

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОМАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ БЕЛКОВ ШЕЛКА ДЛЯ МОДУЛЯЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА

© 2019 г. М. А. Носенко^{1,2*}, А. Ю. Архипова^{2,3}, К.-С. Н. Атретханы^{1,2}, М. С. Друцкая¹, С. А. Недоспасов^{1,2}, М. М. Мойсенович²

*E-mail: maxim-nosenko@yandex.ru

¹Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта
Российской академии наук, Москва, Россия;

²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ГБУЗ МО МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского, Москва, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 01.04.2019

В последнее время широкое внимание уделяется применению биоматериалов для целей регенеративной медицины и тканевой инженерии, так как они представляют собой не только структурный каркас для клеточных популяций, но и способны оказывать влияние на функции различных типов клеток. При этом перспективным является направление по разработке биоматериалов на основе белков шелка (например, фиброина или спидроина), которые имеют оптимальные механические характеристики, а также обладают регенеративной активностью. В ходе работы мы продемонстрировали, что композитные матриксы на основе фиброина с добавлением желатина обладают провоспалительными свойствами *in vitro* и *in vivo*, причем эти свойства зависят от конфигурации скаффолдов. Так, культивирование мышинных эмбриональных фибробластов (МЭФ) на трехмерных (3D), но не двумерных (2D) фиброин/желатиновых матриксах приводит к увеличению экспрессии в клетках молекул адгезии ICAM-1 и VCAM-1, а также экспрессии провоспалительных цитокинов TNF и IL-6. Подкожное введение трехмерных фиброин/желатиновых микрочастиц мышам способствует инфильтрации кожи моноцитами и ускоряет заживление полнослойных кожных ран, а имплантация трехмерных матриксов под капсулу почки приводит к кластеризации лимфоцитов и образованию примитивной лимфоидной ткани в импланте. Таким образом, наши данные свидетельствуют об иммуномодулирующих свойствах фиброиновых матриксов, которые могут быть полезны в тканевой инженерии и в регенеративной медицине.

Ключевые слова: фиброин, воспаление, биоинженерия, регенерация, МЭФ, 3D матрикс

DOI: 10.31857/S102872210006642-1

Адрес: 119991 Москва, ул. Вавилова 32, ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук», лаборатория молекулярных механизмов иммунитета. Недоспасов Сергей Артурович.
Тел.: +74991352311 (раб.).

E-mail: sergei.nedospasov@gmail.com

Авторы:

Носенко М. А., младший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов иммунитета Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН; аспирант кафедры иммунологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

Архипова А. Ю., к.б.н., в.н.с. лаборатории конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова; старший научный сотрудник Научно-исследовательской лаборатории Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского», Москва, Россия;

Атретханы К.-С.Н., младший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов иммунитета Института

молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН; аспирант кафедры иммунологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

Друцкая М. С., к.б.н., в.н.с. лаборатории молекулярных механизмов иммунитета Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия;

Недоспасов С. А., acad., проф., д.б.н., заведующий лабораторией молекулярных механизмов иммунитета Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН; заведующий кафедрой иммунологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

Мойсенович М. М., к.б.н., заведующий лабораторией конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия.

Использование биоматериалов в качестве структурного каркаса для клеток, а также для таргетной доставки препаратов в последнее время активно развивается. Однако до сих пор не

до конца установлено, как различные материалы могут влиять на клетки. Некоторые полимеры считаются относительно инертными, тогда как другие способны вызывать изменения в фенотипе различных клеточных популяций [1]. Это влияние опосредовано, с одной стороны, сигнальными последовательностями в составе полимера, а с другой стороны, связано с особенностями пространственной организации матрикса. В результате, ряд биополимеров может обладать иммуномодулирующими свойствами, которые могут представлять интерес в клинике. Наша работа сфокусирована на исследовании таких свойств биоинженерных матриксов, сконструированных на основе белка шелка тутового шелкопряда – фиброина [2]. Мы обнаружили, что композитные фиброин/желатиновые скаффолды (желатин необходим для стимуляции клеточной адгезии [3]), в зависимости от их конфигурации, могут обладать провоспалительными свойствами. Так, при культивировании мышечных эмбриональных фибробластов (МЭФ) на трехмерных (3D), но не двумерных (2D) фиброин/желатиновых матриксах мы наблюдали усиление экспрессии молекул адгезии ICAM-1 и VCAM-1, а также провоспалительных цитокинов TNF и IL-6 как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Используя селективные ингибиторы внутриклеточных сигнальных путей, мы обнаружили значительную роль киназы JNK в индукции экспрессии молекул адгезии. При этом, экспрессия генов факторов *Ctgf* и *Fgf2*, способствующих развитию фиброза, была снижена в МЭФ, культивируемых на 3D матриксах. В результате мы обнаружили, что фиброин/желатиновые скаффолды имеют провоспалительную активность и препятствуют формированию фиброзной ткани, что также подтверждается данными *in vivo*. Так, подкожное введение трехмерных фиброин/желатиновых микрочастиц вызывало повышенную инфильтрацию миелоидных клеток, экспрессирующих Ly6C^{hi}, в кожу и снижение экспрессии *Ctgf* и *Fgf2*. Более того, фиброин/желатиновые микрочастицы способствовали заживлению в модели полнослойных ран кожи, ускоряли реэпителизацию и препятствовали развитию фиброза [4]. Поскольку фиброин/желатиновые матриксы обладают провоспалительными свойствами, мы предположили, что они могут быть использованы для биоинженерии третичной лимфоидной ткани *in vivo*, с помощью которой в дальнейшем будет возможно индуцировать специфический

иммунный ответ. Для проверки этой гипотезы была проведена имплантация фиброин/желатиновых матриксов под капсулу почки мышам с целью индуцировать рост сосудов и миграцию иммунных клеток в имплант [5]. В этой модели полная васкуляризация матриксов происходила примерно через 2 месяца после имплантации. При анализе имплантов мы обнаружили их значительную инфильтрацию Т- и В-лимфоцитами. Более того, были выявлены кластеры В-лимфоцитов, характерные для третичной лимфоидной ткани. Тем не менее, в имплантах отсутствовали ключевые для вторичных и третичных лимфоидных органов сигнатуры венул с высоким эндотелием (HEV) и фолликулярных дендритных клеток (FDC), что говорит о примитивности полученной лимфоидной ткани. Интересно, что имплантация фиброиновых матриксов, заселенных МЭФ, приводила к увеличению количества инфильтрирующих имплант лимфоцитов, что говорит о необходимости использования стромальных клеток в процессе биоинженерии лимфоидных органов.

Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Smits AIPM, Bouten CVC. (2018) Tissue Engineering meets Immunoengineering: Prospective on Personalized In Situ Tissue Engineering Strategies. *Curr Opin Biomed Eng.*
2. Agapov I. I., Moisenovich M. M., Vasiljeva T. V., Pustovalova O. L., Kon'kov A. S., Arkhipova A. Y., Sokolova O. S., Bogush V. G., Sevastianov V. I., Debabov V. G., Kirpichnikov M. P. (2010) Biodegradable matrices from regenerated silk of *Bombix mori*. *Dokl Biochem Biophys.* 433,201–4.
3. Moisenovich M. M., Arkhipova A. Yu., Orlova A. A., Drutskaya M. S., Volkova S. V., Zacharov S. E., Agapov I. I., Kirpichnikov M. P. (2014) Composite Scaffolds Containing Silk Fibroin, Gelatin, and Hydroxyapatite for Bone Tissue Regeneration and 3D Cell Culturing. *Acta Naturae (English version)*. 2014. Т. 6. № 1. С. 96–101.
4. Nosenko M. A., Moysenovich A. M., Zvartsev R. V., Arkhipova A. Y., Zhdanova A. S., Agapov I. I., Vasilieva T. V., Bogush V. G., Debabov V. G., Nedospasov S. A., Moisenovich M. M., Drutskaya M. S. (2018) Novel biodegradable polymeric microparticles facilitate scarless wound healing by promoting re-epithelialization and inhibiting fibrosis. *Front Immunol.* 9,2851.
5. Shultz L. D., Goodwin N., Ishikawa F., Hosur V., Lyons B. L., Greiner D. L. (2014) Subcapsular transplantation of tissue in the kidney. *Cold Spring Harb Protoc.* 737–740.

**SILK-BASED BIOMATERIALS FOR MODULATION
OF IMMUNE RESPONSE**

© 2019 M. A. Nosenko^{1,2*}, A. Y. Arkhipova^{2,3}, K-S.N. Atretkhany^{1,2},
M. S. Drutskaya¹, S. A. Nedospasov^{1,2}, M. M. Moisenovich²

*E-mail: maxim-nosenko@yandex.ru

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

³Moscow Regional Research and Clinical Institute ("MONIKI"), Moscow, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 01.04.2019

Biomaterials have recently been recognized for their potential use in regenerative medicine and tissue engineering, since they not only represent a scaffold for cell populations, but also can influence functionality of different cell types. In particular silk-based biomaterials (i.e. fibroin or spidroin) are of high interest, because they show prominent mechanistic features and have proregenerative potential. In our work we showed that composite fibroin/gelatin scaffolds induce moderate inflammation both *in vitro* and *in vivo* and this effect depends on the configuration of the matrices. In particular, culturing of Mouse Embryonic Fibroblasts (MEF) on three-dimensional (3D), but not two-dimensional (2D) fibroin/gelatin scaffolds resulted in overexpression of adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 as well as proinflammatory cytokines TNF and IL-6. Moreover subcutaneous injection of fibroin/gelatin microparticles in mice lead to accumulation of inflammatory myeloid cells and acceleration of skin wound healing, while implantation of 3D fibroin/gelatin scaffolds under the kidney capsule promoted lymphocytes clusterization, resulting in generation of primitive lymphoid tissue. Altogether our data suggest immunomodulatory features of fibroin/gelatin scaffolds, which can be useful in tissue engineering and regenerative medicine.

Key words: fibroin, inflammation, bioengineering, regeneration, MEF, 3D scaffold

Authors:

Nosenko M. A., junior staff scientist at Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences; PhD student at immunology department biological faculty of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

Arkhipova A. Y., PhD, lead researcher at biological faculty of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; senior scientist researcher at scientific research laboratory of Moscow Regional Research and Clinical Institute ("MONIKI") Moscow, Russia;

Atretkhany K-S.N., junior staff scientist at Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences; PhD student at immunology department biological faculty of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

Drutskaya M. S., PhD, leading staff scientist at Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

Nedospasov S. A., ✉ Academician of RAS, PhD, head of the lab at Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. E-mail: sergei.nedospasov@gmail.com;

Moisenovich M. M., PhD, head of the lab at biological faculty of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia.