

УДК 577.24

ПЛЕНКИ ИЗ РЕКОМБИНАНТНОГО СПИДРОИНА ОТМЕНЯЮТ НЕКОТОРЫЕ ПРИЗНАКИ СТАРЕНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ NIH 3T3, ИНДУЦИРОВАННЫЕ ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ ГЛЮКОЗЫ

© 2020 А.М. Мойсенович^{1#}, М.М. Мойсенович^{1*#}, А.К. Судьина¹, В.В. Татарский^{2,3,4}, А.И. Хамидуллина³, М.А. Ястребова³, Л.И. Давыдова^{5,6}, В.Г. Богуш^{5,6}, В.Г. Дебабов^{5,6}, А.Ю. Архипова^{1,7}, К.В. Шайтан^{1,8}, А.А. Шгиль^{2,3}, И.А. Дёмина^{1,9}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия; электронная почта: tmoisenovich@mail.ru

² Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, 115478 Москва, Россия

³ Институт биологии гена РАН, 119334 Москва, Россия

⁴ Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», 119049 Москва, Россия

⁵ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, 117545, Москва, Россия

⁶ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182, Москва, Россия

⁷ Московский областной научно-исследовательский клинический институт (МОНИКИ), 129110 Москва, Россия

⁸ Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991 Москва, Россия

⁹ Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, 117198 Москва, Россия

Поступила в редакцию 28.03.2020

После доработки 15.05.2020

Принята к публикации 22.05.2020

Целью исследования было изучение влияния производных структурных белков шелка на показатели клеточного старения при культивировании мышечных фибробластов NIH 3T3 в средах с повышенным содержанием глюкозы. В качестве субстратов для культивирования клеток использовали пленки, сформированные из фиброина шелка *Bombyx mori* или из рекомбинантного аналога спидроина 1 *Nephila clavipes* – rS1/9, а также покровные стекла. Показано, что воздействие 50 мМ глюкозы вызывало замедление роста фибробластов на покровных стеклах. Также, культивирование фибробластов на стеклах при повышенной концентрации глюкозы приводило к увеличению площади клеток и их ядер, к усилению программируемой клеточной гибели и уменьшению синтеза коллагена. Пленки защищали фибробласты от клеточной гибели, вызываемой глюкозой. Наиболее выраженное влияние на количество клеток, включение BrdU и снижение программируемой клеточной гибели было показано для спидроина. Общее количество растворимого коллагена, продуцируемого фибробластами при повышении концентрации глюкозы, уменьшалось на стекле и субстрате из фиброина и не изменялось для спидроина. Проведение молекулярного анализа показало, что при концентрации глюкозы 50 мМ усиливается фосфорилирование субъединицы р65 гетеродимера NF-κB при культивировании на стекле, в то время как на фиброине влияние концентрации глюкозы на данный показатель не детектировалось, а на спидроине фосфорилирование снижалось. В ходе исследования была продемонстрирована антивозрастная активность спидроина, что указывает на его перспективность при разработке скаффолдов, предназначенных для тканевой инженерии и регенеративной медицины.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: клеточное старение, рекомбинантный спидроин, регенерация, искусственная кожа.

DOI: 10.31857/S032097252007009X

ВВЕДЕНИЕ

Важнейшими функциями кожи являются защита от внешних воздействий, в том числе, от

патогенов и ультрафиолетового излучения, выработка витамина D, терморегуляция, газообмен, обеспечение тактильной чувствительности. Эти функции необходимы для поддержания го-

Принятые сокращения: ВКМ – внеклеточный матрикс; BrdU – 5-бром-2'-дезоксисуридин; AGE – конечные продукты гликирования; NF-κB – транскрипционный ядерный фактор; СЭМ – сканирующая электронная микроскопия; FBS – эмбриональная бычья сыворотка; МТГ – 3-(4,5-диметилтиозол-2-ол)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

меостаза и функционирования организма, поэтому разработка подходов для полного физиологического восстановления повреждений кожи — одна из важнейших задач современной регенеративной медицины. Старение сопровождается нарушениями гомеостаза, которые, накапливаясь, вызывают формирование морщин, развитие сухости, усиление пигментации и потерю эластичности [1]. Нарушения микроциркуляции приводят к замедлению заживления ран, развитию диабетических язв и хронических воспалений [2, 3], чему способствуют и изменения внеклеточного матрикса (ВКМ) [4]. Наиболее важные компоненты ВКМ кожи — комплексы гликозаминогликанов и фибриллярных белков, таких как коллаген типа 1 и 3, фибронектин и эластин [5]. Молодая дерма состоит из длинных, плотно упакованных коллагеновых фибрилл, содержащих положительно заряженные остатки лизина, гидроксизина, аргинина и в меньшей степени гистидина. В стареющей коже коллагеновые фибриллы фрагментированы и дезорганизованы. Количество фрагментированного коллагена у доноров кожи 80-ти лет в 4,3 раза больше по сравнению с донорами 21–30 лет [6]. Возрастной фрагментации коллагена может способствовать повышенная активность металлопротеиназ. Кроме того, повреждение белков и липидов может вызывать окислительный стресс, что приводит к ускорению старения кожи [7].

При этом заметной перестройке подвергаются межмолекулярные коллагеновые сшивки. Сшивок между лизинами в цепях $\alpha 1$ и гидроксизинами в цепях $\alpha 2$, опосредованных лизилоксидазой, становится меньше по сравнению с числом сшивок, образующихся при неферментативном гликозилировании (реакция Майяра) [8]. Данный процесс является посттрансляционной модификацией первичных аминогрупп глюкозой. В результате реакции образуется фруктолизин, который формируется при гликозилировании аминогрупп лизина [9]. Впоследствии глюкоза или другие сахара внедряются между молекулами коллагена вместо прямой связи между соседними боковыми цепями аминокислот [8]. Конечные продукты гликирования (AGE) изменяют структуру коллагеновых фибрилл, уменьшая положительный заряд белка [10, 11]. Межмолекулярные сшивки коллаген–сахар–коллаген увеличивают жесткость ткани, делая ее менее эластичной, и уменьшают способность коллагена связывать гиалуроновую кислоту и другие гликозаминогликаны [8, 11].

Гипергликемия — важный фактор старения кожи [12–24]. Токсическое влияние повышенного содержания глюкозы включают в себя следующие эффекты: усиление окислительного

стресса, активацию полиольного пути и биосинтеза гексозамина, повреждение ДНК и изменение экспрессии генов, что приводит к старению, воспалению и/или клеточной смерти [14–17]. Сосудистые осложнения при диабете, вызываемые гипергликемией, приводят к образованию плохо заживающих трофических язв на коже [18, 19].

Культирование клеток в присутствии высокой концентрации глюкозы используется в моделях старения. В этих моделях исследуются такие параметры, как площадь клеток и ядер, повышенная скорость запрограммированной гибели клеток, ослабление пролиферации, изменение синтеза коллагена и активность ядерного фактора каппа В (NF- κ B) [20–22].

Транскрипционный фактор NF- κ B является основным регулятором множества клеточных реакций на стресс. В покоящихся клетках пять субъединиц NF- κ B находятся в цитоплазме в комплексе с ингибирующим белком I κ B. В ответ на стимул киназные каскады приводят к протеолизу I κ B, фосфорилированию субъединицы p65 (Rel A) и трансактивации NF- κ B-зависимых генов [23]. Многочисленные модели показали активацию NF- κ B в результате повреждения ДНК, окислительного стресса и повышенной концентрации глюкозы [24–27]. Учитывая, что каждый из этих факторов участвует в старении клеток кожи, фосфорилирование p65 может быть важным молекулярным процессом, который регулирует фенотип, соответствующий старению. Кроме того, известно, что ингибирование NF- κ B задерживало проявления признаков старения в мышечной модели прогерии [28].

Возрастные изменения кожи могут быть замедлены с помощью использования искусственных компонентов ВКМ, биоискусственных аналогов кожи и биоразлагаемых скаффолдов. Биоинженерные заменители кожи созданы с целью поддержания достаточного уровня пролиферации фибробластов, необходимого для выработки ВКМ, восстановления и обновления соединительной ткани и ее эластичности. Сформированные аналоги ВКМ являются предпочтительными моделями из-за их биосовместимости и умеренной иммуномодулирующей активности. Важно отметить, что при биодegradации этих материалов образуются нетоксичные продукты: короткие пептиды и аминокислоты. Структурные белки шелка и их рекомбинантные аналоги успешно используются в тканевой инженерии при создании скаффолдов — аналогов ВКМ и биоискусственной кожи. Фиброин, структурный белок нити шелкопряда, является примером такого материала [29]. Белок rS1/9, реком-

бинантный аналог спидроина 1 каркасной нити паутины *Nephila clavipes*, имеет рI 10,49 и положительно заряжен при физиологических значениях pH [30–32]. Ген, кодирующий rS1/9, был синтезирован и клонирован в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* [30–32]. Ранее мы продемонстрировали более высокую активность спидроиновых скаффолдов rS1/9 по сравнению с фиброиновыми при регенерации кости и заживлении ран кожи в моделях *in vivo*. Скаффолд из спидроина стимулировал пролиферацию клеток кожи, а также образование сосудов и нервов внутри 3D-конструкций [33–36].

В данной работе мы исследовали влияние пленок, сформированных из rS1/9, на параметры старения мышинных фибробластов линии NIH 3T3, культивируемых при физиологической (5,5 мМ) и высокой (50 мМ) концентрациях глюкозы. Для сравнения были использованы пленки, сформированные из фиброина, и покровные стекла. Пленки из спидроина оказались более эффективны, чем пленки из фиброина в предотвращении некоторых признаков старения клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В исследованиях использовали следующие реактивы: 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропанола (ГФИП, 99%) («ПиМ-Инвест», Россия); этанол 95% («Медхимпром», Россия); диметилсульфоксид (ДМСО, 99,9%), глюкоза, смесь ингибиторов протеаз, фенолметилсульфонилфторид, реагент Брэдфорда («Sigma-Aldrich», США); этанол, ацетон, соляная кислота, Tween-20, Triton X-100, Tris-HCl, NP-40, додецилсульфат натрия, NaCl и EDTA («Chemmed», Испания); 5-бром-2'-дезоксигуанидин (BrdU), антитело против BrdU, козий антикрысиный IgG H + L («Abcam», Великобритания); набор для флуоресцентной микроскопии аннексина V – FITC («BD Pharmingen™», США); набор для анализа Sircol («Bioscolor», Великобритания); Alexa Fluor™ 488 фаллоидин и Hoechst 33342 («ThermoFisher Scientific», США); нитроцеллюлозная мембрана («GE Healthcare», США). Первичные антитела против фосфорилированного (Ser536, клон 93H1) и общего p65 (клон D14E12), вторичные IgG кролика, связанные с пероксидазой хрена (7074) и реагент Enhanced Chemiluminescence («Cell Signaling Technology, Inc.» США). В работе использовали круглые покровные стекла типа D 263® M производства «Marienfeld», Германия.

Выделение и очистка белков шелка. Лиофилизированный фиброин получали из шелковых

хирургических нитей (ООО «Оптикум», Россия) по протоколу, описанному нами ранее [37]. Хирургические нити кипятили 30 мин в 20 мМ водном растворе Na₂CO₃ и затем 3 × 30 мин в дистиллированной воде. Высушивали 4 ч при 60 °С и растворяли в 9,3 М водном растворе LiBr в течение 4 ч на водяной бане при 60 °С, затем диализовали против дистиллированной воды в течение 2 дней, проводя 10 смен воды. Полученный водный раствор фиброина замораживали на 2 дня при –70 °С и лиофилизировали, используя прибор Alpha 1-2 LDplus («Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH», Германия).

Для получения rS1/9 использовали штамм дрожжей *S. cerevisiae*. Клетки дрожжей были трансформированы плазмидой с искусственным геном *rS1/9*, состоящим из девяти химически синтезированных «мономеров» *If1* [32]. Белок rS1/9 выделяли из биомассы дрожжевых клеток, как описано ранее [31]. Клетки были разрушены в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 1 мМ ЭДТА («Amresco», США) и 5% (v/v) глицерина («Merck», Германия), с помощью стеклянных шариков. Полученную суспензию центрифугировали («Eppendorf», Германия) (30 000 g, 1 ч,) и экстрагировали целевой белок из осадка 10%-ным раствором LiCl («Panreac», США) в 90%-ной муравьиной кислоте в течение 18 ч при интенсивном перемешивании. Затем образец центрифугировали при 30 000 g в течение 1 ч, супернатант диализовали против 10 мМ ацетата натрия (pH 4,0) и снова центрифугировали. Окончательную очистку проводили с помощью ионообменной хроматографии на колонке HiPrep 16/10 SP FF («GE Healthcare», США) при изменении pH (pH 4,0 → pH 7,0 → pH 4,0). Белок элюировали градиентом концентрации NaCl и диализовали против деионизированной воды, затем замораживали при –70 °С и лиофилизировали. Высокая чистота образцов была подтверждена с помощью RAAG-SDS электрофореза [31] и спектрофотометрии («Pharmacia LKB Biochrom», Великобритания). Полученные лиофилизированные фиброин и спидроин хранили в плотно завинченных флаконах при 4 °С.

Формирование и характеристика пленок. Для получения 2%-го (w/v) раствора фиброина или rS1/9 в ГФИП навеску 200 мг материала растворяли в 1 мл при 70 °С, пропускали через целлюлозный фильтр для удаления нерастворимых частиц и центрифугировали при 13 680 g в течение 6 мин [38]. Образцы пленок были получены с помощью нанесения раствора белка на круглые покровные стекла диаметром 23 мм с последующим высушиванием. Образцы промывали этанолом и водой для формирования эластич-

ных пленок (несколько мкм толщиной), прочно прикрепленных к поверхности стекла. Морфология поверхности пленок была охарактеризована с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

Пленки для СЭМ были подготовлены в соответствии со стандартным протоколом. Фиксировали 2,5%-ным (v/v) глутаральдегидом в 0,1 М какодилатном буфере, pH 7,2, при 4 °C в течение ночи и трижды промывали в том же буфере с последующей дегидратацией в растворах этанола восходящей концентрации и ацетона. Высушивание в критических точках проводили на приборе НСР-2 («Hitachi, Ltd.», Япония). Образцы металлизировали слоем платины толщиной 20 нм («Ion Coater IB3; Eiko Engineering Co.», Япония). Полученные образцы анализировали с помощью микроскопа Camscan S2 («Cambridge Instruments», Великобритания) с разрешением 10 нм и рабочим напряжением 20 кВ. Изображения были получены с использованием программного обеспечения MicroCapture («SMA», Россия).

Клеточные культуры. Клетки линии мышечных фибробластов NIH 3T3 («American Type Culture Collection», Manassas, США) культивировали в модифицированной Дульбессо среде Игла («PanEco», Россия) с добавлением 10% (v/v) эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) («HyClone», США), 2 мМ L-глутамин («PanEco», Россия) и 100 мкг/мл гентамицина («Gibco», США) при 37 °C, 5% CO₂ во влажной атмосфере. Клетки 15–20 пассажей использовали в качестве модели стареющих фибробластов. Клетки были разделены на шесть групп: 5,5 мМ глюкоза/стекло; 50 мМ глюкоза/стекло; 5,5 мМ глюкоза/фиброин; 50 мМ глюкоза/фиброин; 5,5 мМ глюкоза/гS1/9; 50 мМ глюкоза/гS1/9.

Измерение количества клеток и их площади. Для определения количества клеток и площади, покрытой клетками, растущими на твердых субстратах, был обновлен протокол, описанный ранее [39]. На соответствующие стекла, находящиеся в чашках Петри диаметром 35 мм, наносили 40 000 клеток в 2 мл среды. Клетки фиксировали в 4%-ном (v/v) параформальдегиде в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,4 (PBS) в течение 30 мин после 3-х дней культивирования. Затем проводили пермеабиллизацию в 0,1%-ном (v/v) растворе Triton X-100, содержащем 0,1% (v/v) FBS, в PBS в течение 30 мин при 4 °C с дальнейшей отмывкой образцов дважды с помощью PBS, содержащего 0,1% (v/v) FBS. Для идентификации актиновых микрофиламентов и ядер клетки инкубировали с Alexa Fluor™ 488 фаллоидином и Hoechst 33342 соответственно, затем трижды отмывали PBS. Изо-

бражения были получены на микроскопе Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 («Nikon Corporation», Япония), объективами CFI Plan Apo VC 20×, 0,75 и Apo TIRF 60× Oil DIC. Среднюю площадь отдельных клеток определяли путем измерения площади кластеров и отдельных клеток, деленной на количество ядер.

Оценка клеточной пролиферации путем включения BrdU. Анализ включения BrdU проводили в соответствии с протоколом производителя. Для этого фибробласты линии NIH 3T3 (4×10^4) высевали на соответствующие стекла в чашках Петри диаметром 35 мм в 2 мл среды. Через 44 ч в среду добавляли BrdU (конечная концентрация 10 мкМ) на 4 ч, после чего клетки фиксировали с помощью параформальдегида при комнатной температуре в течение 10 мин с последующей пермеабиллизацией в растворе 0,1%-го (v/v) Triton X-100 и обработкой 1,5 М HCl. Образцы инкубировали в течение ночи с антителами против BrdU (1/250). Несвязанные антитела отмывали 5× с помощью раствора 0,1%-го (v/v) Tween-20, содержащего 1% (v/v) FBS в PBS. Далее образцы обрабатывали конъюгированными с Су3 вторичными поликлональными антителами (козий анти-крысиный IgG H + L, 1/750) в течение 1 ч при комнатной температуре. Ядра были окрашены Hoechst 33342. Изображения были получены на микроскопе Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 («Nikon Corporation», Япония) и объективом Plan Fluor 40×, 1,3.

Анализ апоптоза. Необработанные стекла или пленки, прикрепленные к 23 мм покровным стеклам, помещали на дно чашки Петри, диаметром 35 мм, после чего добавляли 10^5 клеток в 2 мл среды. Апоптоз оценивали через 48 ч после посева с помощью конфокальной микроскопии с использованием набора для флуоресцентной микроскопии аннексин V – FITC. Клетки визуализировали на микроскопе Eclipse Ti-E, оборудованном конфокальным модулем A1 («Nikon Corporation», Япония) и объективом Plan Fluor 40×, 1,3.

Измерение коллагена. Для оценки количества растворимого коллагена фибробласты линии NIH 3T3 высевали на чашку Петри диаметром 35 мм в количестве 4×10^4 в 2 мл культуральной среды. Набор для анализа Sircol [40] использовали для определения количества общего растворимого коллагена через 48 ч после посева.

Анализ выживаемости клеток. Клетки высевали на пленки из фиброина или гS1/9, как описано выше. Через 2 дня добавляли 200 мкл раствора МТТ (3-(4,5-диметилтиозол-2-ол)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид, 5 мг/мл в PBS) («Sigma-Aldrich», США) и инкубировали при 37 °C, 5% CO₂ в течение 4 ч во влажной атмосфере.

ре. Кристаллы формазана растворяли в ДМСО и колориметрические измерения («Тесан», Швейцария) проводили при 550 нм.

Иммуноблоттинг. Клетки линии NIH 3T3 обрабатывали в соответствии с вышеуказанными протоколами, после чего промывали ледяным PBS и лизировали в течение 30 мин на льду в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl, pH 7,4, 1% (v/v) NP-40, 0,1% (m/v) SDS, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, смесь ингибиторов протеаз и 2 мМ фенилметилсульфонилфторида. Концентрацию белка определяли с помощью реагента Брэдфорда [41]. Белки разделяли электрофорезом в RAAG (40 мкг общего белка на лунку) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0,2 мкм. Неспецифические взаимодействия белок–антитело блокировали раствором 5%-го обезжиренного молока в PBS. Мембраны инкубировали в течение 2 ч с первичными антителами против фосфорилированного (Ser536, клон 93Н1) или общего p65 (клон D14E12) и визуализировали с использованием вторичного связанного с пероксидазой хрена анти-кроличь-

его IgG (клон 7074) и реагента с улучшенной хемиллюминесценцией в системе Image Quant LAS 4000 («GE Healthcare», США). Денситометрия иммуноблотов и количественный анализ интенсивностей полос проводили с использованием ImageJ. Интенсивности полос фосфо-p65 были нормализованы на уровень общего p65. Образец «Стекло 5,5 мМ» был взят за 1.

Статистический анализ. Данные представлены как среднее из трех повторов \pm стандартное отклонение. Сравнения проводились с использованием одностороннего теста ANOVA с тестом множественных сравнений Тьюки (GraphPad Prism 8.2.0; GraphPad Software, Inc.). $p < 0,05$ между группами считали статистически значимым различием.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Пленки, сформированные из структурных белков шелка. Пленки были сформированы из фиброина тутового шелкопряда *Bombyx mori* или

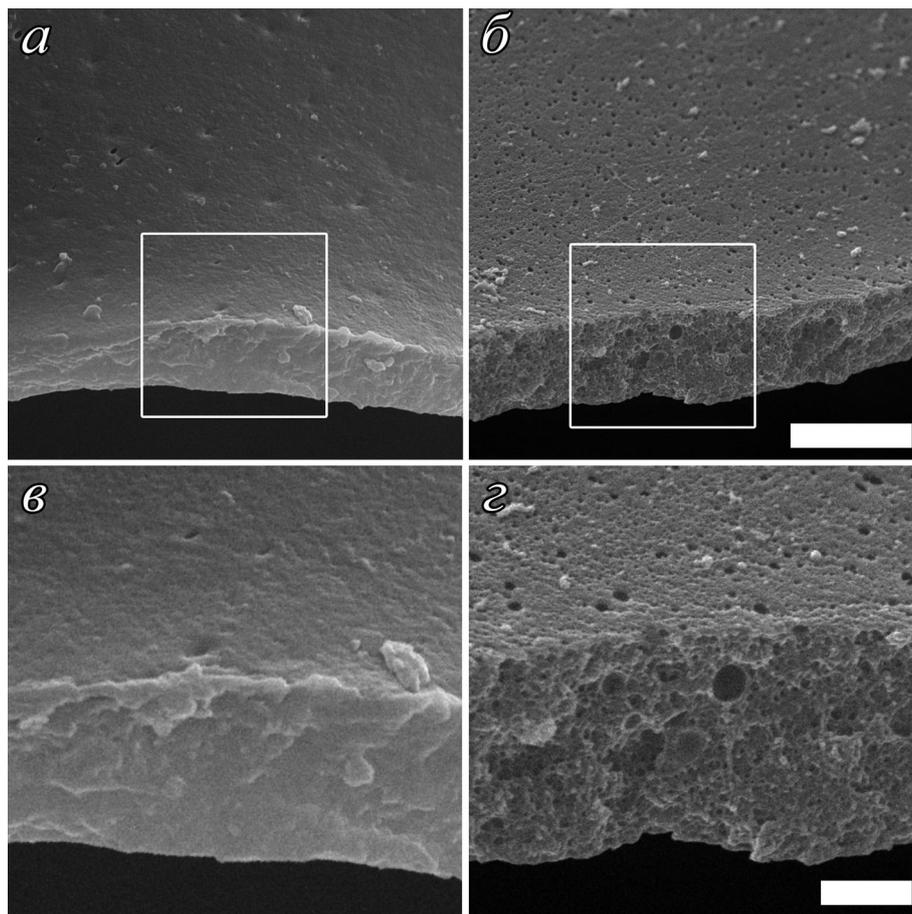


Рис. 1. СЭМ пленок, образованных фиброином или спидроином rS1/9. а, в – Фиброиновая пленка; б, г – пленка rS1/9. Белые прямоугольники обозначают расположение увеличенных изображений (в, г). Масштаб: а, б – 10 мкм; в, г – 3 мкм

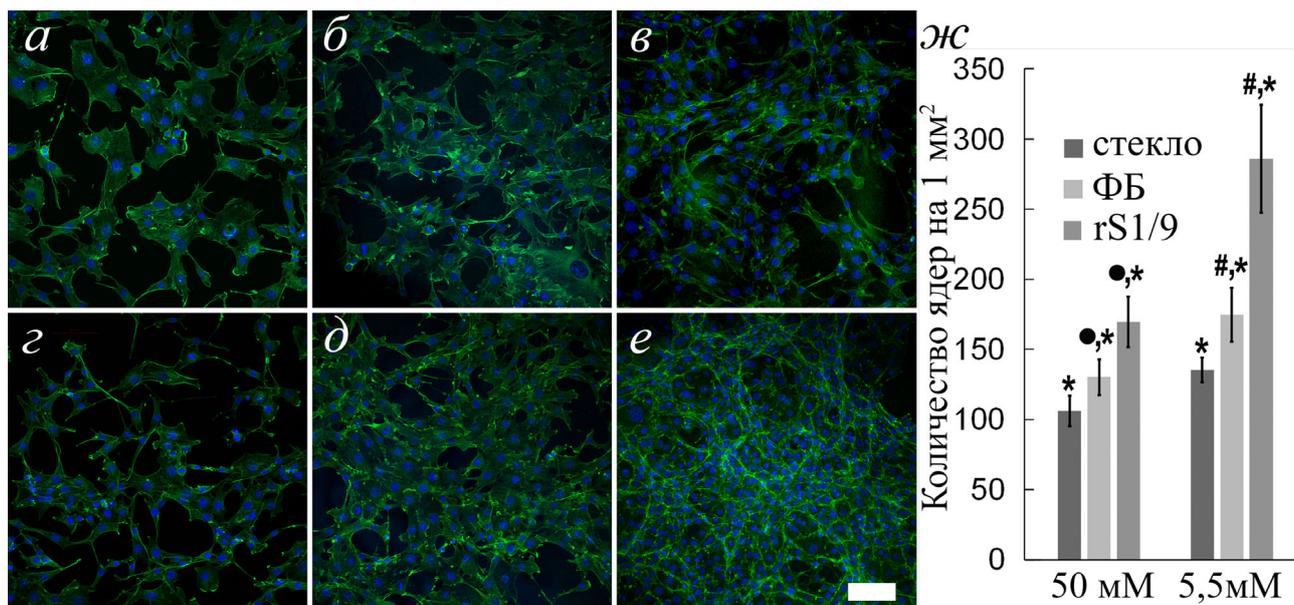


Рис. 2. Плотность клеток на разных подложках в зависимости от концентрации глюкозы. *a–e* – 50 мМ; *z–e* – 5,5 мМ. *a, z* – Стекло; *б, д* – фиброин; *в, e* – rS1/9. Ядра визуализировали с помощью Hoechst 33342 (синий), актиновые филаменты – с Alexa Fluor™ 488 фаллоидином (зелёный). Масштаб – 100 мкм. *ж* – Плотность клеток на разных субстратах в зависимости от концентрации глюкозы. Представлены средние значения ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Парное сравнение показало существенные различия между клетками в среде с низкой и высокой концентрациями глюкозы на различных субстратах шелка (фиброине (ФБ) или спидроине (rS1/9)) и стекле (* – разница, выявленная при культивировании клеток на одних и тех же субстратах с низким или высоким содержанием глюкозы; • – разница, выявленная при культивировании клеток на субстратах из белков шелка и стекле в присутствии 50 мМ глюкозы; # – разница, выявленная при культивировании клеток на субстратах из белков и стекле в присутствии 5,5 мМ глюкозы); $p < 0,05$. (С цветными вариантами рис. 2–4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>.)

белка rS1/9 – рекомбинантного аналога спидроина 1 *Nephila clavipes* (рис. 1).

Значения толщины пленки составляли 8–10 мкм для фиброина и 10–12 мкм для спидроина (подробности приготовления см. в разделе «Материалы и методы»). Небольшая разница в толщине пленок может быть обусловлена наличием нанопор в структуре спидроиновых пленок. Эти нанопоры сформировались спонтанно, без каких-либо дополнительных реагентов. Отдельные нанопоры открываются на поверхности. Диаметр нанопор составлял 5–25 нм. В пленках из фиброина поверхностных пор обнаружено не было.

Плотность и пролиферация клеток линии НИН ЗТЗ на пленках из фиброина и спидроина при различных концентрациях глюкозы. Для моделирования условий старения фибробластов мы оценили влияние высокой концентрации глюкозы на выживаемость клеток, их пролиферацию, а также клеточную и ядерную площади. Клетки наносили на покровные стекла или на биоразлагаемые пленки, сформированные из фиброина или rS1/9, затем подвергали воздействию 50 мМ глюкозы. Для сравнения использовали 5,5 мМ

глюкозу. В 5,5 мМ глюкозе после 72 ч культивирования на стеклах средняя плотность клеток составила 136 ± 9 ядер/мм², тогда как на фиброине эта величина составила 175 ± 19 ядер/мм², а для спидроина этот показатель был еще выше – 287 ± 39 ядер/мм² (рис. 2.). При концентрации глюкозы 50 мМ максимальная плотность (170 ± 27 ядер/мм²) была выявлена на пленках из спидроина, а минимальная – на стеклах (107 ± 11 ядер/мм²); плотность клеток на пленках из фиброина составила 131 ± 13 ядер/мм².

Снижение плотности клеток в среде с концентрацией глюкозы 50 мМ было связано с замедленной скоростью клеточной пролиферации. Процент BrdU-положительных клеток был самым низким у фибробластов, культивируемых на стеклах, по сравнению с таким же показателем для клеток, культивируемых на пленках. Пленки из спидроина обуславливали максимальное включение BrdU в ДНК клеток, культивируемых при 50 мМ глюкозы (рис. 3). Кроме того, при концентрации глюкозы 5,5 мМ скорость пролиферации на стекле была низкой, тогда как спидроин обеспечивал условия для самой быстрой пролиферации.

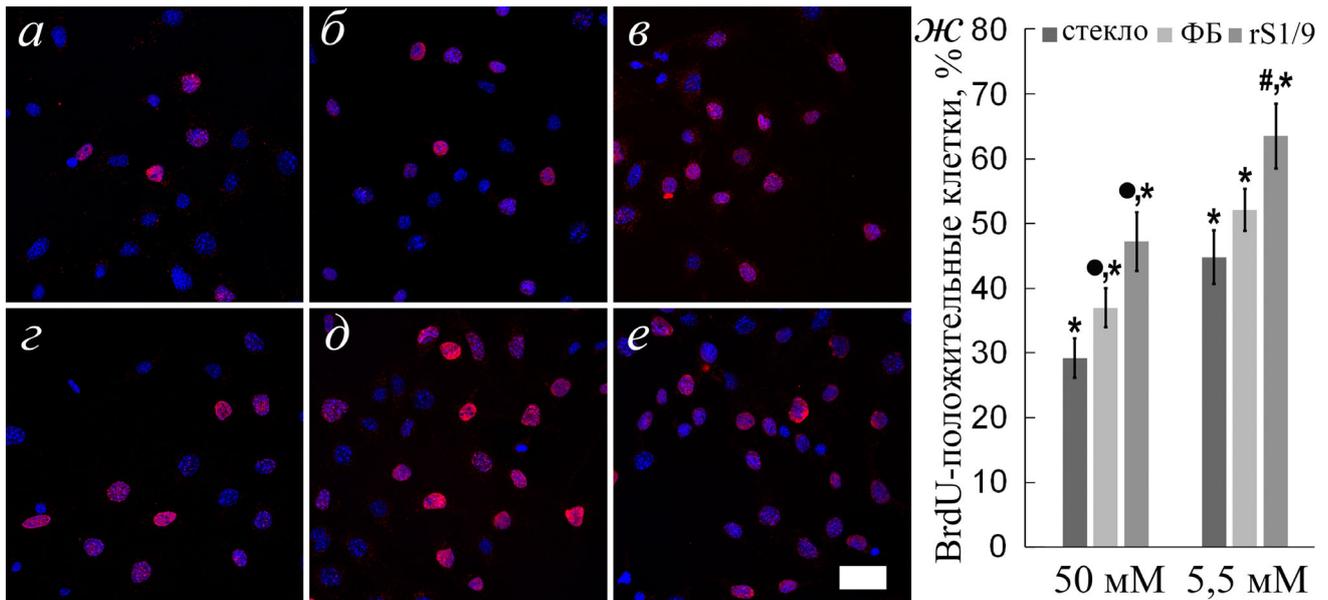


Рис. 3. Включение BrdU фибробластами линии NIH 3T3 на разных подложках в присутствии 50 мМ (*a–в*) или 5 мМ (*г–е*) глюкозы. *a, г* – Стекло, *б, д* – фиброин, *в, е* – rS1/9. Красный цвет: окрашивание BrdU; синий цвет: Hoechst 33342 (ядро). Масштаб – 100 мкм. *ж* – Процентное содержание BrdU-положительных клеток на разных подложках в зависимости от концентрации глюкозы. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Парное сравнение показало существенные различия между клетками в среде с низкой и высокой концентрациями глюкозы на различных субстратах шелка (фиброине (ФБ) или спидроине (rS1/9)) и стекле. * Разница, выявленная при культивировании клеток на одних и тех же субстратах с низким или высоким содержанием глюкозы; • – разница, выявленная при культивировании клеток на субстратах из белков шелка и стекле в присутствии 50 мМ глюкозы; # – разница, выявленная при культивировании клеток на субстратах из белков и стекле в присутствии 5,5 мМ глюкозы; $p < 0,05$

Влияние высокого содержания глюкозы на площадь клеток и их ядер. Площадь клеток и их ядер увеличивалась при культивировании фибробластов линии NIH 3T3 на стекле с 50 мМ глюкозой. Пленки из фиброина частично ослабляли эти эффекты, тогда как на пленках из спидроина влияния высокой концентрации глюкозы обнаружено не было (рис. 4).

Выживаемость клеток: роль материала пленки и содержания глюкозы. Воздействие 50 мМ глюкозы на фибробласты линии NIH 3T3 при культивировании на стекле в течение 48 ч существенно увеличивало количество апоптотических клеток, при концентрации глюкозы 5,5 мМ процент ранних апоптотических клеток (аннексин V положительный/пропидий йодид отрицательный) составлял $1,84 \pm 0,73\%$, тогда как в 50 мМ глюкозе соответствующие значения составили $8,31 \pm 2,71\%$ (рис. 5, *a*); количество поздних апоптотических/некротических клеток также увеличивалось в 50 мМ глюкозе (рис. 5, *б*). Количество клеток с маркерами гибели уменьшалось, если фибробласты культивировали на пленках из белков шелка, причем лучший защитный эффект выявляли на спидроине (рис. 5).

Было измерено количество коллагена, продуцируемого фибробластами линии NIH 3T3

после их культивирования в течение 48 ч на разных субстратах в концентрациях глюкозы 5,5 мМ или 50 мМ с применением колориметрического теста, и нормализовано к сигналу МТТ (рис. 6). Первый параметр отражает концентрацию растворимого коллагена, а второй соответствует синтетической активности отдельных клеток.

Дифференциальное влияние концентрации глюкозы на активацию NF-κB в фибробластах линии NIH 3T3, выращенных на пленках из шелка. Известно, что транскрипционный фактор NF-κB опосредует различные клеточные ответы на внутриклеточные и внеклеточные сигналы [42]. В частности, NF-κB задействован в регуляции адгезии и метаболизма глюкозы. Субъединица p65 гетеродимера NF-κB фосфорилируется по Ser536 с последующей транслокацией в цитоплазму и трансактивацией генов. Добавление 50 мМ глюкозы к фибробластам линии NIH 3T3 привело к заметным различиям в фосфорилировании субъединицы p65, биомаркера активации NF-κB. По аналогии с предыдущими сообщениями [20] количество фосфо-p65 было увеличено в клетках, культивированных на стекле в 50 мМ глюкозе. Кроме того, пленки из разных видов шелка по-разному регулировали фосфорилирование p65:

на пленках из спидроина при концентрации глюкозы как 5,5 мМ, так и 50 мМ были выявлены противоположные эффекты, а фиброин не изменял фосфорилирование р65 в ответ как на низкую, так и на высокую концентрацию глюкозы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Модель клеточного старения. При проведении исследований была использована модель

клеточного старения фибробластов при их культивировании в среде с повышенным содержанием глюкозы. Диабет и сопутствующая ему гипергликемия сопровождаются проявлениями клеточного старения. Для установления диагноза сахарный диабет ВОЗ рекомендует ориентироваться на уровень глюкозы в плазме крови натощак $\geq 7,0$ мМ (126 мг/дл) или при проведении теста с нагрузкой $\geq 11,1$ мМ (200 мг/дл) в плазме через 2 ч после приема глюкозы [43].

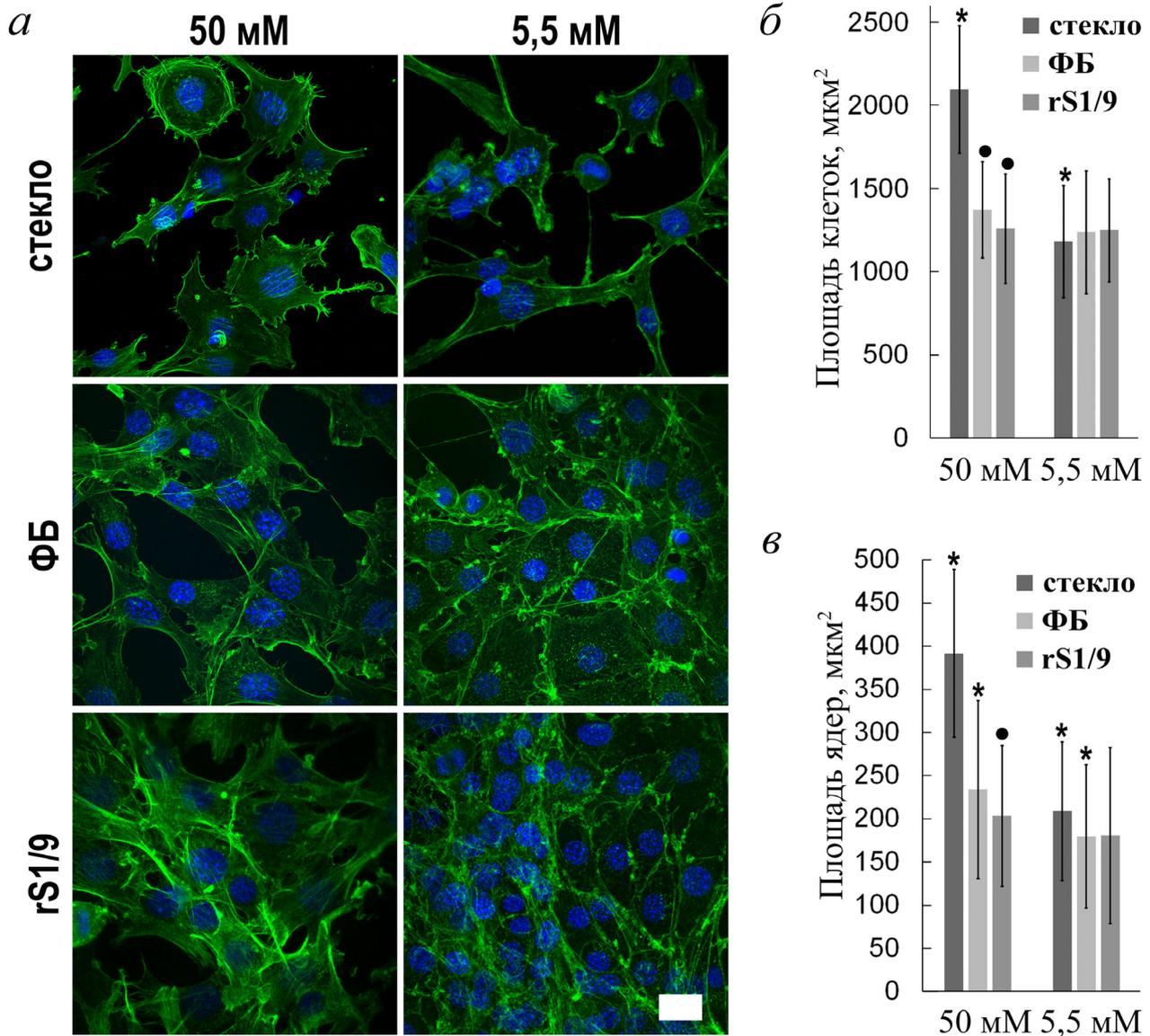


Рис. 4. Площадь клеток и их ядер на разных пленках при 50 мМ против 5,5 мМ глюкозы. *а* – Ядра визуализировали с помощью Hoechst 33342 (синий), актиновые микрофиламенты – с Alexa Fluor™ 488 фаллоидином (зеленый). Масштаб – 10 мкм. Средние значения площади клеток (*б*) и ядер (*в*) соответственно. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Попарное сравнение показало существенные различия, (*) выявленные при культивировании клеток на одних и тех же субстратах (фиброине (ФБ), спидроине (rS1/9) и стекле) с низким или высоким содержанием глюкозы, и (•) разницу, выявленную при культивировании клеток на субстратах из белков шелка и стекле в присутствии 50 мМ глюкозы; $p < 0,05$

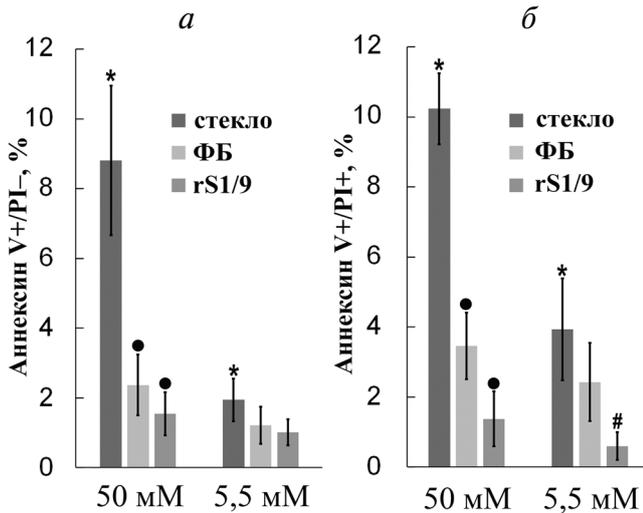


Рис. 5. Окрашивание аннексин V/PI фибробластов линии NIH 3T3, выращенных на разных подложках, в зависимости от концентрации глюкозы. *a* – Окрашивание аннексин V+/PI–; *б* – окрашивание аннексин V+/PI+. PI – пропидий йодид. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Парное сравнение показало существенные различия между клетками в среде с низкой и высокой концентрациями глюкозы на различных субстратах шелка и стекле. * Разница, выявленная при культивировании клеток на одних и тех же субстратах с низким или высоким содержанием глюкозы; • разница, выявленная при культивировании клеток на субстратах из белков шелка (фиб्रोине (ФБ) или спидроине (rS1/9)) и стекле в присутствии 50 мМ глюкозы; # разница, выявленная при культивировании клеток на субстратах из белков и стекле в присутствии 5,5 мМ глюкозы; $p < 0,05$

Повышение концентрации глюкозы в среде культивирования до 20–50 мМ и выше – основа модели клеточного старения во многих исследованиях, в том числе при индукции старения мышечных фибробластов 3T3 [20], мезенхимальных стволовых клеток крысы [44], фибробластов человека [45], эндотелиальных клеток [46]. При этом гипергликемия является важнейшим фактором старения фибробластов. Такое старение в значительной степени обусловлено образованием конечных продуктов гликирования (AGEs). AGEs – ковалентно связанные соединения, являющиеся продуктами неферментативной реакции между глюкозой и белками или липидами. Повреждающее действие этих реакций проявляется в их способности модифицировать белки, участвующие в образовании фокальных контактов и белки-регуляторы транскрипции генов [47].

Взаимодействие AGEs с рецептором RAGE приводит к активации внутриклеточных сигнальных каскадов и активации транскрипции генов, продукты которых, среди прочих регуля-

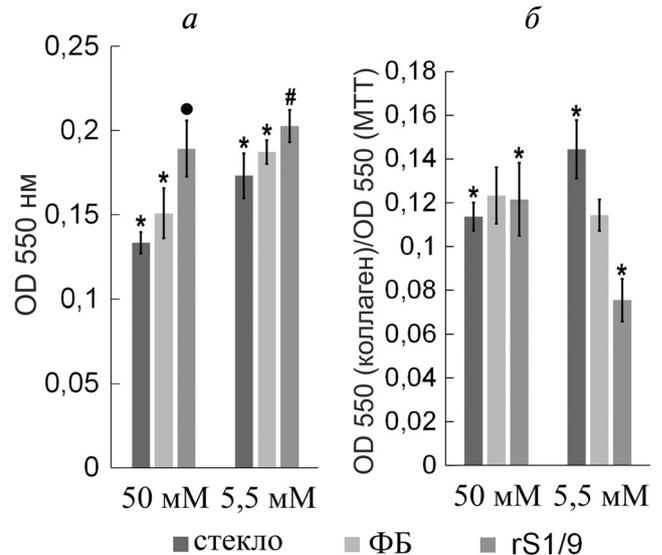


Рис. 6. Измерение растворимого коллагена. *a* – Колориметрические анализы концентрации коллагена в среде; *б* – значения в *a* нормированы на сигнал MTT. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Парное сравнение показало существенные различия между клетками в среде с низкой и высокой концентрациями глюкозы на различных субстратах шелка [фиб्रोине (ФБ) или спидроине (rS1/9)] и стекле (* разница, выявленная при культивировании клеток на одних и тех же субстратах с низким или высоким содержанием глюкозы; • разница, выявленная при культивировании клеток на субстратах из белков шелка и стекле в присутствии 50 мМ глюкозы; # разница, выявленная при культивировании клеток на субстратах из белков и стекле в присутствии 5,5 мМ глюкозы); $p < 0,05$

торных эффектов, участвуют в формировании фенотипа старения. Кроме того, взаимодействие AGE-RAGE стимулирует генерацию активных форм кислорода (АФК) по пути НАДФН-оксидазы [48]. Блокирование RAGE путей приводит к отмене признаков старения, индуцированных повышенной концентрацией глюкозы в культивируемых фибробластах человека [45].

Роль структурных характеристик спидроиновых пленок в пролиферации и старении фибробластов. Молекула rS1/9 (94 кДа) содержит 9 мономерных повторов, каждый из которых состоит из 4 первичных аминокислотных повторов, идентичных природному спидроину 1. Первичные повторы обогащены триплетами GGL, GGY и GGQ, а также каждый несет по одному поли-аланиновому участку (5–8 а.о.). Эти блоки образуют β -листы в виде кристаллитов, и именно эти структуры придают уникальную прочность материалам, полученным из спидроина. С другой стороны, растяжения участков между Ala

блоками позволяют материалу быть эластичным. Рассчитанное значение pI для rS1/9 составляет 10,49. Двадцать девять остатков Arg и отсутствие отрицательно заряженных боковых цепей делают белок rS1/9 поликатионом при физиологических значениях pH [49]. Из-за низкого значения pI (4,9) фиброин, напротив, заряжен отрицательно в том же диапазоне pH. Во время контакта с питательными средами или биологическими жидкостями поверхности фиброина и других биоматериалов могут быть изменены за счет адсорбции растворимых макромолекул. Такие модификации изменяют свойства поверхности и кардинально влияют на цитосовместимость этих структур [50].

Главной особенностью rS1/9 является его способность самопроизвольно образовывать поры в формируемых из него изделиях. Мы продемонстрировали преимущества пористой структуры скаффолда в модели регенерации кости [33, 34]. В этих материалах сеть макроскопических пор переплетается с более мелкими, микрометровыми. Однако поры нанометрового размера в конструкциях на основе rS1/9 ранее не обнаруживали. Пленки, сформированные из rS1/9 и использованные в настоящем исследовании, имели нанометровые поры (рис. 1). Можно ожидать, что в искусственном ВКМ они

могут быть полезны для газообмена и движения метаболитов [51–53]. Механические характеристики и рельеф поверхности нанопористых материалов могут способствовать необходимой биосовместимости в культуре клеток и в организме. Действительно, хорошая цитосовместимость пленок, сформированных из шелка (рис. 2), подтверждает эту гипотезу. Более того, rS1/9 обеспечивал наилучшие условия для пролиферации клеток, что было определено по включению BrdU (рис. 3).

Среди множества изменений, типичных для стареющих клеток, увеличенный размер является отличительной чертой, связанной с дезорганизацией коллагеновых фибрилл, как следствием активации металлопротеиназ [54]. В культурах стареющие клетки часто бывают крупнее, как показано в моделях старения, вызванного высоким содержанием глюкозы [55], ультрафиолетовым излучением [56], перекисью водорода [57], а также в модели изолированных дермальных фибробластов человека, взятых у доноров молодого и пожилого возраста [58]. Ядра стареющих клеток теряют округлую форму, а их размер увеличивается [59–61]. На стекле при высокой концентрации глюкозы площадь, занимаемая клетками и ядрами (рис. 4), была больше, по сравнению с таковой при низкой концентрации

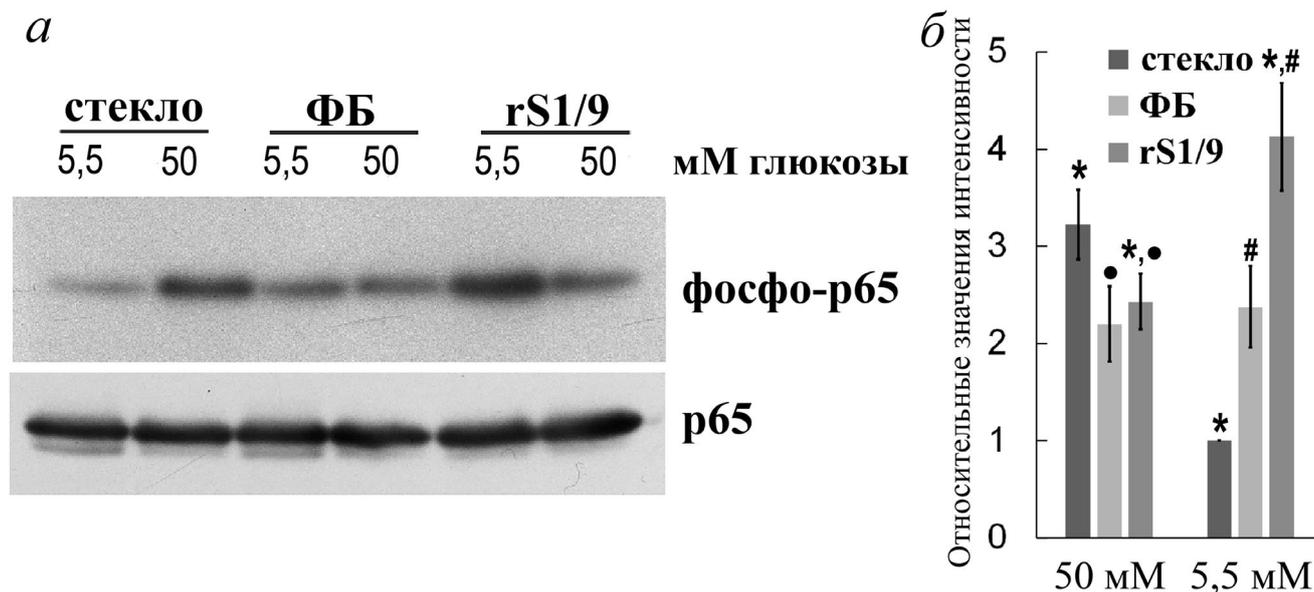


Рис. 7. Влияние концентрации глюкозы на фосфорилирование субъединицы p65 NF-κB в фибробластах NIH 3T3 на различных носителях. *а* – Иммуноблоттинг (данные одного репрезентативного эксперимента из трех с аналогичными результатами); *б* – денситометрия (средние значения ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов). Попарное сравнение показало существенные различия между клетками в среде с низкой и высокой концентрациями глюкозы на различных субстратах шелка [фиб्रोине (ФБ) или спидроине (rS1/9)] и стекле (* разница, выявленная при культивировании клеток на одних и тех же субстратах с низким или высоким содержанием глюкозы; • разница, выявленная при культивировании клеток на субстратах из белков шелка и стекле в присутствии 50 мМ глюкозы; # разница, выявленная при культивировании клеток на субстратах из белков и стекле в присутствии 5,5 мМ глюкозы); $p < 0,05$

глюкозы. При культивировании на производных шелка при 5,5 и 50 мМ глюкозы значения размеров площади клеток были одинаковы. При 50 мМ глюкозы площадь клеток, культивируемых на стекле, выше, чем на пленках из производных шелка. (рис. 4, б). На пленке из фиброина влияние высокого уровня глюкозы на площадь ядер было менее выраженным, чем на стекле; никаких изменений не было обнаружено на спидроине (рис. 4, в). Кроме того, культивирование на пленках из фиброина или спидроина защищало клетки от запрограммированной гибели (рис. 5). Плотность клеток и интенсивность контактных взаимодействий, которые обеспечивают передачу сигналов для реализации запрограммированных механизмов гибели клеток, были выше при культивировании фибробластов на пленках по сравнению с культивированием на необработанных стеклах, однако уровень раннего и позднего апоптоза на пленках был значительно ниже, чем на стекле, как при низких, так и при высоких концентрациях глюкозы. Пленки из rS1/9 были наиболее эффективными и в поддержании выживания фибробластов линии NIH 3T3 (рис. 5). Таким образом, специфическая молекулярная архитектура rS1/9 и особенности трехмерных пленок не только способствуют пролиферации клеток, но и предотвращают появление фенотипа старения (определяемого увеличенным размером клеток и ядер, а также повышенной скоростью апоптоза) в ответ на повышение уровня глюкозы.

Влияние пленок из rS1/9 на выработку коллагена. При культивировании фибробластов на rS1/9 в присутствии 50 мМ глюкозы уровень растворимого коллагена на rS1/9 оставался высоким (рис. 6, а). Напротив, на фиброине и на стекле значения поглощения, которые отражают общее количество растворимого коллагена, снижались в присутствии высокой концентрации глюкозы. Эти результаты свидетельствуют о том, что пленка, полученная из спидроина, может поддерживать заживление ран и регенерацию тканей при стрессе, вызванном глюкозой. В таких процессах своевременный синтез ВКМ имеет решающее значение для миграции и дифференцировки клеток. Другое важное наблюдение заключается в том, что спидроин предотвращал гиперсинтез растворимого коллагена при 5,5 мМ глюкозы. При этой концентрации плотность клеток на спидроине была примерно в два раза больше, чем на стекле (рис. 2), тогда как концентрации коллагена отличались незначительно (рис. 6, а). Когда плотность клеток была высокой при физиологическом содержании глюкозы, синтетическая активность фибробластов была наименее выраженной (рис. 6, б). Этот

факт может быть полезен для контроля гиперпластических процессов.

При концентрации глюкозы 50 мМ и низкой плотности клеток количество растворимого коллагена, нормализованного по сигналу МТТ (как определено по значениям поглощения), было аналогично соответствующим значениям для фибробластов, культивируемых при концентрации глюкозы 5,5 мМ (рис. 6 а). Эти результаты полностью подтверждают наши ранние данные об антифиброзных свойствах фиброина и спидроина: у эмбриональных фибробластов мыши (MEF) растворимый фиброин или rS1/9 значительно подавляли экспрессию генов *Ctgf* и *Fgf2* [33]. Известно, что белки, кодируемые этими генами, способствуют фиброзу во время заживления раны на коже [62]. Кроме того, пониженная экспрессия *Ctgf* и *Fgf2* была продемонстрирована в MEF, культивируемых на микрогелях, содержащих rS1/9, и на микрочастицах, изготовленных из фиброина и желатина. Подкожная имплантация этих микрогелей ускоряла процесс заживления. Важно отметить, что микрогели предотвращали образование рубцов и способствовали регенерации полнослойной раны кожи [36, 63].

NF-κB как молекулярный сенсор высокого содержания глюкозы: роль фиброина и спидроина. Ряд исследований показал активацию NF-κB в моделях старения [28, 42, 64,]. P65 накапливается в ядрах стареющих клеток во время старения, вызванного онкогенной экспрессией, повреждением ДНК [59] или повышенными концентрациями глюкозы [42]. Активация NF-κB во время старения необходима для формирования связанного со старением секреторного фенотипа (SASP), а также управляет возрастными симптомами у мышей в модели прогерии [28]. Фосфорилирование субъединицы p65 транскрипционного фактора NF-κB при 50 мМ глюкозы на стекле соответствует предполагаемой роли этого механизма в ответ на увеличение концентрации глюкозы. В противоположность этому, 50 мМ глюкозы не оказали влияния на количество фосфо-p65 при культивировании на фиброине. Спидроиновая пленка имела противоположный эффект, а именно, при 50 мМ количество фосфо-p65 было меньше, чем при 5,5 мМ (рис. 7). Никаких изменений в количестве общего p65 обнаружено не было, что указывает на то, что разные концентрации глюкозы и разные клеточные подложки влияют на специфическую активацию этого сигнального пути. Интересно, что аттенуированное фосфорилирование p65 на спидроине сопровождалось выраженным влиянием этой пленки на снижение значений параметров старения, таких как пло-

щадь клеток и их ядер, скорость пролиферации и жизнеспособность. Кроме того, меньшее количество фосфо-p65 коррелировало с ограниченной продукцией растворимого коллагена на спидроине. Остается выяснить, связаны ли эти явления и фосфорилирование p65. Независимо от механизма, ослабленная активация p65 на пленках rS1/9 при концентрации глюкозы 50 мМ может быть полезной для предотвращения воспалительных реакций в коже, что дополнительно подтверждает терапевтическую применимость этого биоматериала.

Биосовместимые пленки, сформированные из структурных белков фиброина шелка и спидроина, поддерживали пролиферацию и выживание мышечных фибробластов и по некоторым маркерам ослабляли изменения, ассоциированные с клеточным старением, вызванным повышенным содержанием глюкозы. Уникальные молекулярные свойства рекомбинантного спидроина, в частности его способность самопроизвольно образовывать нанопоры во время фор-

мирования пленок, делают этот полимер перспективным для дальнейшего развития тканевых заменителей кожи и инструментов для замедления старения.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований [проекты №№ 17-00-00359 (17-00-00356, 17-00-00357 и 17-00-00358) и 18-34-00875].

Благодарности. Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского Университета и на оборудовании ЦКП Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- West, M. D., Pereira-Smith, O. M., and Smith, J. R. (1989) Replicative senescence of human skin fibroblasts correlates with a loss of regulation and overexpression of collagenase activity, *Exp. Cell Res.*, **184**, 138-147.
- Stadelmann, W. K., Digenis, A. G., and Tobin, G. R. (1998) Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds, *Am. J. Surg.*, **176**, 26S-38S.
- Mekkes, J. R., Loots, M. A. M., Van Der Wal, A. C., and Bos, J. D. (2003) Causes, investigation and treatment of leg ulceration, *Br. J. Dermatol.*, **148**, 388-401.
- Bellin, C., De Wiza, D. H., Wiernsperger, N. F., and Rösen, P. (2006) Generation of reactive oxygen species by endothelial and smooth muscle cells: influence of hyperglycemia and metformin, *Horm. Metab. Res.*, **38**, 732-739.
- Beauchef, G., Bigot, N., Kypriotou, M., Renard, E., Porée, B., Widom, R., Domp martin-Blanchere, A., Oddos, T., Maquart, F. X., Demoor, M., Boumediene, K., and Galera, P. (2012) The p65 subunit of NF- κ B inhibits COL1A1 gene transcription in human dermal and scleroderma fibroblasts through its recruitment on promoter by protein interaction with transcriptional activators (c-Krox, Sp1, and Sp3), *J. Biol. Chem.*, **287**, 3462-3478.
- Fisher, G. J., Kang, S., Varani, J., Bata-Csorgo, Z., Wan, Y., Datta, S., and Voorhees, J. J. (2002) Mechanisms of photoaging and chronological skin aging, *Arch. Dermatol.*, **138**, 1462-1470.
- Fisher, G. J., Quan, T., Purohit, T., Shao, Y., Moon, K. C., He, T., Varani, J., Kang, S., and Voorhees, J. J. (2009) Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevation of matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin, *Am. J. Pathol.*, **174**, 101-114.
- Cole, M. A., Quan, T., Voorhees, J. J., and Fisher, G. J. (2018) Extracellular matrix regulation of fibroblast function: redefining our perspective on skin aging, *J. Cell Commun. Signal.*, **12**, 35-43.
- Dyer, D. G., Dunn, J. A., Thorpe, S. R., Bailie, K. E., Lyons, T. J., McCance, D. R., and Baynes, J. W. (1993) Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging, *J. Clin. Invest.*, **91**, 2463-2469.
- Hadley, J. C., Meek, K. M., and Malik, N. S. (1998) Glycation changes the charge distribution of type I collagen fibrils, *Glycoconj. J.*, **15**, 835-840.
- Phillip, J. M., Aifuwa, I., Walston, J., and Wirtz, D. (2015) The mechanobiology of aging, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **17**, 113-141.
- Shanbhag, S., Nayak, A., Narayan, R., and Nayak, U. Y. (2019) Anti-aging and sunscreens: paradigm shift in cosmetics, *Adv. Pharm. Bull.*, **9**, 348-359.
- Matsuyama, M., WuWong, D. J., Horvath, S., and Matsuyama, S. (2019) Epigenetic clock analysis of human fibroblasts *in vitro*: effects of hypoxia, donor age, and expression of hTERT and SV40 large T, *Aging (Albany NY)*, **11**, 3012-3022.
- Yan, L.-J. (2014) Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress, *J. Diabetes Res.*, **2014**, 1-11.
- Campos, C. (2012) Chronic hyperglycemia and glucose toxicity: pathology and clinical sequelae, *Postgrad. Med.*, **124**, 90-97.

16. Safi, S. Z., Qvist, R., Kumar, S., Batumalaie, K., and Ismail, I. S. B. (2014) Molecular mechanisms of diabetic retinopathy, general preventive strategies, and novel therapeutic targets, *Biomed Res. Int.*, **2014**, 801269.
17. Sun, Q., Li, J., and Gao, F. (2014) New insights into insulin: the anti-inflammatory effect and its clinical relevance, *World J. Diabetes*, **5**, 89-96.
18. Geraldès, P., and King, G. L. (2010) Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications, *Circ. Res.*, **106**, 1319-1331.
19. Groop, P.-H., Forsblom, C., and Thomas, M. C. (2005) Mechanisms of disease: pathway-selective insulin resistance and microvascular complications of diabetes, *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.*, **1**, 100-110.
20. Soydas, T., Yaprak Sarac, E., Cinar, S., Dogan, S., Solakoglu, S., Tuncdemir, M., and Kanigur Sultuybek, G. (2018) The protective effects of metformin in an *in vitro* model of aging 3T3 fibroblast under the high glucose conditions, *J. Physiol. Biochem.*, **74**, 273-281.
21. Li, B., Bian, X., Hu, W., Wang, X., Li, Q., Wang, F., Sun, M., Ma, K., Zhang, C., Chang, J., and Fu, X. (2020) Regenerative and protective effects of calcium silicate on senescent fibroblasts induced by high glucose, *Wound Repair Regen.*, **28**, 315-325.
22. Maeda, M., Hayashi, T., Mizuno, N., Hattori, Y., and Kuzuya, M. (2015) Intermittent high glucose implements stress-induced senescence in human vascular endothelial cells: role of superoxide production by NADPH oxidase, *PLoS One*, **10**, e0123169.
23. Christian, F., Smith, E., and Carmody, R. (2016) The regulation of NF- κ B subunits by phosphorylation, *Cells*, **5**, 12.
24. Wei, W., and Ji, S. (2018) Cellular senescence: molecular mechanisms and pathogenicity, *J. Cell. Physiol.*, **233**, 9121-9135.
25. Zhang, L., Yousefzadeh, M. J., Suh, Y., Niedernhofer, L. J., and Robbins, P. D. (2019) Signal transduction, ageing and disease, *Subcell Biochem.*, **91**, 227-247.
26. Zhang, W.-S., Pan, A., Zhang, X., Ying, A., Ma, G., Liu, B.-L., Qi, L.-W., Liu, Q., and Li, P. (2019) Inactivation of NF- κ B2 (p52) restrains hepatic glucagon response via preserving PDE4B induction, *Nat. Commun.*, **10**, 4303.
27. Soria-Valles, C., López-Soto, A., Osorio, F. G., and López-Otín, C. (2017) Immune and inflammatory responses to DNA damage in cancer and aging, *Mech. Ageing Dev.*, **165**, 10-16.
28. Tilstra, J. S., Robinson, A. R., Wang, J., Gregg, S. Q., Clauson, C. L., Reay, D. P., Nasto, L. A., St Croix, C. M., Usas, A., Vo, N., Huard, J., Clemens, P. R., Stolz, D. B., Guttridge, D. C., Watkins, S. C., Garinis, G. A., Wang, Y., Niedernhofer, L. J., and Robbins, P. D. (2012) NF- κ B inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice, *J. Clin. Invest.*, **122**, 2601-2612.
29. Sheikh, F. A., Ju, H. W., Lee, J. M., Moon, B. M., Park, H. J., Lee, O. J., Kim, J. H., Kim, D. K., and Park, C. H. (2015) 3D electrospun silk fibroin nanofibers for fabrication of artificial skin, *Nanomedicine*, **11**, 681-691.
30. Teplenin, A., Krashennikova, A., Agladze, N., Sidoruk, K., Agapova, O., Agapov, I., Bogush, V., and Agladze, K. (2015) Functional analysis of the engineered cardiac tissue grown on recombinant spidroin fiber meshes, *PLoS One*, **10**, e0121155.
31. Сидорук К. В., Давыдова Л. И., Козлов Д. Г., Губайдуллин И. И., Глазунов А. В., Богуш В. Г., Дебабов В. Г. (2014) Оптимизация ферментации штамма *Saccharomyces cerevisiae* – продуцента рекомбинантного спидроина 1f9, *Биотехнология*, **30**, 27-35.
32. Богуш В. Г., Сидорук К. В., Молчан О. К., Птицын Л. Р., Альтман И. Б., Козлов Д. Г., Ефремов Б. Д., Беневоленский С. В., Агапов И. И., Машко С. В., Дебабов В. Г. (2001) Молекулярное клонирование и экспрессия в дрожжах синтетических генов белков-аналогов белка каркасной нити спидроина 1, *Биотехнология*, **2**, 11-22.
33. Moisenovich, M. M., Pustovalova, O. L., Arhipova, A. Yu., Vasiljeva, T. V., Sokolova, O. S., Bogush, V. G., Debabov, V. G., Sevastianov, V. I., Kirpichnikov, M. P., and Agapov, I. I. (2010) *In vitro* and *in vivo* biocompatibility studies of a recombinant analogue of spidroin 1 scaffolds, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **96**, 125-131.
34. Moisenovich, M. M., Pustovalova, O., Shackelford, J., Vasiljeva, T. V., Druzhinina, T. V., Kamenchuk, Y. A., Guzeev, V. V., Sokolova, O. S., Bogush, V. G., Debabov, V. G., Kirpichnikov, M. P., and Agapov, I. I. (2012) Tissue regeneration *in vivo* within recombinant spidroin 1 scaffolds, *Biomaterials*, **33**, 3887-3898.
35. Мойсенович М. М., Малюченко Н. В., Архипова А. Ю., Котлярова М. С., Давыдова Л. И., Гончаренко А. В., Агапова О. И., Друцкая М. С., Богуш В. Г., Агапов И. И., Дебабов В. Г., Кирпичников М. П. (2015) Новые 3D-микроносители из рекомбинантного спидроина для использования в регенеративной медицине, *Доклады Академии наук*, **463**, 479-482.
36. 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., and Drutskaya, M. S. (2018) Novel biodegradable polymeric microparticles facilitate scarless wound healing by promoting re-epithelialization and inhibiting fibrosis, *Front. Immunol.*, **9**, 1-11.
37. Bessonov, I., Moysenovich, A., Arkhipova, A., Ezernitskaya, M., Efremov, Y., Solodilov, V., Timashev, P., Shaytan, K., Shtil, A., and Moisenovich, M. (2020) The mechanical properties, secondary structure, and osteogenic activity of photopolymerized fibroin, *Polymers*, **12**, 646.
38. Bessonov, I. V., Rochev, Y. A., Arkhipova, A. Y., Kopitsyna, M. N., Bagrov, D. V., Karpushkin, E. A., Bibikova, T. N., Moysenovich, A. M., Soldatenko, A. S., Nikishin, I. I., Kotliarova, M. S., Bogush, V. G., Shaitan, K. V., and Moisenovich, M. M. (2019) Fabrication of hydrogel scaffolds via photocrosslinking of methacrylated silk fibroin, *Biomed. Mater.*, **14**, 034102.
39. Baker, B. M., Trappmann, B., Wang, W. Y., Sakar, M. S., Kim, I. L., Shenoy, V. B., Burdick, J. A., and Chen, C. S. (2015) Cell-mediated fibre recruitment drives extracellular matrix mechanosensing in engineered fibrillar microenvironments, *Nat. Mater.*, **14**, 1262-1268.

40. Lodder, E. M., Scicluna, B. P., Beekman, L., Arends, D., Moerland, P. D., Tanck, M. W. T., Adriaens, M. E., and Bezzina, C. R. (2014) Integrative genomic approach identifies multiple genes involved in cardiac collagen deposition, *Circ. Cardiovasc. Genet.*, **7**, 790-798.
41. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
42. Zhang, Q., Lenardo, M. J., and Baltimore, D. (2017) 30 Years of NF- κ B: a blossoming of relevance to human pathobiology, *Cell*, **168**, 37-57.
43. World Health Organization and International Diabetes Federation (2006) Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia: report of a WHO/IDF consultation, *World Health Organization*.
44. Zhang, D., Lu, H., Chen, Z., Wang, Y., Lin, J., Xu, S., Zhang, C., Wang, B., Yuan, Z., Feng, X., Jiang, X., and Pan, J. (2017) High glucose induces the aging of mesenchymal stem cells via Akt/mTOR signaling, *Mol. Med. Rep.*, **16**, 1685-1690.
45. Bian, X., Li, B., Yang, J., Ma, K., Sun, M., Zhang, C., and Fu, X. (2020). Regenerative and protective effects of dMSC-sEVs on high-glucose-induced senescent fibroblasts by suppressing RAGE pathway and activating Smad pathway, *Stem Cell Res. Ther.*, **11**, 166.
46. Khemais-Benkhiat, S., Belcastro, E., Idris-Khodja, N., Park, S. H., Amoura, L., Abbas, M., Auger, C., Kessler, L., Mayoux, E., Toti, F., and Schini-Kerth, V. B. (2020) Angiotensin II-induced redox-sensitive SGLT1 and 2 expression promotes high glucose-induced endothelial cell senescence, *J. Cell. Mol. Med.*, **24** 2109-2122.
47. Stirban, A., Gawlowski, T., and Roden, M. (2013) Vascular effects of advanced glycation endproducts: clinical effects and molecular mechanisms, *Mol. Metab.*, **3**, 94-108.
48. Chen, J. H., Lin, X., Bu, C., and Zhang, X. (2018). Role of advanced glycation end products in mobility and considerations in possible dietary and nutritional intervention strategies, *Nutr. Metab.*, **15**, 72.
49. Bogush, V. G., Sokolova, O. S., Davydova, L. I., Klinov, D. V., Sidoruk, K. V., Esipova, N. G., Neretina, T. V., Orchanskyi, I. A., Makeev, V. Y., Tumanyan, V. G., Shaitan, K. V., Debabov, V. G., and Kirpichnikov, M. P. (2009) A novel model system for design of biomaterials based on recombinant analogs of spider silk proteins, *J. Neuroimmune Pharmacol.*, **4**, 17-27.
50. Schmidt, D. R., Waldeck, H., and Kao, W. J. (2009) Protein adsorption to biomaterials, in: *Biological Interactions on Materials Surfaces* (Puleo, D., and Bizios, R., eds.) Springer, New York, NY.
51. Gao, C., Peng, S., Feng, P., and Shuai, C. (2017) Bone biomaterials and interactions with stem cells, *Bone Res.*, **5**, 17059.
52. Haugh, M. G., Murphy, C. M., and O'Brien, F. J. (2010) Novel freeze-drying methods to produce a range of collagen-glycosaminoglycan scaffolds with tailored mean pore sizes, *Tissue Eng. Part C Methods*, **16**, 887-894.
53. Sai, K. P., and Babu, M. (2000) Collagen based dressings – a review, *Burns*, **26**, 54-62.
54. Tu, Y., and Quan, T. (2016) Oxidative stress and human skin connective tissue aging, *Cosmetics*, **3**, 1-12.
55. Hang, W., He, B., Chen, J., Xia, L., Wen, B., Liang, T., Wang, X., Zhang, Q., Wu, Y., Chen, Q., and Chen, J. (2018) Berberine ameliorates high glucose-induced cardiomyocyte injury via AMPK signaling activation to stimulate mitochondrial biogenesis and restore autophagic flux, *Front. Pharmacol.*, **9**, 1121.
56. Chen, W., Kang, J., Xia, J., Li, Y., Yang, B., Chen, B., Sun, W., Song, X., Xiang, W., Wang, X., Wang, F., Wan, Y., and Bi, Z. (2008) p53-related apoptosis resistance and tumor suppression activity in UVB-induced premature senescent human skin fibroblasts, *Int. J. Mol. Med.*, **21**, 645-653.
57. Chen, Q. M., Tu, V. C., Catania, J., Burton, M., Toussaint, O., and Dilley, T. (2000) Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide, *J. Cell Sci.*, **113**, 4087-4097.
58. Bentov, I., Damodarasamy, M., Plymate, S., and Reed, M. J. (2014) Decreased proliferative capacity of aged dermal fibroblasts in a three dimensional matrix is associated with reduced IGF1R expression and activation, *Biogerontology*, **15**, 329-337.
59. Beausejour, C. M. (2003) Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways, *EMBO J.*, **22**, 4212-4222.
60. Mehta, I. S., Figgitt, M., Clements, C. S., Kill, I. R., and Bridger, J. M. (2007) Alterations to nuclear architecture and genome behavior in senescent cells, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1100**, 250-263.
61. Zhang, R., Chen, W., and Adams, P. D. (2007) Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci, *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 2343-2358.
62. Chujo, S., Shirasaki, F., Kondo-Miyazaki, M., Ikawa, Y., and Takehara, K. (2009) Role of connective tissue growth factor and its interaction with basic fibroblast growth factor and macrophage chemoattractant protein-1 in skin fibrosis, *J. Cell. Physiol.*, **220**, 189-195.
63. Arkhipova, A. Y., Nosenko, M. A., Malyuchenko, N. V., Zvartsev, R. V., Moisenovich, A. M., Zhdanova, A. S., Vasil'eva, T. V., Gorshkova, E. A., Agapov, I. I., Drutskaya, M. S., Nedospasov, S. A., and Moisenovich, M. M. (2016) Effects of fibroin microcarriers on inflammation and regeneration of deep skin wounds in mice, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1251-1260.
64. Chien, Y., Scuoppo, C., Wang, X., Fang, X., Balgley, B., Bolden, J. E., Premsrirut, P., Luo, W., Chicas, A., Lee, C. S., Kogan, S. C., and Lowe, S. W. (2011) Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity, *Genes Dev.*, **25**, 2125-2136.

RECOMBINANT SPIDROIN FILMS ATTENUATE INDIVIDUAL MARKERS OF GLUCOSE INDUCED AGING IN NIH 3T3 FIBROBLASTS

A. M. Moysenovich^{1#}, M. M. Moisenovich^{1*#}, A. K. Sudina¹, V. V. Tatarskiy^{2,3,4},
A. I. Khamidullina³, M. A. Yastrebova³, L. I. Davydova^{5,6}, V. G. Bogush^{5,6}, V. G. Debabov^{5,6},
A. Yu. Arkhipova^{1,7}, K. V. Shaitan^{1,8}, A. A. Shtil^{2,3}, and I. A. Demina^{1,9}

¹ *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234 Moscow, Russia; E-mail: mmoisenovich@mail.ru*

² *Blokhin National Medical Research Center of Oncology, 115478 Moscow, Russia*

³ *Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia*

⁴ *National University of Science and Technology "MISIS", 119049 Moscow, Russia*

⁵ *NRC "Kurchatov Institute" – GOSNIIGENETIKA, 117545 Moscow, Russia*

⁶ *NRC "Kurchatov Institute", 123182 Moscow, Russia*

⁷ *Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI), 129110 Moscow, Russia*

⁸ *Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia*

⁹ *Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, 117198 Moscow, Russia*

Received March 28, 2020

Revised May 15, 2020

Accepted May 22, 2020

The effect of bioresorbable materials on aging in cultured mouse NIH 3T3 fibroblasts treated with elevated glucose concentration was investigated. The cells were grown on films produced from the silkworm fibroin and rS1/9, a recombinant analog of *Nephila clavipes* spidroin 1. Exposure to 50 mM glucose of the cells grown on uncoated glass support resulted in the cell growth retardation. The average areas of the cells and nuclei and the percentage of apoptotic cells increased, whereas the amount of soluble collagen decreased. In contrast, on the fibroin and spidroin films, the cell density and the percentage of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)-positive cells were higher vs. the cells grown on the glass support. The films protected NIH 3T3 fibroblasts from the glucose-induced death. The most prominent effects on the cell density, BrdU incorporation, and apoptosis prevention were observed in the cells cultured on spidroin films. Unlike the cells grown on glass support (decrease in the soluble collagen production) or fibroin (no effect), production of soluble collagen by the cells grown on spidroin films increased after cell exposure to 50 mM glucose. Molecular analysis demonstrated that 50 mM glucose upregulated phosphorylation of the NFκB heterodimer p65 subunit in the cells grown on the glass support. The treatment of cells grown on fibroin films with 5.5 mM or 50 mM glucose had no effect on p65 phosphorylation. The same treatment decreased p65 phosphorylation in the cells on the spidroin films. These results demonstrate the anti-aging efficacy of biomaterials derived from the silk proteins and suggest that spidroin is more advantageous for tissue engineering and therapy than fibroin.

Keywords: cell aging, recombinant spidroin, regeneration, artificial skin