

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МАТРИКСА ИЗ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПАУТИНЫ

Пустовалова О.Л.¹, Агапов И.И.², Мойсенович М.М.¹, Еремин П.С.¹, Казюлина А.А.¹, Архипова А.Ю.¹, Рамонова А.А.¹, Богущ В.Г.³, Севастьянов В.И.², Кирпичников М.П.¹

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, г. Москва

²ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития, г. Москва

³ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов», г. Москва

Текст

Изучена жизнеспособность и динамика распределения мышинных фибробластов 3Т3 в матрице на основе рекомбинантного белка каркасной нити паутины спидроина 1 при длительном культивировании. Показана возможность и преимущества использования конфокальной микроскопии как для визуализации клеток, находящихся в глубоких слоях трехмерной матрицы, так и для наблюдения за изменением состояния культивируемых клеток. Популяция фибробластов сохраняла высокие показатели жизнеспособности и пролиферативной активности, а инфильтрация матрицы клеточной популяцией становилась однородной в течение длительного времени культивирования. Это позволяет рассматривать матрицы на основе спидроина 1 в качестве перспективного материала для создания биоинженерных конструкций.

Ключевые слова: тканевая инженерия, рекомбинантная паутина

CONFOCAL MICROSCOPY STUDY OF BIOLOGICAL PECULIARITIES OF SCAFFOLD MADE FROM RECOMBINANT SPIDER SILK

Pustovalova O.L.¹, Agapov I.I.², Moisenovich M.M.¹, Eremin P.S.¹, Kazulina A.A.¹, Arhipova A.Y.¹, Ramonova A.A.¹, Bogush V.G.³, Sevastianov V.I.², Kirpichnikov M.P.¹

¹Moscow State University, biological faculty

²Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

³State Scientific Center «GNIIgenetika»

We studied the viability and dynamic of cell distribution during long-term cultivation of fibroblasts 3T3 in spider silk spidroin 1-based scaffold. Laser scanning confocal microscopy is shown to have advantages for visualization of cells situated on the external and internal surfaces of scaffold. Fibroblasts maintain high proliferative ability and viability during long term cultivation. Spidroin 1-based scaffold are the perspective materials for bioengineering.

Key words: tissue engineering, recombinant spider silk

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время большими темпами развиваются биотехнологические методы создания ткане-

инженерных конструкций, которые находят применение в области регенеративной медицины для восстановления тканей и органов. Для создания

Статья поступила в редакцию 12.02.09 г.

Контакты: Агапов Игорь Иванович, зав. лабораторией бионанотехнологий ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития. **Тел.** (499) 190-66-19, **e-mail:** igor_agapov@mail.ru

таких конструкций культивируют аутологичные пролиферирующие комитированные или стволовые клетки на матрицах носителях. Матрицы определяют форму будущего трансплантата, обеспечивают необходимую механическую прочность и трехмерное ориентирование клеток [8]. В качестве материалов для изготовления матриц применяют керамические композиты, синтетические алифатические полиэфиры и биополимеры. Наиболее перспективными являются биodeградируемые материалы, которые после имплантации будут замещены естественной тканью, но способные в течение необходимого для этого времени выполнять биомеханические функции [6, 9, 13]. Преимуществом биополимеров является то, что при их деградации не образуются токсичные продукты. Биополимеры на основе коллагена, эластина и фибронектина часто используют в качестве основы для создания матриц [13]. Их главным недостатком является низкая механическая прочность получаемых конструкций, которая ограничивает возможности их применения. Многообещающими материалами являются биополимеры на основе белков шелка шелкопряда и каркасной нити паутины, которые позволяют синтезировать разнообразные по структуре матрицы с высокими показателями механической прочности [3–5, 7] и низкой иммуногенностью [11]. В.Г. Богуш и сотрудники разработали метод получения рекомбинантного белка спидроина 1, входящего в состав каркасной нити паука *Nephila clavipes* [2]. Ранее мы показали, что такие матрицы способствуют адгезии и пролиферации эукариотических клеток и не оказывают токсического действия на культуру [11]. Применение матриц для создания тканей и органов предполагает необходимость долговременного поддержания жизнеспособной популяции клеток. Целью настоящей работы было изучение динамики распределения клеток и изменения жизнеспособности при культивировании в матрице из спидроина 1. В качестве метода, позволяющего наблюдать за клетками на внешней поверхности и в глубине матрицы, использовали метод лазерной конфокальной микроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение трехмерной матрицы из спидроина 1

Матрицу из рекомбинантного белка спидроина 1 получали методом выщелачивания. Для этого растворяли в 50 мкл раствора 10% хлорида лития и 90% муравьиной кислоты навеску 15 г лиофилизованного белка. Далее раствор центрифугировали в течение 10 минут при 11 300 g и супернатант смешивали с NaCl в соотношении около 1 : 2. Раз-

мер использованных кристаллов NaCl определяет размер пор будущей матрицы. Мы использовали кристаллы диаметром 200–400 мкм. Из полученной полимерной массы формировали диск диаметром 10 мм и толщиной около 1 мм, высушивали его при комнатной температуре. Для культивирования клеток готовую матрицу промывали дистиллированной водой, дегазировали и стерилизовали, погружая в 96% этанол.

Культивирование мышинных фибробластов 3Т3 в матрице из спидроина 1 и на плоской поверхности

Для культивирования мышинных фибробластов 3Т3 образцы матрицы 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. Время культивирования клеток достигало двух недель. Жизнеспособность клеток в матрице сравнивали с культурой на плоскости. Для этого суспензию фибробластов 3Т3 в заведомо меньшей концентрации рассеивали на поверхности культуральных стекол. Через 2 ч отмывали не прикрепившиеся клетки и инкубировали в течение недели.

Конфокальная микроскопия для визуализации клеток в трехмерном пространстве матрицы

Для изучения клеток, расположенных на внутренней и наружной поверхности матрицы после культивирования, образцы исследовали методом конфокальной микроскопии. Для изучения инфильтрации матрицы клетками образцы фиксировали 30 мин 4% формалином и обрабатывали 10 мин 0,1% тритоном X100 в ФСБ для пермеабилзации клеточных мембран. Для выявления ядер препараты инкубировали в растворе SYTOX Green (Invitrogen, USA) в течение 20 мин при постоянном помешивании, что улучшает циркуляцию раствора через толщу матрицы и увеличивает доступность красителя для клеток, расположенных на ее внутренних поверхностях. Изображения клеток на поверхности матрицы получали с использованием лазерных сканирующих микроскопов Leica TCS SP5 и Zeiss Axiovert 200M LSM510 META с объективами Plan-Neo uar 20x/0,5 и Plan-Neo uar 10x/0,3. Настройки пинхола проводили в соответствии с инструкциями производителя. Исследовали клетки, расположенные на наружной поверхности и на глубине до 600 мкм. Для количественного анализа изучали изображения, состоящие из серии оптических срезов, выполненных

с интервалом 0,64 или 1 мкм. Количество клеток определяли по числу визуализированных ядер. Для анализа использовали функциональные возможности приложения 3D for LSM Version 1.4.2. С его помощью получали высококонтрастные изображения в черно-белом режиме, позволяющем отделить от фона воксели, соответствующие ядрам. Подсчет количества ядер на трехмерных изображениях осуществлялся автоматически, основываясь на количестве контрастных структур, соответствующих по объему среднему размеру ядер изучаемых клеток.

Определение жизнеспособности клеток при культивировании в матриксе из спидроина 1

Для определения жизнеспособности клеток при культивировании в матрице и на плоской поверхности использовали дифференциальный метод визуализации клеток с помощью красителей SYTO 9 (Invitrogen) и пропидиум йодида (Sigma). Метод основан на избирательной проницаемости поврежденных мембран мертвых клеток для пропидиум йодида, аффинного к нуклеиновым кислотам. SYTO 9, согласно инструкциям производителя, выявляет ядра и слабо окрашивает цитоплазму живых эукариотических клеток. Количество живых и мертвых клеток определяли по числу ядер, выявленных SYTO 9 и пропидиум йодидом. Количественный анализ проводили по описанной выше процедуре с использованием микроскопа Zeiss Axiovert и объектива Plan-Neofluar 20x/0,5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конфокальная микроскопия для визуализации клеток в трехмерном пространстве матрицы

Для культивирования мышинных фибробластов в трехмерном пространстве использовали матрицу, синтезированную на основе рекомбинантного белка спидроина 1. Матрица имеет пористую структуру с диаметром пор 200–400 мкм, обеспечивающую необходимые условия для культивирования. Поры матрицы, соединенные отверстиями и каналами, образуют сложную незамкнутую внутреннюю поверхность, способствующую однородной инфильтрации клетками внутренних слоев. Материал, из которого она изготовлена, способен поддерживать клеточную адгезию и пролиферацию клеток [1]. Для создания тканеинженерных конструкций необходимо длительное культивирование клеток, и матрицы-носители, являющиеся основой для таких конструкций, должны способствовать сохранению

пролиферативной активности культуры и поддерживать высокие показатели ее жизнеспособности. Для наблюдения за распределением клеток в трехмерном пространстве в процессе культивирования и изменением ее жизнеспособности наиболее информативными являются методы трехмерной микроскопии. Эти методы являются альтернативой сложным процедурам, связанным трехмерным моделированием изображений, полученных при приготовлении механических срезов [14].

Изучение распределения клеток в матрице в процессе культивирования проводили методом лазерной сканирующей микроскопии. Этот метод визуализации клеток, находящихся в глубоких слоях матрицы, позволяет сохранить ее пространственную организацию, которая неизбежно нарушается при приготовлении срезов. Однородность инфильтрации матрицы клетками отражает соотношение средней плотности культуры клеток в поверхностных и глубоких слоях. Через сутки после посева суспензии фибробластов 3T3 на поверхность матрицы определяли среднюю плотность клеточной популяции на глубине до 150 мкм и от 300 до 450 мкм. В наружном слое средняя плотность была в 8 раз больше, чем во внутреннем. Через 9 дней культивирования плотность клеток в наружном и внутреннем слоях была приблизительно одинаковой. Увеличение общего количества клеток в наружном и внутреннем слоях также было неравномерным: на глубине до 150 мкм через 9 дней культивирования количество клеток возрастало в 2,5 раза, а на глубине более 300 мкм – в 11 раз. Достижение однородности распределения фибробластов при культивировании в матрице отчасти объясняется активной миграцией клеток во внутренние слои [10, 12].

Увеличение количества клеток в матриксе при длительном культивировании свидетельствует о пролиферации фибробластов. Клетки, находящиеся в процессе деления, можно выявить по наличию митотического веретена (рис. 1). Такие клетки были обнаружены в наружных и в глубоких слоях матрицы на протяжении всего времени культивирования. Присутствие делящихся фибробластов характерно для клеточной популяции, находящейся в стадии роста. Интенсивное увеличение количества клеток во внутренних слоях матрицы может объясняться большей скоростью пролиферации, которая на поверхности ингибируется контактным торможением при формировании монослоя из-за высокой плотности рассеиваемой суспензии. Достижение монослоя при культивировании является стадией плато для развивающейся популяции клеток. На этой стадии увеличивается количество клеток, вступающих в апоптоз, и жизнеспособность клеточной культуры уменьшается. Для оценки жизнеспособности клеточной популяции на внешней поверхности и

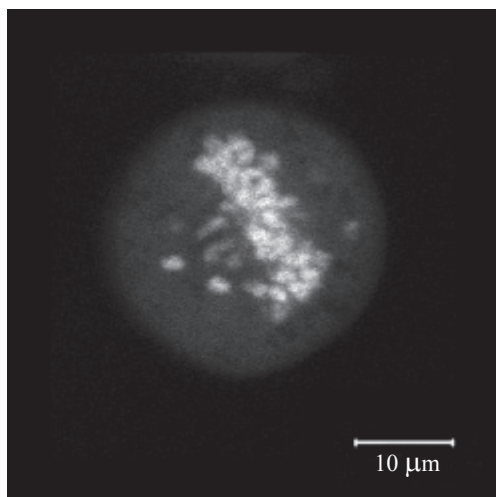


Рис. 1. Фибробласты в процессе деления, выявляемые по наличию митотического веретена. Ядерный материал выделен SYTOX Green

в глубине матрицы могут быть использованы возможности конфокальной микроскопии.

Жизнеспособность клеток при культивировании на поверхности и в глубине матрикса из спидроина 1

Количественным показателем жизнеспособности культуры является соотношение числа живых и мертвых клеток. Увеличение количества мертвых клеток связывают с уменьшением жизнеспособности клеточной популяции. Для визуализации живых и мертвых клеток использовали метод, основанный на избирательной проницаемости для пропидиум йодида, аффинного к нуклеиновым кислотам, для поврежденных клеточных мембран. Для визуализации живых клеток использовали SYTO 9, аффинный к нуклеиновым кислотам, который, так же как и пропи-

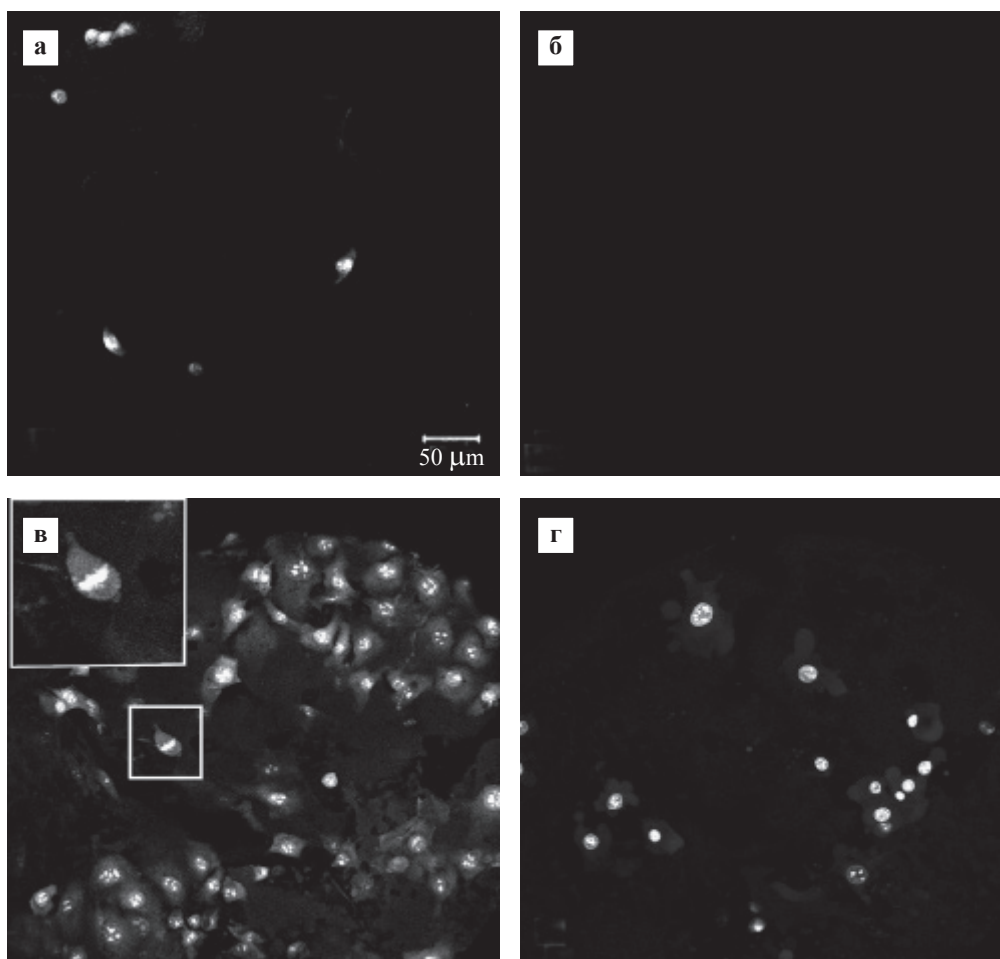


Рис. 2. Изменение жизнеспособности клеточной популяции при культивировании фибробластов в матрице из спидроина 1. Через сутки культивирования на поверхности матрицы присутствовали живые клетки, выявленные SYTO 9 (а); мертвые клетки, ядра которых визуализировали пропидиум йодидом, не обнаружены (б). В популяции присутствует значительное количество делящихся клеток, выявляемых по наличию веретена деления. Через 7 сут культивирования количество фибробластов возросло (в); были выявлены мертвые клетки (г). Представлены изображения внешней поверхности

диум йодид, выявляет ядра и в меньшей степени – цитоплазму. Изучение поверхности матрицы в первые сутки культивирования фибробластов показало, что 100% клеток жизнеспособны (рис. 2, а, б). Увеличение времени культивирования приводит к появлению мертвых клеток. Но рост популяции клеток продолжается, и выявляются клетки, находящиеся в процессе митоза (рис. 2, в). Через 7 дней, по мере инфильтрации фибробластами внутренних слоев матрицы, количество живых клеток снижается до 87%. Сравнение полученных данных проводили с динамикой роста культуры фибробластов на плоскости. В первый день культивирования 100% фибробластов, рассеянных на поверхность культурального стекла, так же, как и на матриксе, были жизнеспособными. Но через неделю культивирования, при достижении популяцией фибробластов стадии конfluence, процент жизнеспособных клеток также уменьшился и составил около 80% (рис. 3). Возможность длительного поддержания жизнеспособности культивируемых клеток в матрице связывают с большей площадью поверхности в трехмерном пространстве. Но жизнеспособность культуры на поверхности и в глубине матрицы существенно отличается. Большее количество мертвых клеток находится на внешней поверхности матрицы и уже на глубине более 60 мкм значительно снижается. На глубине до 60 мкм соотношение живых и мертвых клеток достигало 3 : 1, а на глубине более 60 мкм – не менее 8 : 1 (рис. 4). Несмотря на то что распределение клеток при долговременном культивировании становится гомогенным в поверхностных и внутренних слоях, жизнеспособность клеточной популяции в глубине матрицы больше. Резкое уменьшение показателей жизнеспособности культуры на поверхности, вероятно, также связано с достижением стадии конfluence. Поддержание адгезии, пролиферации и

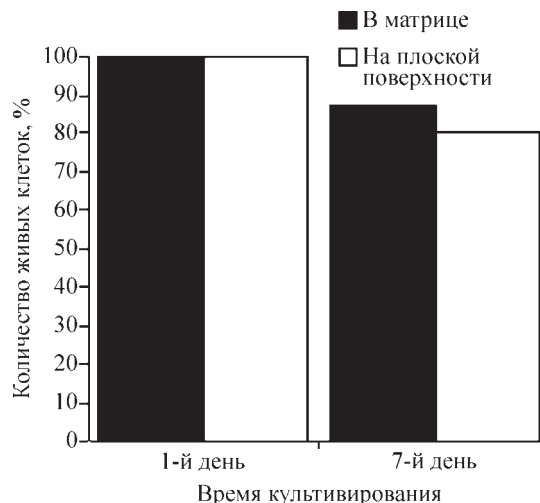


Рис. 3. Жизнеспособность фибробластов 3Т3 при культивировании в матрице из рекомбинантной паутины или на плоской поверхности. Жизнеспособность выявляли по количеству живых клеток в культуре, ядра которых визуализированы SYTO 9

жизнеспособности клеток в матриксе из спидроина 1 свидетельствует о формировании благоприятного микроокружения в глубоких слоях матрицы, и требуется дополнительный подбор условий для улучшения показателей жизнеспособности трехмерной культуры в целом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показана возможность использования конфокальной микроскопии как для визуализации клеток, находящихся в глубоких слоях трехмерной матрицы, так и для наблюдения за изменением состояния культивируемых клеток. Использование матрицы-носителя имеет

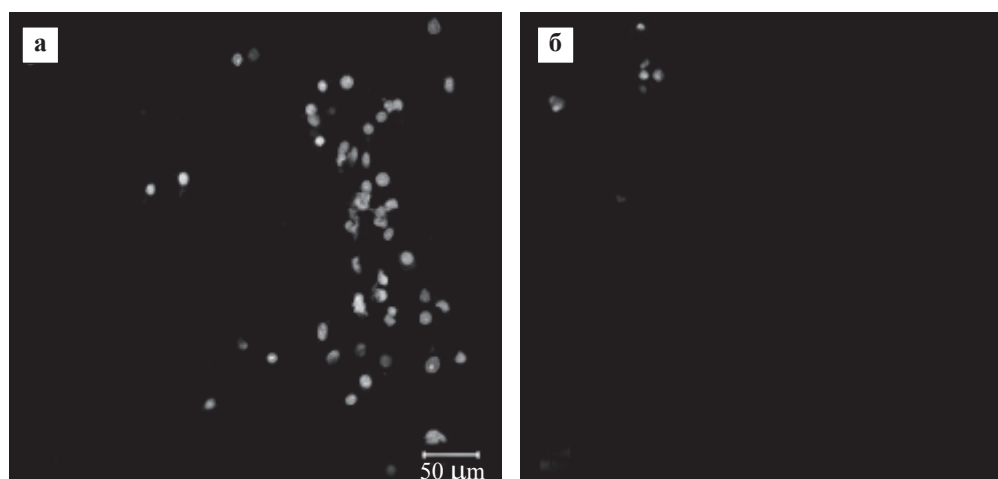


Рис. 4. Нежизнеспособные клетки, выявляемые конфокальной микроскопией в поверхностных слоях матрикса (а) и на глубине 100–120 мкм (б) при культивировании фибробластов 3Т3 в течение 7 дней. Ядра мертвых клеток выявлены пропидиум йодидом. Представлена горизонтальная проекция серии оптических срезов матрицы из спидроина 1 на глубине до 20 мкм и на глубине 100–200 мкм общей площадью 0,6 мм²

преимущества для долговременного культивирования клеток по сравнению с культивированием на плоскости. Это связано со значительно большей площадью поверхности трехмерной структуры и большим временем, необходимым для достижения культурой стадии конfluence. Для создания трехмерной культуры использован матрикс на основе рекомбинантного белка спидроина 1. Адгезия, пролиферация и высокие показатели жизнеспособности обуславливаются и поддерживаются свойствами структуры и материала, из которого изготовлена матрица. Эти необходимые для долговременного культивирования эукариотических клеток свойства делают потенциально возможным использование таких матриц для создания биоинженерных конструкций.

Работа была частично профинансирована Российским Фондом фундаментальных исследований (гранты № 09-02-00173, 06-04-49464-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агапов И.И., Пустовалова О.Л., Мойсенович М.М. Трехмерный матрикс из рекомбинантного белка паутины для тканевой инженерии // Доклады Академии наук. 2009. Т. 426 (1). С. 1–4.
2. Богуш В.Г., Сазыкин А.Ю., Давыдова Л.И. и др. Получение, очистка и прядение рекомбинантного аналога спидроина I // Биотехнология. 2006. № 4. С. 3–12.
3. Gellynck K., Verdonk P., Almqvist K.F. et al. Chondrocyte Growth in Porous Spider Silk 3D-Scaffolds // European Cells and Materials. 2005. V. 10. Suppl. 2. P. 45.
4. Gellynck K., Verdonk P.C., Van Nimmen E. et al. Silk-worm and spider silk scaffolds for chondrocyte support // Journal of materials science. Materials in medicine. 2008. V. 19 (11). P. 3399–3409.
5. Altman G.H., Diaz F., Jakuba C. et al. Silk-based biomaterials // Biomaterials. 2003. V. 24 (3). P. 401–416.
6. Dawson E., Mapili G., Erickson K. et al. Biomaterials for stem cell differentiation // Advanced drug delivery reviews. 2008. V. 60 (2). P. 215–228.
7. Kluge J.A., Rabotyagova O., Leisk G.G. et al. Spider silks and their applications // Trends in biotechnology. 2008. V. 26 (5). P. 244–251.
8. Lee J., Cuddihy M.J., Kotov N.A. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art // Tissue engineering. Part B, Reviews. 2008. V. 14 (1). P. 61–86.
9. Ma P.X. Biomimetic materials for tissue engineering // Advanced drug delivery reviews. 2008. V. 60 (2). P. 184–198.
10. Mandal B.B., Kundu S.C. Cell proliferation and migration in silk broin 3D scaffolds Biomaterials. 2009. Epub ahead of print.
11. Panilaitis B., Altman G.H., Chen J., Jin H.J. et al. Macrophage responses to silk // Biomaterials. 2003. V. 24 (18). P. 3079–3085.
12. Raebera G.P., Lutolf M.P., Hubbell J.A. Mechanisms of 3-D migration and matrix remodeling of fibroblasts within artificial ECMs // Acta Biomaterialia. 2007. V. 3 (5). P. 615–629.
13. Sachlos E., Czernuszka J.T. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds // European cells & materials. 2003. V. 30 (5). P. 244–251.
14. Thevenot P., Nair A., Dey J. et al. Method to Analyze Three-Dimensional Cell Distribution and Infiltration in Degradable Scaffolds // Tissue Engineering Part C: Methods. 2008. V. 14 (4). P. 319–331.