбере определящата роля на повърхностните свойства на биоматериалите при взаимодействието им с клетки (Scheule and Holian, 1991; Lee et al., 1996; Grinnell and Feld, 1981).

Първоначалното взаимодействие на клетките с материалните повърхности може да се сведе до процеса на клетъчна адхезия. Важно свойство на клетъчната адхезия е нейната селективност. Клетките, както и всички втреклетъчни структури, трябва да бъдат прикрепени и ориентирани в пространството. За да могат да се придвижват също им е необходима опорна точка. Способността да се прикрепват е основно свойство на всички живи клетки, обуславящо тяхната жизнена дейност. В условия *in vitro* клетките могат да се прикрепват и към различни повърхности – процес, който има пряко отношение към взаимодействието им с биоматериали (Алтънков, 2004; Grinnell and Feld, 1981)

Механизмът на взаимодействие на клетки с изкуствени повърхности не е изучен напълно, но се знае, че фактори като хидрофилно/хидрофобен баланс, грапавост на повърхността, вид и количество на някои повърхностни функционални групи играят съществена роля. Принципно хидрофилните повърхности са предпочитани при създаване на биохибридни биоматериали, а хидрофилизирането е основния и общоприет подход за подобряване на клетъчното взаимодействие. Причината за този ефект на хидрофилността, най-вероятно се крие в конформацията на адсорбираните адхезивни белтъци, благоприятстваща клетъчната адхезия (Алтънков, 2004). Съществуват многобройни възможности за повърхностно функционализиране на полимерите, по принцип предизвикващи промяна в тяхната повърхностна свободна енергия и създаването на незаредени, положително или отрицателно заредени, както и съдържащи различни функционални групи повърхности (Scheule and Holian, 1991; Lee et al., 1996). Например, имобилизиране на хидрофилни химични групи на повърхността на полимера би могло да подобри взаимодействието му с клетки. Съществуват разнообразни възможности за това, но е много важно процеса да се осъществи така, че да се избегне нарушаване на биологичната активност на

повърхността. В нашите изследвания, беше наблюдавана разликата във взаимодействието на клетките при различните ПЕГ покрития, каквито са ПЕГ 1500, ПЕГ 6000 и ПЕГ 12500, което може да се обясни със специфичната организация на ПЕГ веригите, тяхната дължина, структура и различният хидрофилно/хидрофобен баланс на тези субстрати. Трябва да се има предвид, обаче че клетките не взаимодействат директно със субстрата. За да се поддържа физиологичното им прикрепване, те се нуждаят от адхезивни белтъци или други прикрепващи фактори (полизахариди), които да се адсорбират от средата. Такъв фактор е например фибронектина (Altankov and Groth, 1994; Grinnell, 1987; Grinnell and Feld, 1982; McAbee and Grinnell, 1985). По този начин могат да бъдат обяснени добрите биологични свойства на ПЕГ 6000, (върху който беше измерена най-високата ФН адсорбция, докато късоверижния ПЕГ 1500 показва ниска ФН адсорбция, кореспондираща с не добро клетъчно взаимодействие, установено от опитите с фибробласти (виж Фиг. 1). За ПЕГ 12500 ефектът от ФН пре-адсорбция беше най-силен, но тук трябва да се отбележи, че началната клетъчна адхезия (към чистия ПЕГ 12500) беше слаба. Въобще, ПЕГ 12500 изглежда има много добри биологични свойства, но само ако е преадсорбиран с фибронектин. От друга страна, най-ниската ФН адсорбция беше установена също върху този полимер (виж Таблица 2). Очевидно, няма директна връзка между количеството преадсорбиран фибронектин върху ПЕГ повърхностите и техните биологични свойства. Това съответства на основното схващане, че не количеството, а конформацията на адсорбираните белтъчни молекули е от най-голямо значение (Grinnell and Hays, 1978; Grinnell et al., 1987; Grinnell and Feld, 1982) за взаимодействието с клетки. Въобще, трябва да се има предвид, че по-ниската белтъчна адсорбция не означава непременно по-ниска клетъчна адхезия и разстилане (Grinnell and Feld, 1982, Алтънков, 2004). След като ФН беше изолиран и идентифициран като серумен компонент, отговорен за адхезията на клетките *in vitro* (Klebe, 1974), подобрената биологична активност на материалите започна да се обяснява с различния начин на адсорбция на ФН. На следващата схема (Фиг.1) е показан един от възможните механизми, чрез който се нарушава биологичната активност на ФН, например когато повърхността е хидрофобна, а именно, вследствие стеричното “прикриване” на RGD клетъчно-свързващите последователности на молекулите: (Алтънков, 2004).

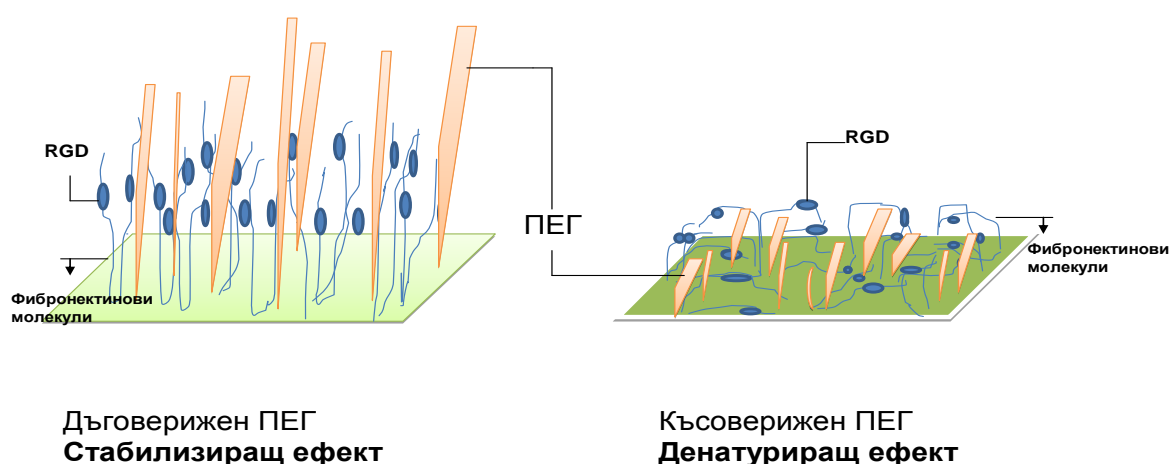


**Фиг.15.** Модел, показващ възможната роля на хидрофобността на субстрата за конформацията на ФН и експонируемостта на RGD мотива за клетъчното свързване

Известно е, че върху хидрофобните повърхности клетките не могат и да реорганизират адсорбирания ФН (Altankov and Groth, 1994, 1996), което вероятно е свързано с по-здравото му свързване към субстрата. Интересното е, че при нашето изследване с ПЕГ повърхностите се наблюдаваше слаба белтъчна адсорбция, но изненадващо добра реорганизация, особено при ПЕГ12500 повърхностите, което е един пример за това как слаби вариации в структурата на полимера могат да окажат съществено влияние върху поведението на адхезираните клетки (Алтънков, 2004).

Интересното е, че независимо от изключително слабата адсорбция на белтъци, ПЕГ

покрытията допускат взаимодействие с клетки (Vladkova et al., 1999), което при това зависи, както от структурата на ПЕГ полимера (дълговерижен, късоверижен, разклонен) (Vladkova et al., 1999), така и от гъстотата на покритието (Thom et al., 1999; Altankov et al., 2000). Нашите изследвания показаха, че по-дългите вериги на ПЕГ предлагат по-добри условия за клетъчно прикрепване, и именно ФН е този, който обуславя това взаимодействие, тъй като в негово отсъствие адхезията е слаба. Вероятното обяснение за този ефект е, че ФН се адсорбира не директно към ПЕГ, който е силно репелентен за белтъците (Harris, 1992), а към останалите свободни свързващи места върху субстрата (виж Фиг.2). При това положение, ПЕГ веригите упражняват страничен стабилизиращ ефект върху конформацията на адсорбираните белтъци (Altankov et al., 2000, Thom et al., 1999), поради хидрофилната си природа. Както личи от схемата на Фиг.2, логично е това да зависи от дължината на ПЕГ веригите.



**Фиг. 16.** Модел, показващ възможната роля на дължината на ПЕГ веригите (сиво) за конформацията на ФН (извити чертички) и експонирането на RGD мотива (сини кръгчета) за клетъчно свързване.

Търсенето на подходи за хидрофилизиране повърхността на биоматериалите е стъпка към подобряване на тяхната биологична съвместимост. Един от тези начини е третирането с  $Ag^+$  плазма (Lee et al., 1996; Keranov et al., 2005), като резултатите от нашите изследвания със синтетичният каучук са типичен пример за това.

Както беше изяснено в увода, този материал има голям потенциал за биомедицинско приложение, но е хидрофобен и показва лоша биосъвместимост. Третирането с плазма на чистия ПДМС определено доведе до хидрофилизиране на повърхността му до около WCA  $60^0$ , превръщайки я от хидрофобна в умерено хидрофилна. Механизмът на този процес е свързан с функционализиране на повърхността и изменение на свободната й енергия (Keranov et al., 2008; Dinef et al., 2009), като се счита че, именно това води и до подобряване на биосъвместимостта. Интересното в случая е, че клетъчното взаимодействие с плазма-третирания ПДМС се осъществява дори и без ФН, като това може да се обясни с по-лесното преодоляване на електростатичната бариера, което благоприятства прикрепването на клетки (Керанов, 2008; Алтънков, 2004).

Химичното свързване на колаген I към ПДМС очевидно е още един начин за подобряване на клетъчното взаимодействие с полимерните повърхности (Keranov, 2009). Биофункционализацията на ПДМС, в този случай представлява един многостепенен процес, включващ обработване в  $Ag^+$  плазма, присаждане на акрилна

киселина (AA) и ПЕГ като гъвкава връзка за свързване на ПДМС с молекулите на колагена, чрез пептидно-синтезна реакция (Keranov et al., 2008).

Основното изменение в състава на химичната повърхност (нейната минерализация) поради обработката в  $\text{Ar}^+$  плазма се появява в първата минута след обработката на ПДМС при 1200 W, както е установено и в предишни изследвания (Vladkova et al., 2005). Затова пробите за по-нататъшно присаждане с AA бяха обработени при тези условия (1200 W/1 мин). Към пробите с присъдена AA беше присадена и гъвкава ПЕГ връзка с различна дължина на веригата, след което последва свързването на колаген I. Бяха използвани Три  $\text{diNH}_2$ -ПЕГ с относително дълга полимерна верига (2000, 6000 и 20000 Da), като очаквахме, че относително дългия гъвкав спейсър от ПЕГ би предоставил по-голяма свобода на прикрепените колагенови молекули, съответно и по-добро взаимодействие с фибробластите (Керанов, 2008).

В нашите изследвания използвахме различни методи за характеризиране на получените повърхности. Един от тях е рентгеновата фотоелектронна спектроскопия или XPS анализ. Това изследване не е заслуга на автора (Keranov et al., 2009), но тук ще го дискутираме накратко, за да можем да обясним по-добре взаимодействието на клетките с различните модифицирани ПДМС повърхности.

Присъединената AA променя допълнително повърхностната химическа композиция на плазма обработения ПДМС: силициевото съдържание намаля до 28%, а двете Si/C и Si/O отношения се променят отново. От друга страна се наблюдава нов компонент, показвайки присъствието на  $-\text{COO}$  групи на повърхността (Vladkova et al., 2005; Keranov et al., 2009). Именно тези карбоксилни групи на AA-присъединена върху ПДМС бяха използвани за присъединяване на  $\text{diNH}_2$ -ПЕГ, за да служат като гъвкава връзка между повърхността и колагена. Ковалентното прикрепване на  $\text{diNH}_2$ -ПЕГ към повърхността се потвърждава от установяването на значително количество азот върху  $\text{diNH}_2$ -ПЕГ-покритите повърхности. (Керанов, 2008, Keranov et al., 2009)

При по-подробното разглеждане на данните от XPS анализа, N1s спектъра показва, амино и амидни групи на повърхността. Тези групи се появяват като резултат от взаимодействието между  $\text{NH}_2$ -групи на ПЕГ-спейсър и  $-\text{COOH}$  на AA-присадена повърхност и доказват образуването на пептидна връзка (Керанов, 2008). Съдържанието на азот е най-високо (4.4 at %) върху ПЕГ 6000. За същата повърхност се отчита, че и гъстотата на  $\text{NH}_2$  групите е най-висока. Има данни, че именно наличието на  $\text{NH}_2$  групи на повърхността засилва взаимодействието на клетките с полимерните повърхности (Curtis et al., 1983, Lydo et al., 1985), затова вероятно не случайно и най-доброто взаимодействие с фибробласти е там където като гъвкав спейсър е използван именно ПЕГ 6000.

Доказателство за успешното прикрепяне на колагена идва от присъствието на ниското количество сяра, което показва XPS анализа. Този резултат може да бъде обяснен само с присъствието на сяра-съдържащи аминокиселини в колагена, като метионин и цистеин (Ayad et al., 1998). XPS данните бяха потвърдени от измерванията на контактния ъгъл. Водният контактен ъгъл ( $\text{WCA}^0$ ) на много хидрофобния ПДМС ( $101.9^0$ ) значително намалява на всеки етап от модификацията, и повърхността става повече или по-малко хидрофилна в зависимост от вида на обработката (Керанов, 2008; Keranov et al., 2009) (виж Таблица 3).

В допълнение беше проведено и изследване чрез атомно силова микроскопия (АСМ) на получените повърхности, за да се даде по-подробна информация за повърхностната морфология и неравност (грапавина) на обработения ПДМС. Така се установи, че повърхността на немодифицирания ПДМС е относително гладка и показва ситно зърнеста повърхностна топография, сходна с тази, наблюдавана от други автори. Повърхностната топография почти се запазва и след обработка с  $\text{Ar}^+$  плазма.

Сравнението на АСМ изображенията, обаче ясно показва, че повърхностната неравност се увеличава рязко след присаждането на АА (Kerapov et al., 2008). Повърхностната неравност нараства и с присъединяването на ПЕГ, доказано от XPS анализ и от измерванията на водния контактен ъгъл. Дължината на ПЕГ веригата повлиява също повърхностната неравност и на колаген-прикрепените повърхности. Така, колкото по-дълга е ПЕГ веригата, толкова по-ниска е повърхностната неравност и по-малко е взаимодействието на клетки с тази повърхност, тъй като е известно, че клетките предпочитат грапави повърхности. Вероятно затова клетъчната адхезия и пролиферация дадоха най-добри параметри при полимерните повърхности, където като за гъвкава връзка беше използван ПЕГ 6000 (виж Фиг.9). Тук, обаче трябва да се отчете и ефекта на колагена като основен компонент на базалните мембрани, който се разпознава специфично от клетките.

След като разгледахме данните от химическия и физико-химичен анализ на обработения ПДМС, много по-лесно може да си обясним и различното клетъчно поведение върху модифицираните повърхности. Така например, различният брой фибробласти адхезирали върху трите ПЕГ повърхности може да бъде обяснен с едновременното влияние на хидрофилността и неравността на повърхността и двете зависещи от дължината на ПЕГ веригата. Клетъчното поведение обаче е по-различно след прикрепване на колаген I върху тези повърхности. Очевидно, адхезията и разстилането на фибробластите се повлияват положително от колагеновата модификация, като все пак клетъчна адхезия зависи и от дължината на ПЕГ веригата, използвана като гъвкав спейсър. Дължината на ПЕГ-веригите повлиява слабо повърхностната хидрофилност на колаген-модифицираната повърхност, но значително нейната неравност. Умерената хидрофилност ( $\theta_{H_2O} = 40.0-47.5^\circ$ ) приемаща се като важна предпоставка за добро взаимодействие с живите клетки (van Koten et al., 1992) също може да бъде причина за подобреното клетъчно взаимодействие на изследваните колаген-покрити ПДМС повърхности. Освен това, обаче гъвкавата спейсърна верига може да предостави подходяща конформация на колагеновата молекула и така по-лесно да се експонират неговите клетъчно свързващи последователности (GFOGER), а това съответно води и до по-добро взаимодействие с клетките (виж Фиг.8, десен панел). Интересно е да се отбележи, че клетките нормално взаимодействат с нативния колаген чрез своите  $\alpha_1\beta_1$  и  $\alpha_2\beta_1$  интегринови рецептори, разпознавайки GFOGER последователността, т.е. по един RGD независим механизъм, и за да се експонират RGD последователностите на колагеновата молекула е необходима нейната частична денатурация (Yamamoto et al., 1995). Но тогава колаген (желатина) започва да взаимодейства и с  $\alpha_5\beta_1$  и  $\alpha_v\beta_3$  интегрините, които са специфични за други адхезивни белтъци (фибронектин и витронектин) (Davis, 1992) и въпреки че е налице клетъчна адхезия тя може да запусне други сигнални пътища. Следователно, ковалентното свързване на колагена, както е в нашия случай, не е изключено да нарушава специфичността на разпознаването на този белтък както става нормално в базалната мембрана, и това не е без значение когато се планира евентуално тъканно инженерното приложение на една такава модификация.

Функционалното поведение на фибробластите върху колаген-покритите ПДМС повърхности беше по-нататък характеризирано чрез измервания на клетъчната пролиферация чрез ЛДХ теста. Пролиферативната активност се увеличава до 7-мия ден, както е видно от фигура 9, най-отчетливо върху diNH<sub>2</sub>-ПЕГ покритите повърхности, докато diNH<sub>2</sub>-ПЕГ2000/ diNH<sub>2</sub>-ПЕГ6000 и

diNH<sub>2</sub>-ПЕГ20000 демонстрират по-слаба клетъчна пролиферация, сравнено със съответните колаген-покрити ПДМС повърхности (ПЕГ2000 + колаген, ПЕГ6000+колаген и ПЕГ20000+колаген), което корелира с тяхната повишена хидрофилност ( $\theta_{H_2O} = 20.1-10.6$ ), като сходен резултат е получен и по-рано за ПЕИ/ПЕГ-покрити повърхности (Vladkova et al., 1999) (Таблица 1). ЛДХ анализът на колаген-покритите повърхности също потвърждава по-рано описаните резултати (виж Фиг.9.). Интересното е, че клетъчната активност, измерена с ЛДХ анализ, нараства по време на инкубацията до 7 дни върху всички колаген-покрити повърхности, но остава най-висока при diNH<sub>2</sub>-ПЕГ6000 ПДМС повърхността (виж Фиг. 9), което потвърждава, че оптималната верижна дължина на ПЕГ спейсер е от 6000 Da, но също така показва, че присъствието на колагена осигурява допълнителни условия за оптимално клетъчно функциониране.

В резюме нашите изследвания показват, че умерената дължина от 6000 Da на ПЕГ спейсърната верига е за предпочитане, поради оптималната начална клетъчна адхезия и пролиферация (виж Фиг.8 и Фиг.9.). Установено беше обаче, че няма пряка взаимовръзка между хидрофилността и началното клетъчно взаимодействие, вероятно поради едновременното влияние на други фактори като повърхностна химическа структура и топография (Keranov et al., 2008).

През последните години силно нарастна интересът към полимерните мембрани като субстрат за прикрепване и растеж на хепатоцити, във връзка с разработването на изкуствен черен дроб (Watanabe, 1997, Tzanakakis, 2000). Известно е, че функционалната организация на чернодробната тъкан, както и на всички вътрешни органи, се обуславя от базалната мембрана, която осигурява не само добро прикрепване на паренхимните клетки, но и необходимите транспортни свойства. За това е необходима да се създаде изкуствена мембрана с необходимите параметри, която да осигурява тези функции. Все още има редица трудности, които възпрепятстват биологичните изследванията в тази насока (Keogh et al., 1996; Klinkmann et al., 1995). Мембраните са непрозрачни и грапави, трудно се омекчат и лесно изплуват във вода, което затруднява използването на стандартните култивирани и хистологични техники. Именно затова ние използвахме различни флуоресцентни техники (витално оцветяване с FDA, имунофлуоресценция) съчетани с конфокална микроскопия, като по този начин генерално решихме проблема с непрозрачността и грапавостта на изследваните мембрани. Трябва да се отбележи, че въпреки голямото разнообразие от биоматериали, все още няма мембрани, специално изработени за биохибридни чернодробни системи. Това определи насоката на проучването ни, което започна с избора на подходящи мембрани. Неотдавна нашите колеги от Института по Химия в Телтов създадоха полимерни мембрани, базирани на ПАН-кополимеризирани с различни хидрофилизиращи ко-мономери, предоставящи по-добри повърхностни свойства за култивация на клетки (Krasteva et al., 2005; Grant et al., 2005; Krasteva et al., 2004; Groth et al., 2002). В една от статиите беше описано, че полимеризацията на *акрилонитрил* с АМПС води до ко-полимер, който поддържа хепатоцитното функциониране и преживяемост (Grant et al., 2005). Този ко-полимер, обаче има слаби мембранообразуващи свойства водещо до получаването на мембрани с гумо-подобни механични свойства. Затова, основната задача на това изследване беше разработването на АМПС - съдържащи мембрани с подходящ разделителен профил и механични свойства, които едновременно да показват и добра биосъвместимост по отношение на хепатоцитите. Беше установено предварително, че съединяването на ко-полимера АН-АМПС с ПАН хомополимер е един добър подход за получаване на мембрани с подходяща механична стабилност и желани транспортни свойства, които да съответстват на

изискванията за биохибридните клетъчни технологии (Groth and Liu, 2007; Tzanakakis et al., 2000).

Следващата наша задача беше да изберем най-подходящото съотношение на компонентите при тип мембрани, същевременно удобно за химична модификация и производство. Спряхме се върху четири такива синтетични мембрани: P/A100/0, P/A75/25, P/A50/50 и P/A0/100, които се различаваха по химичната си композиция (съотношение на компонентите) и физико-химичните си свойства, но всички си приличаха по едно свойство - бяха силно хидрофилни (виж Таблица 6). Независимо от това, обаче при всички АМПС мембрани беше открито експонирането на сулфонови групи на полимерната повърхност, което комбинирано с една по-висока хидрофилност вероятно води до рязкото подобряване взаимодействието им с клетките. (Kowalczyńska et al., 2005).

Всъщност, пропускливостта на АН-АМПС мембраните зависи от пропорцията на ПАН хомополимер и АН-АМПС кополимер в съединението. По-конкретно, изследваните съотношения на ПАН с АН-АМПС ко-полимера, бяха 75:25 и 50:50 (%). Фазовото разделяне на по-хидрофилния ко-полимер (АН-АМПС ко-полимер) е важно тъй като води до образуване стените на порите (Boom and van der Boomgaard, 1994). Подкрепящо доказателство за обогатяването на хидрофилния АН-АМПС ко-полимер дойде от АСМ измерванията показващи, че тези мембрани имат по-висока повърхностна неравност, отколкото чистите ПАН (P/A 100/0) и АН-АМПС (P/A-0/100) (виж Фиг.10), като нехомогенното разпределение на хидрофилния АН-АМПС ко-полимер в сместа е най-вероятната причина за това. Заслужава да се отбележи, че подобни наблюдения са направени и за други полимерни системи показващи, че фазовото разделяне на полимери в сместа води до появата на повърхостни структури в наноразмерната скала (Dalby et al., 2002). Установената различна грапавост на повърхностите може да обясни също и извънредно силната омокряемост на АН-АМПС мембраните, в сравнение с чистия ПАН или чистия АМПС, което пък значително подобрява и взаимодействието им с клетки. От друга страна, повърхностната поръзност на мембраните е увеличена в сместа, което също може да допринесе за по-силно омокряне (Callwaert et al., 2005). Силно хидрофилните повърхности по принцип подпомагат клетъчното прикрепване, но могат и да го намалят, като това зависи и от химичния състав на повърхността. Полярните хидрофилни групи като хидроксилни или етерни могат да доведат до силно привличане и подреждане на водата, докато заредените групи като карбоксилни и сулфонови засилват белтъчната адсорбция и като следствие, подобряват клетъчното прикрепване. От друга страна високата грапавина на полимерните мембрани може допълнително да подпомагане процеса на клетъчно прикрепване.

Проведените от нас биологични експерименти имаха за цел да потвърдят предположението, че включването на АМПС е подходящо за култивирането на хепатоцити поради внасянето на хидрофилен компонент в системата. Опитите бяха разширени, за да проверим дали и биологичният отговор на хепатоцитите може да бъде контролиран до някаква степен от количеството АН-АМПС в сместа. Ако всички получени резултати се резюмират, ще се стигне до една най-обща корелация между клетъчната морфология, растеж и функционална активност. Първото нещо, което прави впечатление е, че при визуализирането на прикрепените клетки с ФДА след 24 ч. не се наблюдават особени различия между мембраните, с изключение на чистия АМПС, където клетките са склонни да се отлепват. Беше наблюдавана и ясна тенденция за подобро клетъчно разстилане върху смесените P/A-75/25 и P/A-50/50 мембрани (виж Фиг.11.).



Също така беше установено, че разстилането на клетките в смесените П/А мембрани е съпроводено с по-добре изразени фокално-адхезионни комплекси (виж Фиг.12, ляв панел) свидетелстващо за по-добро клетъчно взаимодействие, като при P/A-50/50 мембраните развитието на фокалните адхезионни комплекси беше най-добро (виж Фиг.12).

Изненадващо, E-кадхерините бяха също добре организирани в смесените П/А проби. Така, по-високата хидрофилност и неравност изглежда се отразяват положително както на началното клетъчно взаимодействие, така и на междуклетъчно взаимодействие, което най-вероятно е предпоставка и за добър клетъчен растеж върху тези полимерни мембрани (Garcia and Boettiger, 1999). Нашите изследвания, обаче показват, че на седмия ден от култивирането, най-добър клетъчен растеж се наблюдава върху P/A 100/0, следвано от P/A 75/25 мембраната, ако се съди по ЛДХ анализа (виж Фиг.13), но и ФДА оцветяването също подкрепя това. По-малък брой клетки бяха установени върху P/A-0/100, при това с по-окръглена форма говореше за нарушено клетъчно взаимодействие със субстрата.

Тъй като междуклетъчните контакти също са важни за функционирането на хепатоцитите (Bartolo and Set, 2002) това обеснява максималната метаболитна активност наблюдавана при P/A-50/50 мембраните (виж. Фиг.12, ляв панел P/A50/50). Ако се вземе предвид обаче, че клетъчният брой беше сравнително висок върху P/A-100/0 мембраната, най-високата метаболитна активност там е лесно обяснима. За P/A-0/100, обаче клетъчният брой беше нисък, което показва, че АМПС по-скоро повишава индивидуалната метаболитна активност на СЗА клетките.

Друго доказателство за повишената функционална активност на хепатобластомните клетки е тяхната способност да секретират ФН, която беше най-добра при мембраните с по-високо АМПС съдържание, най-много ФН се синтезира при P/A-50/50, следвано от P/A-0/100 (виж Фиг. 14). Трябва да се отбележи, че ФН е основен адхезивен гликопротеин в биологичните течности и както беше отбелязано по-рано, е особено важен за клетъчното взаимодействие с чужди материали (Garcia and Boettiger, 1999; Bartolo, 2002; Kasemo and Lausmaa, 1991). Така, секретирания ФН вероятно води и до допълнително подобро взаимодействие на клетките със тези мембрани особено при по-продължително култивиране (Kostadinova et al., 2009).

В резюме, можем да заключим, че чрез промяна в състава на ПАН-АМПС мембраните може да се модулира взаимодействието с хепатоцитите. Мембраните произведени от P/A-50/50, освен че притежават желаните транспортни свойства съчетават и една способност да стимулират клетъчната активност. Тези данни, които са в съгласие с предишни изследвания (Grant et al., 2005), както и доказателствата за добра кръвна съвместимост на АМПС (Paneva et al., 2003), показват, че тези мембрани са изключително подходящи за приложение в биохибридни чернодробно-заместващи системи.

## ИЗВОДИ

1. Доказано е, че човешките фибробласти взаимодействат изненадващо добре с ПЕГ модифицирани повърхности. Показано е, че:

- Пре-адсорбцията с фибронектин подпомага прикрепването на фибробластите

- Установен е оптимум на клетъчното взаимодействие при ПЕГ 6000 т.е. при модификация със средна дължина на веригите
- ПЕГ повърхностите адсорбират фибронектин слабо, но той е с висока активност

2. От изследване взаимодействието на човешки фибробласти с модифицирани ПДМС повърхности е установено, че:

- Обработването с Ag<sup>+</sup> плазма открива нова възможност за биофункционализиране на ПДМС
- Съществува пряка зависимост между началното клетъчно взаимодействие и хидрофилността на модифицираните ПДМС повърхности
- Предложена е многоетапна процедура за биофункционализиране на ПДМС, завършваща с имобилизирането на колаген, чрез използването на гъвкава ПЕГ връзка
- имобилизирането на колаген чрез гъвкава връзка подобрява съществено клетъчното взаимодействие
- клетъчното взаимодействие зависи от дължината на тази гъвкава връзка; най-добра е при ди-NH<sub>2</sub>-ПЕГ 6000, което обезпечава оптимален достъп до клетъчно-свързващите места на колагеновите молекули

3. От изследване взаимодействието на хепатоцити с различни синтетични мембрани е установено, че:

- Промените в състава на мембраните довеждат до съществени промени и в техните повърхностни свойства, като хидрофилност, пропускливост и грапавост
- Чрез промяна в състава на ПАН-АМПС мембраните може да се модулира взаимодействието с хепатоцити
- мембраната със състав P/A-50/50 отговаря на нуждите за изкуствен черен дроб: притежава желаните транспортни свойства и подпомага функционалната активност на клетките

## НАУЧНИ И НАУЧНОПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ

Основен принос на представения дисертационен труд се свежда до участие в създаването на няколко типа модифицирани повърхности (ПЕГ, ПДМС/ПЕГ и колаген) показващи подобро клетъчно взаимодействие, които биха могли да намерят приложение в регенеративната медицина, като подложки за култивиране на клетки и тъканно инженерство, както и като биоматериал за биоинтегриращи се импланти. Оптимизирани са операционните условия за получаване и евентуално производство на модифицирани ПДМС повърхности с подходящ хидрофилно-хидрофобен баланс и благоприятни начални клетъчни взаимодействия.

Освен това дисертанта е участвал като водещ автор в разработването на уникална полимерна мембрана, представляваща бленд от ПАН/АМПС, която притежава едновременно необходимите транспортни свойства и способност да стимулира клетъчната активност на хепатоцитите - предпоставка за успешно приложение в биохибридните чернодробно-заместващи системи.

### Публикации във връзка с дисертационния труд

1. Vladkova T., Krasteva N., **Kostadinova A.**, Altankov G., Preparation of PEG-coated surfaces and a study for their interaction with living cells. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 10 (6), pp. 609-620. (1999)  
IF 1.416
2. Keranov, T., Vladkova, M., Minchev, **A. Kostadinova**, G. Altankov, P. Dineff, Topo-graphy Characterization and Initial Cellular Interaction of Plasma Based Ar+ Beam Treated PDMS Surfaces. *J. Appl. Polym. Sci.*, 111(5), 2637-2646. (2008)  
IF 1.306
3. Keranov, T. Vladkova, M. Minchev, **A. Kostadinova**, G. Altankov, Preparation, Characterisation and Cellular Interactions of Collagen Immobilized PDMS Surfaces. *J. Appl. Polym. Si.*, 110 (1), 321-330. (2008)  
IF 1.306
4. **Aneliya Kostadinova**, Barbara Seifert, Wolfgang Albrecht, Guenter Malsch, Thomas Groth, Andreas Lendlein, George Altankov, Novel Polymer Blends for the Preparation of Membranes for Biohybrids Liver Systems. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 20 (5-6) 821-839. (2009)  
IF 1.416
5. G. Altankov, T. Vladkova, N. Krasteva, **A. Kostadinova**, I. Keranov, Preparation of protein repellent PEI / PEG coatings and fibronectin reorganization study on the coated surfaces. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 44, 4, 333-340. (2009)

## Участия в научни конференции и семинари

1. T. Vladkova, M. Malmstein, N. Krasteva, **A. Kostadinova**, G. Altankov. PEG-coated biomedical surfaces studied for their interaction with living cells. *9<sup>th</sup> International Conference on Surface and Colloid Science*, , Sofia, Bulgaria 6-12 July, (1997)
2. G. Altankov, T. Vladkova, N. Krasteva, **A. Kostadinova** Fibroblasts and fibronectin on PEG-Coated surfaces. Abstracts of European Cells and Materials II *The Cell-Biomaterial Interaction*. Page 33 Volume No 1 – Suppl.t 2 - Davos, Switzerland June 25th-28th (2001)
3. **A. Kostadinova** Studing the adhesion and growth of C3A cells on different syntetic membranes to choose the best biocampability membrane and put in the perfusion culture contener *Десета юбилейна научна сесия на БФ*. 20-21.11.2003 Sofia
4. B. Seifert, **A. Kostadinova**, W. Albrecht, T. Groth, G. Altankov, A. Lendlein Membranes made of P(AN/AMPS) copolymers for hepatocyte cultivation in bioreactors. *Int. J Artif Organs* 2005; 28(5):511. Presentation, Engineering With Membranes 2005, Camogli, Italy May (2005 a)
5. B. Seifert, **A. Kostadinova**, W. Albrecht, T. Groth, G. Altankov, A. Lendlein Membranes made of P(AN/AMPS) copolymers for hepatocyte cultivation in Bioreactors. *International Journal of Artificial Organs* 28(5), 511 (2005)
6. **A. Kostadinova** B. Seifert, W. Albrecht, T. Groth, G. Altankov. Development of membranes for biohybrid liver assists devices. PAN/AMPS composite membranes and hepatocyte interaction. *Methods and Technology Scientific Slanchev Briag* 1 juni 2006., 8 (2006)
7. I. Keranov, T. Vladkova, S. Kitova, **A. Kostadinova**, P. Dineff, G. Altankov, Preparation, Characterization and Cellular Interactions of Collagen Immobilized PDMS Surfaces via Plasma Based Ar<sup>+</sup> Beam Induced Multi-Step Procedure, *Int. Fachtagung "TECHNOMER 2007"*, Hemnitz (Germany), November 15-17, (2007)
8. **A. Kostadinova**, I. Keranov, N. Zaekov, Materials, Articles Acryl acid grafted PDMS preliminary activated by Ar<sup>+</sup> beam plasma and cell observation. *Methods and Technology Scientific* 2007., 83-87 (2007)

## Забелязани цитати

Vladkova T., Krasteva N., **Kostadinova A.**, Altankov G., Preparation of PEG-coated surfaces and a study for their interaction with living cells. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 10 (6), pp. 609-620. (1999)

1. Bioactive materials for biomedical applications using sol-gel technology  
Author(s): Gupta R, Kumar A Source: BIOMEDICAL MATERIALS Volume: 3  
Issue: 3 Article Number: 034005 Published: SEP 2008

2. Low-fouling amine-terminated poly(ethylene glycol) thin layers and effect of immobilization conditions on their mechanical and physicochemical properties .Author(s): Martin Y, Vermette PSource: MACROMOLECULES Volume: 39 Issue: 23 Pages: 8083-8091 Published: NOV 14 2006
3. Surface grafting of phenolic resole onto LDPE films Author(s): Cheng J, Zheng Y., Yang, W.T. Source: CHINESE CHEMICAL LETTERS Volume: 17 Issue: 8 Pages: 1133-1136 Published: AUG 2006
- 4.Endotoxin removal from whole blood by a novel adsorption resin: Efficiency and hemocompatibilityAmoureux, M.-C., Rajapakse, N., Hegyi, E., Le, D., Grandics, P., Szathmary, S. International Journal of Artificial Organs 27 (6), pp. 480-487
- 5.Polymer surface with graft chainsKato, K., Uchida, E., Kang, E.-T., Uyama, Y., Ikada, Y. Progress in Polymer Science (Oxford) 28 (2), pp. 209-259
- 6.Immobilized gellan sulfate surface for cell adhesion and multiplication: Development of cell-hybrid biomaterials using self-produced fibronectinMiyamoto, K., Kanemoto, A., Hashimoto, K., Tokita, M., Komai, TInternational Journal of Biological Macromolecules 30 (2), pp. 75-80.
- 7.Silica-based hybrid materials as biocompatible coatings for glucose sensorsKros, A., Gerritsen, M., Sprakel, V.S.I., Sommerdijk, N.A.J.M., Jansen, J.A., Nolte, R.J.M. Sensors and Actuators, B: Chemical 81 (1), pp. 68-75
- 8.Improving biomaterial properties of collagen films by chemical modificationTiller, J.C., Bonner, G., Pan, L.-C., Klibanov, A.M. Biotechnology and Bioengineering 73 (3), pp. 246-252
- 9.Self-assembly of poly(ethylene glycol)-based block copolymers for biomedical applicationOtsuka, H., Nagasaki, Y., Kataoka, K. Current Opinion in Colloid and Interface Science 6 (1), pp. 3-10
- 10 Biocompatibility evaluation of dental metal alloys in vitro: Expression of extracellular matrix molecules and its relationship to cell proliferation ratesGrill, V., Sandrucci, M.A., Lenarda, R.D., Cadenaro, M., Narducci, P., Bareggi, R., Martelli, A.M. Journal of Biomedical Materials Research 52 (3), pp. 479-487

Keranov, T. Vladkova, M. Minchev, **A. Kostadinova**, G. Altankov, Preparation, Characterisation and Cellular Interactions of Collagen Immobilized PDMS Surfaces. *J. Appl. Polym. Si.*, 110 (1), 321-330. (2008)

1. The molecular surface conformation of surface-tethered polyelectrolytes on PDMS surfaces Author(s): Shi Q, Ye S, Spanninga SA, et al. Source: SOFT MATTER Volume: 5 Issue: 18 Pages: 3487-3494 Published: 2009
2. Integrating polyurethane culture substrates into poly(dimethylsiloxane) microdevices. Author(s): Moraes C, Kagoma YK, Beca BM, Source: BIOMATERIALS Volume: 30 Issue: 28 Pages: 5241-5250 Published: OCT 2009