



УДК 576.524,526; 57.085.23; 543.544.53

**МОДЕЛИРОВАНИЕ *in vitro* ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КЛЕТКА–НОСИТЕЛЬ**

© 2011 г. В. А. Коржиков\*\*, Е. Г. Влах\*, К. Каспер\*\*, Т. Б. Тенникова\*

\*Учреждение Российской академии наук Институт высокомолекулярных соединений РАН, 199004, Санкт-Петербург, Большой пр. В.О., 31;

\*\*Leibniz Universität Hannover, Institut für Technische Chemie, Hannover, Deutschland

Поступила в редакцию 21.06.2010 г. Принята к печати 30.08.2010 г.

В ходе моделирования на носителе специфической адгезии клеток с последующим их ростом и образованием костной ткани предложен простой метод контроля эффективности взаимодействия поверхностный лиганд–клеточный рецептор с использованием аффинной хроматографии на макропористых монолитных сорбентах. Биоспецифический пептид GRGDSP выполнял роль адгезионно-активного лиганда на носителе, в то время как функцию клетки имитировали полимерные (полистирольные) микрочастицы с иммобилизованным на их поверхности пептидом EDYVPDIYYLMDLSYSMKDD, представляющим собой часть сайта связывания RGD-последовательности в клеточном интегране. Таким образом, монолитная ультракороткая колонка (СІМ®-диск) представляла собой упрощенную модель носителя (структурного каркаса), обладающего биоспецифическими свойствами. Параметры взаимодействия аффинных партнеров количественно оценивали фронтальным анализом с построением изотерм адсорбции, последующей их линейризацией и математической обработкой. Полученные данные достоверно указывают на высокоспецифичный характер образования биологических пар, что полностью подтверждается данными экспериментов на культуре клеток.

*Ключевые слова:* моделирование клеточных взаимодействий, тканевая инженерия, аффинная хроматография.

**ВВЕДЕНИЕ**

В настоящее время огромный интерес исследователей во всем мире вызывает разработка материалов, предназначенных для восстановления костной ткани методом тканевой инженерии [1–3]. Данный метод основан на имплантации ткани пациента, выращенной из его собственных клеток. Для этого клетки высевают на поверхность трехмерного макропористого структурообразующего каркаса. Очевидно, что для направления роста клеток в сторону образования костной ткани, каркас, координирующий рост клеток в пространстве, должен обладать также системой доставки необходимых сигналов, управляющих поведением клеток [4]. Недавно нами была предложена новая стратегия создания гибридных биораспознающих носителей клеток (скаффолдов) для инженерии костной ткани, основанная на адсорбционном покрытии макропористой керамической основы биосовместимыми гидрофильными полимерами, модифицированными биологически-

ми молекулами, управляющими поведением клеток [5, 6].

Контролирование механизма и степени адгезии клеток на поверхности каркаса – один из основных аспектов его конструирования. Известно, что в живых тканях специфическая адгезия клеток на поверхности структурных компонентов межклеточного матрикса (МКМ) происходит за счет взаимодействия между клеточными рецепторами – интегринными и специальными белками МКМ. К настоящему времени у белков МКМ, ответственных за адгезию клеток, определены последовательности нескольких коротких пептидов, способных связывать интегрины с высокой специфичностью, не уступающей исходным белкам. При использовании для ковалентной модификации биоматериалов короткие пептиды имеют преимущества перед белками ввиду отсутствия денатурации, меньшей подверженности протеолизу, а также меньшей их иммуногенности [7, 8]. Наибольший интерес представляют пептиды, содержащие последовательность RGD (Arg-Gly-Asp; RGD-пептиды), поскольку модификация биоматериала RGD-пептидами приводит к увеличению адгезии клеток и активирует каскад биохимических реакций, обусловленный специфическим связыванием пептидов с интегринными. Использование RGD-пептидов как факторов специфической адгезии клеток на различных искусственных каркасах неоднократно описано в литературе [8–10].

Сокращения: ВЭ-МДАХ – высокоэффективная монолитная дисковая аффинная хроматография; ИМ-пептид – интегрин-моделирующий пептид (EDYVPDIYYLMDLSYSMKDD); МКМ – межклеточный матрикс; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилндолилгидрохлорид; GMA-EDMA – сополимер глицидилметакрилата с этиленгликольдиметакрилатом; FITC – флуоресцеинизотиоцианат; рMAG – поли(2-дезоксид-2-N-метакрилоиламино-D-глюкоза).  
# Автор для связи (тел.: (812) 323-04-61; факс: (812) 328-68-69; эл. почта: v\_korzhiakov@mail.ru).

Учитывая сказанное выше, актуальным вопросом при химическом конструировании искусственного МКМ (каркаса) является сохранение активности того или иного RGD-пептида при его иммобилизации на поверхности биоматериала. Очевидно, что биологический ответ системы *in vivo* на введение тех или иных биомолекул наилучшим образом характеризует их активность. Тем не менее определение параметров взаимодействия биомолекул с клеточными рецепторами можно провести только *in vitro*.

Известно, что скоростная аффинная хроматография на ультракоротких монолитных колонках предоставляет исключительные возможности для моделирования и изучения *in vitro* процессов специфического комплексообразования в динамических условиях [11, 12]. Недавно метакрилатные монолиты на основе сополимера глицидилметакрилата с этиленгликольдиметакрилатом (GMA-EDMA) были использованы нашей группой для моделирования межфазовых процессов, построенных на динамической адсорбции крупных частиц, выступающих в качестве моделей вирусов [13, 14]. По аналогии, взаимодействие клетки, содержащей на поверхности интегриновые рецепторы, с носителем, на поверхности которого иммобилизован RGD-пептид, также происходит на границе раздела фаз, когда один из аффинных партнеров располагается в мембране клетки, находящейся в потоке биологической жидкости, а второй является поверхностным компонентом стационарной фазы. Для моделирования данного процесса предлагается использовать высокоэффективную монолитную дисковую аффинную хроматографию (ВЭ-МДАХ), где в качестве активной RGD-последовательности служит пептид GRGDSP, способный, как известно [15], взаимодействовать с интегриновыми рецепторами стволовых клеток – предшественников клеток костной ткани.

Целью данного исследования является характеристика модели аффинного взаимодействия клетка–носитель методом ВЭ-МДАХ на ультракоротких монолитных колонках (дисках). Для создания приближенной модели клеток с одним рецептором была использована пептидная последовательность EDYRPVDIYYLMDLSYSMKDD, ответственная за взаимодействие с RGD-последовательностью витронектина, иммобилизованная на поверхности карбоксилсодержащих полистирольных латексных частиц.

Результаты, полученные при моделировании системы, сравнивали с данными экспериментов в культуре клеток с GRGDSP-пептидом, иммобилизованным на поверхности керамической макропористой матрицы Sponceram®.

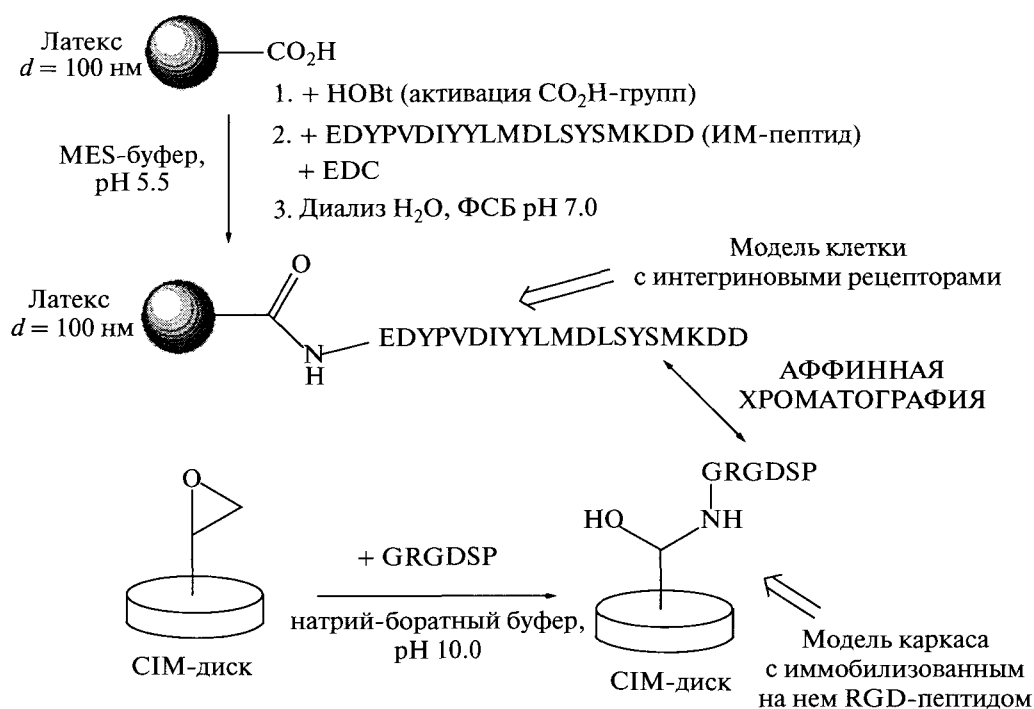
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Схема проведенного модельного эксперимента представлена на рис. 1.

Первая стадия заключалась в получении физико-химической модели клетки с интегриновыми рецепторами. При этом пептидная последовательность, используемая для моделирования клеточных рецепторов, должна соответствовать определенному типу клеток, используемых для выращивания костной ткани. Наиболее перспективными являются недифференцированные, т. е. стволовые клетки, а также клетки – предшественники остеобластов. На основании анализа последовательностей внеклеточных участков интегриновых рецепторов, являющихся сайтами связывания RGD-лигандов, была выбрана 20-членная пептидная последовательность  $\beta$ -субъединицы интегрин ствольных клеток, а именно, пептид EDYRPVDIYYLMDLSYSMKDD [15], ответственный за взаимодействие с RGD-последовательностью витронектина. Далее в тексте данный пептид обозначается как интегринмоделирующий пептид (ИМ-пептид).

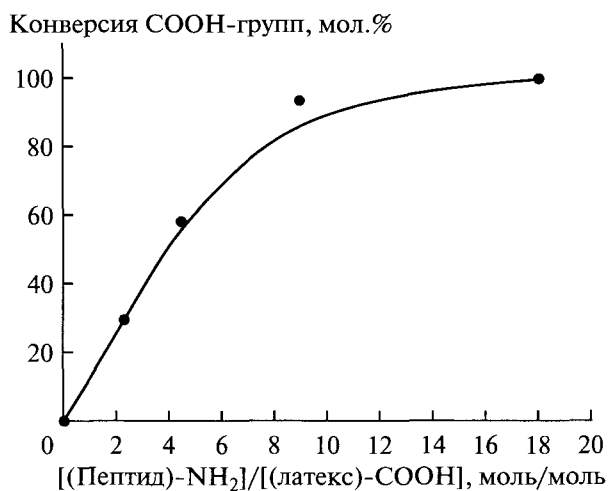
При моделировании клетки необходимо использовать частицы, имитирующие ее физико-химические параметры. Несомненным преимуществом использованных нами латексных частиц является их стабильность (в отличие от липосом) и монодисперсность. Наличие на поверхности частиц карбоксильных групп, пригодных для связывания ИМ-пептида, позволяет придавать модели способность к аффинному взаимодействию с соответствующим партнером. Для создания упрощенных моделей клеток с одним рецептором (ИМ-пептидом) были использованы полистирольные монодисперсные латексные частицы с карбоксилсодержащей поверхностью, полученные безэмульгаторной полимеризацией стирола в присутствии карбоксилсодержащего азоинициатора, а именно, азо-бис-4-циановалериановой кислоты [16]. Ковалентную иммобилизацию ИМ-пептида на поверхности указанных частиц проводили двустадийным методом активации функциональных групп [14]. Метод активированных эфиров осуществляли с использованием 1-гидроксипиперазина и водорастворимого карбодиимида в буферном растворе *N*-2-гидроксиэтилпиперазин-*N*-этансульфоновой кислоты (MES-буфер, pH 5.5). Иммобилизацию пептида по концевой  $\alpha$ -аминогруппе проводили в 0.01 М натрий-боратном буфере при значении pH 8.2, оптимальном для иммобилизации пептидов по  $\alpha$ -аминогруппе.

С целью максимального соответствия создаваемой модели клетки биологическому объекту было необходимо определить условия, при которых наибольшее количество карбоксильных групп будет амидировано ИМ-пептидом. Для определения степени конверсии карбоксильных групп латексных частиц при связывании ИМ-пептида, его предвари-



**Рис. 1.** Схема эксперимента, моделирующего специфическое взаимодействие GRGDSP-пептида и клеточного интегрин (пептидного сайта связывания RGD-лиганда) методом аффинной хроматографии. EDC – водорастворимый карбодимид, HOBT – 1-гидроксисбензотриазол, СИМ-диск – макропористый метакрилатный сорбент (см. “Эксперимент. часть”).

тельно модифицировали FITC по  $\epsilon$ -аминогруппе остатков лизина (0.01 М натрий-боратный буферный раствор, pH 10.0). Количество вступившего в реакцию пептида, а следовательно, и карбоксильных групп латексных частиц, детектировали по поглощению FITC в видимой области (475 нм).



**Рис. 2.** Изотерма насыщения карбоксильных групп полистирольных частиц – пептидом EDYVPVDIYYLMDLSYSMKDD (ИМ-пептид).

Полученная изотерма насыщения карбоксильных групп латексных частиц ИМ-пептидом представлена на рис. 2. Видно, что кривая, описывающая изотерму, выходит на плато при 8-кратном избытке аминокрупп пептида по отношению к карбоксильным группам на поверхности частиц латекса. Именно это соотношение реагирующих групп было использовано при модификации полистирольных частиц ИМ-пептидом для создания приближенных моделей клеток.

Для создания модели биофункционализированного макропористого каркаса, способного к распознаванию клеточных рецепторов (интегринов) в качестве носителя использовали монолитный макропористый метакрилатный сорбент (СИМ<sup>®</sup>-диск), модифицированный пептидом GRGDSP. Реакция иммобилизации затрагивает эпоксидные группы основного мономера твердого сополимера – глицидилметакрилата (рис. 1), содержание которых в зависимости от условий синтеза составляет 3–5 ммоль/г. Как было установлено ранее [17], максимальное количество иммобилизованного лиганда достигается через 16 ч (25–30°C) при его концентрации в реакционном буфере не менее 5 мг/мл. Количество иммобилизованного пептида составило 3.2 мг/СИМ<sup>®</sup>-диск (0.005 ммоль/СИМ<sup>®</sup>-диск), или 9.4 мг/г сорбента.

На третьей стадии работы для изучения процессов специфического комплексообразования были

использованы возможности не осложненной диффузией аффинной хроматографии на монолитных дисках. Известно, что данный метод позволяет адекватно оценить количественные параметры взаимодействия биологических аффинных партнеров [12–14]. С использованием теоретических и практических подходов к данному типу хроматографического процесса, разработанных ранее на модели разделения вирусов на основе подобных полистирольных частиц [13, 14], была исследована биоспецифическая адсорбция полученных моделей клеток на поверхности модифицированного GRGDSP-пептидом CIM®-диска, имитирующего макропористый трехмерный каркас.

Количественное исследование биоспецифического связывания, выполненное в режиме скоростной аффинной хроматографии, осуществляли методом фронтального элюирования. В этом варианте через сорбент (CIM®-диск) пропускали дисперсии модифицированных ИМ-пептидом латексных частиц с разной концентрацией, причем объемы пропускаемых образцов были достаточны для полного адсорбционного насыщения поровой поверхности монолитного сорбента. Отделение модифицированных частиц, связанных с носителем неспецифически, проводили промыванием диска раствором 2 М NaCl в ФСБ (рН 7.0), в то время как десорбция адсорбированных частиц, т. е. разрушение аффинного комплекса EDYPVDIYYLMDLSYSMKDD/GRGDSP, достигалась элюцией раствором 0.01 М HCl, рН 2.0. Определение концентрации модифицированного латекса в собранных десорбированных фракциях позволило определить количество специфически связанных частиц. Полученные данные были пересчитаны на количество ИМ-пептида с учетом построенной ранее изотермы хемосорбции данного пептида на поверхности полистирольных частиц.

На основании полученных результатов были определены количественные параметры взаимодействия модели клетки, содержащей на поверхности ИМ-пептид, с модифицированной GRGDSP-пептидом поверхностью CIM®-диска, моделирующей поверхность биофункционализированного каркаса. Линеаризация построенной изотермы насыщения (рис. 3а и б) позволила определить адсорбционную емкость диска с иммобилизованным на поверхности GRGDSP-пептидом по отношению к ИМ-пептиду ( $Q_{\text{макс}} = 1.8$  мкг) и константу диссоциации исследуемого аффинного комплекса ( $K_{\text{дисс}} = 2.6 \times 10^{-7}$  М). Определенные количественные параметры взаимодействия в системе (CIM®-диск)–GRGDSP/(латекс)–EDYPVDIYYLMDLSYSMKDD однозначно свидетельствуют о выраженном аффинном характере их взаимодействия. Таким образом, нами была показана перспективность использования GRGDSP-пептида для увеличения специфической адгезии клеток на поверхности носителя.

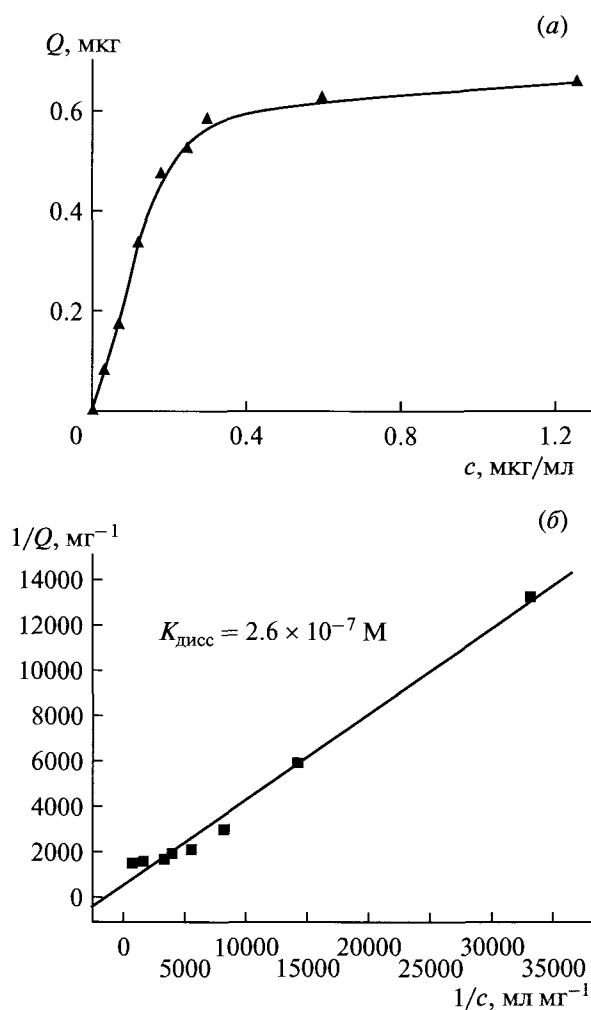
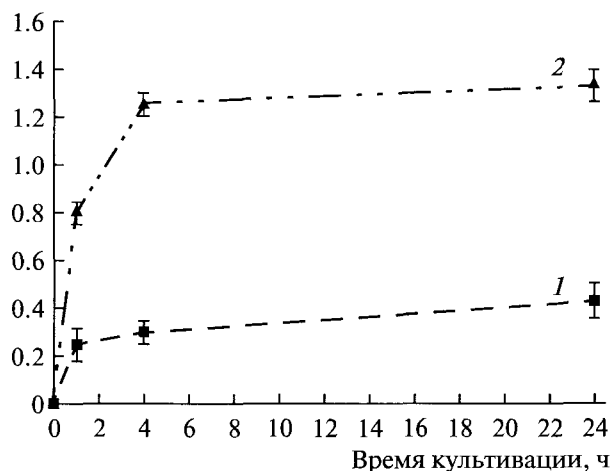


Рис. 3. Изотерма насыщения иммобилизованного на CIM®-диске GRGDSP-пептида аффинным ему ИМ-пептидом EDYPVDIYYLMDLSYSMKDD, ковалентно связанным с полистирольными частицами (а), и ее линеаризованная форма для расчёта  $K_{\text{дисс}}$  комплекса, равна 2462 г/моль.  $Q$  – количество связанного ИМ-пептида,  $c$  – исходная концентрация пептида.

Полученные результаты позволили перейти от изучения модельных объектов к исследованию влияния на адгезию живых клеток иммобилизации на поверхности каркаса пептида GRGDSP. Как уже было отмечено выше, ранее нами был разработан подход к получению биофункциональных полимерно-неорганических каркасов для инженерии костной ткани [5, 6], основанный на ковалентном конъюгировании необходимых для иммобилизации на поверхности каркаса биомолекул с гидрофильным полимером с последующей адсорбцией последнего на керамической макропористой матрице (Sponceram®). В качестве гидрофильного полимера был использован альдегидсодержащий поливинилсахарид – окисленная метапериодатом натрия



**Рис. 4.** Результаты флуоресцентного анализа прикрепленных на поверхности чистого Sponceram (1) и Sponceram, адсорбционно покрытого конъюгатом pMAG с GRGDSP-пептидом (2), окрашенных DAPI-клеток линии МТЗС3-Е1 (инкубация 1, 4 и 24 ч). На оси ординат — единицы, пропорциональные количеству окрашенных DAPI-клеток.

поли(2-дезоксид-2-N-метакрилоиламино-D-глюкоза) (окисленная p(MAG)).

Для исследования влияния адсорбционного покрытия Sponceram® конъюгатами окисленной p(MAG) с пептидом GRGDSP на адгезию живых клеток был проведен эксперимент, основанный на флуоресцентном детектировании количества прикрепленных клеток (коммерческая линия предшественников остеобластов МТЗС3-Е1). С этой целью клетки высевали на диски Sponceram® одинакового размера, предварительно помещенные внутрь силиконового кольца для фиксации клеток внутри матрицы. Культивирование клеток проводили в течение 1, 2 и 24 ч. По истечении указанного времени не прикрепившиеся клетки отмывали ФСБ и проводили инкубацию матриц в растворе флуоресцентного маркера 4',6-диамидино-2-фенилиндолгидрохлорида (DAPI), связывающегося с двухцепочечной ДНК в ядрах клеток. Необходимо отметить, что связывание DAPI с ДНК приводит к ~20-кратному увеличению интенсивности флуоресценции. После очистки матриц от несвязавшегося зонда проводили количественное детектирование флуоресценции (рис. 4). При этом использование одинаковых монолитных дисков Sponceram® позволило свести к минимуму погрешности количественного определения. Из приведенных зависимостей количества детектированных клеток, прикрепленных в течение первых суток культивирования, видно, что адгезия клеток на керамической матрице, поверхность которой адсорбционно покрыта конъюгатом pMAG с GRGDSP-пептидом, в первые четыре часа проте-

кает более интенсивно, чем на поверхности чистого Sponceram®.

Наблюдаемое соответствие результатов модельного и биологического экспериментов демонстрирует возможность использования метода аффинной хроматографии для предварительной оценки возможности использования иммобилизованного специфического лиганда для управления поведением клеток без проведения дорогостоящих экспериментов в культуре клеток.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное методом ВЭ-МДАХ *in vitro*-моделирование взаимодействия интегринавых рецепторов клеток с GRGDSP-пептидом позволило количественно оценить параметры данного аффинного взаимодействия. Эксперименты в культуре клеток подтвердили полученные результаты, продемонстрировав значительную интенсивность адгезии клеток на поверхности, содержащей указанный пептид. Таким образом, можно предложить подобный способ моделирования для предварительной оценки параметров аффинных взаимодействий при химическом конструировании искусственных биофункциональных материалов, в частности каркасов для тканевой инженерии.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Коммерчески доступные реагенты и растворители, если не указано отдельно, использовали без дополнительной очистки. В случае необходимости растворители очищали и осушали фракционной перегонкой. Используемые соли закупали у компаний Fluka и Sigma (Германия).

FCS, DMEM и 4',6-диамидино-2-фенилиндолгидрохлорид (DAPI) были закуплены у Invitrogen Ltd. (Molecular Probes Inc., Великобритания).

Пептиды GRGDSP и EDYPVDIYYLMDLSYSMKDD были предоставлены компанией Диафарм, Россия. 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид (EDC), флуоресцеинизотиоцианат (FITC) и боргидрид натрия получены от Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Германия).

Для аффинной хроматографии использованы монолитные GMA-EDMA-диски размером 12 × 3 мм (CIM® Epoxy Disks, BIA Separations GmbH, Австрия—Словения), а также специальный картридж-держатель того же производства. Полимерные частицы на основе полистирола (размер частиц 100 нм), содержащие на поверхности карбоксильные группы (0.919 мг-экв./м<sup>2</sup>), были предоставлены к.х.н. Т.Г. Евсеевой и д.х.н. А.Ю. Меньшиковой (ИВС РАН). В качестве неорганической матрицы использовали диски макропористого монолитного материала Sponceram® (допированная гидроксил-апатитом керамическая матрица на основе ZrO<sub>2</sub>;

средний размер пор 600 мкм, средняя площадь поверхности, определенная методом БЭТ, ~1.4 м<sup>2</sup>/г; диаметр 1 см; толщина 3 мм), предоставленные Zellwerk GmbH (Германия).

Альдегидсодержащий поливинилсахарид – поли(2-дезоксид-2-*N*-метакрилоиламино-*D*-глюкоза), а также его конъюгат с GRGDSP-пептидом синтезированы и охарактеризованы как описано в работах [5, 6].

Для проведения биологических экспериментов использована коммерческая линия клеток МТ3С3-Е1 (CCS Cell Culture, Германия) – предшественники остеобластов, выделенные из черепа мышей. Клетки культивировали в среде DMEM, дополненной телячьей сывороткой крови (FCS) (10%) и пенициллином/стрептомицином (1%). Ядра клеток окрашивали DAPI.

Высокоэффективную монолитную дисковую аффинную хроматографию (ВЭ-МДАХ) проводили, используя хроматографическую систему Gilson (Франция), включающую насосы 303 и 305 и УФ-детектор 2138 Uvicord S (LKB Bromma, Швеция).

Для измерений в УФ- и видимой областях спектра использовали спектрофотометр СФ-26 ЛОМО (Россия). Для подсчета количества клеток перед их культивированием на матрице, а также для детектирования флуоресценции клеток на минеральной матрице, использовали тринокулярный инвертированный микроскоп Ceti INVERSO TC, JENCONS Tissue culture equipment (Dunn Labortechnik GmbH, Германия). Количество клеток в суспензии рассчитывали с использованием диаграммы гемоцитометра Нейбауера (Thermo Fisher Scientific Inc., Германия).

**Модификация полистирольных частиц EDYPVDI-YULMDSL SYSMKDD-пептидом.** При изготовлении моделей клеток с интегринподобным рецептором использовали карбоксилированные полистирольные латексные частицы ( $d = 100$  нм;  $[\text{COOH}]_{\text{поверхн.}} = 0.919$  мкг-экв./м<sup>2</sup>,  $S_{\text{уд}} = 57.1$  м<sup>2</sup>/г;  $\rho = 1.05$  г/см<sup>3</sup>; содержание в суспензии 3.9 г/100 мл H<sub>2</sub>O). Модификацию частиц пептидом, имитирующим детерминанту связывания клеточного рецептора – интегрина (ИМ-пептидом), осуществляли двухстадийным методом, основанным на активации карбоксильных групп полимерных частиц водорастворимым карбодимидом в присутствии 1-гидроксибензотриазола [13, 14].

Для исследования поверхностной модификации полистирольных частиц указанным пептидом проводили его связывание с флуоресцентной меткой (FITC) по ε-аминогруппе лизина. К раствору 2 мг (0.81 мкмоль) пептида в 1 мл натрий-боратного буфера, pH 10.0, добавляли 0.32 мл (0.81 мкмоль) раствора FITC (1 мг/мл) в том же буфере. Объем реакционной смеси доводили до 2 мл так, чтобы получить эквимолярное конечное соотношение

реагентов [пептид] : [FITC]. Реакцию проводили при интенсивном перемешивании и комнатной температуре в течение 1 ч. Очистку конъюгата пептид-FITC от избытка реагентов проводили гель-фильтрацией на сефадексе G-25, элюируя дистиллированной водой.

Для модификации поверхности карбоксилированных латексов частицы, предварительно пропущенные через колонку с сефадексом G-25 (элюция 0.1 М MES-буфером, pH 5.5), последовательно активировали 1-гидроксибензотриазолом и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимидом (EDC), взятыми в эквимолярном отношении к поверхностным карбоксильным группам (0°C, 15 мин). Затем суспензию очищали от избытка реагентов гель-фильтрацией на колонке G-25, уравновешанной 0.01 М натрий-боратным буфером, pH 8.5. В пробирки, содержащие по 0.2 мл суспензии частиц (7.8 мг частиц, 0.0091 мкмоль COOH-групп) в 0.01 М натрий-боратном буфере, pH 8.5, добавляли 20, 40, 80 и 160 мкл раствора конъюгата пептид-FITC (1 мг/мл) в этом же буфере и инкубировали (4 ч, 20°C). По завершении реакции избыток пептида удаляли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-200 с 0.01 М ФСБ в качестве подвижной фазы.

Количество иммобилизованного на поверхности частиц пептида определяли по поглощению связанного с пептидом FITC при 475 нм с использованием предварительно построенной калибровочной кривой для конъюгата пептид-FITC. Для сведения к минимуму влияния рассеяния поглощаемого излучения на частицах использовали сильно разбавленные растворы модифицированных частиц.

При модификации поверхности полистирольных частиц ИМ-пептидом для дальнейшего изучения его биоспецифического взаимодействия с ковалентно закрепленным на поверхности CIM®-диска GRGDSP-пептидом методом аффинной хроматографии реакционную смесь составляли из 0.2 мл суспензии частиц и 80 мкл раствора пептида (1 мг/мл), не модифицированного FITC.

**Иммобилизация GRGDSP-пептида на CIM®-диске.** Используемые для создания аффинного сорбента на основе GRGDSP-пептида коммерческие CIM®-диски представляют собой монолитный макропористый материал на основе сополимера глицидилметакрилата с этиленгликольдиметакрилатом (GMA-EDMA), содержащий поверхностные эпоксидные функциональные группы (3–5 ммоль/г). Диаметр дисков составляет 12 мм, толщина – 3 мм, средний размер пор, определенный методом ртутной порометрии, равен 1.5 мкм.

Для удаления из пор носителя возможных органических примесей CIM®-диск предварительно последовательно промывали (в потоке жидкой фазы, при скорости 5 мл/мин, 30 мин каждым растворителем): этанолом, смесью этанол–вода (1 : 1), водой и

0.0125 М натрий-боратным буфером, рН 8.2. После подготовки монолитный диск с нативными эпоксидными группами помещали в 1 мл раствора GRGDSP-пептида (5 мг/мл) в указанном выше буферном растворе (22 ч, 22–30°C). Для оценки количества удержанного в порах носителя пептида полученный аффинный сорбент промывали последовательно рабочим буфером и 2 М раствором NaCl. Количество пептида, определенное в полученных фракциях, суммировали с количеством, детектируемым в растворе супернатанта. Количество иммобилизованного пептида определяли по разности концентраций исходного раствора пептида и раствора супернатанта после иммобилизации.

**Высокоэффективная монолитная дисковая аффинная хроматография полученных модельных систем.** Параметры взаимодействия аффинной пары EDYPVDIYYLMDLSYSMKDD/GRGDSP количественно оценивали фронтальным анализом. Через помещенный в картридж диск с иммобилизованным GRGDSP-пептидом пропускали суспензии модифицированных ИМ-пептидом частиц с различной концентрацией (0.005–0.61 мг частиц/мл) до полного насыщения всех адсорбционных сайтов сорбента. Скорость элюции на стадии адсорбции составляла 1.5–2 мл/мин, элюат – ФСБ (0.01 М, рН 7.0); для отделения неспецифически связавшихся частиц использовали 2 М раствор NaCl в ФСБ (рН 7.0), а для десорбции моделей клеток – 0.01 М HCl, рН 2.0. Для регистрации зон элюируемых модифицированных частиц определяли поглощение элюата при 278 нм. Во фракциях, содержащих десорбированные частицы, оптическое поглощение регистрировали при 300 нм. Полученные данные были пересчитаны на количество ИМ-пептида с учетом построенной ранее изотермы хемосорбции данного пептида на поверхности полистирольных частиц. Результаты представлены в виде изотерм адсорбции, линеаризация которых позволила определить  $K_{\text{дисс}}$  исследуемого аффинного комплекса [14].

**Оценка влияния введения GRGDSP-пептида на адгезию клеток методом окрашивания 4',6-диамидино-2-фенилиндолгидрохлоридом (DAPI).** Используемый в качестве основы каркаса керамический материал (Sponceram®) представляет собой монолитные диски одинакового размера, которые предварительно помещали внутрь силиконового кольца для фиксации клеток внутри матрицы. Для адсорбции конъюгата полимера (окисленной рMAG) с GRGDSP-пептидом диски Sponceram® и предварительно полученный конъюгат [6] (1 мг/мл; 0.1 М натрий-фосфатный буфер, рН 7.0, стерилизация фильтрованием) инкубировали при слабом перемешивании в течение 12 ч. Для проведения контрольного опыта аналогичную процедуру проводили в 0.1 М натрий-фосфатном буфере, не содержащем конъюгат. После этого диски дважды промывали ФСБ, помещали

в 24-луночный микропланшет (Sigma, Германия) и инкубировали в среде для культивирования в течение 2 ч. Клетки линии МТЗС3-Е1 высевали на диски ( $5 \times 10^3/100$  мкл среды), инкубировали 30 мин (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), после чего лунки микроплшета заполняли культуральной средой и инкубировали в термостате в течение 1, 4 и 24 ч. Затем диски переносили в новый 24-луночный микропланшет и дважды промывали ФСБ. Закрепившиеся на матрице клетки фиксировали ледяным этанолом (20 мин), дважды промывали ФСБ и инкубировали в растворе DAPI (5 мг/мл, или 14.3 мМ, 37°C, 15 мин), после чего трижды промывали раствором ФСБ и детектировали флуоресценцию DAPI ( $\lambda_{\text{возб.}} = 360$  нм,  $\lambda_{\text{эмисс.}} = 460$  нм).

Оценку ошибки определения количества прикрепленных клеток по флуоресценции связанного с ДНК DAPI проводили путем расчета величины относительной погрешности в серии из пяти измерений ( $n = 5$ ).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 05-03-32310) и Немецкого научного общества (DFG, KA 1784/4-1). Авторы благодарят сотрудников лаборатории синтеза пептидов и полимерных микросфер ИВС РАН к.х.н. Т.Г. Евсееву и д.х.н. А.Ю. Меньшикову за предоставленные полистирольные латексные частицы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bancroft G.N., Mikos A.G. // Bone tissue engineering by cell transplantation / Eds Ikada Y., Oshima N. New York: Elsevier, 2001. P. 151.
2. Mistry A.S., Mikos A.G. // Tissue Engineering Strategies for Bone Regeneration / Ed. Ioannis V. Yannas. Adv. Biochem. Engin. Biotechnol. 2005. V. 94. P. 2–22.
3. Scaffolding in tissue engineering / Eds Ma P., Elisseeff J., London, New York: CRC Taylor & Francis, 2006. P. 638.
4. Ma P. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2008. V. 60. P. 184–198.
5. Korzhikov V.A., Diederichs S., Nazarova O.V., Vlach E.G., Kasper C., Panarin E.F., Tennikova T.B. // J. Applied Polymer Science. 2008. V. 108. P. 2386–2397.
6. Korzhikov V., Roeker S., Vlach E., Kasper C., Tennikova T. // Bioconjugates Chemistry. 2008. V. 19. P. 617–625.
7. Ito Y., Kajihara M., Imanishi Y. // J. Biomed. Mat. Res. 1991. V. 25. P. 1325–1337.
8. Mann B.K., Tsai A.T., Scott-Burden T., West J.L. // Biomaterials. 1999. V. 20. P. 2281–2286.
9. Humphries M.J. // J. Cell Biol. 1990. V. 97. P. 585–592.
10. Massia S.P., Hubell J.A. // J. Cell Biol. 1991. V. 114. P. 1089–1100.
11. Tennikova T.B., Reusch J. // J. Chromatography A. 2005. V. 1065. P. 13–17.

12. *Vlakh E.G., Tennikova T.B.* // J. Chromatography A. 2009. V. 1216. P. 2637–2650.
13. *Kalashnikova I.V., Ivanova N.D., Evseeva T.G., Menshikova A.Yu., Vlakh E.G., Tennikova T.B.* // J. Chromatography A. 2007. V. 1144. P. 40–47.
14. *Kalashnikova I.V., Ivanova N.D., Tennikova T.B.* // Russ. J. Appl. Chem. 2008. V. 81. P. 867–873.
15. *Smith J.W., Cheresh D.A.* // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P. 18726–18731.
16. *Menshikova A.Yu., Evseeva T.G., Shabsel's B.M., Balanina I.V., Sirotkin A.K., Ivanchev S.S.* // Russ. J. Appl. Chem. 2005. V. 78. P. 1008–1012.
17. *Svec F., Tennikova T.B.* // J. Bioact. Compat. Polym. 1991. V. 6. P. 95–107.

### ***In vitro* Modeling of Cell-Scaffold Interaction**

**V. A. Korzhikov\*\*#, E. G. Vlakh\*, C. Casper\*\*, and T. B. Tennikova\***

#Phone: +7(812) 323-04-61; fax: +7(812) 328-68-69; e-mail: v\_korzhikov@mail.ru

\*Institute of Macromolecular Compounds RAS, Bolshoy pr. V.O. 31, Saint-Petersburg, 199004 Russia

\*\*Leibniz Universität Hannover, Institut für Technische Chemie, Hannover, Deutschland

The simple approach for modeling of surface ligand – cell receptor interaction is proposed to control the effectiveness of peptide acceptor selected to be immobilized on a scaffold surface in order to promote specific cell adhesion and their subsequent proliferation and bone tissue formation. For experimental realization of such approach the affinity chromatography with use of macroporous monolithic sorbent is suggested. The biospecific GRGDSP-peptide performed the role of scaffold surface ligand which is responsible for cell adhesion, while the “cells” were simulated by polymer (polystyrene) micro particles with EDYPVDIYYLM-DLSYSMKDD-peptide immobilized on their surface. The latter peptide is the integrin molecule active site which is responsible for RGD-sequence binding. Thus the ultra-short monolithic chromatography columns (CIM®-disks) represent the simplified model of a scaffold possessing biospecific properties. The qualitative evaluation of complement interaction parameters was performed via frontal analysis method followed by adsorption isotherm plotting and subsequent linearization and mathematical treatment. The data obtained reliably indicate the highly specific character of biological pair binding. This was in a good accordance with results obtained in the cell culture experiments.

*Keywords: modeling cellular interactions, tissue engineering, affinity chromatography.*