

УДК 57.01

ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО СПИДРОИНА СТИМУЛИРУЮТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ И МИГРАЦИЮ КЛЕТОК РОГОВИЦЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. О. И. Агапова¹, Д. С. Островский², М. Х. Хубецова², Т. З. Керимов^{2,3}, С. А. Борзенко^{2,3},
В. Г. Богуш⁴, Л. И. Давыдова⁴, С. Э. Чеперегин⁴, А. Е. Ефимов¹, И. И. Агапов^{1,*}, В. Г. Дебабов⁴

Поступило 09.11.2023 г.

После доработки 20.11.2023 г.

Принято к публикации 25.11.2023 г.

В данной статье представлены результаты изучения влияния гидрогеля из рекомбинантного спидроина на клетки переднего эпителия и кератоциты роговицы человека в эксперименте *in vitro*. Всемирная организация здравоохранения в своих исследованиях установила высокую распространенность травм роговицы среди населения развивающихся стран. Для восстановления поврежденной поверхности роговицы в последние годы предложены различные технологии. Одним из актуальных направлений в вопросе заживления дефекта и ускорения регенерации роговицы является применение биodeградируемых материалов на основе шелка, в том числе рекомбинантных аналогов белков каркасной нити паучьего шелка – спидроинов. Эти белки известны своим оптимальным балансом прочности и эластичности, что при имеющейся биологической совместимости, неиммунногенности и способности к биodeградации позволяет использовать их в качестве биоматериала для тканевой инженерии и регенеративной медицины. В связи с этим в данной работе проведена детальная оценка цитотоксичности гидрогелей на основе рекомбинантного спидроина rS2/12-RGDS в отношении эпителиальных клеток и кератоцитов, выделенных из человеческих роговиц, с учетом возможных изменений фенотипа и миграционной активности данных клеток. Проведенное исследование демонстрирует перспективность и терапевтический потенциал гидрогелей на основе рекомбинантного спидроина.

Ключевые слова: роговица, шелк, рекомбинантный спидроин, регенерация, клетки.

DOI: 10.31857/S2686738924020098, **EDN:** WFGSTZ

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение “Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В. И. Шумакова” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

²Федеральное государственное автономное учреждение “Национальный медицинский исследовательский центр “Межотраслевой научно-технический комплекс “Микрохирургия глаза” имени академика С. Н. Федорова” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

⁴Федеральное государственное бюджетное учреждение “Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

*E-mail: igor_agapov@gmail.com

Роговица является одной из оптических сред глаза с уникальным гистологическим строением, однако в результате травматического либо инфекционного воздействия ткань роговицы может необратимо потерять прозрачность, что вызывает значительное снижение остроты зрения и качества жизни пациента [1–3]. Биосовместимые материалы для восстановления ткани роговицы должны соответствовать характеристикам нативной ткани роговицы и обладать подходящими механическими и гидрофильными свойствами, подконтрольной скоростью биodeградации, а также биосовместимостью и прозрачностью [4]. На сегодня в качестве материалов, предназначенных для восстановления роговицы, активно исследуются гидрогели (ГГ) на основе различных природных биоматериалов [5–8]. ГГ на основе рекомбинантных спидроинов (РС), представляющих собой аналоги – белков каркасной нити паутины пауков-кругопрядов, характеризуются очень высокой способностью к адгезии и пролиферации клеток. Благодаря превосходным механическим свойствам и сходству с внеклеточ-

ным матриксом такие ГГ широко исследуются и применяются в областях тканевой инженерии, доставки лекарств и биопроизводства [9–11]. Ранее нами было показано, что материалы на основе РС rS1/9 и rS2/12 (в том числе ГГ и микрогели) эффективно поддерживают адгезию и пролиферацию гепатоцитов, кардиомиоцитов, клеток кости, фибробластов, эпителиальных и мезенхимальных клеток, вызывают васкуляризацию и иннервацию в зоне дефекта при подкожном введении животным [12–14]. Еще одним из преимуществ ГГ на основе РС является возможность введения в их структуру различных биологически активных пептидов, включая мотивы белков внеклеточного матрикса, что значительно расширяет возможности их применения для регенерации различных тканей [15]. Таким образом, биосовместимые ГГ на основе РС обладают одновременно отсутствием иммуногенности, биосовместимостью, регулируемой пористостью, прочностью, упругостью, регулируемым временем биорезорбции и способностью поддерживать эффективный рост и пролиферацию клеток, что в совокупности делает их подходящим материалом для восстановления роговицы.

В настоящей работе для получения ГГ был использован РС rS2/12-RGDS [12]. В этом белке к полноразмерному РС rS2/12 [16] через нейтральный линкер (GGS)₃GG на С-конце молекулы присоединен тетрапептид RGDS из фибронектина, который узнает интегрины большинства клеток [17], чем существенно повышается биосовместимость биоматериала. В большом количестве работ [18] и в наших исследованиях (например, [12]) было продемонстрировано выраженное положительное влияние введения этих последовательностей на взаимодействие матриксов с клетками.

Целью настоящего исследования явилось исследование влияния ГГ на основе РС rS2/12-(GGS)₃GG-RGDS на пролиферативную активность клеток эпителия и кератоцитов роговицы человека.

Ферментацию клеток дрожжевого штамма-продуцента РС *Saccharomyces cerevisiae* и выделение и очистку искомого белка с помощью ионообменной хроматографии осуществляли в соответствии с ранее опубликованным протоколом [19]. Образцы ГГ получали из 3%-ного раствора высокоочищенного РС, как описано в работе [20]. Субстанцию образцов ГГ в закрытых пробирках в герметично закрытом пакете подвергали стерилизации в радиационно-технологической установке (РТУ) с радионуклидными источниками ионизирующего излучения закрытого типа 60Co РХМ-γ-20 с характерной энергией гамма-кванта 1,3 МэВ в течение 10 ч с дозой в 1 кГр/ч. Использованный мягкий вариант γ-облучения позволил сохранить консистенцию ГГ и достичь достаточной стерильности.

Образцы ГГ были разделены на 3 группы из расчета конечной концентрации РС в ГГ: 1-я группа – 0,5%; 2-я группа – 1,0%; 3-я группа – 1,5%.

Для оценки стерильности полученных образцов ГГ из РС выполняли бактериологическое исследование на тиогликолевой среде и бульоне Сабуро по стандартному протоколу. Длительность контроля составляла 14 сут. Результаты бактериологического исследования полученных образцов ГГ на основе РС спустя 14 сут показали отсутствие роста микроорганизмов во всех исследуемых группах, что свидетельствует о стерильности изучаемых образцов.

Кератоциты были выделены из трупных донорских роговиц, полученных из глазного тканевого банка ФГАУ “НМИЦ “МНТК “Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова” Минздрава России (г. Москва). Для выделения клеточных культур были получены 3 роговицы: 1 от донора мужского пола и 2 от доноров женского пола. Средний возраст доноров составил 49 ± 10 лет. Среднее время от момента смерти до ввода в эксперимент составило 9 ± 4 ч.

Выделение клеточных культур из стромы роговицы выполнялось по стандартному протоколу и включало следующие этапы: ферментативную обработку, измельчение, повторную ферментативную обработку, центрифугирование клеточной взвеси. Культуру эпителиальных клеток получали за счет миграции клеток.

Для изучения влияния ГГ из РС на клетки роговицы полученные охарактеризованные клеточные культуры кератоцитов и эпителиальных клеток переносили в ЧП диаметром 35 мм² в концентрации 1×10^6 для кератоцитов и 2×10^6 для эпителиальных клеток. Культивирование проводили при стандартных условиях, в трех повторах. При достижении 70% конфлюэнтности клеток удаляли культуральную среду с внесением 0.5 мл ГГ и 0.5 мл культуральной среды согласно 4 группам исследования: 1-я группа – 0,5% ГГ; 2-я группа – 1,0%; 3-я группа – 1,5%; 4 группа – контроль (интактные клеточные культуры). Оценку роста и морфологии клеток осуществляли при помощи инвертированного светового фазово-контрастного микроскопа IX-81 (Olympus, Япония).

Проведенное иммуногистохимическое исследование (ИГХ) до эксперимента верифицировало исходный фенотип эпителиальных клеток и кератоцитов. Так, по данным ИГХ выделенные эпителиальные клетки экспрессировали маркеры, характерные для клеток данного типа: ABCG2, integrinb1, connexin 43. Выделенные кератоциты стромы роговицы человека экспрессировали характерные маркеры кератоцитов – кератокан, кератансульфат и

Таблица 1. Результаты МТТ-теста для эпителиальных клеток и кератоцитов

	Эпителиальные клетки			Кератоциты		
	Среднее значение (тыс. клеток)	Стандартное отклонение	Количество	Среднее значение (тыс. клеток)	Стандартное отклонение	Количество
Группа 1	138,00	1,42	5	127,20	4,60	5
Группа 2	138,94	1,94	5	129,20	4,13	5
Группа 3*	142,98	1,18	5	140,15	2,66	5
Группа 4 (контроль)	137,00	1,58	5	125,00	1,18	5

Примечание. * — статистически значимые отличия ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

люмикан — при отсутствии либо слабой экспрессии α -гладкомышечного актина.

После совместного культивирования образцов ГГ из групп 1–3 с эпителиальными клетками и кератоцитами выполняли повторное ИГХ-исследование для верификации итогового фенотипа клеточных культур. По окончании эксперимента по данным ИГХ было верифицировано отсутствие изменений в экспрессии характерных маркеров эпителиальных клеток и кератоцитов во всех группах.

Таким образом, установлено, что ГГ из PC rS2/12-RGDS в испытанных концентрациях не оказывают отрицательного влияния на экспрессию характерных маркеров эпителиальных клеток и кератоцитов.

Для изучения жизнеспособности клеток при культивировании с полученными образцами ГГ был выполнен МТТ-тест по стандартному протоколу. Обнаружено статистически значимое увеличение количества как эпителиальных клеток, так и кератоцитов в группе 3 по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (группа 4). Таким образом, ГГ с концентрацией 1,5% статистически значимо стимулировали пролиферативную активность как эпителиальных клеток, так и кератоцитов.

В то же время не было выявлено статистически значимого влияния образцов ГГ из PC в концентрациях 0,5–1,0% на жизнеспособность обоих типов клеток по сравнению с контролем. Полученные значения МТТ-теста для эпителиальных клеток и кератоцитов представлены в табл. 1.

Также было проведено изучение миграционной активности клеток в ходе скарификационного теста (определение ранозаживляющей активности ГГ), который выполнялся по стандартному протоколу с формированием однотипного линейного дефекта при помощи хирургического ножа-скарификатора. Скарификационный тест проводили по следующему алгоритму: в лунки культурального планшета вносили суспензию клеток с добавлением полной культуральной среды, по достижении

клеточного монослоя формировали однотипный дефект данного монослоя с последующей сменой полной культуральной среды. Далее в каждую лунку вносили ГГ в соответствии с группами. Так как плотность ГГ выше, чем плотность культуральной среды, ГГ покрывал клеточную культуру с зоной дефекта, а над ГГ оставалась питательная среда. Наблюдение и оценку восстановления области повреждения проводили в течение 36 ч. По результатам исследования установлено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение миграционной активности эпителиальных клеток в 1,5%-ном ГГ и кератоцитов — в 1,0 и 1,5%-ных образцах ГГ. В остальных группах отсутствие статистически значимых отличий в миграционной активности клеток обнаружено не было. Полученные значения скарификационного теста для эпителиальных клеток и кератоцитов представлены на рис. 1 и в табл. 2.

Выполненное исследование продемонстрировало зависимость эффективности взаимодействия клеток роговицы глаза с ГГ от концентрации в нем PC и позволило подобрать оптимальную концентрацию (1,5%), вызывающую выраженное положительное влияние на пролиферативную и миграционную активность эпителиальных клеток и кератоцитов, что, видимо, связано с более высокой концентрацией сайтов связывания (и в том числе последовательностей RGDS) клеток. При этом ГГ сохранял полную прозрачность.

Показанная в данном исследовании способность ГГ на основе PC rS2/12-RGDS стимулировать пролиферативную и миграционную активность клеток является одним из важнейших критериев терапевтической значимости этих материалов.

Таким образом, полученные в данной работе ГГ на основе PC rS2/12-RGDS могут рассматриваться как перспективный экспериментальный материал с терапевтическим потенциалом, который способен стимулировать процессы клеточной миграции и пролиферации, не вызывая при этом изменений клеточного фенотипа.

Таблица 2. Результаты скарификационного теста для эпителиальных клеток и кератоцитов

	Кератоциты			Эпителиальные клетки		
	Среднее значение (ч)	Среднее отклонение	Количество	Среднее значение (ч)	Среднее отклонение	Количество
Группа 1	29	1,97	5	31	1,58	5
Группа 2	27*	2,37*	5	30	1,58	5
Группа 3	26**	1,94**	5	28**	1,27**	5
Группа 4 (контроль)	30	2,37	5	32	1,96	5

Примечание. *, ** – статистически значимые отличия ($p < 0,05$) по сравнению с контролем).

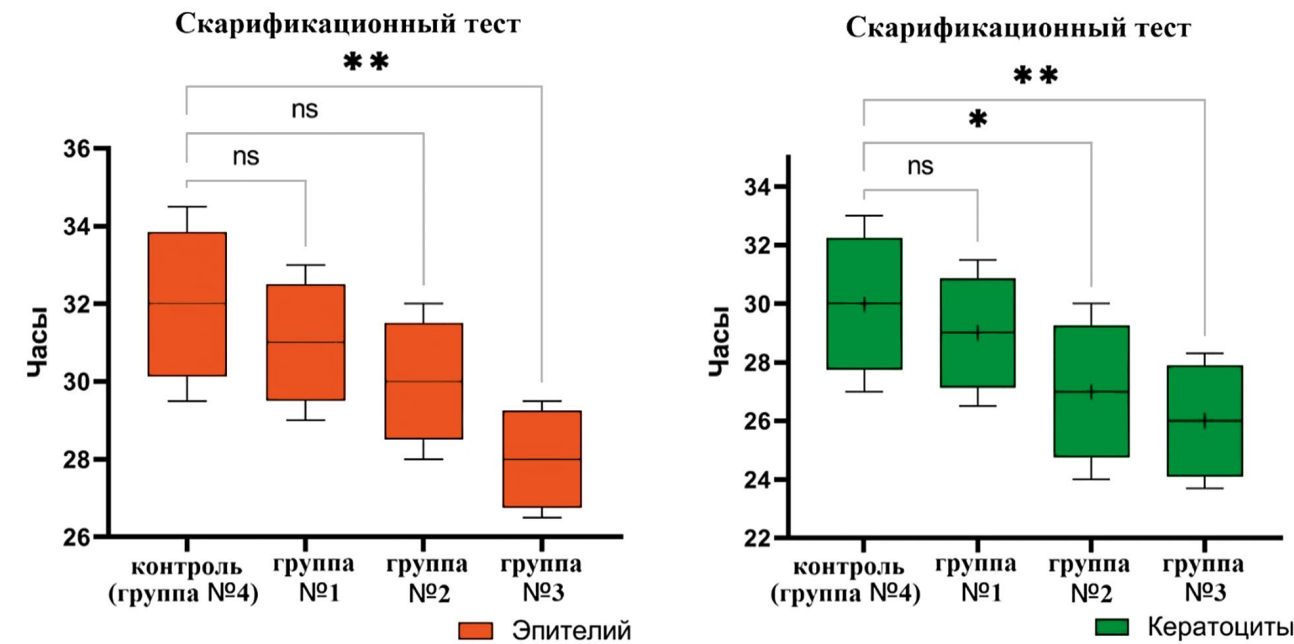


Рис. 1. Результаты скарификационного теста эпителиальных клеток и кератоцитов (*;**– статистически значимые отличия по сравнению с контролем – группой 4, $p < 0,05$; ns – отличия между опытными группами и контролем статистически не значимы, $p > 0,05$).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Культивирование штамма-продуцента, выделение и очистка РС, приготовление и стерилизация гидрогелей выполнены в рамках Государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Донорский материал (кадаверные роговицы и выделенные клетки стромы

роговицы доноров-трупов) использовали в качестве источника биоматериала для экспериментальных исследований. Исследования осуществляли в условиях *in vitro* в соответствии с официально принятыми процедурами и специальным разрешением в рамках законодательства РФ, на основании лицензии Территориального органа Росздравнадзора по Новосибирской области № Л041-00110-47/00574034 от 07.04.2020, которая позволяет использовать ткани, выделенные из кадаверных человеческих глаз для целей трансплантации и научных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Whitcher J.P., Srinivasan M., Upadhyay M.P.* Corneal blindness: a global perspective // *Bull World Health Organ.* 2001. V. 79(3). P. 214–221.

2. Gain P., Jullienne R., He Z., et al. Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking // *JAMA Ophthalmol.* 2016. V. 134 (2). P. 167–173.
3. Jeng B. H., Ahmad S. In Pursuit of the Elimination of Corneal Blindness: Is Establishing Eye Banks and Training Surgeons Enough? // *Ophthalmology.* 2021. V. 128(6). P. 813–815.
4. Mahdavi S.S., Abdekhodaie M.J., Mashayekhan S., et al. Bioengineering Approaches for Corneal Regenerative Medicine // *Tissue Eng Regen Med.* 2020. V. 17 (5). P. 567–593.
5. El-Sherbiny I.M., Yacoub M.H. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges // *Glob Cardiol Sci Pract.* 2013. V. 2013 (3). P. 316–342.
6. Jameson J.F., Pacheco M.O., Nguyen H.H., et al. Recent Advances in Natural Materials for Corneal Tissue Engineering // *Bioengineering (Basel).* 2021. V. 8(11) P. 161.
7. Han Y., Li C., Cai Q., et al. Studies on bacterial cellulose/poly(vinyl alcohol) hydrogel composites as tissue-engineered corneal stroma // *Biomed Mater.* 2020. V. 15(3). P. 035022.
8. Kong B., Chen Y., Liu R., et al. Fiber reinforced GelMA hydrogel to induce the regeneration of corneal stroma // *Nat Commun.* 2020. V. 11 (1). P. 1435.
9. Bowen C.H., Dai B., Sargent C.J., et al. Recombinant Spidroins Fully Replicate Primary Mechanical Properties of Natural Spider Silk // *Biomacromolecules.* 2018. V. 19 (9). P. 3853–3860.
10. Zhang Q., Li M., Hu W., et al. Spidroin-Based Biomaterials in Tissue Engineering: General Approaches and Potential Stem Cell Therapies // *Stem Cells Int.* 2021. V. 2021. P. 7141550.
11. Ramezaniaghdam M., Nahdi N.D., Reski R. Recombinant Spider Silk: Promises and Bottlenecks // *Front Bioeng. Biotechnol.* 2022. V. 10. P. 835637.
12. Teplenin A., Krashennnikova A., Agladze N., et al. Functional analysis of the engineered cardiac tissue grown on recombinant spidroin fiber meshes // *PLoS One.* 2015. V. 10 (3). P. e0121155.
13. Агапов И.И., Пустовалова О.Л., Мойсенович М.М. и др. Трехмерный матрикс из рекомбинантного белка паутины для тканевой инженерии // Доклады Академии наук. 2009. Т. 426. № 1. С. 115–118.
14. Агапова О.И., Ефимов А.Е., Мойсенович М.М. и др. Сравнительный анализ трехмерной наноструктуры пористых биodeградируемых матриксов из рекомбинантного спидроина и фиброина шелка для регенеративной медицины // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2015. Т. 17 (2). С. 37–44.
15. Jansson R., Thatikonda N., Lindberg D., et al. Recombinant spider silk genetically functionalized with affinity domains // *Biomacromolecules.* 2014. V. 15 (5). P. 1696–1706.
16. Bogush V.G., Sokolova O.S., Davydova L.I., et al. A novel model system for design of biomaterials, based on recombinant analogs of spider silk protein // *J Neuroimmune Pharmacol.* 2009. V. 4 (1). P. 17–27.
17. Hirano Y., Okuno M., Hayashi T., et al. Cell-attachment activities of surface immobilized oligopeptides RGD, RGDS, RGDV, RGDT, and YIGSR toward five cell lines // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1993. V. 4. P. 235–243.
18. Kumar V.B., Tiwari O.S., Finkelstein-Zuta G., et al. Design of Functional RGD Peptide-Based Biomaterials for Tissue Engineering // *Pharmaceutics.* 2023. V. 15. P. 345.
19. Revkova V., Sidoruk K., Kalsin V., et al. Spidroin silk fibers with bioactive motifs of extracellular proteins for neural tissue engineering // *ACS Omega.* 2021. V. 6. P. 15264–15273.
20. Nosenko M.A., Moysenovich A.M., Zvartsev R.V., et al. Novel Biodegradable Polymeric Microparticles Facilitate Scarless Wound Healing by Promoting Re-epithelialization and Inhibiting Fibrosis // *Frontiers in Immunology.* 2018. V. 9. P. 2851.

HYDROGELS BASED ON RECOMBINANT SPIDROIN STIMULATE PROLIFERATION AND MIGRATION OF HUMAN CORNEA CELLS

**O. I. Agapova^a, D. S. Ostrovsky^b, M. Kh. Khubetsova^b, T. Z. Kerimov^{b, c}, S. A. Borzenok^{b, c},
V. G. Bogush^d, L. I. Davydova^d, S. E. Cheperegin^d, A. E. Efimov^a, I. I. Agapov^{a, #},
Academician of the RAS V. G. Debabov^d**

^a *Federal State Budgetary Institution "Academician V.I.Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs", of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation Moscow, Russian Federation.*

^b *S. Fyodorov Eye Microsurgery Complex Federal State Institution of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation*

^c *Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation*

^d *The National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, Russian Federation*

[#] *E-mail: igor_agapov@gmail.com*

This article presents the results of studying the impact of recombinant spidroin hydrogel on posterior epithelial cells and human corneal keratocytes in an in vitro experiment. The World Health Organization in its studies has established a high prevalence of corneal injuries among the population of developing countries. In recent years, various technologies have been proposed to restore the damaged surface of the cornea. The use of biodegradable silk-based materials, such as spidroins is one of the main parts of scientific research of corneal regeneration. Spidroins are well known for their optimal balance of strength and elasticity, which, given their biological compatibility, non-immunogenicity and biodegradability, allows them to be used as a biomaterial for tissue engineering and regenerative medicine. In this reason a detailed assessment of the cytotoxicity of hydrogels based on recombinant rS2/12-RGDS spidroin on the epithelial cells and keratocytes was performed here, taking into attention possible changes of the phenotype and migratory activity of these cells. This study demonstrates the promise and therapeutic potential of hydrogels based on recombinant spidroin.

Keywords: cornea, silk, spidroin, regeneration, cells.