

## Характер распластывания и структура цитоскелета мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при культивировании на хитозановых матрицах

А.В. Кисель<sup>1</sup>, В.В. Киروشка<sup>2</sup>, Т.П. Бондаренко<sup>1,2</sup>, В.А. Петрова<sup>3</sup>, Ю.Г. Баклагина<sup>3</sup>, Д.Д. Черняков<sup>4</sup>, Ю.А. Скорик<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Харьковский национальный университетим. В.Н. Каразина, г. Харьков

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>3</sup>Институт высокомолекулярных соединений РАН, Россия

<sup>4</sup>Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Россия

## Character of Spreading and Cytoskeleton Structure of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Cultured on Chitosan Scaffolds

A.V. Kisil<sup>1</sup>, V.V. Kiroshka<sup>2</sup>, T.P. Bondarenko<sup>1,2</sup>, V.A. Petrova<sup>3</sup>,

Yu.G. Baklagina<sup>3</sup>, D.D. Chernyakov<sup>4</sup>, Yu.A. Skorik<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

<sup>3</sup>Institute of Macromolecular Compounds of Russian Academy of Sciences, Russia

<sup>4</sup>St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy, Russia

В настоящее время биополимерные матрицы на основе хитозана широко применяются в области тканевой инженерии. Микроструктура таких матриц – один из факторов, определяющих адгезивные характеристики, скорость пролиферации и направленность дифференцировки клеток. Цель данной работы – исследование характера распластывания, структуры цитоскелета и пролиферации мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (МСК КМ) при культивировании на хитозановых матрицах (ХМ) с различной микроструктурой.

Для визуализации актинового цитоскелета МСК КМ после 2-х суток культивирования на ХМ использовали метод флуоресцентного окрашивания «TRITC-conjugated Phalloidin» («Sigma», США) в концентрации 1:1000. Форму и распластывание клеток при культивировании на ХМ оценивали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа «AmScope XYL-403» (Китай). Пролиферацию клеток изучали на 1-е, 3-и и 5-е сутки культивирования с помощью МТТ-теста. Исследовали ХМ («Биопрогресс», Россия) следующих групп: А – выдержанные в вакууме при 60°C в течение 6-ти суток (солевая форма); В – без термообработки, обработанные 2%-м раствором аммония и переведенные в основную форму. Хитиновые матрицы обеих групп содержали частицы nano-chit в концентрации 1 и 5%. Частицы nano-chit размером 0,1–0,2 мм получали из фракции  $\alpha$ -хитина.

Установлено, что показатель пористости ХМ группы А был значимо выше, чем группы В (0,286 и 0,583 на  $\text{см}^3$  соответственно). При введении в состав ХМ 5% nano-chit изменялась пористость ХМ. Так, в группе А этот показатель снижался до 0,173 на  $\text{см}^3$ , тогда как в группе В повышался до 0,787  $\text{см}^3$ .

При культивировании на образцах ХМ (группа А – 5% nano-chit и группа В – 5% nano-chit) МСК КМ имели веретенообразную или фибробластоподобную форму, что характерно для культивирования данного типа клеток на пластике. Микрофиламенты актина были равномерно распределены по всему объему цитоплазмы. Следует отметить, что при культивировании на ХМ площадь распластывания и форма клеток группы В были сопоставимы с контролем. Установлено, что динамика роста МСК КМ на ХМ группы А и А – 5% nano-chit была ниже, чем на ХМ группы В и В – 5% nano-chit и пластике.

Таким образом, можно сделать вывод, что поведение в культуре МСК КМ на ХМ определяется микроструктурой субстрата.

Nowadays the chitosan-based biopolymer scaffolds are widely applied in tissue engineering. The microstructure of these matrices is one of the factors, determining adhesive characteristics, proliferation rate and direction of cell differentiation. The research objective was to study the character of spreading, cytoskeleton structure and proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells (BM MSCs) cultured on chitosan scaffolds (CS) with different microstructure.

To visualize actin cytoskeleton after 2 days of culture on CS the BM MSCs were stained with fluorescent TRITC-conjugated Phalloidin (Sigma, USA) in 1:1000 concentration. Cell shape and spreading during culture on CS were assessed with inverted fluorescent microscope (AmScope XYL-403). Cell proliferation was studied to days 1, 3 and 4 of culture with MTT-test. We studied the CS (Bioprogres, Russia) divided to the following groups: the group A comprised the specimens, exposed in vacuum at 60°C within 6 days (salt form); the group B consisted of scaffolds without thermal processing, treated with 2% ammonium solution and thereby transformed into the basic form. Chitosan scaffolds of both groups contained the nano-chit particles in 1 and 5% concentrations. The 0.1–0.2 mm nano-chit particles were procured from  $\alpha$ -chitin fraction.

The CS porosity index in group A was established to be much higher, than in group B (0.286 and 0.583 per  $\text{cm}^3$ , respectively). When introducing 5% nano-chit into the CS its porosity was changed. In group A this index reduced down to 0.173 per  $\text{cm}^3$ , and in group B it increased up to 0.787 per  $\text{cm}^3$ .

During culture on CS samples (groups A and B both with 5% nano-chit) the BM MSCs were of spindle or polygonal shape, typical for cells cultured on plastic. The actin microfilaments were uniformly distributed in the entire cytoplasm. Of note was the fact, that the spreading area and the shape of cultured cells of group B were close to the control indices. The dynamics of BM MSCs growth on CS in group A and group A with 5% nano-chit was lower than in the cells of group B and group B with 5% nano-chit or cultured on plastic.

Thus the behaviour of BM MSCs during culture on CS depends on a substrate microstructure.

