

УДК 576.535:57.089.67

ТРЕХМЕРНЫЙ МАТРИКС ИЗ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ПАУТИНЫ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

© 2009 г. **И. И. Агапов, О. Л. Пустовалова, М. М. Мойсенович, В. Г. Богуш,
О. С. Соколова, В. И. Севастьянов, член-корреспондент РАН В. Г. Дебабов,
академик М. П. Кирпичников**

Поступило 26.12.2008 г.

В настоящее время при разработке имплантируемых материалов для восстановительной и заместительной медицины предпочтение отдается полимерам природного происхождения (биополимерам) и их производным: альгинаты, коллаген, желатин, хитозан, гиалуроновая кислота, полиэферы бактериального происхождения [1]. Многие биополимеры, обладая высокой биосовместимостью, являются также высокоэффективными биостимуляторами. При имплантации они расщепляются на более простые соединения, которые выводятся из организма либо принимают активное участие в метаболизме на клеточном уровне [2–4].

В последние 10 лет в научной литературе наблюдается большой интерес к белкам каркасной нити пауков, который обусловлен впечатляющими механическими свойствами этого вида шелка [5]. Вязкоэластичные нити каркасного шелка обладают одновременно высокой прочностью на разрыв, превышающей сталь и сопоставимой с кевларом, и высокой эластичностью. Это приводит к очень высоким значениям энергии разрыва, по которым этот материал не имеет аналогов среди других природных и большинства искусственных материалов [6]. Каркасная нить состоит из двух белков – спидроина 1 и спидроина 2, которые имеют высокую молекулярную массу и периодическую структуру – состоят из большого числа прямых повторов [7]. Повторы различаются

между собой наличием делеций и вставок, но имеют одинаковый принцип строения: каждый из них содержит поли-Ala-блок (длиной от 4 до 8 а. о.), который придает белку гидрофобные свойства, и более гидрофильную, обогащенную Gly-последовательность. Эти белки не растворяются в воде и слабых кислотах и щелочах. Каркасные нити содержат большое количество кристаллов, состоящих из β -складчатых слоев (формируемых из поли-Ala-блоков), и характеризуются высоким уровнем структурной организации, в том числе в Gly-богатых областях [8].

Спидроины обладают способностью к быстрому структурному переходу из слабоупорядоченного к высокоупорядоченному состоянию и далее – к фазовому переходу в нерастворимое состояние в водных растворах под воздействием спиртов и других факторов [9], а также возможностью декорирования их поверхности путем введения сайтов адгезии или, например, цитокинов по боковым группам аминокислотных остатков.

Перечисленные выше свойства белков каркасной нити, включая уникальные механические свойства, а также устойчивость к условиям внешней среды, биосовместимость и биodeградируемость обеспечивают серьезную основу для использования такого материала для медицинских целей.

В нашей работе мы описываем получение биосовместимого, трехмерного матрикса на основе рекомбинантного белка паутины для культивирования эукариотических клеток.

Структура искусственного гена-аналога спидроина 1 разработана нами на основе известной нуклеотидной последовательности соответствующей кДНК из паука *Nephila clavipes*. Четыре фрагмента, кодирующие консенсусные первичные повторы последовательности природного спидроина 1, были выбраны для синтеза мономера искусственного гена. Мономер получен путем химико-ферментативного синтеза и амплифицирован в составе плазмиды в клетках *Escherichia coli*. Результирующий ген, содержащий 9 повторов

*Научно-исследовательский институт
трансплантологии и искусственных органов
им. В.И. Шумакова Росмедтехнологий, Москва
Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова*

*Научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов,
Москва*

*Институт медико-биологических исследований
и технологий,
Москва*

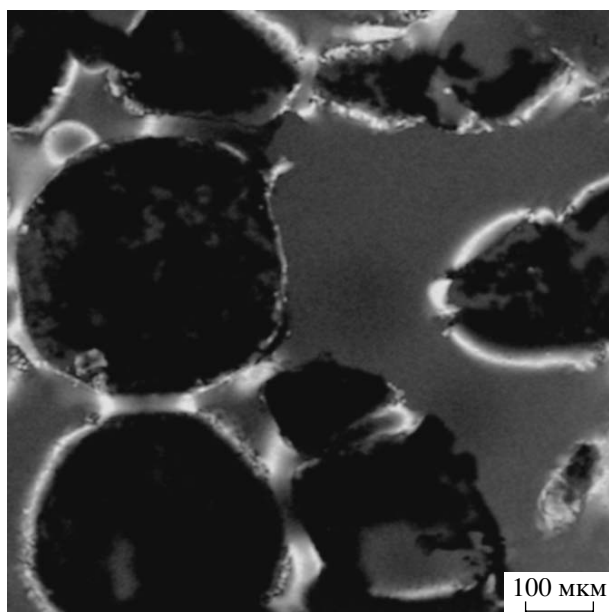


Рис. 1. Пористая структура матрикса, полученного с использованием 200–400-микронных частиц NaCl. Оптический срез на уровне 250 мкм от поверхности матрикса. Размер пор соответствует размеру частиц NaCl. Видно, что некоторые поры соединены между собой.

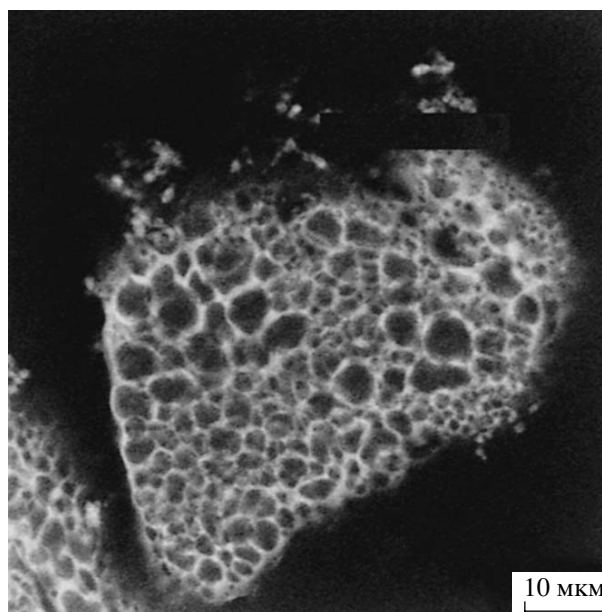


Рис. 2. Структура стенки поры матрикса из рекомбинантного спидроина, полученного с использованием 50–100-микронных частиц NaCl. Оптический срез на уровне 100 мкм от поверхности матрикса.

мономера, был введен в геном клеток дрожжей *Pichia pastoris*. Рекombинантный белок 1F9 – аналог спидроина 1, был выделен и очищен до 98%-ной чистоты из клеток дрожжей-продуцентов [10] и использован для изготовления матриксов.

Трехмерный матрикс из высокоочищенного лиофилизированного спидроина 1 получали методом выщелачивания. Навеску 15 мг рекомбинантного спидроина 1F9 растворяли в 50 мкл 10%-ного раствора лития хлористого в 90%-ной муравьиной кислоте в течение 30 мин при 40°C. Раствор центрифугировали 10 мин при 11300 g, и 50 мкл супернатанта смешивали со 110 мг хлорида натрия с размером частиц от 50 до 100 или от 200 до 400 мкм. Далее формовали диск диаметром 10 мм и толщиной примерно 1 мм, высушивали при комнатной температуре, обрабатывали 96%-ным этанолом в течение 120 мин, промывали дистиллированной водой 120 мин, дегазировали и хранили в 96%-ном этаноле. Размер частиц NaCl влияет на размер пор матрицы и, следовательно, на ее механические свойства, скорость биодеградации и взаимодействие с клетками [11].

Исследования образцов матрицы, а также прикрепленных к ней клеток проводили с использованием конфокальных микроскопов Zeiss Axiovert 200M LSM510 META и Leica TCS SP5, а также сканирующего электронного микроскопа Samsan S2 (“Cambridge Instruments”, Великобритания). Для исследования структуры матрицы мето-

дами конфокальной микроскопии получали ее конъюгаты с флуорохромами. Анализ конфокальных изображений и подсчет количества клеток на 1 мм³ матрицы проводили, используя программное обеспечение 3D for LSM Version 1.4.2.

На рис. 1 представлен оптический срез матрицы, полученной с использованием частиц NaCl размером 200–400 мкм. Срез выполнен на уровне 250 мкм от поверхности матрицы. На рис. 2 показан оптический срез поры матрицы (100 мкм от поверхности), полученной при использовании частиц NaCl размером 50–100 мкм. Видна структура стенки поры, состоящей из ячеек размером от 1 до 10 мкм, образованных агрегированным спидроином. Размеры пор образцов, находящихся в водной среде, соответствуют размерам частиц NaCl, используемых в процессе их приготовления (рис. 1 и 2). Крупные поры связаны между собой каналами и отверстиями (рис. 1), через которые возможна миграция клеток в глубокие слои, что способствует однородности условий культивирования клеток на поверхности и в глубине. Соединенность пор полученных образцов матрицы была подтверждена также стандартным тестом на проницаемость. Для этого образцы матрицы погружали в тушь и через 2 ч исследовали ее срез. Частички туши равномерно прокрасили весь материал, что указывает на отсутствие замкнутых полостей.

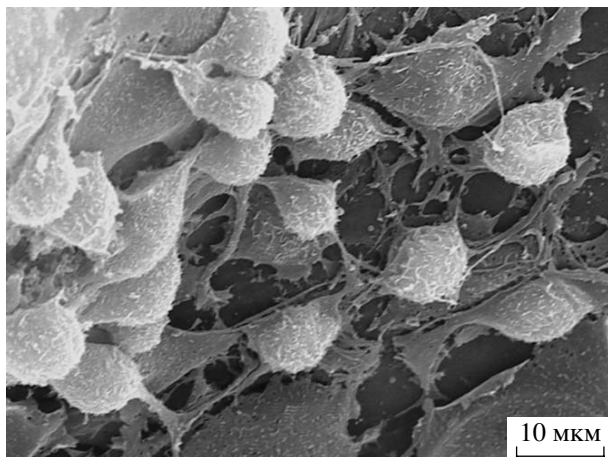


Рис. 3. Клетки 3Т3 на поверхности матрикса из рекомбинантного спидроина через 24 ч инкубации в условиях, описанных в тексте. Сканирующая электронная микроскопия.

Для исследования динамики роста клеток образцы матрицы толщиной около 700 мкм, приготовленной с использованием 400 мкм частиц NaCl, помещали в лунки 24-луночной платы и добавляли 2500 клеток 3Т3, суспендированных в 300 мкл среды культивирования. Через 2 ч образцы переносили в соседние лунки, содержащие 1 мл среды культивирования. Микроскопическое исследование образцов проводили на 1-, 4- и 14-й дни инкубации. Для получения изображений в сканирующем электронном микроскопе образцы фиксировали глутаровым альдегидом, постфиксировали в 1%-ном тетроксиде осмия, обезвоживали в увеличивающихся концентрациях этанола, переводили в ацетон и подвергали сушке методом перехода критической точки в приборе. Образцы перед просмотром в микроскопе напыляли слоем золота толщиной около 20 нм в атмосфере аргона при ионном токе 6 мА и давлении 0.1 мм рт. ст. на приборе Ion Coater IV-3 (“Eico”, Япония). Исследования проводили на сканирующем электронном микроскопе Camscan S2 (“Cambridge Instruments”, Великобритания) в режиме SEI. Разрешение микроскопа 10 нм, рабочее напряжение 20 кВ.

Для проведения конфокальной микроскопии образцы фиксировали 30 мин 4%-ным формалином, обрабатывали 10 мин 0.1%-ным тритоном X-100 в ФСБ и инкубировали в растворе DAPI или SYTOX Green для выявления клеточных ядер.

Данные, полученные с использованием сканирующей электронной микроскопии, указывают на то, что в течение 24 ч клетки эффективно прикрепляются к материалу матрицы и распластаются на его поверхности (рис. 3). Применение метода конфокальной микроскопии позволило исследовать клетки в глубоких слоях матрицы, а также изучить изменение количества клеток во

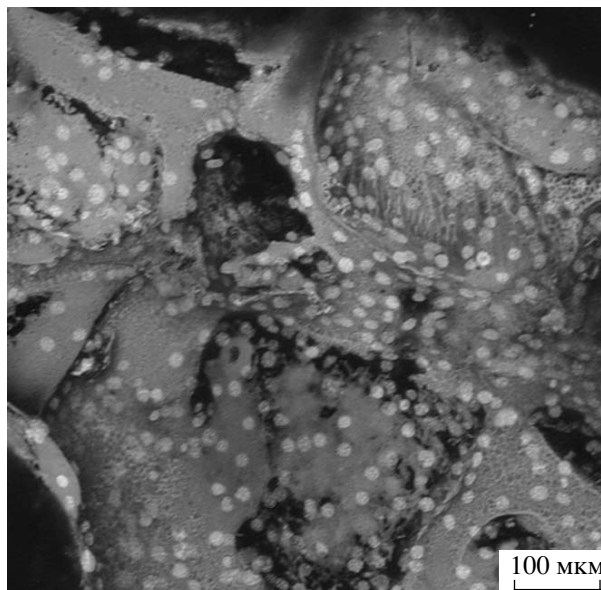


Рис. 4. Проекция на плоскость серии оптических срезов матрицы, выполненных с интервалом 1 мкм от поверхности до 200 мкм в глубину. Видны структура матрикса и ядра фибробластов 3Т3, выявленные DAPI. Расположение ядер указывает на монослой клеток и на то, что клетки прикреплены к стенкам пор.

времени. Через 24 ч культивирования клетки располагались преимущественно в поверхностных слоях матрицы. На глубине более 200 мкм от поверхности матрицы выявлялись лишь единичные ядра клеток. Усредненная по слоям плотность клеток после 24 ч культивирования составляла 355 ± 64 клеток на 1 мм^3 матрицы. К четвертому дню культивирования ядра фибробластов выявлялись также в глубоких слоях матрицы. Клетки были расположены на стенках крупных пор (рис. 4). Плотность клеток увеличилась до 861 ± 118 ; соотношение плотности клеток на поверхности к плотности клеток на уровне 200 мкм было приблизительно 3 : 1. К 14-му дню культивирования плотность клеток в глубоких слоях матрицы не отличалась от плотности клеток на поверхности и составляла 1924 ± 212 клеток на 1 мм^3 матрицы.

Таким образом, нами показано, что трехмерные матрицы из рекомбинантного спидроина 1 обладают хорошей совместимостью с культурой клеток, обеспечивая эффективную адгезию и пролиферацию клеток на протяжении длительного периода времени. Ранее было установлено, что рекомбинантный спидроин обладает малой иммуногенной активностью [12], что также подтверждает его биосовместимость и повышает перспективность использования в качестве имплантируемого материала.

Полученные данные позволяют говорить о возможности применения рекомбинантного спид-

роина I в восстановительной и заместительной медицине, включая создание гибридных органов и тканей.

Работа частично профинансирована Российским фондом фундаментальных исследований (гранты 09-02-00173, 06-04-49464-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волова Т.Г., Севастьянов В.И., Шишацкая Е.И. Полиоксиалканоаты. 2 изд. Красноярск: Платина, 2006. 288 с.
2. Dawson E., Mapili G., Erickson K. et al. // Adv. Drug Delivery Revs. 2008. V. 60. № 2. P. 215–228.
3. Ma P.X. // Adv. Drug Delivery Revs. 2008. V. 60. № 2. P. 184–198.
4. Sachlos E., Czernuszka J.T. // Europ. Cells and Materials. 2003. V. 30. № 5. P. 29–39.
5. Vehoff T., Glisovic' A., Schollmeyer H. et al. // Biophys. J. 2007. V. 93. № 12. P. 4425–4432.
6. Kluge J.A., Rabotyagova O., Leisk G.G., Kaplan D.L. // Trends Biotechnol. 2008. V. 26. № 5. P. 244–251.
7. Guerette P.A., Ginzinger D.G., Weber B.H., Gosline J.M. // Science. 1996. V. 272. P. 112–115.
8. van Beek J.D., Hess S., Vollrath F., Meier B.H. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 10266–10271.
9. Bogush V., Sokolova O., Davydova L. et al. // J. Neuroimmune Pharmacol. 2008. In press.
10. Богуш В.Г., Сазыкин А.Ю., Давыдова Л.И. и др. // Биотехнология. 2006. Т. 4. С. 3–12.
11. Lee J.J., Lee S.G., Park J.C. et al. // Curr. Appl. Phys. 2007. V. 7. S. 1. P. e37–e40.
12. Богуш В.Г., Сидорук К.В., Молчан О.К. и др. // Биотехнология. 2001. № 2. С. 11–21.