

МЕТОДЫ

УДК 576.535:57.089.67

ФОТООТВЕРЖДАЕМЫЕ ГИДРОГЕЛИ, СОДЕРЖАЩИЕ СПИДРОИН
ИЛИ ФИБРОИН

И.В. Бессонов¹, М.С. Котлярова^{1,*}, М.Н. Копицына¹, А.В. Федулов²,
А.М. Мойсенович¹, А.Ю. Архипова³, В.Г. Богущ⁴, Д.В. Багров¹,
А.А. Рамонова³, А.Е. Машков², К.В. Шайтан¹, М.М. Мойсенович³

¹Кафедра биоинженерии и ³лаборатория конфокальной микроскопии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Россия, 129110, г. Москва, ул. Щепкина, д. 61/2, корп. 1;

⁴Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Россия, 117545, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1

*e-mail: kotlyarova.ms@gmail.com

Получены биосовместимые фотоотверждаемые гидрогели, состоящие из метакрилированного желатина и белков шелка (рекомбинантного аналога спidroина каркасной нити паутины *Nephila clavipes* и фиброина шелка из коконов тутового шелкопряда *Bombyx mori*). Данные полимеры характеризуются высокой биосовместимостью и способностью к биодegradации, что обуславливает возможность их применения в тканевой инженерии. Гидрогели были изготовлены двумя способами, позволяющими получать либо изделия большого размера, либо микроструктуры заданной формы. Для изготовления объемных гидрогелей образцы фотополимеризовали в свете ультрафиолетовой лампы в течение 10 мин. В результате были получены образцы гидрогелей, представляющие собой диски диаметром 13 мм. Методом сканирующей электронной микроскопии было показано, что они обладают пористой структурой. Микроструктуры были сформированы на покровном стекле с использованием лазера с длиной волны 405 нм микроскопа Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 (Nikon, Япония). Данный подход позволяет контролировать топографические особенности получаемых субстратов, он применим для создания микроструктурированных поверхностей, которые могут быть использованы для изучения взаимодействия клеток с субстратом.

Ключевые слова: гидрогели, фотополимеризация, спidroин, фиброин, тканевая инженерия, метакрилированный желатин

Фотоотверждаемые материалы затвердевают при облучении светом определенной области спектра. Их использование в биомедицинских исследованиях представляет интерес как в фундаментальном, так и в прикладном аспекте. Так, они могут являться основой микроструктурированных поверхностей с контролируемой топографией и распределением лигандов для клеточных рецепторов, что позволяет моделировать различные биологические процессы, например, рост аксонов [1]. Также фотоотверждение лежит в основе ряда аддитивных технологий, позволяющих создавать трехмерные структуры с субмикронной точностью позиционирования [2].

Одной из наиболее востребованных областей применения фотоотверждаемых материалов является получение скаффолдов для тканевой инженерии, направленной на поиск эффективных подходов к восстановлению повреждений в различных тканях и органах. Скаффолды играют роль искус-

ственного внеклеточного матрикса, на основе которого формируется ткань, поэтому большое значение имеет материал, из которого они состоят.

Метакрилированный желатин является фотоотверждаемым материалом, который широко используется для различных биомедицинских приложений вследствие его нетоксичности, биодegradируемости и возможности контролировать его свойства [3]. Однако даже химически сшитые гидрогели, сформированные из этого полимера, не обладают необходимыми механическими свойствами, а также имеют высокие коэффициент набухания и скорость биодegradации. Один из подходов к решению этой проблемы был предложен ранее: в водный раствор метакрилированного желатина перед проведением фотополимеризации добавляли небольшие количества (5–20%) фиброина шелка [4]. В результате получали гидрогели, обладающие структурой взаимопроницающих сеток. В их состав входят химически сшитый по двойным связям C=C-полимер

на основе метакрилированного желатина и физически сшитый благодаря формированию бета-структур фиброин шелка. Такой состав обеспечивает лучшие механические и технологические характеристики получаемого биоматериала по сравнению с однокомпонентными аналогами.

Структурные белки шелка, к которым относится фиброин, обладают всеми свойствами, необходимыми для применения в тканевой инженерии, а также характеризуются уникальной для природных полимеров прочностью и эластичностью. Особенно интересна возможность использования белков паутины — спидроинов. Ранее было показано, что имплантация сформированных из рекомбинантного спидроина пористых скаффолдов в область дефекта бедренной кости крысы приводит к значительному ускорению регенерации по сравнению с регенерацией незаполненного дефекта бедренной кости, а также регенерацией дефекта при имплантации фиброинового скаффолда [5].

Целью данной работы являлось получение фотоотверждаемых гидрогелей на основе метакрилированного желатина и структурных белков шелка — рекомбинантного аналога спидроина каркасной нити паутины *Nephila clavipes* и фиброина шелка из коконов тутового шелкопряда *Bombyx mori*.

Материалы и методы

Материалы. Метакриловый ангидрид (94%), оксид дифенил(2,4,6-триметилбензоил)фосфина (97%), диметилсульфоксид (99,9%) и бромид лития (99%) (Sigma-Aldrich, Германия), муравьиная кислота (99%) (Acros Organic, США), этанол (95%) (Медхимпром, Россия), желатин кристаллический (особо чистый, Carl Roth, Германия), среда Игла в модификации Дульбекко (DMEM, ПанЭко, Россия), эмбриональная телячья сыворотка (HyClone, США), параформальдегид (Sigma-Aldrich, Германия), краситель SYTOX Green Nucleic Acid Stain (Invitrogen, США), хирургические шелковые нити (ООО «Моснитки», Россия), рекомбинантный аналог спидроина 1F9, полученный по описанной ранее методике [6], 0,1 М калий-фосфатный буферный раствор (pH 7,2).

Синтез метакрилированного желатина. Навеску кристаллического желатина (1 г) помещали в круглодонную колбу, оснащенную магнитной мешалкой, и добавляли 20 мл 0,1 М калий-фосфатного буферного раствора (pH 7,2). Растворение желатина производили на водяной бане (50°C) при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Итоговая концентрация составляла 5 мас.%. В полученный раствор вносили избыток метакрилового ангидрида. Реакцию проводили в течение 3 ч при

постоянном перемешивании и нагревании (50°C). Далее к реакционной смеси добавляли 20 мл 0,1 М калий-фосфатного буферного раствора (pH 7,2), после чего охлаждали смесь до комнатной температуры и очищали диализом в целлюлозных мембранах против двадцатикратного объема дистиллированной воды при постоянном перемешивании на магнитной мешалке со сменой каждый час в течение 3 сут до исчезновения запаха метакрилового ангидрида. Продукт реакции переносили в чашку Петри, замораживали при –18°C и лиофилизировали на приборе Alpha 1-2 LDplus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Германия) до постоянной массы.

Получение водного раствора фиброина шелка. Навеску хирургических шелковых нитей растворяли в 9,3 М растворе бромида лития, затем диализовали против дистиллированной воды в течение суток с десятью сменами воды. Раствор фиброина замораживали в чашках диаметром 10 см и лиофилизировали на приборе Alpha 1-2 LDplus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Германия). Необходимую для получения раствора с нужной концентрацией массу белка растворяли в дистиллированной воде.

Формирование гидрогелей. Для изготовления гидрогелей на основе фиброина навеску метакрилированного желатина растворяли в диметилсульфоксиде в термощкафу при температуре 50–60°C до его полного растворения и добавляли фотоинициатор оксид дифенил(2,4,6-триметилбензоил)фосфина (97%, 3 мас.% по метакрилированному желатину). Далее аккуратно при перемешивании приливали водный раствор фиброина. Концентрация метакрилированного желатина в итоговом растворе составляла не менее 3 мас.%, а соотношение мономеров (метакрилированный желатин:фиброин) — 2:1.

Для изготовления гидрогелей на основе спидроина навеску белка растворяли в 90%-ной муравьиной кислоте, затем аккуратно добавляли метакрилированный желатин и встряхивали до полного растворения. Далее к смеси добавляли фотоинициатор оксид дифенил(2,4,6-триметилбензоил)фосфина (97%, 5 мас.% по метакрилированному желатину). Концентрация метакрилированного желатина в итоговом растворе составляла не менее 10 мас.% при соотношении мономеров (метакрилированный желатин:спидроин) 2:1.

Фотополимеризация. Для получения макроскопических образцов гидрогелей растворы мономеров (300 мкл) вносили в полипропиленовую форму диаметром 13 мм так, чтобы образовался ровный слой. После этого смесь фотополимеризовали в свете ультрафиолетовой лампы мощностью

36 Вт в течение 10 мин. Далее в формы добавляли 95%-ный этиловый спирт и выдерживали при комнатной температуре в течение одного часа. Затем отмывали растворители избытком дистиллированной воды в течение 2–3 ч при постоянном перемешивании и смене раствора. При необходимости дальнейшего хранения переносили гидрогелевые образцы в 70%-ный этиловый спирт.

Микроскопические гидрогелевые структуры были сформированы посредством фотоотверждения с применением микроскопа Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 (Nikon, Япония). С помощью программы NIS-elements (Nikon, Япония) создавали шаблоны заданной формы и облучали соответствующие им области смеси, нанесенной на покровное стекло, лазером с длиной волны 405 нм, используя объектив Plan Fluor 40x/1,30 Oil DIC. Отмывали полученные микроstructures дистиллированной водой, после чего обрабатывали их 95%-ным этиловым спиртом.

Культивирование фибробластов 3Т3 на гидрогелях. Фибробласты 3Т3 суспендировали в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Концентрацию фибробластов доводили до 24 тыс. клеток в одном миллилитре. Гидрогели помещали в чашки Петри диаметром 35 мм и вносили 2 мл суспензии. Через 48 ч клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом. Ядра клеток выявляли красителем SYTOX Green Nucleic Acid Stain (Invitrogen, США). Для получения изображений использовали конфокальный микроскоп Axiovert 200M LSM 510 Meta и программное обеспечение 3D for LSM (Zeiss, Германия).

Сканирующая электронная микроскопия. Гидрогели обезжизивали в возрастающих концентрациях этилового спирта и ацетоне, затем высушивали на приборе Critical point dryer HCP-2 (Hitachi Ltd., Япония) и напыляли слоем платины толщиной 20 нм с использованием прибора IB-3 Ion Coater (Eiko Engineering Co., Ltd, Япония). Полученные образцы изучали на микроскопе CamScan S2 (Cambridge Instruments, Великобритания).

Результаты и обсуждение

Гидрогели представляют собой трехмерные полимерные сети, способные поглощать и удерживать большие количества воды. Многие исследования посвящены изучению возможности их использования для тканевой инженерии, направленной доставки лекарственных средств и других биомедицинских приложений [7].

Активным направлением применения гидрогелей является создание на их основе раневых покрытий, так как они обладают способностью удерживать экссудат в ране, что способствует ускорению зажив-

ления. Также к достоинствам гидрогелей можно отнести возможность введения в их состав антибиотиков и других фармацевтических препаратов [8]. Ранее было показано, что изготовленные из фиброина [9] и спидроина [10] микроносители при введении в область полнослойной кожной раны способствуют ускорению заживления с восстановлением всех структурных компонентов кожи. Вероятно, раневые покрытия, сформированные из гидрогелей на основе данных структурных белков шелка, также могут способствовать регенерации. В рамках данной работы были созданы прототипы таких изделий, состоящие из метакрилизованного желатина в сочетании со спидроином или фиброином. Были получены образцы гидрогелей в виде дисков диаметром 13 мм (рисунок, А и Б).

В качестве фотоинициатора был выбран оксид дифенил(2,4,6-триметилбензоил)фосфина (97%), являющийся высокореактивным нерастворимым

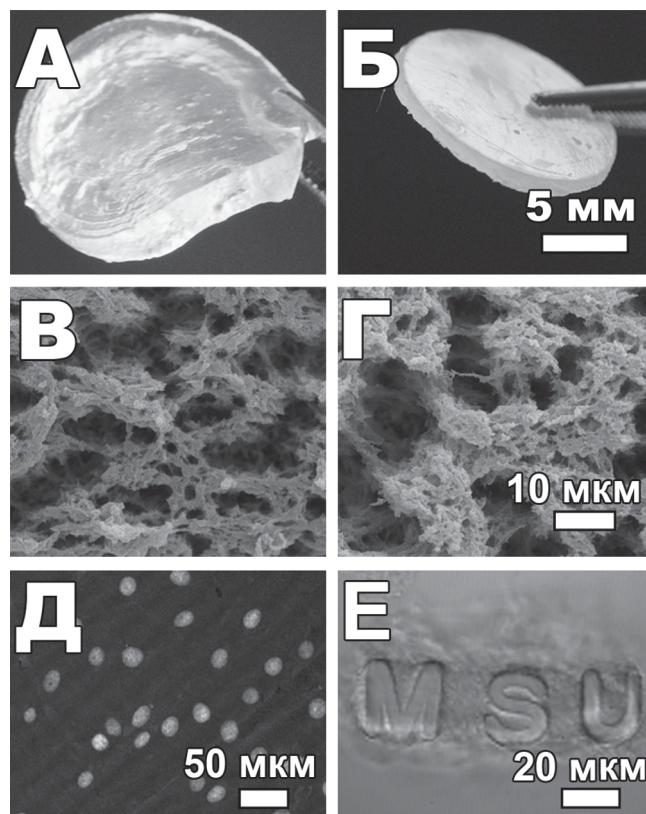


Рисунок. Фотоотверждаемые гидрогели, содержащие спидроин (А, В) или фиброин (Б, Г, Д). А – диски, сформированные из гидрогелей на основе метакрилизованного желатина и спидроина. Б – диски, сформированные на основе метакрилизованного желатина и фиброина. В, Г – структура дисков на основе метакрилизованного желатина в сочетании со спидроином (В) или с фиброином (Г), изображения получены методом сканирующей электронной микроскопии. Д – ядра фибробластов 3Т3, культивируемых 48 ч на поверхности гидрогеля на основе метакрилизованного желатина в сочетании со спидроином. Е – микроструктура, сформированная из гидрогеля на основе фиброина и метакрилизованного желатина

в воде соединением, применяемым для быстрого фотоотверждения, например, для лазерной стереолитографии. В ранее описанной системе с метакрирированным желатином и фиброином был использован 2-гидрокси-4'-(2-гидроксиэтокси)-2-метилпропиофенон (Irgacure 2959) [4]. Это изменение позволило сократить время требуемого УФ-облучения в 5–10 раз и осуществлять фотополимеризацию в слоях раствора толщиной до 5 мм.

Внутреннее пространство высушенных дисков характеризовалось пористой структурой (рисунок, В и Г). Для оценки биосовместимости фотоотверждаемых гидрогелей в модельных системах *in vitro* были использованы мышинные фибробласты линии 3Т3. На рисунке (Д) представлено репрезентативное изображение ядер клеток через 48 ч после нанесения суспензии фибробластов на поверхность спидроин-содержащего гидрогеля. Плотность клеток указывает на их активную пролиферацию. Аналогичные данные были получены и для фиброин-содержащих гидрогелей. Таким образом, фотоотверждаемые производные фиброина или спидроина после их модификации метакрирированным желатином и фотоотверждающими реагентами сохраняют биосовместимость в модельных системах *in vitro*.

Возможность создания микроскопических структур была оценена с использованием оптической системы конфокального микроскопа. На поверхности покровного стекла были сформированы рельефные элементы из гидрогеля на основе фиброина

шелка, линейные размеры которых в одном из сечений не превышали 5 мкм (рисунок, Е). Микроструктурированные поверхности могут применяться в модельных системах для изучения влияния микроокружения клеток на их функции. В частности, могут быть разработаны алгоритмы для автоматизированного изучения единичных клеток [11]. Кроме того, применение метакрирированного желатина позволяет адаптировать производные структурных белков шелка к аддитивным технологиям и технологиям прототипирования.

Таким образом, были получены фотоотверждаемые гидрогели на основе метакрирированного желатина и рекомбинантного спидроина и фотоотверждаемые гидрогели на основе метакрирированного желатина и фиброина шелка, которые могут быть использованы при формировании скаффолдов для тканевой инженерии и раневых покрытий, в том числе микроструктурированных. Биосовместимые фотоотверждаемые производные спидроина были получены впервые.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в соответствии с соглашением о предоставлении субсидий №14.604.21.0167 от 26 сентября 2017 г. «Создание функционализированного композитного фотоотверждаемого биоразлагаемого материала на основе структурного белка шелка и метакрирированных производных желатина» (уникальный идентификатор RFMEFI60417X0167).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Li S., Tuft B.W., Xu L., Polacco M.A., Clarke J.C., Guymon C.A., Hansen M.R. Microtopographical features generated by photopolymerization recruit RhoA/ROCK through TRPV1 to direct cell and neurite growth // *Biomaterials*. 2015. Vol. 53. P. 95–106.
- Chia H.N., Wu B.M. Recent advances in 3D printing of biomaterials // *J. Biol. Eng.* 2015. Vol. 9. 4.
- Yue K., Trujillo-de Santiago G., Alvarez M., Tamayol A., Annabi N., Khademhosseini A. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels // *Biomaterials*. 2015. Vol. 73. P. 254–271.
- Xiao W., He J., Nichol J.W., Wang L., Hutson C.B., Wang B., Du Y., Fan H., Khademhosseini A. Synthesis and characterization of photocrosslinkable gelatin and silk fibroin interpenetrating polymer network hydrogels // *Acta Biomater.* 2011. Vol. 7. N 6. P. 2384–2393.
- Moisenovich M.M., Pustovalova O.I., Shackelford J., Vasiljeva T.V., Druzhinina T.V., Kamenchuk Y.A., Guzev V.V., Sokolova O.S., Bogush V.G., Debabov V.G., Kirpichnikov M.P., Agapov I.I. Tissue regeneration *in vivo* within recombinant spidroin 1 scaffolds // *Biomaterials*. 2012. Vol. 33. N 15. P. 3887–3898.
- Sidoruk K.V., Davydova L.I., Kozlov D.G., Gubaidullin D.G., Glazunov A.V., Bogush V.G., Debabov V.G. Fermentation optimization of a *Saccharomyces cerevisiae* strain producing 1F9 recombinant spidroin // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2015. Vol. 51. N 7. P. 766–773.
- Caló E., Khutoryanskiy V.V. Biomedical applications of hydrogels: a review of patents and commercial products // *Eur. Polym. J.* 2015. Vol. 65. P. 252–267.
- Kamoun E.A., Kenawy E.R.S., Chen X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings // *J. Adv. Res.* 2017. Vol. 8. N 3. P. 217–233.
- Arkipova A.Y., Nosenko M.A., Malyuchenko N.V., Zvyartsev R.V., Moisenovich A.M., Zhdanova A.S., Vasil'eva T.V., Gorshkova E.A., Agapov I.I., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A., Moisenovich M.M. Effects of fibroin microcarriers on inflammation and regeneration of deep skin wounds in mice // *Biochemistry (Mosc)*. 2016. Vol. 81. N 11. C. 1251–1260.
- Moisenovich M.M., Malyuchenko N.V., Arkipova A.Y., Kotlyarova M.S., Davydova L.I., Goncharenko A.V., Agapova O.I., Drutskaya M.S., Bogush V.G., Agapov I.I., Debabov V.G., Kirpichnikov M.P. Novel 3D-microcarriers from recombinant spidroin for regenerative medicine // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2015. Vol. 463. N 1. P. 232–235.
- Burri O., Wolf B., Seitz A., Gönczy P. TRACMIT: An effective pipeline for tracking and analyzing cells on micropatterns through mitosis // *PLoS ONE*. 2017. Vol. 12. N 7. e0179752.

Поступила в редакцию
14.11.2017

Принята в печать
15.12.2017

METHODS

PHOTOCURABLE HYDROGELS CONTAINING METHACRYLATED GELATIN AND SPIDROIN OR FIBROIN

I.V. Bessonov¹, M.S. Kotliarova^{1,}, M.N. Kopitsyna¹, A.V. Fedulov²,
A.M. Moysenovich¹, A.Yu. Arkhipova³, V.G. Bogush⁴, D.V. Bagrov¹,
A.A. Ramonova³, A.E. Mashkov², K.V. Shaitan¹, M.M. Moisenovich³*

¹Department of Bioengineering and ³Laboratory of Confocal Microscopy, School of Biology,
Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Scientific Research Clinical Institute,
Shepkina st. 61/2–1, Moscow, 129110, Russia;

⁴State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National
Research Center “Kurchatov Institute”, 1-st Dorozhniy pr. 1, Moscow, 117545, Russia

*e-mail: kotlyarova.ms@gmail.com

Photocurable hydrogels were fabricated from methacrylated gelatin and silk proteins, including recombinant analogue of spidroin from *Nephila clavipes* spider web and fibroin from the cocoons of the silkworm *Bombyx mori*. These polymers have high applicability in tissue engineering due to their biocompatibility and biodegradability. Hydrogels were fabricated using two different methods that allowed us to obtain either large-sized products or microstructures of certain shape. For the production of extensive hydrogels, samples were photopolymerized in the UV light within ten minutes. As a result samples of hydrogels were obtained as disks with a diameter of 13 mm. Scanning electron microscopy confirmed their porous structure. Microstructures were formed on coverslips using confocal microscope Eclipse Ti-E with 405 nm laser. This approach gives us an opportunity to control the topographic features of the obtained substrates and is applicable for creating micropatterns for studying the interaction of cells with a substrate.

Keywords: hydrogels, photopolymerization, spidroin, fibroin, tissue engineering, methacrylic gelatin

Сведения об авторах

Бессонов Иван Викторович — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-499-348-95-58; e-mail: ivanbessonov@gmail.com

Котлярова Мария Сергеевна — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: kotlyarova.ms@gmail.com

Копицына Мария Николаевна — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-499-348-95-58; e-mail: mariankuznetsova@gmail.com

Федулов Александр Владимирович — науч. сотр., детский хирург отделения детской хирургии Московского областного научно-исследовательского клинического института им. М.Ф. Владимирского. Тел.: 8-495-631-74-45; e-mail: iksanderf@mail.ru

Мойсенович Анастасия Михайловна — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: a-moisenovich@mail.ru

Архипова Анастасия Юрьевна — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. лаборатории конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: anastasia-yu-arkhipova@yandex.ru

Богущ Владимир Григорьевич — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории белковой инженерии ГосНИИгенетика. Тел.: 8-495-315-04-56; e-mail: bogush@genetika.ru

Багров Дмитрий Владимирович — канд. физ.-мат. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-23-74; e-mail: dbagrov@gmail.com

Рамонова Алла Аликовна — мл. науч. сотр. межкафедральной лаборатории конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-12-56; e-mail: a.ramonova@yandex.ru

Машков Александр Евгеньевич — докт. мед. наук, руководитель отделения детской хирургии Московского областного научно-исследовательского клинического института им. М.Ф. Владимирского. Тел.: 8-495-631-05-82; e-mail: malexe@yandex.ru

Шайтан Константин Вольдемарович — докт. физ.-мат. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-23-74; e-mail: shaytan49@yandex.ru

Мойсенович Михаил Михайлович — канд. биол. наук, зав. лабораторией конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: mmoisenovich@mail.ru