

УДК 576.535

Композитные матриксы на основе фиброина шелка, желатина и гидроксиапатита для регенеративной медицины и культивирования клеток в трехмерной культуре

М. М. Мойсенович¹, А. Ю. Архипова¹, А. А. Орлова¹, М. С. Друзцкая¹, С. В. Волкова¹, С. Е. Захаров¹, И. И. Агапов^{2##}, М. П. Кирпичников^{1#}

¹Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

²ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова Минздрава РФ, 123182, Москва, ул. Щукинская, 1

Авторы, внесшие одинаковый вклад в работу (расположены в алфавитном порядке).

*E-mail: igor_agarov@mail.ru

Поступила в редакцию 01.08.2013

РЕФЕРАТ Трехмерные матриксы на основе регенерированного фиброина шелка были модифицированы компонентом костной ткани – наногидроксиапатитом и/или производным коллагена – желатином. Модификация одним из этих компонентов приводила к усилению адгезии и пролиферации эмбриональных фибробластов мышцы (МЭФ) на поверхности матриксов. При этом адгезия и пролиферация МЭФ на поверхности матрикса, содержащего одновременно две композитные добавки, достоверно выше, чем в присутствии одной из композитных добавок. Полученные композитные матриксы могут использоваться для ускорения заживления ран, регенерации костной и других тканей, создания биоискусственных органов. Кроме того, они пригодны для создания модельных систем, предназначенных для изучения *in vitro* взаимодействия клеток с субстратом, миграции клеток и других процессов, полноценное изучение которых в двумерных клеточных модельных системах невозможно.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА адгезия, гидроксиапатит, желатин, композитные биodeградируемые матриксы, пролиферация, фиброин.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ GFP (green fluorescent protein) – зеленый флуоресцентный белок; RGD – трипептид Arg, Gly, Asp, участвующий в адгезии клеток; ГА – гидроксиапатит; КЛСМ – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия; МЭФ – эмбриональные фибробласты мышцы; СЭМ – сканирующая электронная микроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка и совершенствование способов восстановления поврежденных или утраченных органов и фрагментов тканей, создание биоискусственных органов – важнейшие задачи современной тканевой инженерии и регенеративной медицины. Технологические прорывы в этих областях возможны при использовании биоматериалов, способных поддерживать адгезию и пролиферацию клеток, обладающих низкой иммуногенностью и со временем деградирующих до химических производных, не наносящих вред организму. Примерами таких современных материалов могут быть бактериальные полиоксикалканаты [1]. Существенным преимуще-

ством данных полимеров являются их уникальные механические свойства, пластичность, способность выдерживать обработку экструзионными методами. Из бактериальных полиоксикалканатов возможно изготовление изделий сложной формы, что делает эту группу материалов перспективными в развитии 3D-прототипирования. Эти материалы уступают в таком показателе, как биосовместимость, коллагену и другим компонентам внеклеточного матрикса. При этом сам коллаген имеет существенные ограничения в использовании из-за своих механических свойств. Изделия из фиброина шелка обладают хорошими показателями биосовместимости в сочетании с высокой механической прочностью и эла-

стичностью. Другие важные преимущества шелка: доступность, возможность получения водных растворов, способность к биологическому разложению с образованием аминокислот, термостабильность, наличие легкодоступных химических групп для функциональных модификаций, устойчивость к радиации, возможность газовой стерилизации, а также приготовления композитных материалов [2, 3]. Увеличивается число публикаций и ссылок на работы, посвященные использованию фиброина для регенерации различных органов и тканей: сухожилий, связок, хрящей, костной ткани, кожи, печени, трахеи, нервов, роговицы, барабанной перепонки, мочевого пузыря, что указывает на высокий потенциал данного полимера в качестве биомедицинского материала [4].

Ранее мы сравнили свойства матриксов из фиброина и из рекомбинантного спидроина. Эти исследования показали, что регенерированный фиброин поддерживает адгезию и пролиферацию фибробластов, одного из основных компонентов, вовлеченных в процессы заживления ран и регенерации тканей, существенно хуже, чем субстрат, сформированный полимеризованным рекомбинантным спидроином из *Nephila clavipes*. Возможно, именно из-за пониженной способности поддерживать адгезию клеток и их пролиферацию регенеративная способность фиброиновых матриксов в экспериментах с искусственным повреждением кости у животных была существенно хуже, чем у спидроиновых. Регенеративные свойства фиброиновых матриксов в подобных опытах удалось существенно улучшить за счет их минерализации наногидроксиапатитом [5]. В нашей работе с целью повышения способности поддерживать адгезию и пролиферацию фибробластов в состав фиброиновых матриксов одновременно ввели две композитные добавки – компонент костной ткани наногидроксиапатит и производное коллагена – желатин. Показано, что композитный субстрат, сформированный всеми тремя компонентами, оптимален для поддержания адгезии и пролиферации МЭФ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Коконы тутового шелкопряда *Bombyx mori* были предоставлены директором Республиканской научно-исследовательской станции шелководства Российской академии сельскохозяйственных наук В.В. Богословским (Ставропольский край, г. Железноводск). Для получения чистого фиброина шелк из коконов подвергали очистке методом «десерицинизации». Серицин и другие примеси из коконов удаляли кипячением в течение 1.5 ч в 0.03 М растворе NaHCO_3 (рН 8.4), промывали водой и высушивали. Гидрок-

сиапатит природного происхождения предоставлен проф. В.В. Гузеевым (Северский технологический институт, Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»).

Изготовление матриксов

Для получения матриксов навеску фиброина (250 мг) растворяли в 1000 мкл 10% раствора хлористого лития в 90% муравьиной кислоте в течение 30 мин при температуре 60–70°C. При изготовлении композитных матриксов с 10% содержанием желатина использовали смесь из 225 мг фиброина и 25 мг желатина в 1000 мкл раствора. Полученный раствор центрифугировали в течение 5 мин при 12100g, супернатант использовали для формирования матриксов. 50 мкл подогретого супернатанта послойно помещали в форму, смешивая со 100 мг хлорида натрия, варьируя размер частиц. В качестве порообразующего агента использовали кристаллы NaCl диаметром 150–300 мкм. Для изготовления композитных матриксов с 30% содержанием ГА навеску порошкообразного ГА смешивали с порообразующими частицами хлорида натрия диаметром 150–300 мкм. Концентрацию частиц соли подбирали таким образом, чтобы получить матрикс со сложной внутренней пористой поверхностью, не содержащей изолированных полостей. Полученные образцы высушивали в течение 3 ч при температуре 75–80°C, далее выдерживали при комнатной температуре в течение 16 ч. Полученные матриксы в течение 120 мин обрабатывали 96% этанолом, отмывали бидистиллированной водой (120 мин), дегазировали и хранили в 70% этаноле.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Структуру матриксов изучали с использованием сканирующей электронной микроскопии.

Образцы для электронной микроскопии подготавливали стандартным методом, включающим фиксацию глутаровым альдегидом, обезвоживание возрастающими концентрациями этанола и ацетона. Далее препараты высушивали методом перехода критической точки в приборе HCP-2 critical point dryer (Hitachi Ltd., Япония). Образцы напыляли слоем золота толщиной 20 нм в атмосфере аргона при ионном токе 6 мА и давлении 0.1 мм рт. ст. на приборе Ion Coater IB-3 (Eiko Engineering, Мито, Япония). Для сканирующей электронной микроскопии использовали Camscan S2 (Cambridge Instruments, Кембридж, Великобритания) в режиме SEI. Разрешение микроскопа 10 нм, рабочее напряжение 20 кВ. Изображения были получены с использованием программного обеспечения MicroCapture (SMA, РФ).

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ)

Использовали конфокальную лазерную сканирующую систему производства «Никон Корпорейшн» (Япония) – микроскоп медико-биологический инвертированный для лабораторных исследований Eclipse с конфокальным модулем A1. Для достижения высокого разрешения изображений получали серии оптических срезов с установленным согласно рекомендациям производителей размером пинхола (pinhole), лазеров и анализирующих фильтров.

Получение первичной культуры эмбриональных фибробластов мыши, экспрессирующих GFP

Клетки МЭФ получали из эмбрионов GFP+ на 13.5 день внутриутробного развития. Для получения датированной беременности двух самок линии C57Bl/6 подсаживали к самцу GFP+ на ночь, утром у самок проверяли наличие копулятивной пробки. Момент обнаружения копулятивной пробки считали 0.5-м днем беременности. На 13.5 день беременности мышью эвтаназируют, извлекали матку, у эмбрионов удаляли голову и внутренние органы, определяли в них экспрессию GFP на УФ-трансиллюминаторе. Оставшиеся ткани измельчали глазными ножницами в стерильных условиях, диссоциировали в 0.05% растворе трипсин/EDTA и центрифугировали в течение 5 мин при 1000 об/мин, а затем клеточную суспензию переносили во флакон площадью 25 см² для адгезивных культур (Grenier). Далее клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 4.5 г/л глюкозы (HyClone) и 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone), при 37°C в условиях 5% CO₂ и 95% влажности. Каждые 3 дня при достижении 80–85% монослая клетки рассеивали в соотношении 1 : 3.

Самки линии C57Bl/6 получены из питомника для лабораторных животных «Пушино» (ФИБХ РАН), трансгенные самцы с экспрессией GFP любезно предоставлены Н.Н. Логуновой (ЦНИИТ РАМН).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы создали матрицы из фиброина шелка [6], а также матрицы на основе фиброина шелка и ГА [5], и изучили биологические свойства экспериментальных образцов. Матрицы являются биосовместимыми, механически прочными, пористыми и обладают всеми необходимыми свойствами для применения в костной хирургии. В результате данной работы получены матрицы на основе фиброина шелка, композитные матрицы на основе фиброина шелка и желатина, на основе фиброина шелка и ГА, а также композитные матрицы, содержащие три основных компонента: фиброин шелка, желатин и ГА (рис. 1). Для создания этих матриц

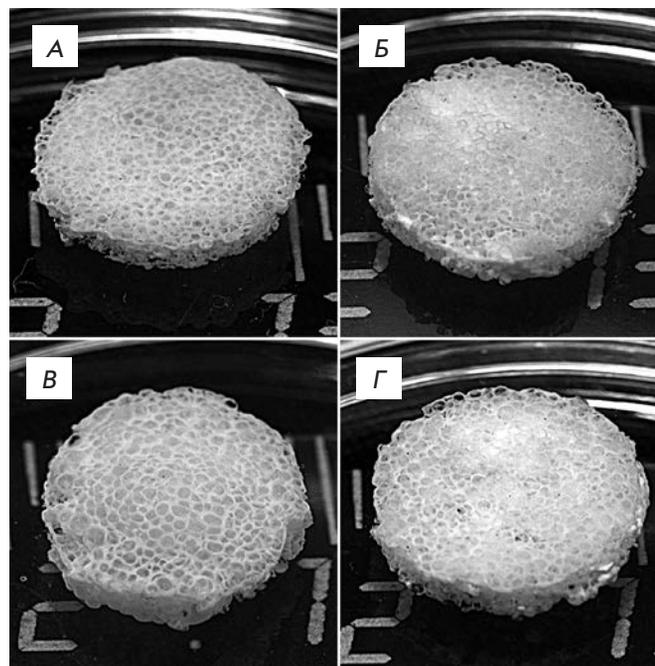


Рис. 1. Внешний вид трехмерных пористых матриц на основе фиброина шелка (А) и композитных матриц на основе фиброина шелка и желатина (Б), фиброина шелка и гидроксиапатита (В), фиброина шелка, желатина и гидроксиапатита (Г). Введение в структуру матрикса желатина и гидроксиапатита не приводит к изменениям его внешнего вида

был выбран порообразующий агент с заданным диаметром частиц.

Полученные экспериментальные образцы поддерживали свою целостность, принимали заданную цилиндрическую форму и не разрушались. Композитные матрицы на основе фиброина шелка и желатина упруго деформировались при непосредственном механическом нажатии, на основе фиброина шелка и ГА – не деформировались. Диаметр пор матриц, изготовленных методом выщелачивания, соответствовал внесенным частицам порообразователя (150–300 мкм).

Поверхность изделий изучали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (рис. 2). Полученные матрицы имели ячеистую сетчатую структуру. Порообразователь полностью вымывался из структуры матрикса, какие-либо его остатки нигде не были обнаружены (рис. 2, 3). Соединенность пор матрикса была подтверждена тестом на проницаемость трехмерных конструкций для суспендированных окрашенных частиц туши.

Изучение структуры образцов показало, что количество желатина и ГА, внесенного в составе ком-

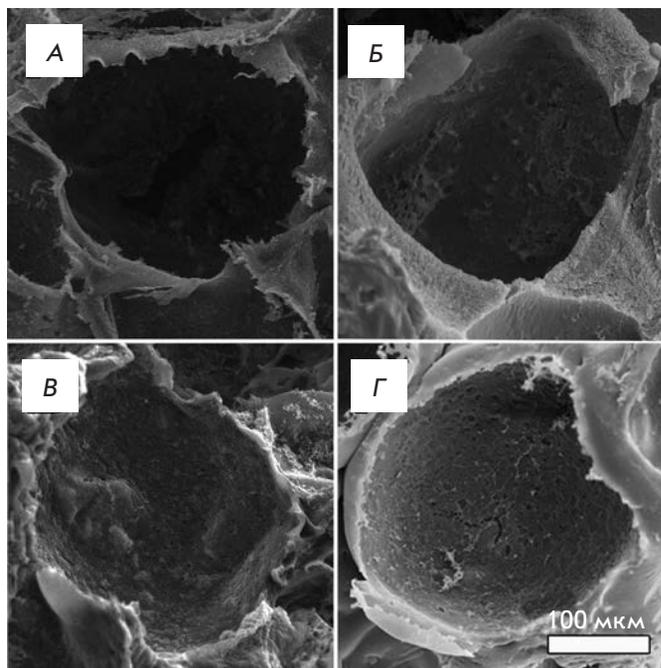


Рис. 2. Структура трехмерных пористых матриц на основе фиброина шелка (А) и композитных матриц на основе фиброина шелка и желатина (Б), гидроксиапатита (В), желатина и гидроксиапатита (Г). Изображения получены методом сканирующей электронной микроскопии. Введение в структуру матрикса желатина и гидроксиапатита не приводит к изменению размера пор и общей структуры матриц

позитного матрикса, не влияет на соединенность пор, внешний вид изделий, проницаемость для окрашенных частиц туши. Пористость и внешний вид трех опытных образцов матриц были абсолютно идентичны. Это связано с тем, что пористость определяется свойствами порообразователя, который формирует поры диаметром 150–300 мкм, и не зависит от количества добавленного желатина и ГА.

Диаметр пор обуславливает механические свойства конструкции, скорость биодеградации, взаимодействие клеток с поверхностью матрикса, а также влияет на тканевый ответ после имплантации. Большой размер пор способствует лучшему и более быстрому врастанию новообразованной ткани, ее васкуляризации и более эффективной биорезорбции имплантата.

Незамкнутая структура матрикса необходима для трехмерного культивирования клеток. Поры, соединенные отверстиями и каналами, образуют сложную незамкнутую внутреннюю поверхность, способствующую миграции клеток во внутренние слои искусственного матрикса. Незамкнутое строе-

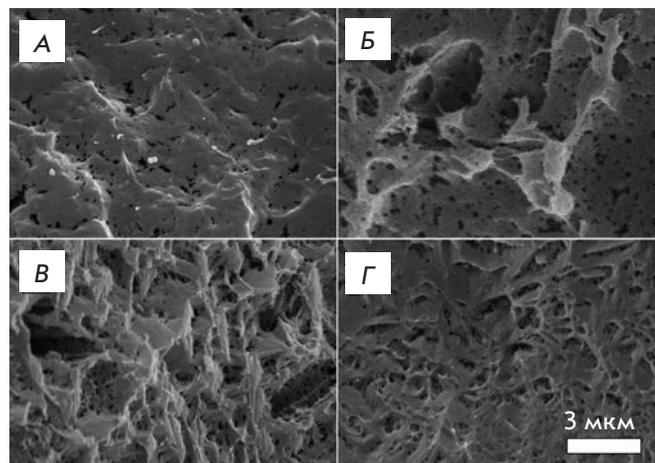


Рис. 3. Поверхность стенки поры матриц на основе фиброина шелка (А) и композитных матриц на основе фиброина шелка и желатина (Б), гидроксиапатита (В), желатина и гидроксиапатита (Г). Изображения получены методом сканирующей электронной микроскопии. Введение в структуру матрикса гидроксиапатита и желатина приводит к изменению тонкой архитектуры поверхности пор матрикса

ние пор также обеспечивает обмен питательной среды, удаление продуктов метаболизма и таким образом способствует созданию гомогенной среды внутри матриц [5, 7–9].

Изучение матриц методом КЛСМ показало, что водная среда ни непосредственно после погружения, ни через 1 ч, ни через 1 сут не влияет на целостность и пористость матриц как фибринового, так и всех композитных. Это очень важное свойство изделий, так как разрушение и изменение базовой структуры и физических свойств имплантата в водной среде может сделать невозможным его применение *in vivo*. Изделия не обладали какими-либо значительными гигроскопичными свойствами и не набухали, что позволило им сохранить заданные параметры.

Для поддержания жизнеспособности субстрат-зависимых клеток в трехмерной культуре необходима их адгезия на поверхность матрикса [10, 11]. Субстрат влияет на продукцию клетками компонентов внеклеточного матрикса, на его синтез и состав. Способность поддерживать адгезию клеток и их пролиферацию считается важным показателем биосовместимости *in vitro* материала, служащего субстратом [10–12]. Материал, оказывающий ингибирующее действие, будет замедлять восстановление тканей *in vivo*.

Фиброин шелка – белок, обладающий свойствами материала, необходимого для регенерации костной

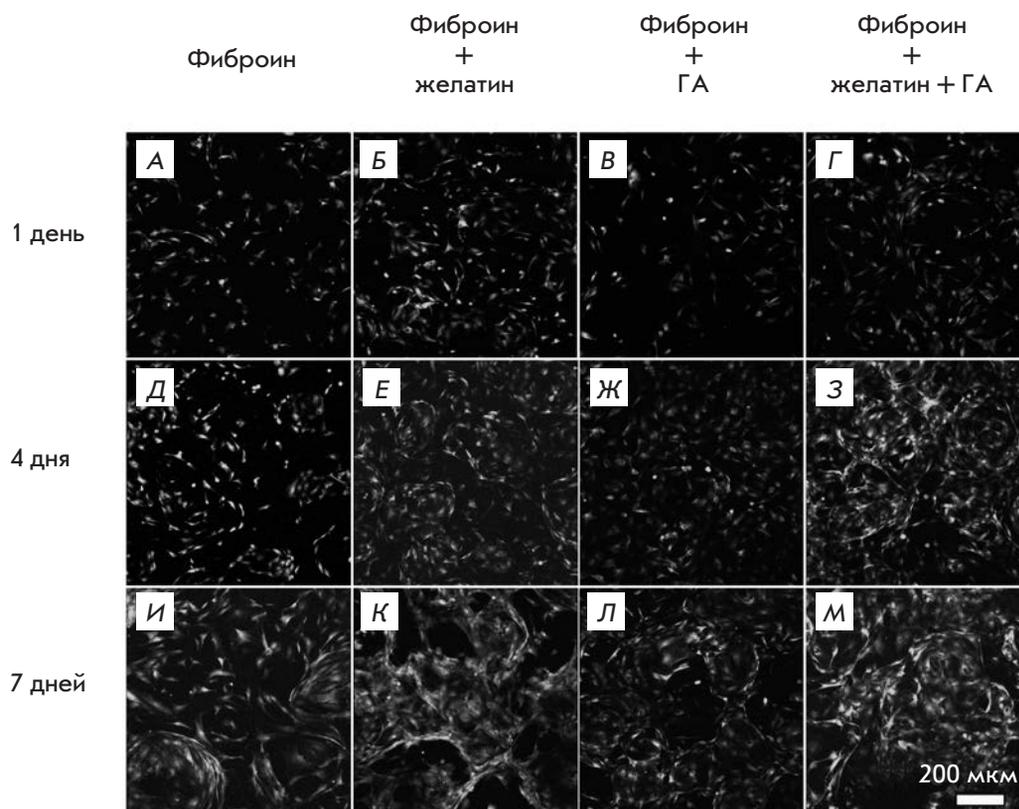


Рис. 4. Эмбриональные фибробласты мыши (МЭФ), экспрессирующие GFP на матриксах из фиброина шелка (А, Д, И) и композитных матриксах на основе фиброина шелка и желатина (Б, Е, К), гидроксиапатита (В, Ж, Л), желатина и гидроксиапатита (Г, З, М), через 1 (А–Г), 4 (Д–З) и 7 (И–М) дней культивирования. Представлены изображения проекции серий оптических срезов на плоскость

ткани. Фиброин не обладает канцерогенным, токсическим и аллергическим действием на организм, не вызывает местной воспалительной реакции, не провоцирует развитие инфекции, замещается со временем нативной тканью пациента, сохраняет функциональные свойства в течение предусмотренного срока и является высокопрочным материалом [5–7]

Фиброин – это амфифильный белок со значительным перевесом в сторону гидрофобности [13]. Его изоэлектрическая точка pI 4.2. По этой причине фиброин нерастворим в воде, разбавленных растворах многих кислот и щелочей [13], а при физиологическом значении pH 7 становится отрицательно заряженным, в отличие от положительно заряженного спидроина [5], что способствует снижению адгезии и увеличению скорости пролиферации клеток [5].

В качестве добавки в композитный материал использовали желатин – производное коллагена. Коллаген – основной фибриллярный компонент внеклеточного матрикса и соединительной ткани, имеет молекулярную массу 300 кДа и составляет около 30% общей массы белков у млекопитающих. Коллаген присутствует почти во всех типах ткани, обеспечивая прочность и структурную стабильность. Этот материал не токсичен и обладает слабыми аллергенными свойствами. К серьезным недостаткам коллагеновых матриксов можно отнести быстрое и лишь частично

регулируемое бифункциональными агентами время биодegradации, ограничивающее срок функционирования коллагеновых изделий 1 мес., и низкие механические свойства. Желатин является продуктом денатурации коллагена. Желатин содержит большое количество остатков глицина, пролина и 4-гидроксипролина, а также последовательности из трех аминокислот – аргинина, глицина и аспартата (RGD), с которыми связываются клеточные рецепторы интегрины, что обуславливает адгезию и пролиферацию клеток. Подобные последовательности найдены и в других белках внеклеточного матрикса. Однако использование их значительно увеличивает себестоимость изделий.

В ходе работы нами изучено влияние внесения добавок при изготовлении матрикса на адгезию и пролиферацию первичной культуры МЭФ. Фибробласты представляют собой гетерогенную популяцию клеток, способную продуцировать такие компоненты внеклеточного матрикса, как проколлаген, фибронектин, проэластин, глюкозаминогликаны, нидоген, ламинин, тенасцин, хондроитин-2-сульфат. Фибробласты активно участвуют в процессах заживления ран и эпителизации [14]. Кроме того, они способны к секреции факторов роста сосудистого эндотелия (VEGF), что стимулирует ангиогенез и образование лимфатических сосудов [15, 16]. Мы выбрали первич-

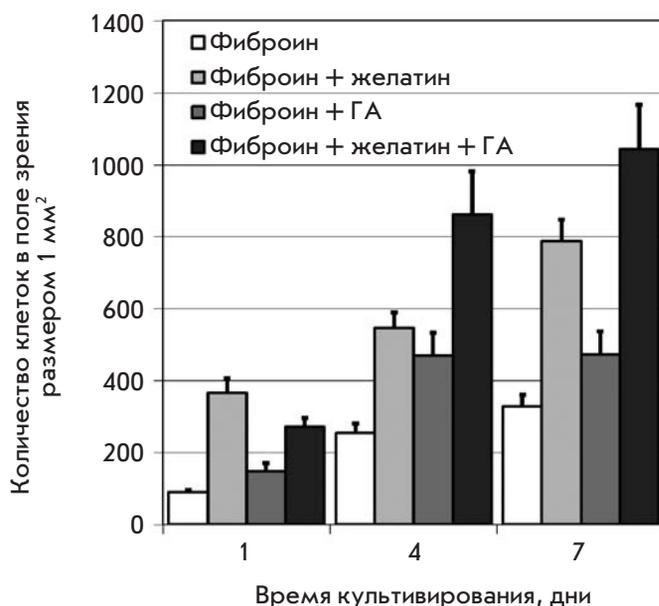


Рис. 5. Увеличение общего количества МЭФ при культивировании на трехмерных пористых матриксах на основе фиброина шелка и композитных материалов

ную культуру эмбриональных фибробластов мыши, пролиферативный потенциал которой больше, чем у клеток постнатальных культур.

Изображения, полученные методом КЛСМ, представляли собой серии горизонтальных оптических срезов матрикса. Для наблюдения были доступны клетки и структуры матрикса на глубине до 300 мкм (рис. 4). Изображения использовали для подсчета клеток. Проводили сравнительный анализ изменения во времени количества клеток, культивируемых на разных матриксах. Введение в структуру матрикса ГА и желатина увеличивает адгезию и ускоряет пролиферацию МЭФ (рис. 5). При этом одновременное включение в структуру и желатина, и ГА приводит к увеличению адгезии и скорости пролиферации.

Так через 1 сут количество клеток на композитном матриксе было в 2.5 раза больше, чем на матриксе из фиброина, а на 4 и 7 день разница увеличилась более чем в 3 раза.

ВЫВОДЫ

В результате проведенной работы были изготовлены матриксы на основе фиброина шелка, а также композитные матриксы с добавлением желатина и ГА. Такие матриксы обладают незамкнутой структурой, поддерживают свою целостность и не разрушаются при механических воздействиях. Модификация фиброиновых матриксов одновременно желатином и ГА изменяет свойства их поверхности. Эти изменения приводят к увеличению адгезии и пролиферации МЭФ в трехмерной культуре, что делает модифицированные матриксы перспективными для использования в регенеративной медицине, в частности при регенерации костной ткани. ●

Авторы благодарят руководителя лаборатории электронной микроскопии Г.Н. Давидовича из Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова за помощь в получении изображений СЭМ.

Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского государственного университета, и на оборудовании ЦКП Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ. Работа выполнена в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы» (государственный контракт № 14.512.11.0006 от 07.03.2013 г.), поддержана РФФИ (грант № 14-04-01799) и Сколковским институтом науки и технологий (Сколтех) в рамках SkolTech/MIT Initiative.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bonartsev A.P., Yakovlev S.G., Boskhomdzhev A.P., Zharkova I.I., Bagrov D.V., Myshkina V.L., Mahina T.K., Charitonova E.P., Samsonova O.V., Zernov A.L., et al. // PLoS One. 2013. V. 8. № 2. P. e57200.
- Zhao Ya., Yan X., Ding F., Yang Yu., Gu X. // J. Biomed. Sci. Engineering. 2011. V. 4. P. 397–402.
- Kundu B., Rajkhowa R., Kundu S.C., Wang X. // Adv. Drug Delivery Rev. 2013. V. 65. P. 457–470.
- Kasoju N., Bora U. // Adv. Healthcare Mater. 2012. V. 1. № 4. P. 393–412.
- Агапов И.И., Мойсенович М.М., Дружинина Т.В., Каменчук Я.А., Трофимов К.В., Васильева Т.В., Коньков А.С., Архипо-

- ва А.Ю., Соколова О.С., Гузеев В.В. и др. // ДАН. 2011. Т. 440. № 6. С. 830–833.
- Moisenovich M.M., Pustovalova O., Shackelford J., Vasiljeva T.V., Druzhinina T.V., Kamenchuk Y.A., Guzeev V.V., Sokolova O.S., Bogush V.G., Debabov V.G., et al. // Biomaterials. 2012. V. 33. № 15. P. 3887–3898.
- Moisenovich M.M., Pustovalova O.L., Arhipova A.Y., Vasiljeva T.V., Sokolova O.S., Bogush V.G., Debabov V.G., Sevastianov V.I., Kirpichnikov M.P., Agapov I.I., et al. // J. Biomed. Materials Res. 2011. V. 96. № 1. P. 125–131.
- Агапов И.И., Пустовалова О.Л., Мойсенович М.М., Богуш В.Г., Соколова О.С., Севастьянов В.И., Дебабов В.Г., Кирпичников М.П. // ДАН. 2009. Т. 426. № 1. С. 127–130.

9. Агапов И.И., Мойсенович М.М., Васильева Т.В., Пустовалова О.Л., Коньков А.С., Архипова А.Ю., Соколова О.С., Богуш В.Г., Севастьянов В.И., Дебабов В.Г. и др. // ДАН. 2010. Т. 433. № 5. С. 699–702.
10. Bacakova L., Filova E., Rypacek F., Svorcik V., Stary V. // *Physiol Res.* 2004. V. 53. P. S35–S45.
11. Saltzman M.W. // *Tissue Engineering: Engineering Principles for the Design of Replacement Organs and Tissues.* Oxford: Oxford Acad., 2004. 538 p.
12. Edwards S.L., Mitchell W., Matthews J.B., Ingham E., Russell S.J. // *AUTEX Res. J.* 2004. V. 4. P. 86–94.
13. Wenk E., Merkle H.P., Meinel L. // *J. Controlled Release.* 2010. V. 150. P. 128–141.
14. Werner S., Krieg T., Smola H. // *J. Invest. Dermatol.* 2007. V. 127. № 5. P. 998–1008.
15. Trompezinski S., Berthier-Vergnes O., Denis A., Schmitt D., Viac J. // *Exp. Dermatol.* 2004. V. 13. № 2. P. 98–105.
16. Bauer S.M., Bauer R.J., Liu Z.J., Chen H., Goldstein L., Velazquez O.C. // *J. Vasc. Surg.* 2005. V. 41. № 4. P. 699–707.