

На правах рукописи

**Сафонова
Любовь Александровна**

**РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ
2D И 3D БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ СКАФФОЛДОВ
НА ОСНОВЕ ФИБРОИНА ШЕЛКА ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ**

14.01.24 – трансплантология и искусственные органы

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Доктор биологических наук,
профессор

Агапов Игорь Иванович

Официальные оппоненты:

Посыпанова Галина Ароновна - доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и молекулярной медицины Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

Манухов Илья Владимирович - доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной генетики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «15» октября 2019 года в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 208.055.01 при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, по адресу: 123182, г. Москва, ул. Щукинская, д.1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, а также на сайте <http://transpl.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2019 года

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 208.055.01

кандидат ветеринарных наук

Елена Алексеевна Волкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Одной из актуальных проблем современной трансплантологии является нехватка донорских органов для пересадки. Эту проблему может решить применение искусственных органов, создание которых является одной из задач тканевой инженерии. Такие органы, как правило, представляют собой конструкции, содержащие два компонента: каркасный и клеточный.

Клеточный компонент обеспечивает функциональную активность искусственной конструкции, которая зависит от пролиферативной активности клеток и их миграции. С целью повышения пролиферативной активности клеток в состав конструкции могут включаться различные биологически активные компоненты, например, факторы роста или различные последовательности, модулирующие процессы адгезии и пролиферации.

При создании каркаса искусственного органа необходимо подобрать материал, который должен сочетать в себе совокупность характеристик – соответствовать по скорости деградации, механическим свойствам, не вызывать токсического эффекта и при этом должен максимально близко имитировать свойства нативного межклеточного матрикса и выполнять его функции. Именно межклеточный матрикс определяет физические свойства тканей, определяет адгезию, пролиферацию и дифференцировку клеток, обеспечивает миграцию клеток и пространственную организацию ткани. Учет этих характеристик при выборе материала для создания искусственной конструкции позволит воссоздать для клеток условия, близкие к нативным.

В тканевой инженерии используется широкий спектр материалов, как синтетических, так и природных. Преимущество синтетических материалов в том, что они просты в обработке и структурировании, однако, зачастую такие материалы образуют токсичные для организма продукты в процессе биodeградации, либо вовсе не подвергаются биodeградации. Поэтому на сегодняшний день предпочтение отдается природным материалам вследствие их сочетания биосовместимости и способности к биodeградации без образования токсичных продуктов распада. Как правило, в роли таких материалов выступают компоненты нативного межклеточного матрикса, такие как коллаген, фибронектин, эластин, гиалуроновая кислота и др., широко применяются полимеры природного происхождения – альгинаты, хитозан и т.п., а также композиты на основе этих материалов.

Но все же такие материалы не могут найти широкого применения в тканевой инженерии, так как технология получения конструкций на их основе связана с множеством проблем: сложности при структурировании, недостаточная механическая прочность и эластичность, низкая растворимость и т.д. Поэтому поиск новых материалов для искусственных конструкций остается актуальной задачей тканевой инженерии. В связи с этим изучение биологических свойств фиброина шелка из коконов тутового шелкопряда *Bombyx mori* и создание конструкций на его основе представляет особый интерес. Фиброин шелка имеет уникальную комбинацию свойств и может найти применение во многих областях тканевой инженерии, как в качестве самостоятельного материала, так и в составе композитов на его основе.

В ходе данной работы были разработаны технологии получения пленок и скаффолдов на основе фиброина шелка, изучена их структура, рассмотрены биологические свойства пленок и скаффолдов, а также изучен их регенеративный потенциал.

Цель исследования

Разработка 2D и 3D биodeградируемых скаффолдов на основе фиброина шелка и изучение их структуры и биологических свойств.

Задачи исследования

1. Разработать методики, которые позволяют получить 2D и 3D биodeградируемые скаффолды на основе фиброина шелка.
2. Исследовать особенности микро- и наноструктуры разработанных биodeградируемых 2D скаффолдов и 3D микроволокнистых скаффолдов методом сканирующей зондовой нанотомографии.
3. Охарактеризовать механические свойства и скорость деградации 2D скаффолдов.
4. Изучить *in vitro* биологические свойства разработанных биodeградируемых скаффолдов.
5. Оценить регенеративный потенциал разработанных биodeградируемых скаффолдов в экспериментальной модели полнослойной раны кожи.

Научная новизна

1. Методом электроспиннинга впервые получены микроволокнистые скаффолды на основе фиброина шелка и рекомбинантных спидроинов 2E12 и 2E12-RGD.
2. Впервые исследованы особенности микро- и наноструктуры пленок и микроволокнистых скаффолдов на основе фиброина шелка методом сканирующей зондовой нанотомографии.
3. Впервые исследованы биологические свойства микроволокнистых скаффолдов на основе фиброина шелка и рекомбинантных спидроинов 2E12 и 2E12-RGD.

Практическая значимость

Результаты предварительных исследований структуры и биологических свойств пленок и микроволокнистых скаффолдов на основе фиброина шелка позволяют рекомендовать данные конструкции для проведения доклинических исследований с целью их использования в тканевой инженерии и регенеративной медицине.

Методология и методы диссертационного исследования

В ходе выполнения диссертационной работы использован комплекс физико-химических, цитологических и гистологических методов исследования:

1. Получение пленок на основе фиброина шелка и коллагена методом полива.
2. Получение микроволокнистых скаффолдов на основе фиброина шелка, желатина и рекомбинантных спидроинов методом электроспиннинга.

3. Изучение структуры полученных конструкций методами сканирующей электронной микроскопии и сканирующей зондовой нанотомографии.
4. Изучение механических свойств пленок на основе фиброина шелка на разрывной машине.
5. Изучение скорости деградации пленок на основе фиброина шелка в нейтральной и окисляющей средах.
6. Методы культивирования мышинных фибробластов 3Т3 и клеток культуры гепатокарциномы человека Нер-G₂ на полученных конструкциях, оценка адгезии и пролиферации клеток методом МТТ (3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромид) и флуоресцентной микроскопии.
7. Оценка регенеративного потенциала полученных конструкций в системе *in vivo* в экспериментальной модели заживления полнослойной раны кожи у крыс.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработанные методики позволяют получить двумерные пленки на основе фиброина шелка методом полива и пористые микроволокнистые скаффолды на основе фиброина шелка методом электроспиннинга.
2. Разработанные биodeградируемые пленки и микроволокнистые скаффолды не проявляют цитотоксического эффекта и поддерживают адгезию и пролиферацию клеток.
3. Разработанные биodeградируемые пленки и микроволокнистые скаффолды ускоряют заживление кожного покрова и характеризуются высоким регенеративным потенциалом *in vivo*.

Степень достоверности апробация результатов

Достоверность результатов, представленных в диссертационной работе, определяется репрезентативным объемом проведенных экспериментальных исследований (2 линии клеток – Нер-G₂ и 3Т3 для экспериментов по исследованию биосовместимости *in vitro* и 45 самцов крыс породы Wistar для экспериментов по исследованию биосовместимости *in vivo*), комплексным применением современных методов исследования и подтверждается статистической обработкой полученных данных.

Апробация работы состоялась 9 июля 2019 г. на совместной конференции научных и клинических подразделений Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ ТИО имени ак. В.И. Шумакова»).

Результаты диссертационной работы были представлены на 8 российских конференциях: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2014», «Ломоносов-2015», «Ломоносов-2016», «Ломоносов-2017», II Национальный конгресс по регенеративной медицине, XXVII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Третий российский национальный конгресс с международным участием «Трансплантация и донорство органов», IX Всероссийский съезд трансплантологов, и 3 зарубежных

конференциях: XLIII Congress of the European Society for Artificial Organs, 44th ESAO and 7th IFAO Congress и 45th ESAO Congress.

Внедрение результатов в практику

Методики получения биodeградируемых пленок и микроволокнистых скаффолдов на основе фиброина шелка разработаны и внедрены в практику лаборатории бионанотехнологий ФГБУ «НМИЦ ТИО имени ак. В.И. Шумакова». Технология исследования биodeградируемых пленок и микроволокнистых скаффолдов на основе фиброина шелка методом сканирующей зондовой нанотомографии внедрена в практику ООО «СНОТРА» (Участник Фонда Сколково).

Личный вклад автора

Автор принимала непосредственное участие в постановке цели и задач исследования, самостоятельно составляла план экспериментальных исследований. Автором самостоятельно были разработаны методики получения пленок и микроволокнистых скаффолдов на основе фиброина шелка, а также проведены эксперименты по изучению структуры полученных конструкций методами сканирующей электронной микроскопии, атомно-силовой микроскопии и сканирующей зондовой нанотомографии. Автором самостоятельно были изучены свойства полученных конструкций и их биосовместимость *in vitro* и *in vivo*.

Публикации по теме диссертации

По результатам диссертационной работы были опубликованы 12 статей в российских и зарубежных журналах, входящих в одну из международных баз Web of Science или Scopus. Из них 9 статей в российских журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий ВАК РФ и 3 статьи в зарубежных журналах. По теме диссертационной работы получено 5 патентов.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной материалам и методам исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов и списка литературы, включающего 113 источников, в том числе 13 отечественных и 100 зарубежных. Работа изложена на 125 страницах машинописного текста, иллюстрирована 27 рисунками, содержит 9 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Получение фиброина шелка. Фиброин шелка получали из коконов тутового шелкопряда *B. mori*, предоставленных директором Государственного научного учреждения Республиканской научно-исследовательской станции шелководства Российской академии сельскохозяйственных наук Богословским В. В. (Ставропольский край, г. Железноводск). На первом этапе коконы подвергали очистке от серицина по следующей методике. Навеску шелка из коконов массой 1 г кипятили на водяной бане в 500 мл бидистиллированной воды с добавлением 1260 мг соды в течение 40 минут. Затем промывали 3,6 л дистиллированной воды. Далее кипятили в 500 мл бидистиллированной воды 30 минут и промывали 3,6 л дистиллированной воды. Последнюю процедуру повторяли 3 раза. Очищенный фиброин шелка сушили на воздухе при комнатной температуре.

Получение растворов фиброина шелка. Для получения водного раствора фиброина к 130 мг отмытого шелка добавляли раствор, содержащий 389 мг CaCl_2 , 388 мкл $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ и 544 мкл H_2O на 1 мл раствора. Смесь нагревали в течение 5 часов на водяной бане до полного растворения шелка. Полученный раствор центрифугировали в течение 7 минут при 12100 g. Супернатант диализовали против 500 мл бидистиллированной воды, всего проводили 5 смен диализа по 30 минут. Раствор фиброина центрифугировали 7 минут при 12100 g. Концентрацию фиброина определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм, молярный коэффициент экстинкции принимали равным $473480 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, что соответствует теоретически рассчитанному коэффициенту экстинкции по аминокислотной последовательности тяжелой цепи фиброина шелка (номер в базе данных UniProt: P05790).

Водный раствор фиброина шелка, полученный по описанной выше методике, наносили на дно чашки Петри и высушивали при комнатной температуре. Для получения раствора фиброина в муравьиной кислоте высушенный фиброин шелка растворяли в муравьиной кислоте из расчета 20 мг/мл при нагревании до 40°C на водяной бане в течение 30 минут. Полученный раствор центрифугировали 5 минут при 12100 g. Аналогично получали раствор фиброина шелка в 1,1,1,3,3,3-гексафторпропанол-2, при этом концентрация фиброина шелка была равной 50 мг/мл, растворение проводили при температуре 30°C в течение 3 суток.

Изготовление пленок из фиброина шелка и коллагена. Пленки получали методом полива. Для изготовления пленки диаметром 1 cm^2 наносили 100 мкл раствора заданного состава на поверхность полированного тефлона и высушивали в течение двух суток при комнатной температуре. Общая концентрация белка в пленке составляла 20 мг/мл, содержание коллагена в композитных пленках – 30% по массе. Пленки отделяли от поверхности тефлона с помощью скальпеля, предварительно инкубировав их в спирте в течение 15 минут, хранили в 96%-ном спирте при температуре 4°C .

Получение растворов рекомбинантных спидроинов и желатина в 1,1,1,3,3,3-гексафторпропанол-2. Образцы рекомбинантных спидроинов 2E12 и 2E12-RGD были предоставлены ведущим научным сотрудником Государственного Научного Исследовательского Института генетики и селекции микроорганизмов Богущем В.Г. Навеску рекомбинантного спидроина или желатина типа А (Sigma-Aldrich, США) растворяли в 1,1,1,3,3,3-гексафторпропанол-2 из расчета 50 мг/мл и инкубировали при температуре 30°C в течение 3 суток. Полученный раствор центрифугировали 10 минут при 12100 g.

Изготовление микроволокнистых скаффолдов на основе фиброина шелка. Микроволокнистые скаффолды на основе фиброина шелка были получены методом электроспиннинга. Для изготовления скаффолда 500 мкл раствора заданного состава с общей концентрацией 50 мг/мл в 1,1,1,3,3,3-гексафторпропанол-2 напыляли на поверхность неподвижного коллектора (стальной пластины) под действием электрического поля напряжением в диапазоне 6,8-7 кВ через иглу типа 22G (для раствора фиброина шелка), либо через иглу типа 23G (для остальных растворов). Скорость подачи раствора составляла 0,1 мл/ч, расстояние между концом иглы и катодом – 7 см. Примерное время напыления составляло 90 минут. Полученные скаффолды высушивали на коллекторе при комнатной температуре в течение 2 суток, а затем отделяли от поверхности коллектора с помощью скальпеля.

Для проведения экспериментов с клеточными линиями напыление производили на покровные стекла диаметром 24 мм. Для этого стекла прикрепляли к поверхности коллектора. Параметры напыления были аналогичными. После высушивания скаффолды на стеклах отделяли от поверхности коллектора.

Анализ структуры конструкций методом сканирующей зондовой нанотомографии. Образцы фиксировали 2,5%-ным раствором глутарового альдегида на фосфатно-солевом буфере с pH=7,4 в течение 2 часов в темноте при 4°C, отмывку образцов от фиксирующего раствора проводили фосфатно-солевым буфером. Затем образцы дегидратировали возрастающими концентрациями этанола. Использовали концентрации этанола 30%, 50%, 70%, 80% и 96%, инкубируя образцы по 10 минут в этаноле каждой концентрации. После этого образцы переносили в пропиленоксид на 10 минут, после чего производили еще две смены пропиленоксида, инкубируя по 10 минут в каждой.

Для заливки образцов использовали эпоксидную смолу, в которую переводили образцы по следующей методике. Сначала образцы инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре в смеси эпоксидной смолы и пропиленоксида 1:1, затем аналогично в смеси в соотношении 2:1. После этого образцы переносили в эпоксидную смолу, не содержащую пропиленоксид, и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. После этого производили заливку образцов в эпоксидную смолу и инкубировали образцы в термостате при температуре 45°C в течение 24 часов, а затем еще 48 часов при температуре 60°C для затвердевания эпоксидной смолы.

Исследование полученных образцов проводили с помощью комбинированной системы NtegraТомо (Нанотехнология МДТ, Россия), которая включает атомно-силовой микроскоп и ультрамикротом Leica EM UC6NT (Leica Microsystems GmbH, Austria). В ходе

исследования выполняли серию последовательных срезов образца ультрамикротомом с помощью алмазного ножа DiatomeUltra AFM 45 (Diatome, Швейцария) с дальнейшим измерением топографии поверхности участка после каждого среза при помощи атомно-силового микроскопа. Толщина среза составляла 150 нм. Измерения проводились в полуконтактном режиме с частотой сканирования 1 Гц. Для измерения использовали кремниевые кантилеверы NSG10 с резонансной частотой 240 кГц (Нанотехнология МДТ, Россия), радиус кривизны острия зонда составлял не более 10 нм. Получение изображений, их обработку, построение профилей поверхности осуществляли с помощью программы Nova 1.0.26.1433 (Нанотехнология МДТ, Россия). Для построения трехмерных реконструкций производили выравнивание изображений в плоскости сканирования. Построение и анализ трехмерных структур анализировали с помощью пакета программного обеспечения ImagePro AMS 6.0 (Media Cybernetics Inc., США), включающего опцию трехмерного реконструирования.

Анализ пролиферативной активности клеток на пленках различного состава.

Эксперимент проводили в 96-луночных планшетах. Для проведения эксперимента пленки позиционировали на поверхности лунок в виде покрытий. В качестве контроля использовали культуральный пластик. Перед проведением теста образцы подвергали стерилизации: обрабатывали 70%-ным спиртом в течение 30 минут, затем облучали ультрафиолетом в течение 30 минут. После этого в лунки планшета вносили стерильный раствор фосфатно-солевого буфера и инкубировали в течение 15 минут, после чего производили смену фосфатно-солевого буфера. Данную процедуру повторяли три раза. Далее в лунки планшета вносили по 300 мкл среды инкубации на 30 минут.

Суспензию клеток в среде инкубации переносили в 96-луночные планшеты из расчета 1000 клеток на лунку в 300 мкл среды инкубации. В эксперименте использовали две линии клеток – линию мышинных фибробластов 3T3 и линию клеток гепатокарциномы человека Нер-G₂. Клетки инкубировали в термостате при 37°C и 5% CO₂ в течение 7 дней.

Оценку адгезии клеток проводили визуально с помощью микроскопа Carl Zeiss Axio Vert.A1 (Zeiss, Германия). Оценку пролиферативной активности клеток проводили на 3-ий, 5-ый и 7-ой дни эксперимента. Для этого в каждую лунку планшета вносили по 50 мкл раствора 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромид с концентрацией 200 мкг/мл, который является субстратом для митохондриальных дегидрогеназ клетки. Планшеты инкубировали в термостате при 37°C и 5% CO₂ в течение 4 часов до выпадения темно-синих кристаллов формазана. Затем планшет центрифугировали в течение 5 минут при 885 g. Супернатант удаляли, осадок формазана растворяли в диметилсульфоксиде из расчета 300 мкл диметилсульфоксида на лунку и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 540 нм с помощью анализатора иммуноферментных реакций Пикон (Пикон, Россия).

Анализ адгезии и пролиферации клеток на микроволоконистых скаффолдах.

Эксперимент проводили в чашках Петри диаметром 3,5 см. Для проведения эксперимента волоконистые скаффолды позиционировали на покровных стеклах, после чего помещали в чашку Петри. В качестве контроля использовали покровные стекла, которые также помещали в чашки Петри аналогичного диаметра. Образцы микроволоконистых скаффолдов на покровных стеклах, имеющие в составе желатин или спидроин

предварительно инкубировали в 0,01% растворе глутарового альдегида в течение 12 часов при 4°C. Перед проведением теста образцы подвергали стерилизации: обрабатывали 70%-ным спиртом в течение 30 минут, затем облучали ультрафиолетом в течение 30 минут. После этого в чашки Петри вносили стерильный раствор фосфатно-солевого буфера и инкубировали в течение 15 минут, после чего производили смену фосфатно-солевого буфера. Данную процедуру повторяли три раза. Далее в чашки Петри вносили по 4 мл среды инкубации на 30 минут.

Суспензию клеток в среде инкубации переносили в 96-луночные планшеты из расчета 20000 клеток на чашку в 4 мл среды инкубации. В эксперименте использовали две линии клеток – линию мышинных фибробластов 3Т3 и линию клеток гепатокарциномы человека Нер-G₂. Клетки инкубировали в термостате при 37°C и 5% CO₂ в течение 7 дней.

Оценку адгезии и пролиферативной активности клеток проводили визуально с помощью микроскопа Carl Zeiss Axio Vert.A1 (Zeiss, Германия). Для этого образцы окрашивали флуоресцентным красителем DAPI, который связывается с ДНК клеток. Перед окрашиванием производили двукратную отмывку образцов от среды инкубации и неадгезированных клеток раствором фосфатно-солевого буфера. После этого вносили водный раствор красителя с концентрацией 3 мкг/мл из расчета 2 мл на чашку Петри и инкубировали в термостате при 37°C и 5% CO₂ в течение 5 минут. Затем образцы двукратно отмывали от несвязавшегося красителя раствором фосфатно-солевого буфера. Полученные образцы анализировали на флуоресцентном микроскопе с помощью фильтра с диапазоном возбуждения 360-370 нм и диапазоном эмиссии 420-470 нм. Изображения клеток получали с помощью камеры AxioCam 305 color (Zeiss, Германия), полученные изображения обрабатывали в программе Zen 2.3 BlueEdition (Zeiss, Германия). По полученным изображениям проводили подсчет клеток в поле зрения микроскопа.

Исследование заживления полнослойной кожной раны крысы породы Wistar. Эксперимент *in vivo* проводили в модели заживления полнослойной кожной раны у самцов крыс породы Wistar массой 200-300 г.

Все операции с животными осуществляли под ингаляционным эфирным наркозом, обеспечиваемым с помощью эксикатора, из расчета 50 мг/кг массы тела. При этом животные находились на спонтанном дыхании с частотой 75±10 дыхательных циклов в минуту, что соответствует хирургической стадии наркоза.

Экспериментальных животных распределяли на 9 групп в зависимости от раневого покрытия. В группах №№ 2, 3, 4, 5 в качестве раневых покрытий использовали пленки на основе фиброина шелка, в группах №№ 6, 7, 8, 9 – микроволокнистые скаффолды на основе фиброина шелка. Подробное описание состава раневых покрытий указано в таблице 1. Количество животных в каждой группе было равным 5.

Моделирование полнослойной кожной раны проводили следующим образом. Крысе удаляли шерсть на спине в области лопаток с помощью лезвия и депиляционного крема, после чего кожу обрабатывали 0,05%-ным раствором хлоргексидина. Далее крысе наносили рану диаметром 15±1 мм с помощью хирургических ножниц и скальпеля. При этом глубина повреждения соответствовала толщине кожного покрова крысы, включающего эпидермис, дерму и гиподерму. Рану обрабатывали 0,05%-ным раствором хлоргексидина.

Перед операцией все раневые покрытия подвергали стерилизации. Пленки на основе фиброина шелка стерилизовали 70%-ным спиртом в течение 12 часов, микроволокнистые скаффолды на основе фиброина шелка стерилизовали в течение 1 часа ультрафиолетом длиной волны 253,7 нм с помощью лампы PhilipsTUV 15W/G15 (PhilipsLightingB.V., Нидерланды). В экспериментальных группах №№ 2, 3 пленку размещали на поверхности раны и не пришивали, так как пленка хорошо адгезировала к поверхности раны и не требовала дополнительной фиксации. В экспериментальных группах №№4, 5 пленку пришивали к поверхности раны тремя швами с помощью хирургических полипропиленовых нитей 4-0, так как пленка требовала дополнительной фиксации на ране. В процессе операции следили за тем, чтобы пленка была влажной и при необходимости увлажняли ее 0,05%-ным раствором хлоргексидина для предотвращения образования микродефектов пленок. В экспериментальных группах №№ 6, 7, 8, 9 микроволокнистые скаффолды размещали на поверхности раны в сухом виде.

Затем рану с раневым покрытием вновь обрабатывали 0,05%-ным раствором хлоргексидина, после чего накладывали стерильную марлевую повязку, которую снимали на третий день проведения эксперимента.

В течение эксперимента крысы находились изолированно друг от друга в одиночных клетках со свободным доступом к воде и пище.

Оценку заживления ран проводили на 0-ой, 3-ий, 7-ой, 14-ый, 21-ый, 23-ий, 28-ой и 40-ой дни эксперимента. Качественную оценку заживления ран проводили визуально. Изображения получали с помощью камеры NikonD5100 18-105 VRkit и объектива Nikon модели AF-SDX 18-105 мм f/3,5-5,6 GEDVR. Для количественной оценки заживления кожной раны измеряли диаметр раны (d) и вычисляли процент уменьшения раны (A) в каждый из контрольных дней эксперимента по следующей формуле:

$$A = \frac{d_{(0)} - d_{(0,3,7,14,21,23,28,40)}}{d_{(0)}} \times 100\% \quad (1), \text{ где}$$

A - процент уменьшения раны,

$d_{(0)}$ - начальный диаметр раны в 0 сутки эксперимента,

$d_{(0,3,7,14,21,23,28,40)}$ - диаметр раны в контрольный день эксперимента.

По полученным значениям строили графики, отображающие изменение площади раны с течением времени.

Статистическая обработка результатов. Данные обрабатывали методом дисперсионного анализа. Статистическую значимость результатов оценивали с помощью критерия Манна-Уитни. Уровень статистической значимости α принимали равным 0,05.

Таблица 1. Группы экспериментальных животных в эксперименте по заживлению кожного покрова.

Номер группы	Конструкция, применяемая для заживления полнослойной раны кожи
1	- (отрицательный контроль)
2	Пленка на основе водного раствора фиброина шелка с концентрацией 20 мг/мл
3	Пленка на основе водного раствора фиброина шелка, содержащего 30% коллагена по массе, с общей концентрацией белка 20 мг/мл
4	Пленка на основе раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте с концентрацией 20 мг/мл
5	Пленка на основе раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте, содержащего 30% коллагена по массе, с общей концентрацией белка 20 мг/мл
6	Микроволокнистый скаффолд на основе раствора фиброина шелка в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-пропаноле-2, общая концентрация белка 50 мг/мл
7	Микроволокнистый скаффолд на основе раствора фиброина шелка в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-пропаноле-2, содержащего 30% желатина по массе, общая концентрация белка 50 мг/мл
8	Микроволокнистый скаффолд на основе раствора фиброина шелка в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-пропаноле-2, содержащего 30% спидроина 2E12 по массе, общая концентрация белка 50 мг/мл
9	Микроволокнистый скаффолд на основе раствора фиброина шелка в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-пропаноле-2, содержащего 30% спидроина 2E12-RGD по массе, общая концентрация белка 50 мг/мл

Результаты и их обсуждение

Получение конструкций для исследований

В рамках данного исследования с помощью двух различных методов были получены две группы образцов. Группа 1 – пленки на основе фиброина шелка тутового шелкопряда *B. mori*, полученные методом полива (рисунок 1А, таблица 1 – группы 2-5). Группа 2 – микроволокнистые скаффолды на основе фиброина шелка тутового шелкопряда *B. mori*, полученные методом электроспиннинга (рисунок 2А, таблица 1 – группы 6-9). Данный метод является одним из перспективных методов тканевой инженерии, поскольку позволяет получать конструкции с заданной структурой. Подбор параметров электроспиннинга позволяет изменять толщину волокон, пористость конструкции, распределение волокон, а также задавать их ориентацию. Рекомбинантные спидроины 2E12 и 2E12-RGD, включенные в состав скаффолдов, позволяют повысить биосовместимость без снижения механической прочности и эластичности, что является преимуществом при хирургических манипуляциях.

Анализ структуры полученных конструкций

Анализ структуры всех полученных конструкций проводился двумя методами: с помощью сканирующей электронной микроскопии и с помощью сканирующей зондовой нанотомографии. Метод сканирующей электронной микроскопии позволил выявить на поверхности пленок микро- и нанорельеф в виде шероховатостей (рисунок 1В). Для количественной оценки шероховатости поверхности полученных пленок использовали метод атомно-силовой микроскопии (рисунок 1Б, таблица 2). Такие показатели могут быть обусловлены различиями в растворимости полимера, а также в процессах высыхания пленок, полученных с применением различных растворителей. Введение коллагена в состав пленок существенно не влияет на величину показателя средней шероховатости. По данным сканирующей зондовой нанотомографии внутренняя структура пленок была однородной и представляла собой плотно упакованные глобулы белка размерами от 10 до 30 нм, которые могут быть образованы в результате агрегации белка при высушивании растворов полимеров на поверхности полированного тефлона. В ходе анализа не было выявлено нано- и микропор в структуре пленок (рисунок 1Г).

Методом сканирующей электронной микроскопии была подтверждена волокнистая структура скаффолдов и измерена толщина волокон в их составе, которая составляла 300-700 нм (рисунок 2Б). Дальнейший анализ структуры с высоким разрешением был проведен методом сканирующей зондовой нанотомографии. Для количественного анализа характеристик полученных скаффолдов были построены трехмерные реконструкции (рисунок 2Г), по которым были получены уникальные данные об объемной пористости скаффолдов и отношении поверхности к объему, которые являются важными количественными параметрами для описания и сравнения структуры полученных скаффолдов (таблица 3). Полученные параметры для различных скаффолдов не имеют статистически значимых отличий, что позволяет считать структуру полученных

скаффолдов аналогичной и исключить её влияние на возможные различия биологических свойств полученных микроволоконистых скаффолдов в системах *in vitro* и *in vivo*.

Была проанализирована структура отдельных волокон (рисунок 2В). Проведенный анализ структуры отдельных волокон позволил визуализировать неоднородную внутреннюю структуру. Важно отметить, что внутренняя структура волокон оказалась сходной с внутренней структурой пленок – на срезе волокон были обнаружены белковые глобулы, размер которых был примерно равен размеру глобул в составе пленок на основе фиброина шелка. Как и в случае пленок это может объясняться агрегацией белка при испарении растворителя в процессе электроспиннинга.

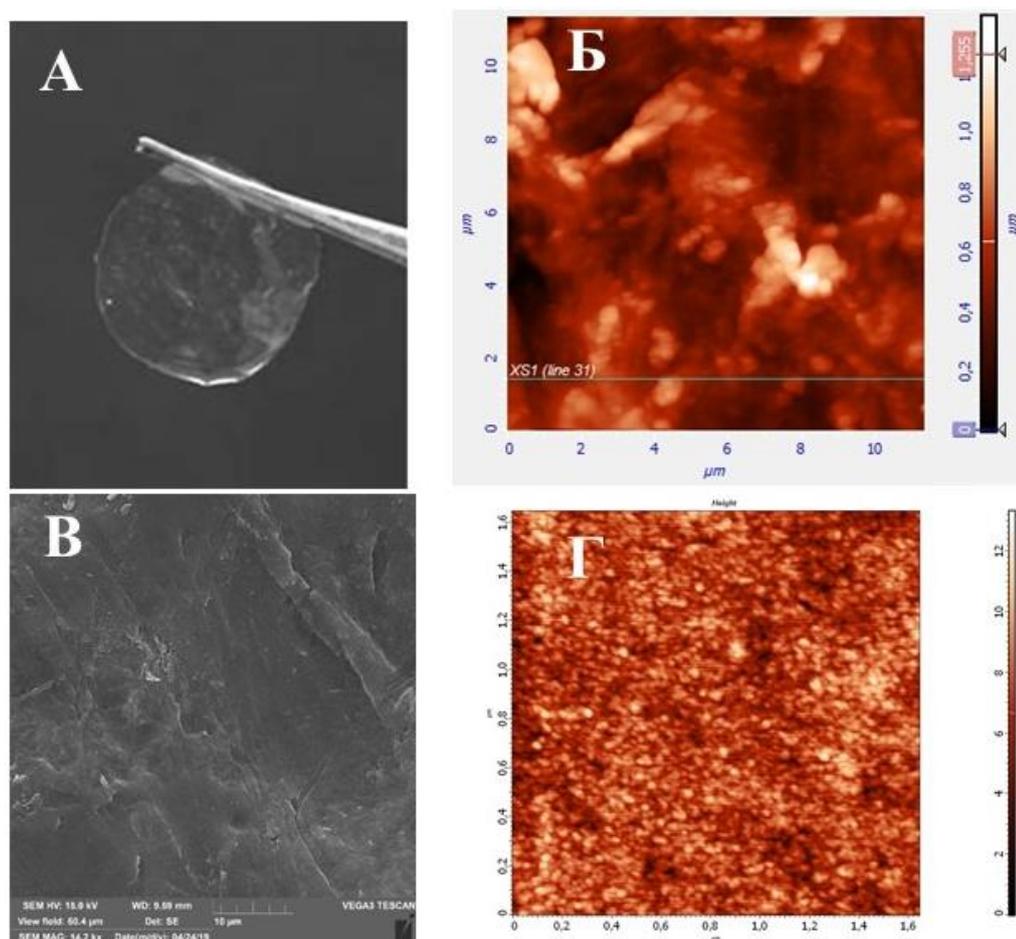


Рисунок 1. Результаты исследований структуры пленки из раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте с добавлением раствора коллагена: А – внешний вид пленки, Б - изображение поверхности пленки, полученное методом атомно-силовой микроскопии, В – изображение поверхности пленки, полученное методом сканирующей электронной микроскопии, Г - изображение поверхности среза пленки, полученное методом сканирующей зондовой нанотомографии.

Таблица 2. Данные о средних шероховатостях пленок различного состава. Указаны значения стандартного отклонения для 6-ти независимых измерений.

Состав тестируемой пленки	Средняя шероховатость поверхности пленок, нм
Водный раствор фиброина	36,5±10,6
Водный раствор фиброина, содержащий 30% коллагена по массе	47,8±11,3
Раствор фиброина в муравьиной кислоте	81,9±12,1
Раствор фиброина в муравьиной кислоте, содержащий 30% коллагена по массе	78,8±13,4

Таблица 3. Значения объемной пористости скаффолда и отношения поверхности скаффолда к объему для микроволокнистых скаффолдов различного состава. Представлены значения стандартного отклонения для 6-ти независимых измерений.

Состав скаффолда	Объемная пористость скаффолда, %	Отношение поверхности скаффолда к объему, мкм ⁻¹
Раствор фиброина шелка в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-пропаноле-2, общая концентрация белка 50 мг/мл	81,3±12,6	37,2±9,7
Раствор фиброина шелка в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-пропаноле-2, содержащий 30% желатина по массе, общая концентрация белка 50 мг/мл	86,4±10,5	33,8±7,4
Раствор фиброина шелка в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-пропаноле-2, содержащий 30% спидроина 2E12 по массе, общая концентрация белка 50 мг/мл	86,2±8,7	33,4±7,9
Раствор фиброина шелка в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-пропаноле-2, содержащий 30% спидроина 2E12-RGD по массе, общая концентрация белка 50 мг/мл	89,3±8,5	31,7±8,2

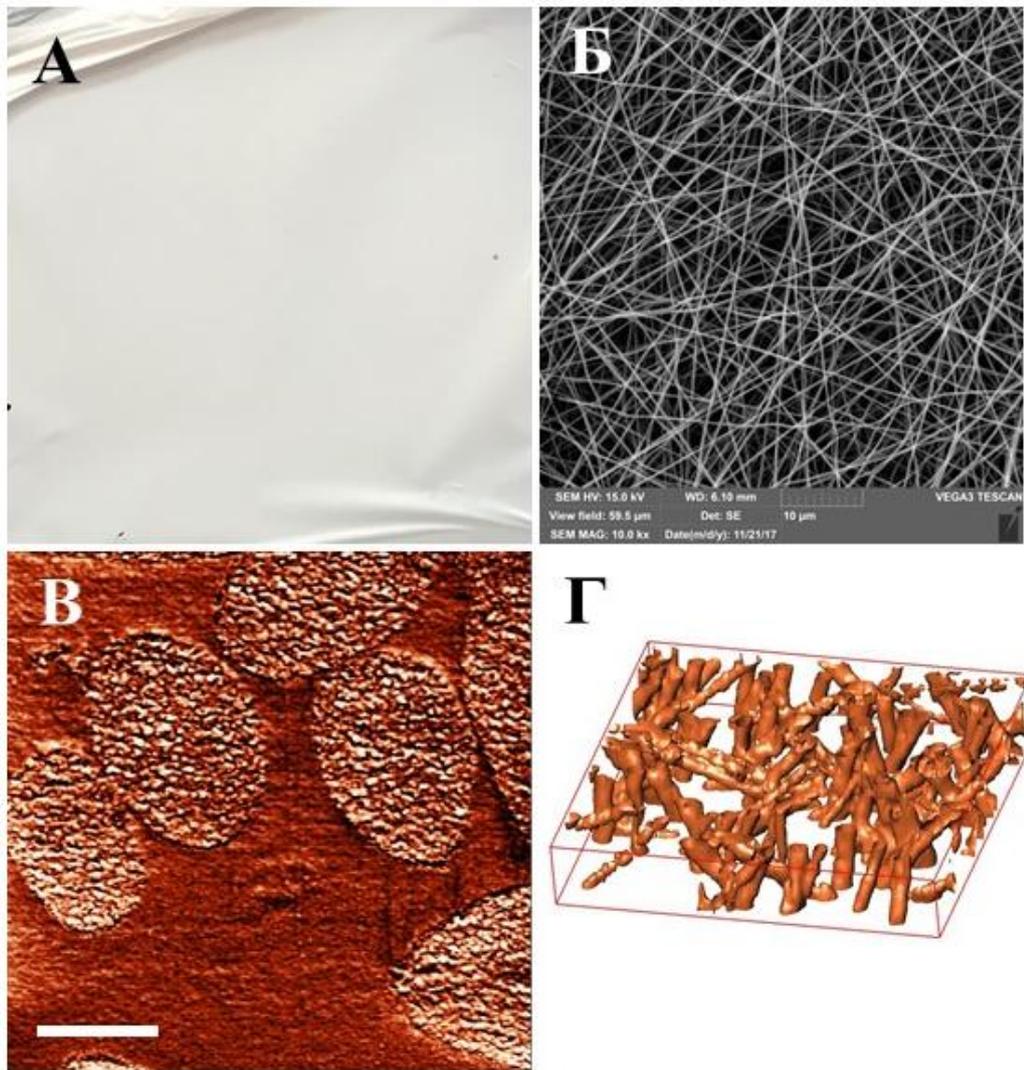


Рисунок 2. Результаты исследований структуры микроволоконистого скаффолда из фиброина шелка: А – внешний вид скаффолда, Б - изображение поверхности скаффолда, полученное методом сканирующей электронной микроскопии В - структура волокон в составе скаффолда, размерный отрезок – 500 нм, Г - трехмерная реконструкция скаффолда, область сканирования – $13,7 \times 12,7 \times 2,25$ мкм, количество срезов – 15, толщина среза - 150 нм.

Анализ биосовместимости полученных конструкций

Изучение адгезии и пролиферативной активности клеток на полученных конструкциях

Все виды пленок поддерживают адгезию и пролиферацию клеток обеих линий на уровне, сопоставимым с контролем. Введение коллагена в состав пленки не оказывает существенного влияния на адгезию и пролиферативную активность клеток (рисунок 3). Это может объясняться тем, что молекулы фиброина экранируют RGD-последовательности, присутствующие в структуре коллагена, от рецепторов клеток.

В ходе анализа адгезии клеток линии Нер-G₂ на поверхности микроволокнистых скаффолдов не было выявлено влияния состава скаффолдов на адгезию клеток, что, как и в случае пленок, может объясняться экранированием RGD-последовательностей в составе скаффолда от рецепторов клеток. Пролиферативная активность клеток линии Нер-G₂ на микроволокнистых скаффолдах всех рассматриваемых групп была достоверно выше, чем в контроле, что может объясняться волокнистой пористой структурой скаффолдов, которая позволяет создать оптимальные условия для пролиферации и миграции клеток в более глубокие слои скаффолда (рисунок 4). При этом на 3 день эксперимента пролиферативная активность клеток на микроволокнистых скаффолдах с добавлением рекомбинантного спидроина, модифицированного RGD-последовательностью, была выше, чем на скаффолдах, не содержащих спидроин, что в данном случае можно объяснить деградацией фиброина в составе скаффолда и освобождением RGD-последовательности, которая запускает адгезию клеток, а значит, влияет на пролиферативную активность клеток в составе скаффолда. Эта гипотеза подтверждается тем, что окрашивание ядер клеток выявило отдельные области адгезии клеток в составе микроволокнистых скаффолдов. На скаффолдах, не содержащих спидроин в составе, такой эффект не был отмечен, и клетки распределялись по поверхности скаффолда равномерно.

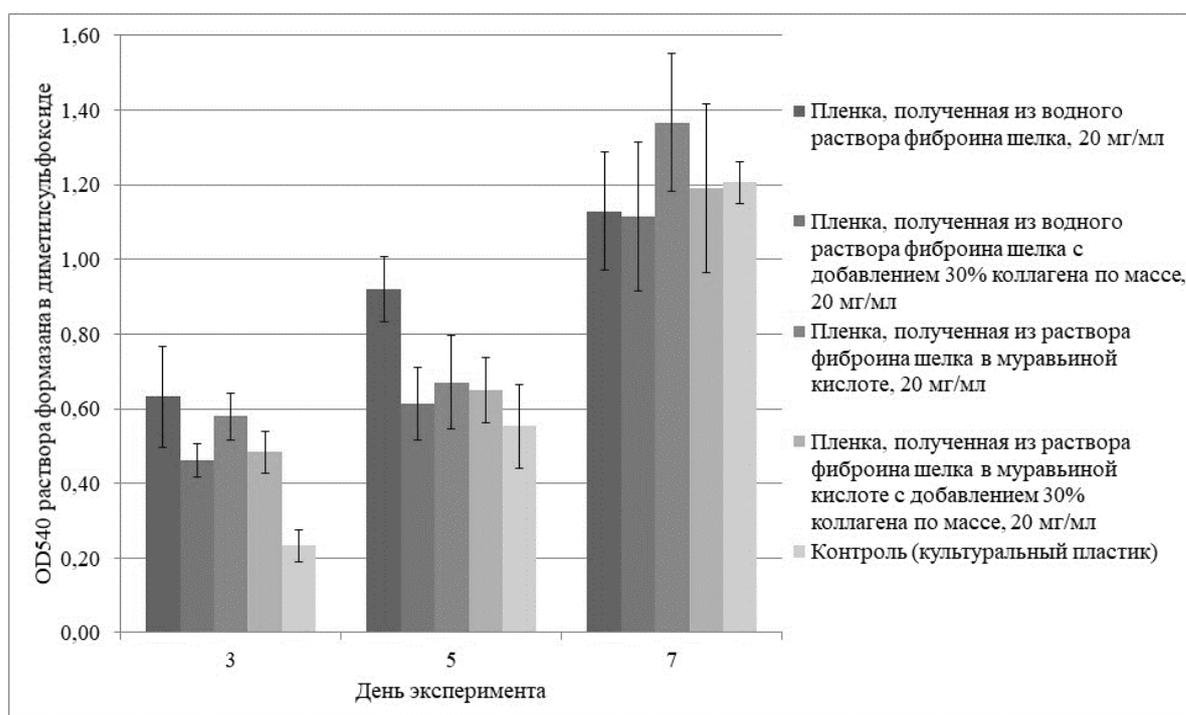


Рисунок 3. Пролиферативная активность фибробластов линии 3Т3 на пленках различного состава. Указаны значения стандартного отклонения для 5-ти независимых измерений.

На 7 день эксперимента эффект увеличения пролиферативной активности проявился на других микроволокнистых скаффолдах, содержащих композитные добавки. Наибольшая пролиферативная активность клеток была зарегистрирована на скаффолдах с добавлением рекомбинантного спидроина, модифицированного RGD-последовательностью, - клетки в составе данных скаффолдов сформировали плотный монослой.

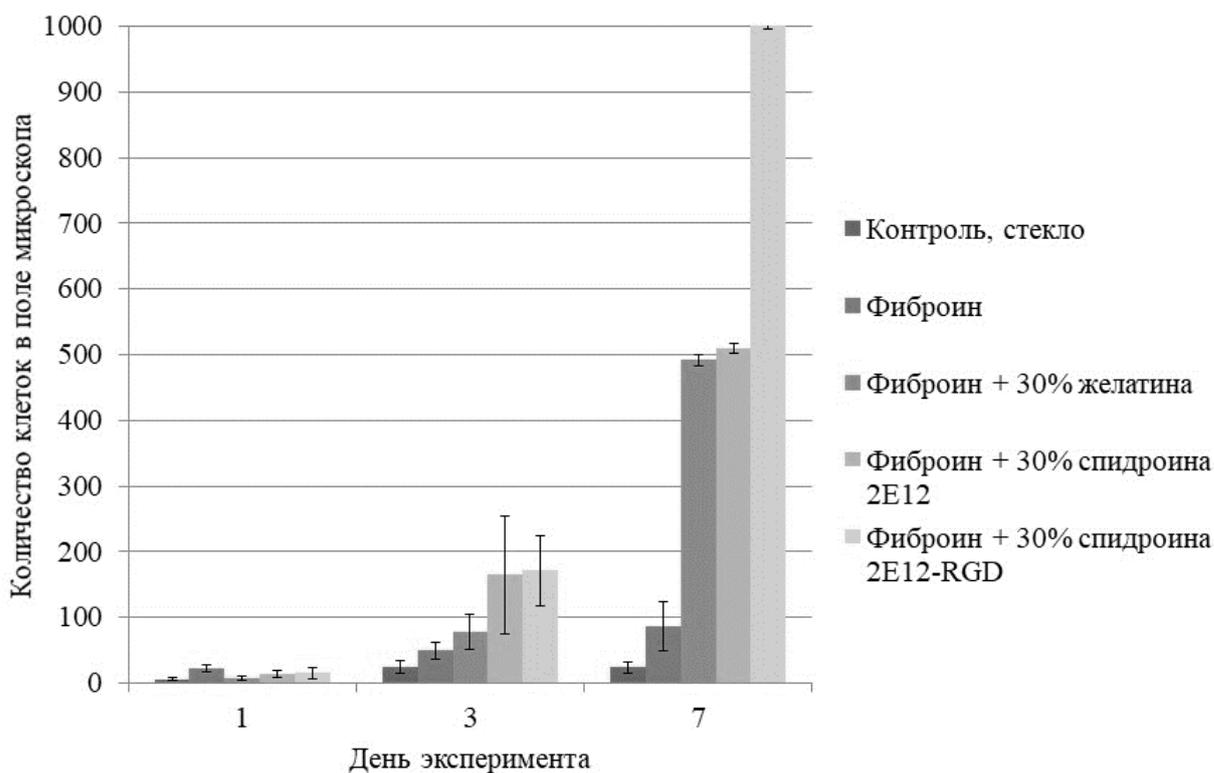


Рисунок 4. Адгезия (1 день) и пролиферативная активность (3, 7 день) клеток линии Нер-G₂ на микроволокнистых скаффолдах различного состава. Указаны значения стандартного отклонения для 10-ти независимых измерений.

Исследование заживления полнослойной кожной раны крыс породы Wistar с помощью полученных конструкций

Изученные свойства пленок и микроволокнистых скаффолдов позволяют рассматривать их как перспективные конструкции для регенеративной медицины, которые могут использоваться в качестве раневых покрытий. В качестве системы для оценки регенеративного потенциала конструкций была выбрана модель заживления кожной раны крысы. В эксперименте использовались самцы крыс породы Wistar массой 200-300 г. Экспериментальным животным наносили рану диаметром 15±1 мм в области лопаток с помощью хирургических ножниц. Животным в контрольной группе рану закрывали стерильной повязкой.

Различия в свойствах конструкций определяют ход процесса имплантации. Пленки, изготовленные из водных растворов, являются гигроскопичными и легко фиксируются на поверхности раны без наложения швов, способны удерживать в себе влагу и в процессе имплантации не требуют постоянного увлажнения. Эти свойства значительно облегчают и

ускоряют процесс имплантации пленки, а возможность не пришивать пленку к поверхности раны позволяет сделать процедуру менее болезненной и не наносить дополнительные повреждения в процессе операции. Напротив, пленки, изготовленные из растворов полимеров в муравьиной кислоте, не фиксируются на поверхности раны, а также в ходе их имплантации возникают трудности, связанные с высыханием пленки, образованием трещин, изгибов, нарушением целостности.

Микроволокнистые скаффолды за счет своей пористости обладают высокой проницаемостью и гигроскопичностью, что значительно облегчает ход имплантации и позволяет не пришивать скаффолд к поверхности раны. Данные скаффолды позиционировались на рану в сухом виде, поэтому в ходе имплантации не требовалось поддерживать уровень влажности скаффолда, что значительно сокращало время операции. Благодаря этим свойствам в области повреждения можно позиционировать сразу несколько скаффолдов, чтобы создавать многослойную конструкцию. Также в ходе имплантации было отмечено гемостатическое действие микроволокнистых скаффолдов, в составе которых присутствует желатин.

В контрольные дни эксперимента получали изображения ран, представленные на рисунке 5 (изображения на 40-ой день эксперимента не приведены, так как не являются показательными, - к этому времени произошло зарастание раны во всех группах, за исключением контрольной группы).

По результатам эксперимента было показано, что пленки, полученные из водных растворов полимеров, ускоряют заживление полнослойной кожной раны в среднем на 17 суток по сравнению с контролем и на 5 суток по сравнению с пленками, полученными из растворов полимеров в муравьиной кислоте. Между пленками и микроволокнистыми скаффолдами аналогичного состава не было выявлено статистически значимых отличий в скорости заживления полнослойной раны кожи. Среди микроволокнистых скаффолдов наибольшая скорость заживления полнослойной раны кожи наблюдалась в группах крыс, которым были имплантированы скаффолды, содержащие в составе рекомбинантные спидроины. Эти скаффолды ускоряли заживление кожного покрова на 19 суток по сравнению с контролем и 3 суток - с другими микроволокнистыми скаффолдами.

Качественную оценку заживления проводили с помощью гистологических исследований. Забор образцов проводили в день полного зарастания раны. Полученные окрашенные срезы кожи крыс анализировали с помощью светового микроскопа (рисунок 6). Морфология срезов образцов кожи животных из экспериментальных групп не отличается от морфологии срезов нативной неповрежденной кожи крысы. На всех полученных срезах было выявлено наличие трех слоев кожи: эпидермис, дерма и гиподерма. Присутствие этих слоев свидетельствует об успешном заживлении раны. Очагов воспаления на полученных срезах выявлено не было, что также является важным показателем, характеризующим успешное заживление кожного покрова.

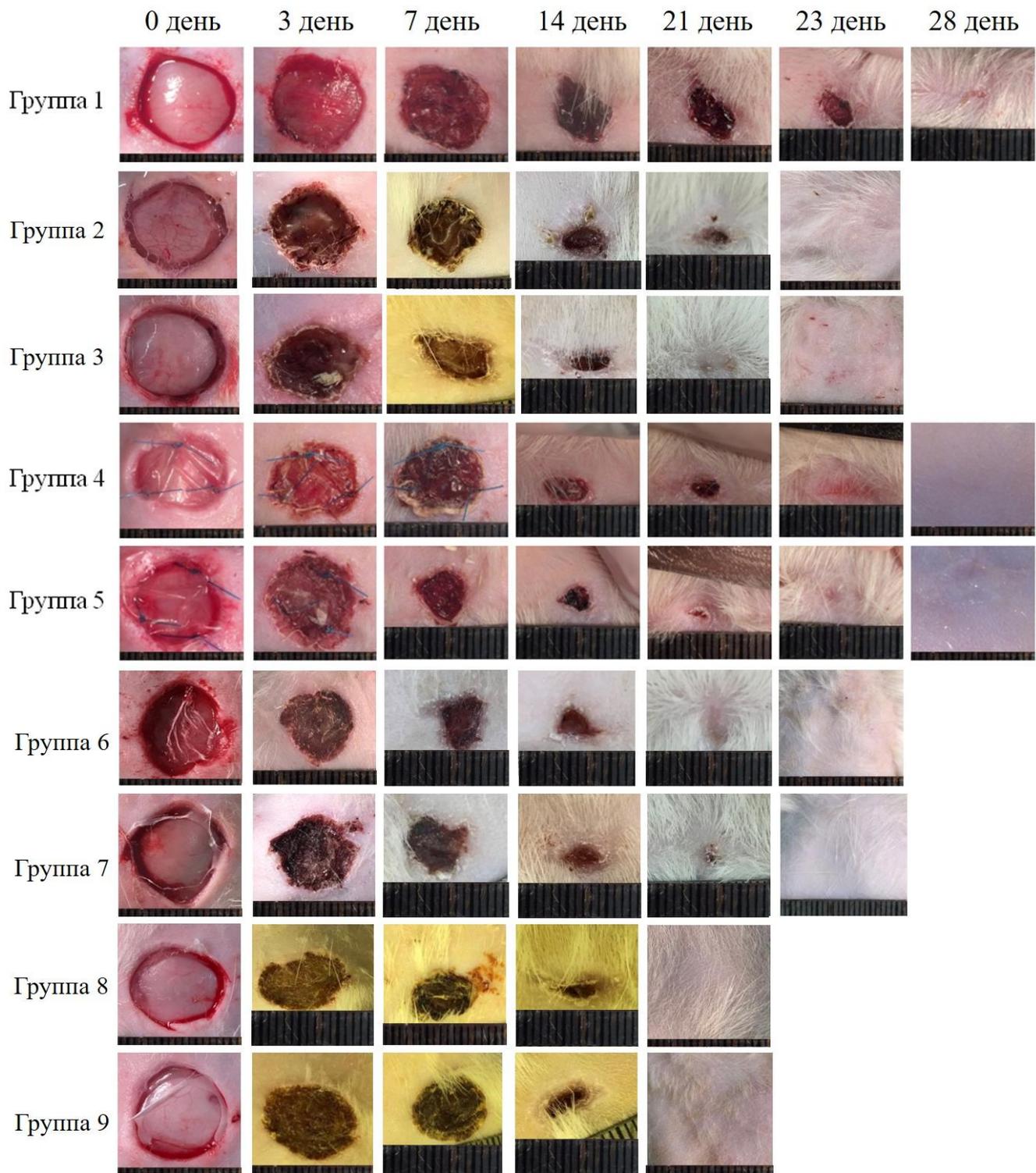


Рисунок 5. Изображения ран, полученные в течение эксперимента по заживлению полнослойной кожной раны крыс породы Wistar на 0-ой, 3-ий, 7-ой, 14-ый, 21-ый, 23-ий и 28-ой дни эксперимента.

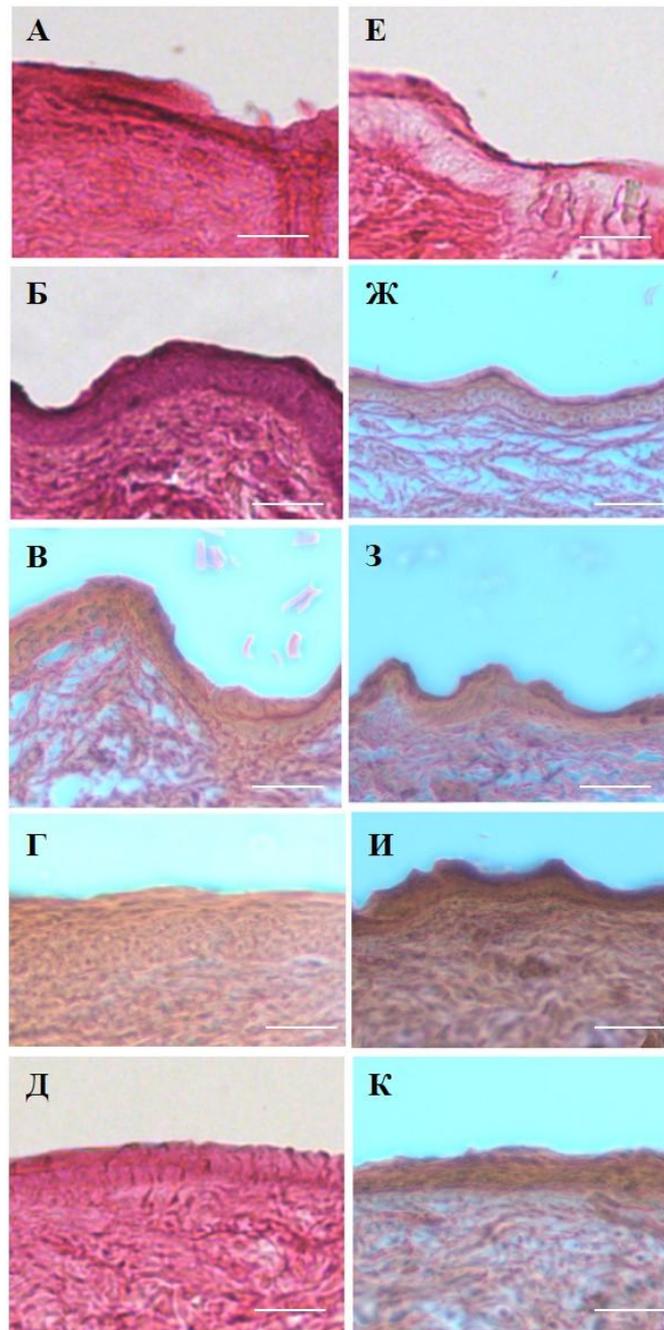


Рисунок 6. Изображения гистологических срезов кожи крысы в зоне полного заживления раны (A=100%), окрашенных гематоксилин-эозином, увеличение $\times 100$, масштаб – 100 мкм. А – нативная кожа крысы (норма), Б – группа 1 на 40 день эксперимента, В – группа 2 на 23 день эксперимента, Г – группа 3 на 23 день эксперимента, Д – группа 4 на 28 день эксперимента, Е – группа 5 на 28 день эксперимента, Ж – группа 6 на 23 день эксперимента, З – группа 7 на 23 день эксперимента, И – группа 8 на 21 день эксперимента, К – группа 9 на 21 день эксперимента.

Таким образом, можно говорить о возможном перспективном применении полученных конструкций для различных задач тканевой инженерии и регенеративной медицины.

ВЫВОДЫ

1. Методом полива на поверхности полированного тефлона получены 4 вида образцов 2D биodeградируемых скаффолдов в виде пленок на основе фиброина шелка с общей концентрацией белка 20 мг/мл: из водного раствора фиброина шелка; из водного раствора фиброина шелка, содержащие 30% коллагена по массе; из раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте; из раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте, содержащие 30% коллагена по массе.

2. Методом электроспиннинга получены 4 вида пористых микроволокнистых 3D скаффолдов на основе растворов полимеров в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-пропанол-2 с общей концентрацией белка 50 мг/мл: микроволокнистые скаффолды из фиброина шелка, микроволокнистые скаффолды из фиброина шелка, содержащие 30% желатина по массе, микроволокнистые скаффолды из фиброина шелка, содержащие 30% рекомбинантного спидроина 2E12 по массе, микроволокнистые скаффолды из фиброина шелка, содержащие 30% рекомбинантного спидроина 2E12-RGD по массе.

3. Внутренняя структура всех 2D скаффолдов представляет собой плотно упакованные глобулы размерами от 10 до 30 нм, не имеет микро- и нанопор. По данным атомно-силовой микроскопии поверхность 2D скаффолдов характеризуются рельефом в виде нанощероховатостей в диапазоне 30-90 нм. Отличий во внутренней структуре 2D скаффолдов различного состава не было выявлено.

4. Микроволокнистые 3D скаффолды состоят из волокон со средним диаметром 300-700 нм, которые неупорядоченно распределены в объеме скаффолдов. Средняя объемная пористость скаффолдов составляет 85,7% , среднее отношение поверхности к объему $34,2 \text{ мкм}^{-1}$. Волокно имеет неоднородную внутреннюю структуру, представленную плотно упакованными глобулами размером от 10 до 30 нм. Отличий во внутренней структуре микроволокнистых 3D скаффолдов различного состава не было выявлено.

5. Показатели механической прочности на разрыв 2D скаффолдов на основе фиброина шелка лежат в диапазоне от 1,44 МПа до 4,29 МПа, эластичности – в диапазоне от 30% до 89%, что обеспечивает пригодность полученных 2D скаффолдов для хирургических манипуляций.

6. Образцы 2D и 3D биodeградируемых скаффолдов не проявляют цитотоксического эффекта и поддерживают адгезию и пролиферацию клеток линий 3T3 и Нер-G₂. За 105 дней эксперимента 2D скаффолды на основе фиброина шелка потеряли в среднем 35% массы в окисляющей среде.

7. В экспериментальной модельной системе полнослойной раны кожи 2D и 3D биodeградируемые скаффолды ускоряют заживление кожного покрова в среднем на 18 дней (в 2,2 раза) по сравнению с контролем, что свидетельствует о высоком регенеративном потенциале.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ефимов А. Е. Исследование микро- и наноструктуры биосовместимых матриц из регенерированного фиброина *Bombyx mori* методом сканирующей зондовой нанотомографии / А. Е. Ефимов, М. М. Мойсенович, А. Г. Кузнецов, Л. А. Сафонова, М. М. Боброва, И. И. Агапов // *Российские нанотехнологии*. - 2014. - Т. 9. - № 9-10. - С. 59-63.
2. Сафонова Л. А., Архипова А. Ю. Биодegradируемые композитные пленки на основе регенерированного шелка для тканевой инженерии. В кн.: XXI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2014», тезисы докладов. Москва, 7-11 апреля 2014. С.:40-41.
3. Сафонова Л. А. Биологические свойства пленок из регенерированного фиброина шелка / Л. А. Сафонова, М. М. Боброва, О. И. Агапова, М. С. Котлярова, А. Ю. Архипова, М. М. Мойсенович, И. И. Агапов // *Современные технологии в медицине*. - 2015. - Т. 7. - № 3. - С. 6-13.
4. Агапова О. И., Боброва М. М., Сафонова Л. А. Влияние нано- и микроструктуры пористых матриц из фиброина шелка и рекомбинантного спидроина 1 на их биологические свойства. В кн.: XXII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2015», тезисы докладов. Москва, 13-17 апреля 2015. С.:29-30
5. Соколова А. И. Зависимость биологических свойств скаффолдов из фиброина шелка и желатина от состава и технологии изготовления / А. И. Соколова, М. М. Боброва, Л. А. Сафонова, О. И. Агапова, М. М. Мойсенович, И. И. Агапов // *Современные технологии в медицине*. - 2016. - Т. 8. - № 3. - С. 6-15.
6. Сафонова Л. А. Пленки на основе фиброина шелка для заживления полнослойной раны кожи у крыс / Л. А. Сафонова, М. М. Боброва, О. И. Агапова, А. Ю. Архипова, А. В. Гончаренко, И. И. Агапов // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. - 2016. - Т. 18. - № 3. - С. 80-83.
7. Ефимов А. Е. Наноструктурные особенности контактов фибробластов и двухмасштабного биосовместимого полиуретанового матрикса / А. Е. Ефимов, О. И. Агапова, Л. А. Сафонова, М. М. Боброва, В. А. Парфенов, Е. В. Кудан, Ф. Д. А. С. Перейра, Е. А. Буланова, В. А. Миронов, И. И. Агапов // *Российские нанотехнологии*. – 2016. - Т. 11. - № 11-12. - С. 116-119.
8. Сафонова Л. А., Боброва М. М., Агапова О. И. Методика сканирующей зондовой нанотомографии для изучения структуры пористых матриц из фиброина шелка и рекомбинантного спидроина 1. В кн.: XXVII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии»: сборник тезисов. Москва, 8-11 февраля 2016. С.:187.

9. Соколова А. И., Боброва М. М., Сафонова Л. А. Метод электроспиннинга для изготовления покрытий из фиброина шелка и желатина. В кн.: XXIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016», тезисы докладов. Москва, 11-15 апреля 2016. С.:69.

10. **Efimov A. E. Cryo scanning probe nanotomography study of the structure of alginate microcarriers / A. E. Efimov, O. I. Agapova, L. A. Safonova, M. M. Bobrova, A. D. Volkov, L. Khamkhash, I. I. Agapov // RSCAdvances. – 2017. - V. 7. - P. 8808-8815.**

11. **Ефимов А. Е. Трехмерный анализ микро- и наноструктуры биоматериалов и клеток методом сканирующей зондовой крионанотомографии / А. Е. Ефимов, О. И. Агапова, Л. А. Сафонова, М. М. Боброва, И. И. Агапов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2017. - Т. 19. - №4. - С. 78-87.**

12. **Safonova L., Bobrova M., Agapova O., Efimov A., Agapov I. Silk fibroin/collagen films for rat skin wound regeneration. Abstracts from the 44th ESAO and 7th IFAO Congress. Vienna, Austria, 6-9 September 2017. P.:467.**

13. Ефимов А. Е., Агапова О. И., Сафонова Л. А., Боброва М. М., Агапов И. И. Трехмерный анализ микро- и наноструктуры биоматериалов, клеток и тканей методом сканирующей зондовой нанотомографии. Третий российский национальный конгресс с международным участием «Трансплантация и донорство органов». Москва, 2-4 октября 2017 г. Вестник трансплантологии и искусственных органов. №19(3): С.:6-230.

14. **Moisenovich M. M. Effect of Silk Fibroin on Neuroregeneration After Traumatic Brain Injury / M. M. Moisenovich, E. Y. Plotnikov, A. M. Moysenovich, D. N. Silachev, T. I. Danilina, E. S. Savchenko, M. M. Bobrova, L. A. Safonova, V. V. Tatarskiy, M. S. Kotliarova, I. I. Agapov, D. B. Zorov // Neurochemical Research. - 2018. – V. 38(9). - P. 1-12.**

15. **Safonova L., Bobrova M., Efimov A., Agapova O., Agapov I. The Comparative Analysis OfElectrospun And Casting Silk Fibroin Scaffold Properties. Abstracts from the 45th ESAO Congress. Madrid, Spain, 12-15 September 2018. The International Journal of Artificial Organs, V.41(9): P.:486–631.**

16. **Сафонова Л. А., Боброва М. М., Ефимов А. Е., Агапова О. И., Агапов И. И. Сравнительный анализ структуры и свойств пленок и скаффолдов на основе фиброина шелка, полученных методами полива и электроспиннинга. IX Всероссийский съезд трансплантологов. Москва, Россия, 17-19 сентября 2018. С.:145.**

17. **.Efimov A. E. 3D scanning probe nanotomography of tissue spheroid fibroblasts interacting with electrospun polyurethane scaffold/ A. E. Efimov, O. I. Agapova, L. A. Safonova, M. M. Bobrova, V. A. Parfenov, E. V. Koudan, F. D. A. S. Pereira, E. A. Bulanova, V. A. Mironov, I. I. Agapov // Express Polymer Letters. - 2019. – V. 13(3). - P. 632-641.**

Патенты

1. Пат. 2606843 РФ МПК А61К 9/14 (2006.01), А61К35/12 (2015.01), А61К35/407 (2015.01), А61К47/36 (2006.01), А61К47/48 (2006.01) Способ получения модифицированных альгинатных микросфер / Агапов И.И., Агапова О.И., Ефимов А.Е., Соколов Д.Ю., Боброва М.М., **Сафонова Л.А.**; заявитель и патентообладатель: ФГБУ «ФНЦТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава РФ, ООО «СНОТРА».-№ 2015145455; заявл. 22.10.2015; опубл. 10.01.2017. бюл. №1.-с.14.

2. Пат. 2653428 РФ МПК С12М3/00 (2006.01) Способ получения биodeградируемых скаффолдов на основе тканей из натурального шелка / Агапов И.И., Агапова О.И., Ефимов А.Е., Соколов Д.Ю., Боброва М.М., **Сафонова Л.А.**; заявитель и патентообладатель: ФГБУ «ФНЦТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава РФ.- №2017108939; заявл. 17.03.2017; опубл. 08.05.2018. бюл. №13.-с. 10.

3. Пат. 2680726 РФ МПК G01Q 60/00 (2010.01), В82У 35/00 (2011.01) Способ исследования трехмерных структур посредством сканирующей оптической зондовой нанотомографии/ Агапов И.И., Агапова О.И., Ефимов А.Е., Соколов Д.Ю., Боброва М.М., **Сафонова Л.А.**; заявитель и патентообладатель: ФГБУ «НМИЦТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава РФ, ООО «СНОТРА».-№2017138865; заявл. 08.11.2017; опубл. 26.02.2019. бюл. №6.-с. 17.

4. Пат. 2683557 РФ МПК С12М 3/00 (2006.01), А61F 2/02 (2006.01) Способ получения биodeградируемых скаффолдов из фиброина шелка с улучшенными биологическими свойствами / Агапов И.И., Агапова О.И., Ефимов А.Е., Соколов Д.Ю., Боброва М.М., **Сафонова Л.А.**; заявитель и патентообладатель: ФГБУ «НМИЦТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава РФ.-№20171400585; заявл. 22.11.2017; опубл. 28.03.2019. бюл. №10.-с. 7.

5. Пат. 2684769 РФ МПК С12М 3/00 (2006.01), А61F 2/02 (2006.01) Композиция для изготовления биodeградируемых скаффолдов и способ ее получения / Агапов И.И., Агапова О.И., Ефимов А.Е., Соколов Д.Ю., Боброва М.М., **Сафонова Л.А.**; заявитель и патентообладатель: ФГБУ «НМИЦТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава РФ.- №20171400583; заявл. 22.11.2017; опубл. 12.04.2019. бюл. №11.-с. 9.