

БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ МАТРИКСЫ ИЗ РЕГЕНЕРИРОВАННОГО ШЕЛКА BOMBIX MORI

© 2010 г. И. И. Агапов, М. М. Мойсенович, Т. В. Васильева, О. Л. Пустовалова,
А. С. Коньков, А. Ю. Архипова, О. С. Соколова, В. Г. Богуш, В. И. Севастьянов,
член-корреспондент РАН В. Г. Дебабов, академик М. П. Кирпичников

Поступило 27.04.2010 г.

Изучены структура и биологические свойства изделий из регенерированного фиброина шелка *Bombix mori* в виде пленок, трехмерных матриц-сеток и трубок, предназначенных для регенеративной медицины. Показано, что регенерированный фиброин формирует субстрат, поддерживающий адгезию и пролиферацию эукариотических клеток, образуя структуру, способствующую равномерному распределению пролиферирующих клеток как на поверхности, так и в глубоких слоях матриц. Полученные изделия обладают высокой прочностью и эластичностью. Имплантированные экспериментальным животным матрицы со временем подвергаются биодеградации и неоваскуляризации. Изделия из регенерированного фиброина обладают свойствами, позволяющими рассматривать их в качестве основы при создании биоискусственных аналогов тканевых структур.

Важнейшая задача современной регенеративной медицины это разработка технологий замены поврежденных или утраченных органов и тканей на сконструированные *in vitro* биоискусственные аналоги, называемые также тканеинженерными конструкциями. Одним из элементов технологии создания биоискусственных органов является формирование каркаса из биосовместимых материалов, имитирующих структуру здоровой ткани. Такие трехмерные каркасы называют матриксами или матрицами.

Искусственные матрицы определяют механические свойства, форму имплантата, формируют субстрат для адгезии клеток. Являясь подложкой для прикрепления клеток, субстрат задает топо-

логию фокальных адгезивных комплексов, инициируя таким образом каскад внутриклеточных сигналов, вызванных механическим напряжением клеточной мембраны [4]. Адгезия клеток приводит к кластеризации клеточных рецепторов и, как следствие, к активации экспрессии генов, вовлеченных в пролиферацию и дифференцировку [5]. Взаимодействие с субстратом определяет поляризацию клеток, изменение их морфологии, пространственную ориентацию компонентов цитоскелета, клеточных органелл и организацию внутриклеточного транспорта [4]. Кроме того, субстрат выступает в качестве депо для растворимых факторов роста [6], а многие субстраты содержат сигнальные последовательности, относящиеся к классу нерастворимых биологически активных лигандов – матрикинов [10, 11]. Регуляторные факторы субстрата влияют на репертуар синтезируемых клетками компонентов внеклеточного матрикса, являющихся в свою очередь источником сигналов, определяющих функциональное состояние клетки [9]. Таким образом, субстрат активно участвует в инструктировании клеточного морфотипа, фенотипа, межклеточных взаимодействий.

Правильный подбор материала, являющегося формообразующим элементом и клеточным субстратом при создании биоискусственных органов, – основа успеха заместительной терапии. В качестве материалов для формирования матриц, используемых в заместительной терапии, применяют керамические композиты, альгинаты, коллаген, желатин, хитозан, гиалуроновую кислоту, полиэферы бактериального происхождения [12]. Относительно недавно в качестве материала для тканевой инженерии был предложен фиброин шелка из коконов шелкопряда *Bombix mori* [1]. Фиброин имеет регулярную структуру, насыщенную отрицательно заряженными аминокислотами, и способен к быстрому фазовому переходу в нерастворимое состояние из водных растворов под воздействием спиртов и других факторов [3]. Это идеальный материал для производства прочных и одновременно гибких структур. Кроме

*Научный центр трансплантологии
и искусственных органов им. В.И. Шумакова,
Москва*

*Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова*

*Государственный научно-исследовательский институт
генетики и селекции промышленных микроорганизмов,
Москва*

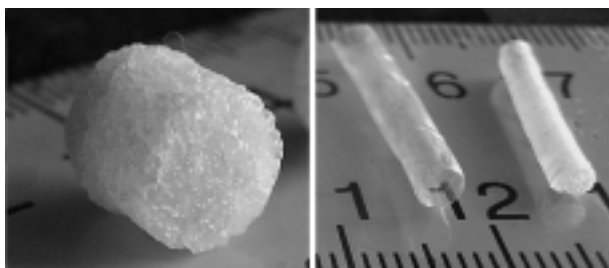


Рис. 1. Внешний вид трехмерных изделий из РФ.

того, шелк термостабилен, изделия из него могут стерилизоваться обработкой при температуре до 150 С [7].

В данной работе представлены свойства разработанных нами изделий из фиброина шелка, предназначенных для дальнейшего использования в качестве основы для гистотипических аналогов кожи, кровеносных сосудов, костной ткани.

Фиброин выделяли из коконов шелкопряда, предоставленных директором Государственного научного учреждения Республиканской научно-исследовательской станции шелководства Российской академии сельскохозяйственных наук В.В. Богословским (Ставропольский край, г. Железноводск). Серицин и другие примеси из коконов удаляли кипячением в течение 1 ч в 0.03 М растворе NaHCO_3 с последующей промывкой водой и высушиванием. Очищенный фиброин растворяли при 60°C в муравьиной кислоте, содержащей 10% хлорида лития. Для приготовления изделий использовали концентрацию белка 250 мг в 1 мл растворителя. Пленки из регенерированного фиброина (РФ), предназначенные для последующего использования в качестве одной из возможных основ при создании биоискусственной кожи, изготавливали методом кастинга [2]. Основа для регенерации костной ткани была выполнена в виде трехмерных матриц с использованием метода выщелачивания [13, 15]. В качестве порообразующего агента применяли частицы сухого NaCl размером от 200 до 400 мкм. Концентрация частиц порообразующего агента была подобрана таким образом, чтобы поры сформированного матрикса были соединены, а сам матрикс не содержал изолированных полостей. Матрицы формировали в виде дисков диаметром 10 мм при толщине от 2 до 10 мм.

Кроме того, были изготовлены двухслойные трубки как прототипы искусственных сосудов. Первый слой (0.5 мм) формировали на поверхности поливинилхлоридного стержня, используя метод выщелачивания. Размер порообразующих частиц NaCl составлял 50 мкм. Второй слой (0.5 мм) создавали десятикратным наплаиванием и высушиванием раствора РФ поверх формируемого изделия.

Полученные нами изделия отличались высокой прочностью и эластичностью. Определение прочности на разрыв матрицы из РФ дало среднее значение $35 \pm 2 \text{ Н/см}^2$ при растяжимости $242 \pm \pm 18\%$. Перешивка матриц бифункциональными реагентами, такими как глутаровый альдегид, реагирующий со свободными аминогруппами и формирующий дополнительные ковалентные межмолекулярные связи, увеличивала прочность до $65 \pm 5 \text{ Н/см}^2$, не оказывая влияния на эластичность материала: после ковалентной перешивки растяжимость материала составляла $237 \pm 23\%$.

Структура трехмерных матриц из фиброина представляет собой систему пор, соединенных каналами и отверстиями (рис. 1). Размер пор совпадает с размером порообразующих частиц, что было подтверждено нами с использованием сканирующей электронной и конфокальной микроскопии. Незамкнутость пор матриц, помимо микроскопических методов, была проверена тестом по распределению частиц туши. В целом структура матриц из РФ соответствует структуре описанных нами ранее изделий из рекомбинантного спидроина 1. Существенным отличием является отсутствие в стенках пор, образованных фиброином, микросетчатой структуры с размером ячейки 1–10 мкм, характерной для стенок пор матриц из спидроина [13, 15].

Регенерированный фиброин – прекрасный субстрат для адгезии и пролиферации клеток: к пленкам из РФ прикреплялось в два раза больше клеток, чем к культуральному пластику (табл. 1). Через 4 дня культивирования плотность клеток на поверхности пленок из РФ достигала максимума и была в 2.5 раза выше, чем при культивировании на пластике. Через 14 дней культивирования на плоских поверхностях наблюдалась 100%-ная гибель клеток вследствие апоптоза, индуцированного контактным торможением (табл. 1).

Использование в наших исследованиях конфокального микроскопа (Zeiss Axiovert 200M LSM 510, Германия), оснащенного объективами с большим рабочим отрезком, сделало возможным выявление ядер клеток на глубине до 600 мкм от поверхности матрикса (рис. 2). Программные приложения для обработки изображений (LSM Version 1.4.2, “Carl Zeiss”, Германия и Imaris 6.1.5, “Bitplane AG”, Швейцария) позволили количественно оценить изменение во времени клеточной плотности. Подсчет клеток в разных оптических слоях, оценку количества ядер клеток в единице объема матрикса и изменение количества клеток во времени (табл. 1). Исследования показали, что нанесенные на поверхность матрикса фибробласты 3Т3 активно пролиферировали и мигрировали в глубокие слои, сохраняя типичную для них морфологию (рис. 2б). Присутствие клеток в глубоких слоях указывает на то, что материал изделий, а также их структура, в том числе

Таблица 1. Изменения во времени количества клеток, культивируемых на изделиях из регенерированного фиброина, нд – не детектировалось

Время культивирования, дни	Пластик, число клеток на 1 мм ²	Пленка, число клеток на 1 мм ²	Матрикс, число клеток в 1 мм ³	Матрикс с наноГА, ³ число клеток в 1 мм ³
0	16 ± 2	32 ± 3	нд	нд
1	22 ± 2	38 ± 2	18 ± 2	73 ± 7
4	97 ± 8	278 ± 25	172 ± 2	697 ± 85
14	Гибель клеток	Гибель клеток	4105 ± 320	4923 ± 412

незамкнутость пор способствуют миграции клеток во внутренние слои матриксов, создают однородные условия, обеспечивая газообмен и обмен продуктами метаболизма.

Нами были приготовлены композитные трехмерные матриксы, содержащие РФ и 10% наногидроксиапатита (наноГА), предоставленного сотрудником Межрегионального ортопедического центра ФГУЗ КБ № 81 ФМБА России (г. Северск) проф. В.В. Гузеевым. Наногидроксиапатит изготовлен по оригинальной методике из костной ткани животных [14]. Модификация матрикса наноГА не нарушала однородность структуры, заметно стимулируя адгезию и ускоряя пролиферацию культивируемых на изделиях клеток (табл. 1).

Полученные нами трехмерные матриксы были имплантированы под кожу мышам линии BALB/c. Гистологическое исследование образцов, полученных после их извлечения через два месяца, показали, что внутрь матрикса внедряется соединительная ткань в виде тяжей, состоящих из фибробластоподобных клеток и сопровождающих их коллагеновых волокон (рис. 3). При этом наблюдается деградация материала матрикса и его заме-

щение молодыми фибробластами, выявляемыми по морфологическим признакам, одним из которых является рыхлый хроматин ядра (эухроматин и наличие 1–2 ядрышек). Гистологическое изучение имплантатов не показало никаких фенотипических изменений прорастающих в имплантат тканей, которые могли бы свидетельствовать о нарушениях физиологии контактирующих с матрицей клеток.

Нами также был отмечен высокий уровень васкуляризации тканей, замещающих матрикс после имплантации. Были выявлены кровеносные сосуды, выстланные плоским эндотелием, и вновь образовавшиеся сосуды с “высоким эндотелием”. Большое количество новообразованных сосудов свидетельствует об активных процессах ангиогенеза и тканеобразования, происходящих

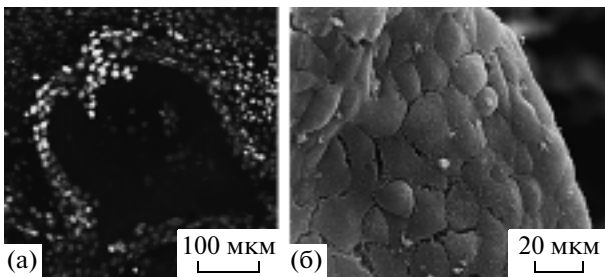


Fig. 2. Фибробласты 3Т3 во внутренних слоях матрикса. Нанесение клеток на поверхность матрикса, культивирование в течение 14 дней. а – оптический срез, выполненный с использованием Zeiss Axiovert 200M LSM 510, на уровне 600 мкм от поверхности матрикса. Ядра фибробластов выявлены с применением Sytox Green nucleic acid stain (“Invitrogen”, Carlsbadm, USA). б – матрикс в виде диска толщиной 2 мм, разрезанный посередине перпендикулярно поверхности, исследованный на сканирующем электронном микроскопе Camscan S2 (“Cambridge Instruments”, Великобритания). Представлен монослой клеток на внешней стороне поры.

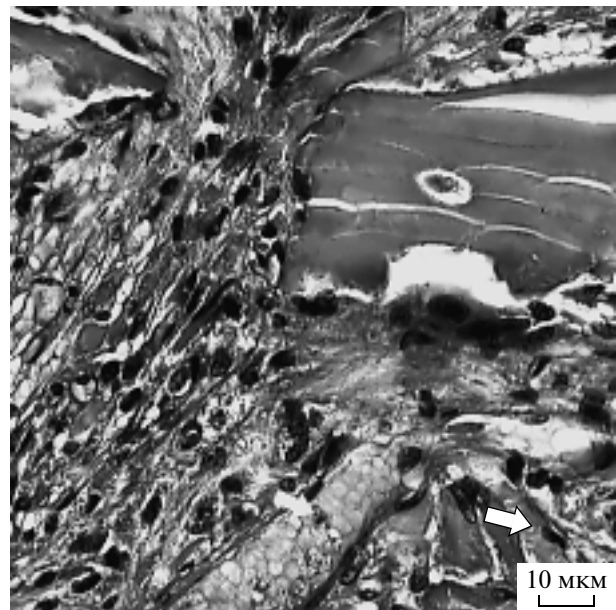


Рис. 3. Замещение матриксов соединительной тканью. Окраска гематоксилином–эозином. Замещение материала матрикса новообразованной тканью через 2 мес после имплантации. Видны сосуды разного диаметра. Неравномерная деградация матрикса. Отдельные участки стенок макропор, сохраняющих исходную структуру матрицы. Стрелками указаны новообразованные кровеносные сосуды.

в матриксе через 2 месяца после его имплантации лабораторным животным. Присутствие сосудов разного типа и диаметра свойственно естественной сосудистой архитектуре ткани [8].

Замещение материала матрикса васкуляризированной тканью подтверждает возможность применения созданных нами изделий в качестве основы при конструировании биоискусственных органов.

Работа была выполнена частично на средства Российского фонда фундаментальных исследований (грант 09–02–00173) и Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 год” по Государственному контракту № П2460 от 19.11.2009 г. и Государственному контракту № П2087 от 3.11.2009 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Altman G.H., Diaz F., Jakuba C. *et al.* // *Biomaterials*. 2003. V. 24. P. 401–416.
2. Bogush V.G., Sokolova O.S., Davydova L.I. *et al.* // *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2009. V. 4. P. 17–27.
3. Chen X., Shao Z., Marinkovic N.S. *et al.* // *Biophys. Chem.* 2001. V. 89. P. 25–34.
4. Шумаков В.И., Севастьянов В.И. // *Здравоохранение и мед. техника*. 2003. № 4. С. 30–32.
5. Huang S., Ingber D.E. // *Nat. Cell. Biol.* 1999. V. 1. P. E131–E138.
6. Hynes R.O. // *Science*. 2009. V. 326. P. 1216–1219.
7. Martel A., Burghammer M., Davies R.J., Riekel C. // *Biomacromolecules*. 2007. V. 8. P. 3548–3556.
8. Sieminski A.L., Gooch K.J. // *Biomaterials*. 2000. V. 21. P. 2232–2241.
9. Streuli C.H., Bissell M.J. // *J. Cell. Biol.* 1990. V. 110. P. 1405–1415.
10. Swindle C.S., Tran K.T., Johnson T.D. *et al.* // *J. Cell. Biol.* 2001. V. 154. P. 459–468.
11. Tran K.T., Griffith L., Wells A. // *Wound Repair Regen.* 2004. V. 12. P. 262–268.
12. Sevastianov V.I., Vasilets V.N., Agapov I.I. // *Rare metals*. 2009. V. 28. P. 84–86.
13. Агапов И.И., Пустовалова О.Л., Мойсенович М.М. и др. // *ДАН*. 2009. Т. 426. № 1. С. 115–118.
14. Дружинина Т.В., Хлусов И.А., Карлов А.В., Ростовцев А.В. // *Гений ортопедии*. 2007. Т. 4. С. 83–88.
15. Пустовалова О.Л., Мойсенович М.М., Еремин П.С. и др. // *Рос. иммунол. журн.* 2009. Т. 3. № 12. С. 139–146.