

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. ШУМАКОВА»**

На правах рукописи

Сафонова Любовь Александровна

**Разработка и исследование 2D и 3D биodeградируемых скаффолдов на основе
фибрина шелка для регенеративной медицины**

14.01.24 – трансплантология и искусственные органы

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук, профессор
Агапов Игорь Иванович

Москва - 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. Фиброин шелка как перспективный материал для тканевой инженерии и регенеративной медицины (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	12
1.1. Биосовместимые материалы	12
1.2. Структура и свойства фиброина шелка	13
1.3. Области применения изделий из фиброина шелка.....	17
1.3.1. Тканевая инженерия	17
1.3.1.1. Регенерация кожи.....	17
1.3.1.2. Костно-хрящевая инженерия.....	19
1.3.1.3. Биоинженерия печени	21
1.3.1.4. Глазная хирургия	23
1.3.1.5. Сосудистая инженерия	24
1.3.1.6. Нейроинженерия	25
1.3.1.7. Мирингопластика.....	27
1.3.1.8. Восстановление соединительной ткани	28
1.3.1.9. Восстановление межпозвоночных дисков	29
1.3.2. Другие области применения фиброина шелка.....	29
1.4. Структура и свойства коллагена и желатина	31
1.5. Структура и свойства рекомбинантных спидроинов	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	42
2.1. Материалы	42
2.2. Экспериментальные животные.....	43
2.3. Клеточные линии	44
2.4. Методы	44
2.4.1. Получение фиброина шелка	44
2.4.3. Получение водного раствора коллагена.....	45
2.4.4. Получение раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте	46
2.4.5. Изготовление пленок из фиброина шелка и коллагена	46
2.4.6. Получение раствора фиброина шелка в 1,1,1,3,3,3-гексафторпропанол-2.....	46

2.4.7. Получение растворов рекомбинантных спидроинов в 1,1,1,3,3,3-гексафторпропанол-2	47
2.4.8. Получение раствора желатина в 1,1,1,3,3,3-гексафторпропанол-2.....	47
2.4.9. Изготовление микроволокнистых скаффолдов на основе фиброина шелка	47
2.4.10. Анализ поверхностной структуры пленок и микроволокнистых скаффолдов методом сканирующей электронной микроскопии	48
2.4.11. Анализ структуры пленок и микроволокнистых скаффолдов методом сканирующей зондовой нанотомографии	49
2.4.12. Изучение структуры пленок методом атомно-силовой микроскопии ..	50
2.4.13. Изучение деградации пленок на основе фиброина шелка <i>in vitro</i>	51
2.4.14. Изучение механических свойств пленок из фиброина шелка.....	51
2.4.15. Анализ цитотоксичности пленок и микроволокнистых скаффолдов ...	52
2.4.16. Анализ пролиферативной активности клеток на пленках различного состава.....	52
2.4.17. Анализ адгезии и пролиферации клеток на микроволокнистых скаффолдах	53
2.4.18. Исследование заживления полнослойной кожной раны крысы породы Wistar	55
2.4.19. Гистологические исследования	58
2.4.20. Статистическая обработка результатов	58
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	59
3.1. Получение образцов пленок и микроволокнистых скаффолдов для исследований	59
3.2. Анализ структуры полученных пленок и микроволокнистых скаффолдов .	63
3.3 Исследование деградации пленок на основе фиброина шелка <i>in vitro</i>	76
1.4. Исследование механических свойств пленок на основе фиброина шелка.	79
1.5. Анализ цитотоксичности полученных пленок и микроволокнистых скаффолдов	82
1.6. Анализ биосовместимости полученных пленок и микроволокнистых скаффолдов	83
1.6.1.Изучение адгезии и пролиферативной активности клеток на полученных пленках и микроволокнистых скаффолдах	83

1.6.2. Исследование заживления полнослойной кожной раны крыс породы Wistar с помощью полученных пленок и микроволокнистых скаффолдов.. 89

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	95
ВЫВОДЫ.....	109
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	112

ВВЕДЕНИЕ

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 биодegradации 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 биодegradируемых 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 3T3 и клеток культуры гепатокарциномы человека Hep-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 и апробация результатов

Достоверность результатов, представленных в диссертационной работе, определяется репрезентативным объемом проведенных экспериментальных исследований (2 линии клеток – Hep-G₂ и 3T3 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.

ГЛАВА 1. Фиброин шелка как перспективный материал для тканевой инженерии и регенеративной медицины (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Биосовместимые материалы

Разработка биосовместимых материалов является одним из приоритетных направлений тканевой инженерии. Изделия, полученные из таких материалов, могут быть использованы в качестве носителей для клеток. При этом клетки определяют назначение изделия и обеспечивают физиологическую активность. В свою очередь, материал, используемый для создания таких биоискусственных конструкций, формирует субстрат для адгезии клеток, обеспечивает их пролиферативную активность и дифференцировку. Используемый материал также должен обладать биосовместимостью, что подразумевает способность материала выполнять свои функции без отрицательных реакций организма «хозяина» (Севастьянов В.И. и др., 1999). Таким образом, биосовместимый материал должен отвечать определенным требованиям (Сао Y., Wang B., 2009), а именно:

- не должен вызывать воспалительной реакции;
- не должен оказывать токсического, канцерогенного или аллергического действия на организм;
- должен иметь нетоксичные продукты распада, которые могут включаться в метаболические пути организма или выводиться из организма;
- должен сохранять функциональные свойства в течение предусмотренного срока эксплуатации.

Помимо этого, существует ряд требований, предъявляемых к материалу, которые зависят от места его имплантации. Это объясняется тем, что свойства изделия должны максимально соответствовать нативной ткани поврежденного органа. Такими свойствами являются, например, проницаемость, пористость, механическая прочность и др.

В настоящее время в тканевой инженерии применяются в основном природные материалы. Это связано с тем, что они обладают биологической

активностью, т.е. содержат в своей структуре специфические последовательности, которые позволяют активно взаимодействовать с клетками, связываясь с рецепторами на их поверхности. Но применение таких материалов связано с рядом проблем, возникающих при создании изделий, в особенности, недостаточной механической прочностью и различными сложностями при структурировании.

Альтернативным вариантом являются биodeградируемые материалы, то есть материалы, которые со временем способны разрушаться клетками организма на нетоксичные для них составляющие. Одно из условий применения таких материалов - соответствие скорости биodeградации материала скорости деления клеток замещаемого органа.

Особый интерес в качестве материала для создания биоискусственных конструкций представляет белок - фиброин шелка. Фиброин шелка удовлетворяет всем вышеперечисленным требованиям, а также имеет уникальные свойства, позволяющие использовать его во многих областях тканевой инженерии.

1.2. Структура и свойства фиброина шелка

Формирование шелковой нити происходит в специализированных железах тутового шелкопряда *B. mori*. Биосинтез белков шелка происходит в эпителиальных клетках железы, которые секретируют водный раствор белка с концентрацией 120-150%. По мере продвижения в просвете железы содержание белка увеличивается до 200-300% , а затем под действием снижения pH до 4,9 происходит скручивание фиброина в нерастворимое волокно диаметром 10-25 мкм.

Шелковая нить состоит преимущественно из двух компонентов: белка фиброина и водорастворимого клееобразного белка - серицина, который обеспечивает сшивку волокон фиброина в шелковой нити (Preda R. et al., 2013). Серицин является аллергеном и вызывает иммунный ответ, что ограничивает применение шелка, загрязненного серицином, в регенеративной медицине.

Фиброин относится к классу фибриллярных белков и характеризуется присутствием большого количества повторов в его первичной структуре. Основной повторяющийся мотив в первичной структуре этого белка – GAGAGS, на него приходится 95% аминокислотных остатков. Оставшаяся часть имеет аморфное строение и состоит преимущественно из гидрофильных аминокислотных остатков. Такое строение приводит к однородности вторичной структуры фиброина, представляющий собой антипараллельные β -слои, связанные водородными связями. Аморфные участки белка образуют α -спирали и их доля возрастает при гидратации белка. В третичной структуре фиброина выделяют 2 цепи: тяжелую цепь с молекулярной массой 390 кДа и легкую цепь – 26 кДа, присутствующие в отношении 1:1 и соединенные дисульфидными связями, а также гликопротеин P25 с молекулярной массой 30 кДа (Yong-Xing He et al., 2012).

Структура фиброина шелка обеспечивает свойства, позволяющие использовать его в качестве материала для биоискусственных конструкций (Агапов И. и др., 2010). Фиброин способен к быстрому фазовому переходу в нерастворимое состояние из водных растворов под воздействием спиртов и других факторов. Это идеальный материал для производства прочных и одновременно гибких структур. Кроме того, фиброин шелка термостабилен, изделия из него могут стерилизоваться обработкой при температуре до 150°C, а также устойчив к действию протеолитических ферментов, разрушающих белки.

Главное преимущество шелка по сравнению с другими биосовместимыми материалами заключается в его механических свойствах. Однако некоторые изделия из фиброина шелка являются ломкими, что связано с технологией их получения, в процессе которой повреждается вторичная структура фиброина.

Не менее важным свойством является биосовместимость фиброина шелка. Отсутствие иммунного ответа на изделия из фиброина шелка было показано на различных моделях *in vivo* и *in vitro*. Однако вопрос о биосовместимости фиброина остается открытым, поскольку изделия из фиброина должны находиться в контакте с тканями в течение длительного периода времени, а

значит, в зависимости от места их имплантации, размера и морфологии могут вызывать иммунный ответ разной степени. Показано, что степень иммунного ответа на изделия зависит от конформации фиброина шелка, присутствующего в изделии. Так степень иммунного ответа на пленки из фиброина шелка, в которых фиброин находился преимущественно в конформации α -спиралей, ниже, чем на трехмерные скаффолды из фиброина шелка, в которых фиброин находится в конформации β -слоев. Однако степень иммунного ответа на изделия из серицина выше (Bhattacharjee M. et al., 2013). В целом же считается, что иммунный ответ на изделия из фиброина часто связан с неполной очисткой шелка от серицина и других примесей (Banani K et al., 2013).

Еще одной важной характеристикой биосовместимого материала является его биodeградируемость. Согласно определению Государственной фармакопеи Российской Федерации биodeградируемым называется материал, который теряет механические свойства в течение 60 дней после имплантации в организм. С этой точки зрения правильнее классифицировать фиброин шелка как небиodeградируемый материал, так как исследования показывают, что время сохранения механических свойств фиброина может достигать одного года (Verari C., Kaplan D., 2007). Однако показано, что время биodeградации фиброина шелка увеличивается при увеличении доли β -слоев в его структуре (Hu Y. et al., 2012). Отсюда можно сделать вывод о том, что, контролируя долю β -слоев при создании изделия из фиброина шелка, можно регулировать скорость биodeградации полимера. Таким образом, шелк имеет явное преимущество в сравнении с другими материалами в нескольких аспектах, касающихся биodeградации. Во-первых, при разрушении некоторых синтетических материалов образуются побочные кислые продукты, которые не включаются в метаболические пути организма. В этом отношении фиброин является безопасным, так как продуктами его биodeградации являются аминокислоты, метаболизируемые клетками. Во-вторых, некоторые материалы не могут сохранять механические свойства в течение необходимого времени, напротив, медленная биodeградация фиброина шелка может быть преимуществом для его использования в тканевой инженерии

в тех случаях, когда требуется время для пролиферации и дифференцировки клеток в имплантируемом изделии (Kasoji N., Vora U., 2012).

К преимуществам фиброина как материала, применяемого в тканевой инженерии можно отнести то, что изделия из него могут быть получены в мягких условиях и их изготовление не требует обработки концентрированными растворами кислот и щелочей, которые могут быть токсичными для организма. Фиброин шелка растворим в воде в конформации α -спирали, и его раствор может сохраняться в течение нескольких дней путем поддержания температуры на уровне комнатной или нейтрального pH. Такие мягкие условия позволяют включать биосенсоры в состав систем на основе фиброина. В то же время устойчивость изделий из фиброина шелка может достигаться за счет конформационного перехода в состояние β -структуры (Banani K. et al., 2013).

Не менее важным преимуществом фиброина шелка является возможность формировать из него волокнистые структуры с различными показателями пористости. Пористость является важной характеристикой, так как позволяет клеткам мигрировать внутри изделия, а волокнистая структура создает микроокружение для клеток, близкое к нативному микроокружению, которое создает межклеточный матрикс (Lu G. et al., 2014).

Наконец, важно отметить, что в структуре фиброина присутствует большое количество свободных химических групп, которые могут быть химически модифицированы или использованы для создания конъюгатов с другими соединениями (Kim H. et al., 2014), а также композитных материалов с улучшенными свойствами (Autran P. et al., 2013).

Таким образом, фиброин обладает такими свойствами, которые позволяют формировать из него различные изделия - покрытия, пленки, трубки, трехмерные скаффолды, микро- и наночастицы, гели - и широко использовать его в качестве биосовместимого материала в различных направлениях тканевой инженерии.

1.3. Области применения изделий из фиброина шелка

1.3.1. Тканевая инженерия

1.3.1.1. Регенерация кожи

Кожа является самым большим по площади и при этом сложно устроенным органом позвоночных животных. В организме кожа выполняет важные функции: защищает внутренние ткани организма от повреждений, обеспечивает сенсорную функцию, а также регулирует постоянство внутренней среды организма. Кожа позвоночных состоит из трех слоев. Верхний слой – эпидермис. Этот слой состоит преимущественно из кератиноцитов, образующих между собой плотные контакты, и выполняет функцию барьера на границе с внешней средой. Средний слой – дерма – является соединительнотканым и образован фибробластами, которые интенсивно секретируют в межклеточное пространство матриксные компоненты и ферменты, необходимые для структурирования межклеточного матрикса, например, коллагеназы, и отвечающие за восстановление кожного покрова, например, металлопротеиназы. Межклеточный матрикс дермы содержит множество компонентов, среди которых основным является коллаген I и III типов, а также эластин, фибронектин, глюкозаминогликаны и др. Такой состав межклеточного матрикса обеспечивает механические свойства кожи, в первую очередь, ее высокую эластичность. Нижний слой представляет собой подкожную жировую клетчатку и включает в себя различные типы клеток – клетки жировой ткани, фибробласты, клетки, входящие в состав иммунной системы организма.

Процесс заживления раны требует взаимодействий между собой различных типов клеток и регулируется множеством цитокинов и факторов роста. В случае кожного покрова получение аутологичного трансплантата практически невозможно, поэтому возникает острая необходимость разработки биоинженерного эквивалента кожи.

Регенерация кожного покрова требует подбора материала, который обеспечивал бы структурное и функциональное восстановление кожи. В связи с

этим для восстановления кожного покрова часто применяют изделия на основе коллагена вследствие его высокого содержания в нативном матриксе кожи.

Помимо коллагена рассматривается возможность применения других натуральных материалов, в том числе фиброина шелка (Karahaliloglu Z. et al., 2014). Уникальные свойства фиброина шелка и возможность получать нано- и микроструктурированные изделия на его основе позволяют считать перспективным использование этих изделий как в качестве носителей для проведения клеточной терапии, так и в качестве самостоятельных изделий, не содержащих клеточного компонента, а также для создания композитов фиброина шелка с матриксными белками нативной кожи (Bhardwaj N. et al., 2014).

Работы в этой области показывают, что конструкции из фиброина шелка, полученные различными методами, могут быть использованы для регенерации кожного покрова *in vivo* (Gil S. et al., 2013). Имплантация конструкций из фиброина ускоряла процесс заживления раны, вызывала восстановление эпителия и дермы, увеличение синтеза коллагена. Рубец, образовавшийся на месте повреждения, после имплантации конструкции из фиброина был практически незаметным. Для более успешной регенерации кожного покрова могут применяться различные биологически активные вещества. Так, например, в данном исследовании на поверхности и внутри изделия были иммобилизованы эпидермальный фактор роста и сульфадиазин серебра, применяемый в медицине как противомикробное средство, не оказывающее повреждающего действия на клетки тканей.

Фиброин может быть использован и в составе композитных материалов. Пленки, изготовленные на основе композита фиброина с хитозаном поддерживают адгезию и пролиферацию фибробластов, обеспечивают межклеточные взаимодействия. В адгезированных клетках наблюдали экспрессию β -актина, а также секрецию коллагена I типа, присутствие которого в межклеточном матриксе характерно для дермы кожи (Luangbudnark W. et al., 2012). Другой композитный материал представляет собой смесь фиброина с эластином, который является фибриллярным белком кожи и отвечает за упругость

соединительных тканей. Пленки, изготовленные из такого материала, поддерживают адгезию фибробластов *in vitro*. Испытания кожного эквивалента на модели ожога показали, что изделия способствуют успешному восстановлению эпителия и заживлению повреждения (Vasconcelos A. et al., 2012).

В настоящее время большое внимание уделяется разработке многослойных эквивалентов кожи. Один из примеров такого изделия, полученного *in vitro*, – трехслойный эквивалент кожи на основе фиброина и коллагена (Bellas E., 2012). Скаффолд из фиброина шелка использовался в качестве каркаса для стволовых клеток жировой ткани и эндотелиальных клеток и моделировал гиподерму, на него наслаивался коллагеновый гель, служащий субстратом для адгезии и пролиферации фибробластов и моделирующий дерму, а на его поверхности выращивались кератиноциты эпидермиса. Другой вариант многослойной конструкции – изделие, состоящее из двух слоев коллагена и расположенного между ними слоя фиброина (Ghezzi E. et al., 2011). Такое изделие было успешно применено для культивирования мезенхимальных стволовых клеток крыс, а также имело оптимальные механические свойства для применения в качестве эквивалента кожи.

1.3.1.2. Костно-хрящевая инженерия

Кость состоит из жесткой прочной высоко васкуляризованной соединительной ткани. Основные составляющие костной ткани – это клеточные элементы, минеральные вещества, преимущественно гидроксиапатит, и органические вещества - матриксные белки, преимущественно коллаген I типа. Помимо костной ткани в состав кости входит костный мозг, нервы, сосуды и хрящевая ткань. Основная функция кости – обеспечивать опору и защиту структурных частей организма. Поэтому какие-либо изменения в структуре кости могут привести к серьезным нарушениям функционирования организма, а значит, важно подобрать материал, способный не только воссоздать структуру кости, но и имеющий при этом высокую механическую прочность.

Для этих целей в костной инженерии фиброин используется как основа для создания трехмерных скаффолдов, имеющих пористую структуру. Эффективность восстановления костной ткани определяется размером пор и структурой изделий (Correia C. et al., 2012). Такая структура обеспечивает клеткам возможность мигрировать в более глубокие слои скаффолда, где происходит пролиферация и дифференцировка клеток. В качестве клеточного компонента, как правило, используют мезенхимальные стволовые клетки или остеобласты.

На основе фиброина создаются композитные материалы с улучшенными свойствами. Так, например, включение гидроксиапатита в скаффолды из фиброина шелка не препятствует формированию β -структуры фиброина, что означает сохранение достаточной механической прочности, но значительно улучшает пролиферативную активность клеток (Le-Ping Y. et al., 2012). Минерализация скаффолда из фиброина шелка гидроксиапатитом увеличивает индекс регенерации костной ткани. Формирование костной ткани начиналось уже через неделю после имплантации изделия крысам. Через четыре недели после имплантации на месте минерализованного скаффолда формировалась костная ткань, в отличие от неминерализованных изделий, которые способствовали регенерации кости только на периферии (Агапов И. и др. 2011).

Показано, что включение фиброина в состав скаффолдов на основе хитозана способствовало адгезии клеток, их пролиферации и остеогенной дифференцировке (Autran P. et al., 2013). Введение в состав трехмерных скаффолдов на основе фиброина шелка гидроксиапатита и желатина в качестве композитной добавки значительно увеличивает адгезионные свойства изделия за счет изменения структуры его поверхности, а также ускоряет пролиферацию фибробластов внутри изделия (Мойсенович М. и др., 2014).

Скаффолды на основе фиброина, армированные натуральными волокнами шелка, могут быть рассмотрены в качестве варианта конструкций с улучшенными механическими свойствами (Mobini S. et al., 2012). При этом значительно возрастает механическая прочность изделия без влияния на адгезию и пролиферацию клеток. Это позволяет решить проблему снижения

биосовместимости изделия, так как ранее было показано, что увеличение концентрации фиброина шелка приводит к снижению клеточной адгезии вследствие уменьшения количества пор в структуре скаффолда (Viman V. M., Subhas C. K., 2009).

Скаффолды на основе фиброина могут быть использованы также и для восстановления хрящевой ткани. Они имеют подходящие механические свойства, способны поддерживать адгезию клеток разных типов, а благодаря своей пористой структуре и набухаемости способны поддерживать обводненность хряща.

Улучшенные свойства имеют скаффолды с добавлением коллагена и продукта его денатурации – желатина. Добавление этих белков позволяет не только регулировать механические свойства изделия, но увеличить адгезию хондроцитов за счет присутствия в структуре коллагена и желатина RGD-последовательности, которая является лигандом для рецепторов на поверхности хондроцитов и запускает их адгезию и пролиферацию (Chomchalao P. et al., 2013).

Скаффолды из фиброина и хитозана были использованы для восстановления хряща в коленном суставе кроликов. В качестве клеточного материала применялись мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (Deng J. et al., 2013). Восстановление костной ткани происходило более эффективно в случае имплантации скаффолда с клеточным материалом: скаффолд был замещен нативной хрящевой тканью за 12 недель.

1.3.1.3. Биоинженерия печени

Печень выполняет в организме человека множество функций, поэтому какие-либо нарушения в работе печени приводят к возникновению различного рода заболеваний. При серьезных повреждениях печени и прогрессирующих нарушениях необходима трансплантация печени. Но количество донорских органов ограничено, а ожидание донорской печени не всегда приемлемо, поэтому необходима разработка биоинженерной печени.

В настоящее время рассматривается множество материалов, которые могут служить в качестве каркаса для культивирования гепатоцитов. Известны материалы, покрытия из которых поддерживают адгезию гепатоцитов, но формирование конструкций из них сопряжено с трудностями. К таким материалам, например, относятся хитозан, желатин, коллаген и др. Фиброин шелка привлекает внимание исследователей, так как сам по себе поддерживает адгезию и пролиферацию гепатоцитов, а также имеет подходящие механические свойства (Kasojū N. et al., 2012).

Фиброин также может применяться в составе композитных материалов. К примеру, трехмерные пористые скаффолды, изготовленные из фиброина и хитозана, смешанных в различных соотношениях, поддерживают адгезию и пролиферацию клеток печеночной карциномы человека *in vitro*, причем адгезивная способность клеток на скаффолдах гораздо выше, чем на контрольном субстрате (She Z., 2008). Скаффолды аналогичного состава, изготовленные с применением технологии электроспиннинга также были использованы для культивирования гепатоцитов мыши (Kasojū N. et al., 2012). Преимущество волокнистых скаффолдов, изготовленных с применением этой технологии в том, что они более точно имитируют структуру межклеточного матрикса здоровой печени за счет высокого показателя пористости и высокого отношения поверхности к объему.

Для культивирования гепатоцитов человека возможно применение композитных скаффолдов из фиброина с различным содержанием желатина (Yang Z. et al., 2012). Полученные скаффолды поддерживали адгезию и пролиферацию клеток и не обладали цитотоксичностью. Помимо этого, скаффолды были имплантированы под кожу крысам. Уровень иммунного ответа на имплантированные конструкции был минимален и уменьшался с ростом содержания желатина в составе скаффолдов, а на 30 день произошла практически полная биодеградация скаффолдов. Это позволяет рассматривать фиброин в качестве каркасного компонента для биоинженерной печени.

1.3.1.4. Глазная хирургия

Свойства фиброина шелка позволяют использовать его в регенеративной медицине при повреждениях оболочек глаза. Различные технологии позволяют варьировать свойства изделий при их получении в зависимости от предполагаемого места имплантации. Сочетание достаточной степени прозрачности с механической прочностью обеспечивает возможность применять подложки из фиброина в качестве субстрата для адгезии, пролиферации и дифференцировки кератиноцитов образующих роговую оболочку глаза. Более того, такие подложки не уступают по свойствам амниотическим мембранам, широко применяемым для культивирования и имплантации кератиноцитов (Liu J. et al., 2012).

Двухслойные конструкции из фиброина шелка могут применяться для восстановления структуры лимба роговицы, располагающегося на границе роговицы и склеры и являющегося местом образования кератиноцитов (Bray L. et al., 2012).

Применение композитных материалов на основе фиброина для восстановления оболочек глаза не менее эффективно. Пористые биосовместимые скаффолды, полученные при смешивании фиброина шелка с хитозаном в различных соотношениях, поддерживают адгезию и пролиферацию кератиноцитов, содержание фиброина шелка позволяет регулировать физические свойства получаемой конструкции, а также время её биodeградации, а добавление хитозана создает микроокружение, близкое к нативному микроокружению кератиноцитов роговицы (Guan L. et al., 2013).

Успешно также применение изделий из фиброина шелка для культивирования клеток пигментного эпителия сетчатки (Shadforth A. et al., 2012). Это исследование является основой для возможного применения фиброина в регенеративной медицине при лечении возрастной макулодистрофии.

1.3.1.5. Сосудистая инженерия

Сердечно-сосудистые заболевания относятся к ряду самых распространенных заболеваний. Среди многочисленных методов их лечения не так много инструментальных, а наиболее часто применяемыми являются шунтирование и стентирование. Оба метода являются эффективными, но сопряжены с рядом проблем как технологических, так и иммунологических. Поэтому одной из задач тканевой инженерии является разработка новых биосовместимых инженерных конструкций для имплантации и замены сосудов или их последующего восстановления.

Материалы, традиционно применяемые в тканевой инженерии сосудов, например, политетрафторэтилен, дакрон, полиуретан и другие имеют некоторые недостатки, а именно, могут вызывать образование тромбов, стеноз сосуда, гиперплазию. Помимо этого, перечисленные материалы подходят для замещения сосудов, диаметр которых превышает 6 мм, но часто возникает необходимость трансплантатов для замещения сосудов меньшего диаметра (Li S. et al., 2014). Поэтому проблема поиска материала для изготовления искусственных сосудов остается актуальной.

Фиброин обладает подходящими физическими свойствами для формирования из него полых конструкций заданного диаметра, а также поддерживает адгезию и пролиферацию эндотелиальных и гладкомышечных клеток. Одним из примеров успешного применения фиброина является имплантация искусственного сосуда в брюшную аорту крысы (Nakazawa Y. et al., 2013). При этом толщина имплантированного сосуда не изменялась в течение эксперимента, иммунного ответа на изделие зарегистрировано не было. Через 9 недель эндотелиальные клетки почти полностью покрыли сосуд изнутри, началось формирование гладкомышечного слоя, а количество коллагена, покрывающего сосуд, значительно увеличилось.

Одним из возможных способов улучшить свойства изделия для восстановления поврежденных сосудов является создание двухслойных

конструкций из фиброина шелка (Liu S. et al., 2013). В данном случае наружный слой толщиной 700 мкм представлял собой пористую трубку из фиброина шелка, которая служила субстратом для адгезии и пролиферации клеток, а внутренний слой толщиной 5 мкм состоял из волокна шелка, очищенного от серицина, что увеличивало механическую прочность изделия. Во внутренний слой имплантата также был добавлен гепарин для обеспечения гемосовместимости.

Перспективным методом для создания искусственных сосудов является метод электроспиннинга. Этот метод позволяет получать пористые конструкции, состоящие из волокон заданного диаметра в диапазоне от 50 нм до 1 мкм. Такая структура изделий позволяет существенно повысить пролиферативную активность клеток и ускорить их миграцию. Изделия, полученные этим методом, имеют механические характеристики, сходные с механическими характеристиками нативных сосудов, а также поддерживают пролиферацию эндотелиальных и гладкомышечных клеток (Soffer L. et al., 2014).

Повышение гемосовместимости изделий из фиброина шелка может быть достигнуто путем включения в их состав гепарина, который используется в качестве антикоагулянта. Его включение в состав изделия не только повышает гемосовместимость, но и приводит к формированию микропористой структуры, что способствует деградации изделия, а также вызывает высвобождение фактора роста эндотелия сосудов, который способствует восстановлению сосудистой сети (Zhu M. et al., 2014).

1.3.1.6. Нейроинженерия

Повреждения нервов являются сопутствующими осложнениями при травмах и ранах различного характера. В настоящее время для замещения поврежденного участка нерва применяются аутологичные трансплантаты. Но область применения этих трансплантатов ограничивается размерами дефекта при повреждении. Проблемы также могут быть связаны с образованием невриномы, сдавливающей окружающие ткани, повышением чувствительности в

поврежденной области и т.п. Одним из альтернативных методов восстановления нервов является разработка синтетических материалов, направляющих рост аксонов периферийных нейронов.

Исследования показывают, что фиброин может быть использован в качестве материала для создания имплантатов, используемых при восстановлении сравнительно небольших по протяженности повреждений нервов (Ghaznavi A. et al., 2011).

Микроволокна в составе скаффолдов, полученных методом электроспиннинга раствора фиброина шелка, поддерживают рост аксонов нейронов и направляют его в соответствии с расположением волокон фиброина (Qu J. et al., 2013). Было показано, что эффективность прорастания аксонов нейронов зависит от диаметра волокна и растет по мере его уменьшения - наиболее эффективный рост наблюдался при диаметре волокна 400 нм. Также было показано, что такие волокна поддерживают адгезию астроцитов – клеток нейроглии - и направляют их миграцию, причем эффективность миграции астроцитов также зависит от диаметра волокна и растет с его уменьшением.

Методом электроспиннинга из фиброина шелка были получены скаффолды с постоянной ориентацией волокон фиброина вдоль одной оси (Zhang Q. et al., 2012). Скаффолды поддерживали адгезию и рост первичных нейронов вдоль волокон фиброина, наблюдалась экспрессия маркерных белков: MAP2 – специфического белка цитоскелета дендритов нейронов, β -III-тубулина – белка +-конца микротрубочек нейронов и NF-200 – белка промежуточных филаментов нейронов. Процессу роста первичных нейронов способствовало присутствие шероховатостей на поверхности волокон в составе скаффолдов.

Цилиндрические конструкции из фиброина шелка поддерживали прорастание шванновских клеток, питающих нейроны, через 10 недель после имплантации происходила регенерация нервного волокна внутри имплантата (Park S. et al., 2012).

Для более эффективной регенерации нервного волокна в состав изделий из фиброина шелка могут быть введены факторы роста и хондроитиназа ABC –

фермент класса гликозидаз, расщепляющий глюкозаминогликаны, имеющие в составе хондроитинсульфат. Такие глюкозаминогликаны являются ингибиторами роста аксонов нейронов в процессе регенерации нервной ткани (Sivak W. et al., 2014).

Еще одним подходом к регенерации нервного волокна является создание композитов на основе фиброина шелка. Примером является включение в состав изделия хитозана, а также нативного межклеточного матрикса нервной ткани, полученным путем культивирования шванновских клеток и последующей децеллюляризации (Gu Y. et al., 2014). Такой подход позволил увеличить время деградации изделия и улучшить его прочность. Применение полученных изделий для регенерации нервного волокна крыс было успешным: структурное и функциональное восстановление 1 см нервного волокна произошло за 12 недель.

1.3.1.7. Мирингопластика

Для восстановления различных повреждений барабанной перепонки применяются как аутологичные материалы, полученные из различных тканей больного: хрящ, надхрящница, жировая ткань и др. – так и синтетические: бумага, бесклеточная дерма человека и др., но они не отвечают всем требованиям, предъявляемым к материалам, применяемым в области восстановления барабанной перепонки (Levin B. et al., 2012). Поэтому, в настоящее время ведется поиск других синтетических материалов, которые могут применяться в этой области. Одним из перспективных материалов является фиброин шелка, так как отвечает основным требованиям к материалам, применяемым для мирингопластики.

Показано, что покрытие из фиброина поддерживает адгезию культуры кератиноцитов, выделенных из человеческой барабанной перепонки (Ghassemifar R. et al., 2010). В кератиноцитах наблюдалась экспрессия E-кадгерина, отвечающего за пролиферацию эпителиальных клеток и формирование межклеточных контактов, а также белков, образующих плотные контакты.

Пленки из фиброина шелка были успешно применены в качестве материала для мирингопластики на различных моделях повреждения барабанной перепонки. На модели повреждения барабанной перепонки крысы (Shen Y. et al., 2013) регенерация барабанной перепонки произошла за 9 дней при применении пленки из фиброина шелка – быстрее, чем при использовании материалов, традиционно применяемых в этой области. Толщина восстановленной барабанной перепонки на 28 день после имплантации была сопоставима с толщиной неповрежденной барабанной перепонки, а восстановление слуха происходило значительно быстрее, чем при применении альтернативных материалов. Похожие результаты наблюдались при испытании пленки на морских свинках, строение барабанной перепонки которых аналогично строению барабанной перепонки человека (Shen Y. et al., 2013). Следует отметить, что пленка из фиброина по механическим свойствам очень близка к нативной барабанной перепонке, обладает прозрачностью и простотой в применении, что является значительным преимуществом по сравнению с другими материалами.

1.3.1.8. Восстановление соединительной ткани

Изделия, получаемые из фиброина шелка, могут быть использованы в качестве имплантатов при лечении травм связок, в частности передней крестообразной связки колена. Показано, что конструкции из фиброина имеют достаточную механическую прочность для замещения поврежденных связок. Фибробласты периодонтальной связки человека, культивируемые на таких конструкциях *in vivo*, секретировали агрекан и фибронектин, а экспрессия интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли не изменялась в течение культивирования, что свидетельствовало об отсутствии иммунного ответа (Fare S. et al., 2013).

Перспективной является возможность использования композита фиброина с коллагеном, который является основным компонентом межклеточного матрикса сухожилий и связок, однако не обладает достаточной механической прочностью.

Добавление фиброина в состав изделия позволяет значительно улучшить механические свойства изделия без потери биосовместимости. Таким образом, варьируя содержание фиброина в изделии, можно получить композит с требуемыми механическими свойствами (Panas-Perez E. et al., 2013).

1.3.1.9. Восстановление межпозвоночных дисков

Нарушение функциональности межпозвоночных дисков может быть связано с рядом причин, таких как механическое повреждение, недостаток питательных веществ, накопление продуктов клеточного метаболизма и др. Основные методы лечения направлены на облегчение симптомов, например, физиотерапия или подразумевают хирургическое вмешательство, например, спондилодез или полная замена диска. В настоящее время ведется поиск материалов для создания тканеинженерных конструкций для регенеративной медицины, которые позволят восстановить структуру межпозвоночного диска. В частности, из фиброина шелка получены скаффолды пластинчатого строения, которые могут быть использованы для восстановления фиброзного кольца межпозвоночного диска. Такие скаффолды очень близки по механическим свойствам к нативной ткани фиброзного кольца, а также поддерживают адгезию и пролиферацию культуры клеток, выделенных из фиброзного кольца (Park S.-H. et al., 2012).

1.3.2. Другие области применения фиброина шелка

Одним из перспективных направлений является создание из фиброина шелка сферических наночастиц для направленной доставки лекарственных препаратов, ферментов и т.п. Химическая инертность фиброина позволяет защитить переносимое вещество от действия ферментов. Варьируя степень кристаллизации фиброина, можно изменять скорость высвобождения

инкапсулированного препарата. Существует перспектива использования таких частиц в противоопухолевой терапии (Subia B., Kundu S.C., 2013). Показано, что клетки принимают наночастицы с метотрексатом, применение которого затруднено в терапии из-за его ограниченной растворимости. Использование наночастиц повышает биодоступность метотрексата, а также регулирует скорость его высвобождения и создает оптимальную концентрацию для получения терапевтического эффекта, снижая цитотоксичность.

Еще одним успешным примером использования микросфер на основе фиброина шелка является создание системы направленной доставки инсулиноподобного фактора роста 1, который является биологически активным пептидом, оказывающим анаболическое действие. Использование таких микроносителей является перспективной альтернативой для решения различных мышечных дистрофий, а также саркопении (Schultz I. et al., 2015).

Разрабатываются системы для доставки препаратов с использованием фиброинового гидрогеля. Пример такой системы – гидрогель с иммобилизованным костным морфогенетическим белком (Diab T. et al., 2012). Эта система может применяться для лечения масштабных повреждений кости. Конструкции из фиброина шелка различного строения могут применяться в качестве носителей антибиотиков и использоваться при инфекционных заболеваниях (Pritchard E., 2012).

В рамках решения проблемы направленной доставки лекарственных средств ведется разработка микроигл на основе фиброина шелка. Носители на основе фиброина шелка не оказывают влияния на активность препарата, обладают приемлемыми механическими свойствами и высокой биосовместимостью, а также способны к биодegradации, что позволяет преодолеть проблемы, возникающие при доставке лекарственных средств с помощью микроигл. На основе фиброина в мягких условиях были получены патчи с микроиглами, которые улучшали кинетику высвобождения лекарственных препаратов благодаря их инкапсуляции в микрочастицы, полученные из фиброина шелка или покрытия микроигл раствором лекарственного средства (Raja W. et al., 2013)

1.4. Структура и свойства коллагена и желатина

Коллаген - самый распространенный фибриллярный белок межклеточного матрикса. Как правило, молекула коллагена представляет собой длинную упругую фибриллу и имеет структуру левозакрученной тройной спирали, которая состоит из трех скрученных полипептидных цепей. Молекула коллагена обогащена пролином и глицином, практически не имеет в составе серосодержащих аминокислот и не содержит триптофана. Коллаген относится немногим белкам животного происхождения, которые содержат остатки нестандартных аминокислот: около 21 % от общего числа остатков приходится на 3-гидроксипролин, 4-гидроксипролин и 5-гидроксилизин.

Молекула коллагена имеет характерный повторяющийся мотив, состоящий из трех аминокислот: Gly-Xxx-Yyy, где X - пролин или лизин, а Y — любая другая аминокислота (Luo J., Tong Y., 2011). Пролин стабилизирует спиральную конформацию каждой из трех цепей, в то время как глицин связывает между собой 3 полипептидных цепи и позволяет им сформировать тройную спираль – тропоколлаген (Северин Е.С., 2003). Длина такой спирали составляет около 300 нм, а диаметр – не более 2 нм (Shoulders M., Rains R., 2009).

Такая структура коллагена обеспечивает высокую термостабильность молекулы, механическую прочность и возможность взаимодействовать с другими молекулами межклеточного матрикса ткани (Luo J., Tong Y., 2011).

Большинство типов коллагена синтезируются фибробластами. Молекула-предшественник α -цепи коллагена синтезируется на мембранах шероховатого эндоплазматического ретикулума и транспортируется в комплекс Гольджи. В процессе транспорта некоторые остатки пролина и лизина в составе полипептидной цепи ферментативно гидроксилируются и гликозилируются. Происходит образование проколлагена и его секреция в межклеточное пространство. Самосборка фибрилл тропоколлагена диаметром 10-300 нм

происходит вне клетки, а затем фибриллы тропоколлагена сшиваются определенным образом под действием множества ферментов, формируя коллагеновые фибриллы диаметром 0,5-3 мкм. Формирование фибрилл характерно преимущественно для коллагена I типа во всех типах тканей за исключением хрящевой ткани, где за формирование фибриллярной структуры отвечает коллаген II типа (Parenteau-Bareil R. et. al., 2010).

Коллаген - полиморфный белок. В настоящее время описано 28 типов коллагена позвоночных (Shoulders M., Rains R., 2009). Они отличаются друг от друга по аминокислотной последовательности, степени модификации — интенсивности гидроксирования или гликозилирования, а также функциям и локализации в организме (таблица 1). В соединительных тканях встречается 5 основных типов коллагена: I, II, III, V, XI. Они имеют фибриллярную структуру, типичную для молекулы коллагена. Выделенные клетками молекулы в межклеточном пространстве образуют упорядоченные коллагеновые фибриллы, а затем формируют фибриллы до нескольких микрометров в диаметре. Коллагены типов IX и XII участвуют в образовании хряща, связываясь между собой и образуя матрикс хрящевой ткани. Коллагены типов IV и VII формируют сеть фибрилл и являются важными компонентами базальных мембран.

Таблица 1. Основные типы коллагена и их локализация в организме.

I	Кожа, сухожилия, кость, аорта, легкие и т.д. (около 90% всего коллагена)
II	Гиалиновый хрящ, межпозвоночные диски, хорда, стекловидное тело глаза
III	Кожа, кровеносные сосуды
IV	В базальных мембранах
V	Аналогичен типу I
VI	В соединительной ткани
VII	В эпителиальных тканях
VIII	В некоторых клетках эндотелия
IX	В хрящевой ткани наряду с типом II
X	Составная часть гипертрофических и минерализованных хрящей
XI	В хрящевой ткани
XII	Совместно с типами I и III в сухожилиях и связках

Коллаген играет ключевую роль в поддержании структурной и функциональной целостности межклеточного матрикса, а также является важной функциональной биомолекулой. Молекула коллагена содержит последовательности аминокислот, которые обеспечивают специфическое связывание с рецепторами-интегринами на поверхности клеток.

Рецепторы семейства интегринов отвечают за взаимодействие клеток с межклеточным матриксом. Молекула рецептора состоит из двух нековалентно

соединенных субъединиц – α и β . Среди высших позвоночных животных обнаружено 18 типов α -субъединиц и 8 типов β -субъединиц, которые образуют 24 различных вида интегринов. Каждая из субъединиц имеет сравнительно большой внеклеточный домен, одну трансмембранную спираль и небольшую цитоплазматическую часть, которая связывается с цитоскелетом клетки. За связывание с коллагеном отвечают 4 группы интегринов: $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ и $\alpha 11\beta 1$. Рецепторы разных групп присутствуют на мембранах клеток различных тканей: $\alpha 1\beta 1$ – в соединительной ткани, $\alpha 2\beta 1$ – в эпителии, $\alpha 10\beta 1$ – в хрящевой ткани и $\alpha 11\beta 1$ – на мембранах фибробластов. Таким образом, разные виды рецепторов связываются с коллагеном разных типов (Leitinger B., 2011).

Такое взаимодействие приводит к активации внутриклеточных цитоплазматических сигнальных каскадов. Адгезия клеток, обусловленная взаимодействием с интегринами, играет ключевую роль во многих биологических процессах, таких как эмбриогенез, поддержание гомеостаза и формирование и регенерация тканей (Luo J., Tong Y., 2011).

Свойства коллагена обеспечили его применение в качестве биосовместимого материала в регенеративной медицине. Коллаген является биodeградируемым материалом – при имплантации в организм волокна коллагена в составе изделия расщепляются на нетоксичные для организма пептиды. Более того, некоторые из этих пептидов являются хемокинами для фибробластов. Видо- и тканеспецифичный коллаген может быть получен из различных источников: путем экстракции из кожи свиней, сухожилий хвоста крыс и т.п., с помощью технологии децеллюляризации органов и тканей, а также может быть синтезирован методами белковой инженерии (Parenteau-Bareil R. et. al., 2010).

Конструкции из коллагена применяются в некоторых областях тканевой инженерии: в костно-хрящевой хирургии, в сосудистой инженерии, в нейроинженерии и др. Особенно широко изделия из коллагена применяются в области регенерации кожного покрова для лечения ожогов и язв. В настоящий момент существует несколько коммерческих изделий на основе коллагена,

которые успешно используются в медицине для регенерации кожи (Parenteau-Bareil R. et. al., 2010).

Однако использование коллагена в качестве самостоятельного материала для создания биоискусственных конструкций затруднено вследствие сложностей при растворении этого полимера и его структурировании. К примеру, методика получения трехмерных минерализованных конструкций на основе коллагена для костной инженерии была разработана в последние несколько лет (Xia Z. et. al., 2013).

Перспективным биосовместимым материалом является также продукт гидролиза коллагена – желатин, который, как и коллаген, поддерживает адгезию и пролиферацию клеток. Денатурация коллагена обычно происходит при температуре около 60°C, однако зависит от кислотно-щелочного равновесия, ионной силы раствора и других факторов. Процесс денатурации обычно является необратимым. При денатурации коллагена с его последующим гидролизом образуются фрагменты с различным аминокислотным составом, что позволяет получать желатин с разными аминокислотными последовательностями, следовательно, и разными химическими свойствами (Zhang et al., 2011). В настоящий момент желатин получают путем кислого гидролиза (желатин типа А) и щелочного гидролиза (желатин типа В). При щелочном гидролизе остатки аспарагина и глутамин трансформируются в остатки аспарагиновой и глутаминовой кислоты, что изменяет заряд белка и ход взаимодействия рецепторов клеток с поверхностью изделий на основе желатина типа В.

Как и коллаген, желатин обладает биосовместимостью и содержит в структуре RGD-последовательность, но в отличие от коллагена имеет значительно более высокую растворимость и скорость деградации, а также характеризуется более широким спектром свободных химических групп, доступных для модификации и ковалентной перешивки. Такие свойства обусловили широкое применение желатина в тканевой инженерии и регенеративной медицине (Su K., Wang C., 2015).

Низкая механическая прочность и значительная растворимость не позволяют широко применять изделия из желатина, однако, желатин используется в качестве композитной добавки к различным изделиям для улучшения их биосовместимости, а также для покрытия изделий с низкими показателями биосовместимости.

Так, например, в одном из исследований был разработан пористый гидрогель с развитой соединенной системой пор на основе фиброина шелка и желатина (Park S. et al., 2019). В данном исследовании авторы объясняют выбор желатина в качестве композитной добавки его высокой биологической активностью, что подтверждается результатами исследований. Пролиферативная активность клеток на гидрогелевом покрытии из желатина была значительно выше, чем на аналогичном покрытии из фиброина шелка. Смешивание двух гидрогелей с последующей ферментативной ковалентной перешивкой позволило значительно повысить биосовместимость полученной на основе геля двухслойной конструкции – пролиферативная активность клеток в составе такой конструкции была сопоставима с пролиферативной активностью клеток на гидрогелевом покрытии из желатина. Важно отметить, что высокая пролиферативная активность клеток обусловлена в данном случае не только присутствием желатина, но и пористой структурой конструкции, которая позволяет клеткам мигрировать внутри конструкции. Такая конструкция была получена с помощью обработки трансглутаминазой, которая осуществляет ковалентную сшивку остатков глутамин и лизина в структуре желатина, что обеспечивает возможность создания сложного пористого изделия.

Введение желатина в состав скаффолда на основе поликапролактона и коллагена, полученного методом замораживания-оттаивания, позволило понизить концентрацию коллагена, чтобы сделать скаффолд более пористым без потери биосовместимости. Полученные в данном исследовании изделия были эффективно применены как *in vitro* для культивирования кератиноцитов и фибробластов, так и в модели заживления кожной раны мыши *in vivo* (Wei L.G. et al., 2019).

Высокая растворимость желатина в летучих растворителях, таких как муравьиная кислота, 1,1,1,3,3,3-гексафторпропанол-2 и др., позволяет применять его для получения изделий с помощью перспективного метода электроспиннинга, который позволяет формировать изделия с заданной волокнистой структурой, ориентацией волокон и высоким отношением площади поверхности к объему (Aldana A.A., Abraham G.A., 2016). Полученные изделия были исследованы в системах *in vitro* и *in vivo*, и показано их возможное применение в различных областях тканевой инженерии для регенерации кости (Meng et al., 2010), хряща (Torricelli et al., 2014), кожи (Gomes et al., 2015), нервной ткани (Binan et al., 2014) и др.

Высокие показатели скорости биодegradации и возможность ковалентной перешивки желатина позволяют применять его как основной компонент систем для адресной доставки низкомолекулярных соединений. При этом желатин может использоваться как в составе конструкций, загруженных необходимыми низкомолекулярными лекарственными средствами или факторами роста, так и в качестве самостоятельного материала для получения микрокапсул и микросфер для контролируемого высвобождения низкомолекулярных соединений. Изменение концентрации желатина в составе изделий, а также степени ковалентной перешивки, позволяют регулировать скорость degradation желатина и кинетику высвобождения низкомолекулярных соединений (Echave M.C. et al., 2019).

Были разработаны микрокапсулы из желатина, в которые был загружен нейротензин, являющийся модулятором воспалительного процесса при заживлении ран (Liu J. et al., 2019). В данном исследовании такие капсулы использовали для терапии диабетических язв у крыс в составе пленки из фиброина шелка. Полученные изделия позволили увеличить пролиферативную активность фибробластов в месте повреждения, стимулировали синтез коллагена и его сборку для образования межклеточного матрикса, сходного по структуре с нативным, что способствовало образованию здоровой ткани.

В одном из исследований наносферы из желатина, заполненные ванкомицином, который обладает антибактериальным эффектом, были введены в состав микроволокнистых скаффолдов на основе фиброина шелка, полученных методом электроспиннинга (Song J. et al., 2017). Была исследована антимикробная активность данных изделий против золотистого стафилококка, было показано, что полученные изделия имеют пролонгированный антибактериальный эффект. Полученные скаффолды обладали биосовместимостью – изделия не оказывали цитотоксического эффекта при культивировании фибробластов крайней плоти человека и запускали их адгезию и пролиферацию.

1.5. Структура и свойства рекомбинантных спидроинов

Спидроинами называют каркасные белки, синтезируемые паутиными железами пауков. Наиболее полно изучены процесс образования и структура белков каркасного шелка пауков-кругопрядов (*Nephila clavipes*). Каркасная нить состоит из двух белков – спидроина 1 и спидроина 2, образующих комплекс (Tokareva O. et al., 2014). Оба этих белка характеризуются наличием повторов в первичной структуре. Эти повторы представляют собой полиаланиновые участки, которые являются гидрофобными, и фрагменты, богатые глицином, которые обеспечивают гидрофильность спидроинов, при этом полиаланиновые и глицин-богатые участки чередуются между собой. В структуре спидроина 2 15% аминокислот приходится на пролин, остатки которого не содержатся в структуре спидроина 1 (Hayashi S.Y. et al., 1999). Такое отличие в первичной структуре оказывает значительное влияние на дальнейшее формирование структур более высоких уровней и обуславливает различные свойства данных белков.

Так же, как и фиброин шелка, спидроины способны осуществлять фазовый переход при дегидратации. Такое свойство позволяет обеспечить стабильность конформации белка в составе конструкций на его основе.

Внимание исследователей к каркасным белкам паутины в первую очередь обусловлено уникальными механическими характеристиками этих белков.

Показатель прочности спидроинов на разрыв сопоставим с прочностью на разрыв кевлара, при этом показатель эластичности спидроина примерно в 7 раз выше (Hinman M.B. et al., 2000, Blackledge T.A., 2012). Такие механические характеристики позволяют рассматривать спидроины как перспективные материалы для применения в технике. Однако применение спидроинов ограничивается невозможностью получать данные белки в промышленных масштабах.

Развитие генной инженерии позволило создать рекомбинантные аналоги спидроинов, которые обладают не только уникальными механическими характеристиками, но и биосовместимостью, что позволяет рассматривать спидроины как перспективные материалы для разработки тканеинженерных конструкций (Абдеева И.А. и др., 2007, Bogush V.G. et al., 2009, Bogush et al., 2011). Методами генной инженерии были созданы также улучшенные аналоги спидроинов, аминокислотная последовательность которых была изменена в соответствии с требуемой задачей.

Показана возможность применения изделий на основе рекомбинантных спидроинов для различных задач регенеративной медицины, таких как восстановление кожного покрова, костная инженерия, нейроинженерия и т.п.

В одном из исследований спидроин, модифицированный доменом, содержащим RGD-последовательность, был использован для создания микроволокнистого скаффолда на основе поливинилового спирта методом электроспиннинга. Было показано, что применение данных скаффолдов ускорило регенерацию кожного покрова по сравнению с контролем, при этом полное восстановление кожного покрова произошло на 28 сутки эксперимента. Авторы связывают данный эффект не только с присутствием RGD-последовательностей в структуре изделия, но и с возможностью высвобождения спидроина из скаффолда для обеспечения адгезии, пролиферации и миграции клеток (Zhao L. et al., 2017).

Рекомбинантные спидроины 1 и 2 были применены в качестве композитных добавок для изготовления микроволокнистых скаффолдов на основе поликапролактона (Baklaushev V.P. et al., 2019). Скаффолды пропитывали

плазмой крови с повышенным содержанием тромбоцитов, а затем культивировали нейральные клетки человека. Было показано, что такие двухкомпонентные системы не только создают нативное микроокружение для клеток, но и благоприятно влияют на адгезию, пролиферацию и дифференцировку клеток, стимулируют и направляют рост аксонов. Данное исследование открывает перспективы применения таких изделий для регенерации повреждений головного и спинного мозга.

Также была показана возможность успешного применения скаффолдов на основе рекомбинантного спидроина 1, полученных методом выщелачивания, для восстановления повреждения кости в модели *in vivo* (Moisenovich M.M. et al., 2012). Было показано, что скаффолды создают благоприятное микроокружение за счет уникальной внутренней пористой структуры, а также наличия микропор в структуре стенок макропор. Все это позволяет клеткам мигрировать внутри конструкции и стимулировать восстановление повреждения за счет более быстрой биодеградации скаффолда на основе спидроина.

В одном из исследований микроносители на основе спидроина 1 были использованы для восстановления полнослойной раны кожи у мышей (Moisenovich M.M. et al., 2015). Введение таких микроносителей в область повреждения способствовало привлечению клеток кожи из неповрежденных участков, что стимулировало процесс заживления раны. Авторы данного исследования отмечают широкие перспективы применения данных микроносителей, так как они обладают высоким регенеративным потенциалом и не требуют предварительной обработки для улучшения биосовместимости, а также предварительного культивирования клеток.

Биосовместимость конструкций на основе рекомбинантных спидроинов была показана при культивировании кардиомиоцитов крыс на микроволокнистых скаффолдах, полученных из смеси спидроина 1 и спидроина 2, модифицированного последовательностью RGD (Teplenin A. et al., 2015). В ходе исследования на таких конструкциях формировался монослой клеток. При этом уровень пролиферативной активности клеток в составе конструкций на основе

рекомбинантных спидроинов был сопоставим с уровнем пролиферативной активности клеток на микроволокнистых скаффолдах на основе поликапролактона и фиброина шелка, покрытых фибронектином. Морфология кардиомиоцитов на данных скаффолдах также существенно не отличалась, что свидетельствует о возможности использования подложек из рекомбинантных спидроинов не только для регенерации сердца, но и для проведения исследований в области клеточной биологии.

Наличие большого количества экспериментальных исследований по применению фиброина шелка и других биосовместимых материалов подтверждает актуальность диссертационных исследований, а также целесообразность сформулированной цели и задач.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

Для получения пленок и микроволокнистых скаффолдов использовали следующие реактивы:

Сода пищевая ГОСТ 2156-76; хлорид кальция (Sigma Aldrich, США); муравьиная кислота (Sigma Aldrich, США); дистиллированная вода ГОСТ 6709; бидистиллированная вода ГОСТ Р 52501-2005; этанол ГОСТ 18300-32.

Для исследований структуры и скорости деградации полученных конструкций использовали следующие реактивы:

Глутаровый альдегид (Sigma Aldrich, США); ацетон (Химмед, Россия); сульфат железа II (Panreac, Испания); пероксид водорода ГОСТ 177-88; хлорид натрия (Helicon, Россия); гидрофосфат натрия двузамещенный (Sigma Aldrich, США); дигидрофосфат калия (Panreac, Испания); хлорид калия (Sigma Aldrich, США); этанол ГОСТ 18300-32; бидистиллированная вода ГОСТ Р 52501-2005; пропиленоксид (Alfa Aesar, США); Epoxy Embedding Medium kit (Sigma Aldrich, США).

Для клеточных работ использовали следующие реактивы:

Культуральная среда DMEM с низким содержанием глюкозы (ПанЭко, Россия); культуральная среда DMEM с высоким содержанием глюкозы (ПанЭко, Россия); культуральная среда DMEM Ham's F12 (ПанЭко, Россия); эмбриональная бычья сыворотка (HyClone, США); гентамицин (Sigma Aldrich, США); глутамин (ПанЭко, Россия); трипсин Версен (ПанЭко, Россия); диметилсульфоксид (Panreac, Испания); хлорид натрия (Helicon, Россия); гидрофосфат натрия двузамещенный (Sigma Aldrich, США); дигидрофосфат калия (Panreac, Испания); хлорид калия (Sigma Aldrich, США); этанол ГОСТ 18300-32; 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромид (Sigma Aldrich, США); DAPI (Sigma Aldrich, США).

Для экспериментов *in vivo* использовали следующие реактивы и материалы:

Уксусная кислота (Химмед, Россия); диэтиловый эфир ТУ 2600-001-43852015-10; хлоргесидин биглюконат водный раствор 0,05% (РосБио, Россия); этанол ГОСТ 18300-32; формалин (Химмед, Россия); ксилол (Химмед, Россия); канадский бальзам (Sigma Aldrich, США); гематоксилин (Sigma Aldrich, США); эозин (Sigma Aldrich, США); гистомикс (Биовитрум, Россия); эксикатор лабораторный ГОСТ 25336-82; хирургические полипропиленовые нити (Ethicon, США); скальпели медицинские ГОСТ 21240-89; хирургические ножницы ГОСТ 19126-2007.

В экспериментах использовали одноразовую пластиковую посуду (Greiner, Австрия), и стеклянную лабораторную посуду ГОСТ 25336-82.

2.2. Экспериментальные животные

В работе были использованы самцы крыс породы Wistar массой 200-300 г. Животные получены из питомника лабораторных животных (Филиал «Андреевка» Федерального Государственного бюджетного учреждения науки «Научный Центр Биомедицинских Технологий» Федерального медико-биологического агентства). Все манипуляции с животными проводили согласно правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследований и других научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS) Strasburg, 1986). Содержание животных и оценка регенеративного потенциала полученных конструкций осуществлялись в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 10993-2-2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными».

2.3. Клеточные линии

Мышечные фибробласты 3Т3. Клетки культивировали в пластиковых флаконах в среде DMEM с низким содержанием глюкозы, содержащей 10% бычьей эмбриональной сыворотки, 0,324 мг/мл глутамина и 10 мг/мл гентамицина при 37°C, 5% CO₂. Смену культуральной среды производили каждые 48 часов. Монослой клеток дезагрегировали с помощью раствора трипсина-Версена, производили подсчет клеток в камере Горяева и рассаживали в соотношении 1/3.

Клетки гепатокарциномы человека Hep-G₂. Клетки культивировали в пластиковых флаконах смеси 1:1 среды DMEM с высоким содержанием глюкозы и среды DMEM Ham's F12, содержащей 10% бычьей эмбриональной сыворотки, 0,324 мг/мл глутамина и 10 мг/мл гентамицина при 37°C, 5% CO₂. Смену культуральной среды производили каждые 48 часов. Монослой клеток дезагрегировали с помощью раствора трипсина-Версена, производили подсчет клеток в камере Горяева и рассаживали в соотношении 1/3.

2.4. Методы

2.4.1. 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.

2.4.2. Получение водного раствора 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).

2.4.3. Получение водного раствора коллагена

Раствор коллагена получали путем экстракции из сухожилий хвостов крыс породы Wistar (Chandrakasan G. et al., 1976). Хвосты обливали кипящей водой, после чего переносили в 70%-ный спирт. С хвостов снимали кожу и разделяли сухожилия вдоль хвоста с помощью скальпеля, так, чтобы надрезы не проникали на глубину кости. Затем хвосты инкубировали в 70%-ном спирте в течение 10 минут, а после этого переносили в 0,5 М раствор уксусной кислоты. Раствор считали готовым к использованию после 3 месяцев инкубации при 4°C.

Полученный раствор центрифугировали в течение 20 минут при 5000 g. Супернатант диализовали против 1 л бидистиллированной воды при комнатной температуре, проводя смены по 1 часу в течение 5 часов. Концентрация полученного раствора составила 9 мг/мл, содержание коллагена в растворе от 60 до 85%, 60% которого составляет коллаген I типа (Kjaer M, 2004).

2.4.4. Получение раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте

Водный раствор фиброина шелка, полученный по описанной выше методике, наносили на дно чашки Петри и высушивали при комнатной температуре. 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.

2.4.5. Изготовление пленок из фиброина шелка и коллагена

Пленки получали методом полива. Для изготовления пленки диаметром 1 см² 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.

2.4.6. Получение раствора фиброина шелка в 1,1,1,3,3,3-гексафторпропанол-2

Водный раствор фиброина шелка, полученный по описанной выше методике, наносили на дно чашки Петри и высушивали при комнатной температуре. Высушенный фиброин шелка 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.

2.4.7. Получение растворов рекомбинантных спидроинов в 1,1,1,3,3,3-гексафторпропанол-2

Образцы рекомбинантных спидроинов 2E12 и 2E12-RGD были предоставлены Богушем В.Г. Навеску рекомбинантного спидроина 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.

2.4.8. Получение раствора желатина в 1,1,1,3,3,3-гексафторпропанол-2

Навеску 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.

2.4.9. 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.

2.4.10. Анализ поверхностной структуры пленок и микроволокнистых скаффолдов методом сканирующей электронной микроскопии

Образцы фиксировали 2,5%-ным раствором глутарового альдегида на фосфатно-солевом буфере с рН=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 10%, 20%, 50%, 70% и 96%, инкубируя образцы по 1 часу в этаноле каждой концентрации. После этого образцы переносили в ацетон на 30 минут, а затем производили смену ацетона.

Подготовленные образцы высушивали методом перехода критической точки ($T_{кр. CO_2}=31^\circ C$, $p_{кр. CO_2}=72,8 \text{ кг/см}^2$) с помощью прибора K850 (Quorum Technologies, Великобритания). Высушенные образцы покрывали слоем золота толщиной 10 нм в атмосфере аргона при ионном токе 20 мА и давлении 1 мбар с помощью вакуумной напылительной установки Q150R ES (Quorum Technologies, Великобритания), затем анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа Tescan Vega3 SBU (Tescan, Чехия). Пространственное разрешение микроскопа 3 нм, рабочее напряжение 15 кВ. Получение и анализ изображений производили с помощью программного обеспечения VegaTC (Tescan, Чехия).

2.4.11. Анализ структуры пленок и микроволокнистых скаффолдов методом сканирующей зондовой нанотомографии

Образцы фиксировали 2,5%-ным раствором глутарового альдегида на фосфатно-солевом буфере с $\text{pH}=7,4$ 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 Ntegra Tomo (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 Diatome UltraAFM 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 (MediaCybernetics Inc., США), включающего опцию трехмерного реконструирования.

2.4.12. Изучение структуры пленок методом атомно-силовой микроскопии

Образцы пленок на скотче помещали на платформу прибора Solver P47-PRO (Нанотехнология МДТ, Россия). Сканирование осуществляли в полуконтактном режиме с частотой сканирования 0,3-0,4 Гц и амплитудой 20-40 нм с помощью кантилевера NSC15/AL BS с резонансной частотой 265-410 кГц и силовой константой 20-80 Н/м (Mikromasch, Эстония). Площадь сканируемой области составляла 11,324×11,324 мкм. Получение изображений, их обработку, построение профилей поверхности и трехмерных изображений осуществляли с помощью программы Nova 1.0.26.1433 (Нанотехнология МДТ, Россия).

Оценку шероховатости поверхности также проводили в программе Nova 1.0.26.1433 с помощью функции Roughness Analysis, которая позволяет получить среднее значение шероховатости поверхности в нанометрах для каждого полученного изображения. Для каждого образца плёнок были обработаны статистически значения шероховатости, полученные для 6 изображений.

2.4.13. Изучение деградации пленок на основе фиброина шелка *in vitro*

Исследование деградации пленок проводили согласно ГОСТ Р ИСО 10993-13–2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 13. Идентификация и количественное определение продуктов деструкции полимерных медицинских изделий» в нейтральных и окисляющих условиях. В качестве окисляющего реагента использовали реактив Фентона, содержащий 100 мкМ сульфата железа (II) и 1мМ пероксида водорода. Смены раствора окисляющего реагента проводили каждые 3 дня. В качестве контроля использовали фосфатно-солевой буфер с рН=7. Образцы инкубировали в десятикратных объемах растворов. Оценку скорости деградации производили по изменению массы образца. Образцы высушивали на воздухе, после чего измеряли массу образцов. Измерения проводили на 7, 21, 35, 49, 63, 77, 91, 105, 119, 133, 157 и 161 дни эксперимента.

2.4.14. Изучение механических свойств пленок из фиброина шелка

Исследование механических свойств пленок проводили в лаборатории химии и технологии материалов для сердечно-сосудистой хирургии Института имени Бакулева под руководством Новиковой С.П. с помощью разрывной машины Zwick/Roell BZ 2.5 /TN1S (Zwick Roell, Германия). Образцы длиной 4 см, шириной 5 мм помещали в зажимы прибора. Предварительная нагрузка составляла 0,05 Н. Далее проводили испытание образцов на растяжение со скоростью 50 мм/мин. Полученные кривые зависимости силы от удлинения обрабатывали статистически с помощью программы TestXpert (Zwick Roell, Германия). По полученным данным вычисляли значения прочности на разрыв в МПа и эластичности (удлинения) в процентах от первоначальной длины образца.

2.4.15. Анализ цитотоксичности пленок и микроволокнистых скаффолдов

Анализ цитотоксичности всех полученных образцов проводили согласно ГОСТ Р ИСО 10993-5-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*» с помощью МТТ-теста (Mosmann Т., 1983) в модели линии клеток мышинных фибробластов 3Т3.

Для этого мышинные фибробласты 3Т3 культивировали в 300 мкл культуральной среды в 96-луночном планшете в термостате при 37°С и 5% CO₂ в течение 3 дней. Затем производили смену культуральной среды и вносили образцы полученных конструкций в лунки планшета. В качестве контроля использовали культуральный пластик. Планшеты инкубировали в термостате при 37°С, 5% CO₂. Оценку цитотоксичности проводили на 3, 5 и 7 сутки эксперимента. Для этого в каждую лунку планшета вносили по 60 мкл раствора МТТ с концентрацией 5 мг/мл. Инкубировали в термостате при 37°С и 5% CO₂ в течение 4 часов до выпадения темно- синих кристаллов формазана. Затем образцы конструкций удаляли из лунок, а планшет центрифугировали в течение 5 минут при 885 г. Супернатант удаляли, осадок формазана растворяли в 300 мкл диметилсульфоксида в течение 20 минут и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 540 нм.

2.4.16. 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 мышечных 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 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 (МТТ) 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).

2.4.17. Анализ адгезии и пролиферации клеток на микроволокнистых скаффолдах

Эксперимент проводили в чашках Петри диаметром 3,5 см. Для проведения эксперимента волокнистые 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 микроволокнистых 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 3T3 и линию клеток гепатокарциномы человека Hep-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 Blue Edition (Zeiss, Германия). По полученным изображениям проводили подсчет клеток в поле зрения микроскопа.

2.4.18. 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 2. 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 Philips TUV 15W/G15 (Philips Lighting B.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 пленки.

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 Nikon D5100 18-105 VR kit и объектива Nikon модели AF-S DX 18-105 мм f/3,5-5,6 G ED VR. 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.

Таблица 2. 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-пропанол-2, общая концентрация белка 50 мг/мл
7	Микроволокнистый скаффолд на основе раствора фиброина шелка в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-пропанол-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-пропанол-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-пропанол-2, содержащего 30% спидроина 2E12-RGD по массе, общая концентрация белка 50 мг/мл

2.4.19. Гистологические исследования

Образцы кожи крыс размером 20 ± 3 мм фиксировали с помощью смеси формалина, этанола и уксусной кислоты в объемном соотношении 4:1:0,3. Далее образцы кожи заливали в парафин, после чего получали срезы с помощью ротационного микротомы Thermo Scientific Rotary Microtome Microm HM 325 (Thermo Scientific, США) толщиной 10 мкм. Окрашивание срезов производили гематоксилин-эозином.

Полученные окрашенные срезы заключали в канадский бальзам и анализировали с помощью микроскопа Carl Zeiss Axio Vert.A1 (Zeiss, Германия). Изображения фрагментов полученных срезов получали с помощью цифровой камеры AxioCam 305 color (Zeiss, Германия). Обработку изображений производили с помощью программного обеспечения Zen 2.3 Blue Edition (Zeiss, Германия)

2.4.20. 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.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Получение образцов пленок и микроволокнистых скаффолдов 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. Для изготовления пленок использовались растворы с общей концентрацией белка 20 мг/мл с применением двух растворителей – воды и муравьиной кислоты.

Рассматриваемая группа включает в себя 4 вида образцов различного состава, описание которых приведено в таблице 3. Все полученные образцы являются бесцветными (рисунок 1).

Таблица 3. Состав полученных образцов пленок на основе фиброина шелка тутового шелкопряда B. mori.

	Состав образца
Образец №1	Водный раствор фиброина шелка, общая концентрация белка 20 мг/мл
Образец №2	Водный раствор фиброина шелка, содержащий 30% коллагена по массе, общая концентрация белка 20 мг/мл
Образец №3	Раствор фиброина шелка в муравьиной кислоте, общая концентрация белка 20 мг/мл
Образец №4	Раствор фиброина шелка в муравьиной кислоте, содержащий 30% коллагена по массе, общая концентрация белка 20 мг/мл

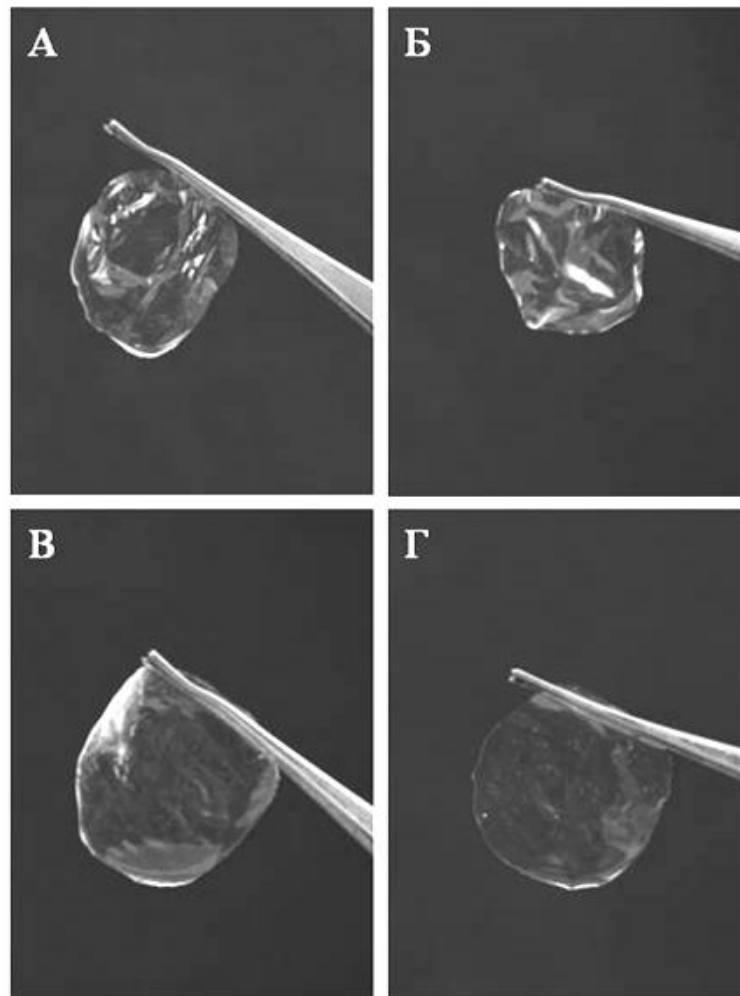


Рисунок 1. Изображения пленок различного состава: А – пленка, полученная из водного раствора фиброина шелка, Б – пленка, полученная из водного раствора фиброина шелка с добавлением раствора коллагена, В – пленка, полученная из раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте, Г – пленка, полученная из раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте с добавлением раствора коллагена.

Группа 2 – микроволокнистые скаффолды на основе фиброина шелка тутового шелкопряда *B. mori*, полученные методом электроспиннинга. Для получения скаффолдов была собрана установка, схема которой изображена на рисунке 2.

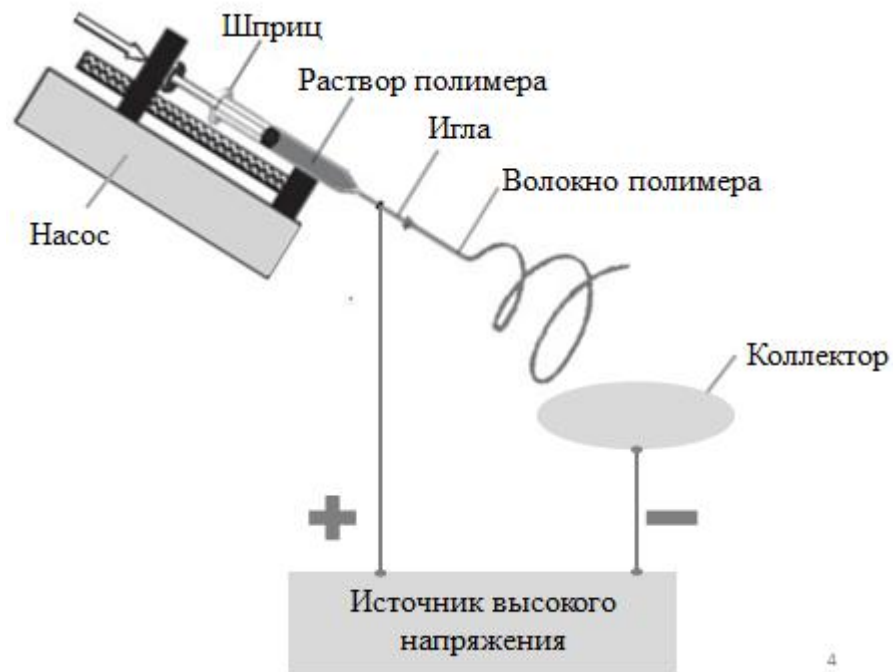


Рисунок 2. Схема установки для получения микроволоконистых скаффолдов методом электроспиннинга.

Для получения скаффолдов использовали растворы полимеров в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-пропанол-2 с общей концентрацией белка 50 мг/мл.

Рассматриваемая группа включает в себя 4 вида скаффолдов различного состава, описание которых приведено в таблице 4, изображения скаффолдов представлены на рисунке 3.

Таблица 4. Состав образцов микроволокнистых скаффолдов на основе фиброина шелка тутового шелкопряда *B. mori*.

	Состав образца
Образец №1	Раствор фиброина шелка в 1,1,1,3,3,3–гексафторпропаноле-2, общая концентрация белка 50 мг/мл
Образец №2	Раствор фиброина шелка в 1,1,1,3,3,3–гексафторпропаноле-2, содержащий 30% желатина по массе, общая концентрация белка 50 мг/мл
Образец №3	Раствор фиброина шелка в 1,1,1,3,3,3–гексафторпропаноле-2, содержащий 30% спидроина 2E12 по массе, общая концентрация белка 50 мг/мл
Образец №4	Раствор фиброина шелка в 1,1,1,3,3,3–гексафторпропаноле-2, содержащий 30% спидроина 2E12-RGD по массе, общая концентрация белка 50 мг/мл

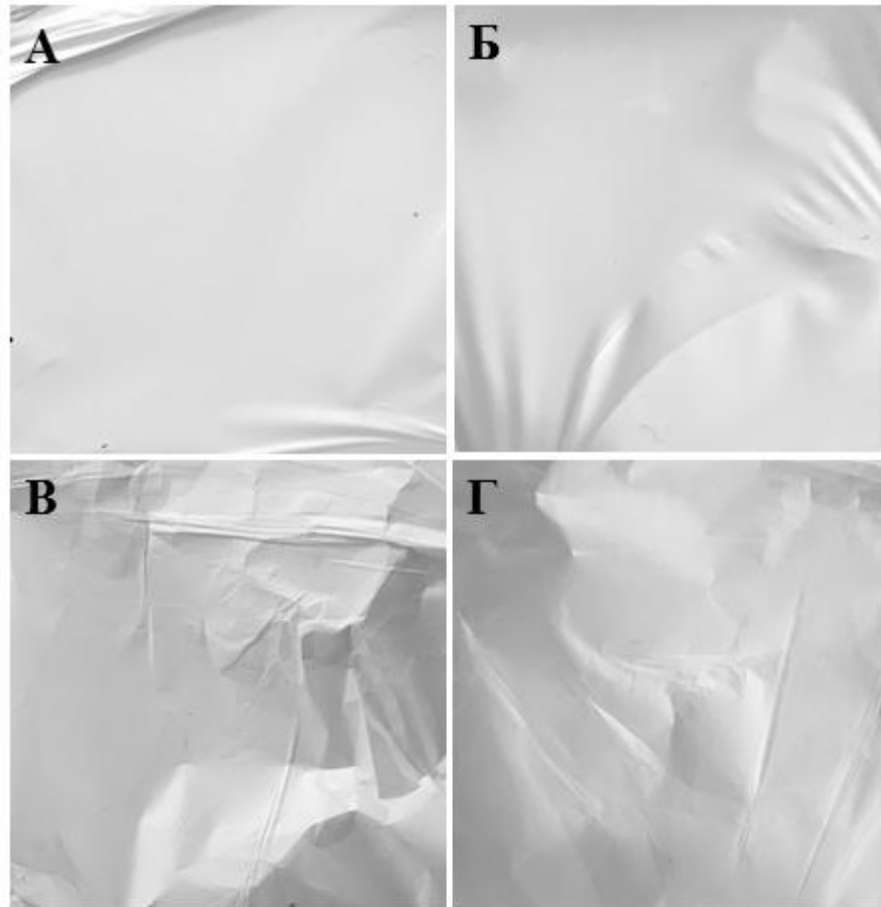


Рисунок 3. Изображения микроволокнистых скаффолдов различного состава: А – скаффолд, полученный из раствора фиброина шелка в 1,1,1,3,3,3–гексафтор-пропаноле-2, Б – скаффолд, полученный из раствора фиброина шелка и желатина в 1,1,1,3,3,3–гексафтор-пропаноле-2, В – скаффолд, полученный из раствора фиброина шелка и спидроина 2E12 в 1,1,1,3,3,3–гексафтор-пропаноле-2, Г – скаффолд, полученный из раствора фиброина шелка и спидроина 2E12-RGD в 1,1,1,3,3,3–гексафтор-пропаноле-2.

3.2. Анализ структуры полученных пленок и микроволокнистых скаффолдов

Поверхностная структура полученных конструкций была исследована методом сканирующей электронной микроскопии.

Поверхность пленок всех видов имеет микро- и нанорельеф в виде шероховатостей (рисунок 4), который характеризуется волокнистой структурой. Данным методом не было выявлено пор в структуре пленок (рисунок 5).

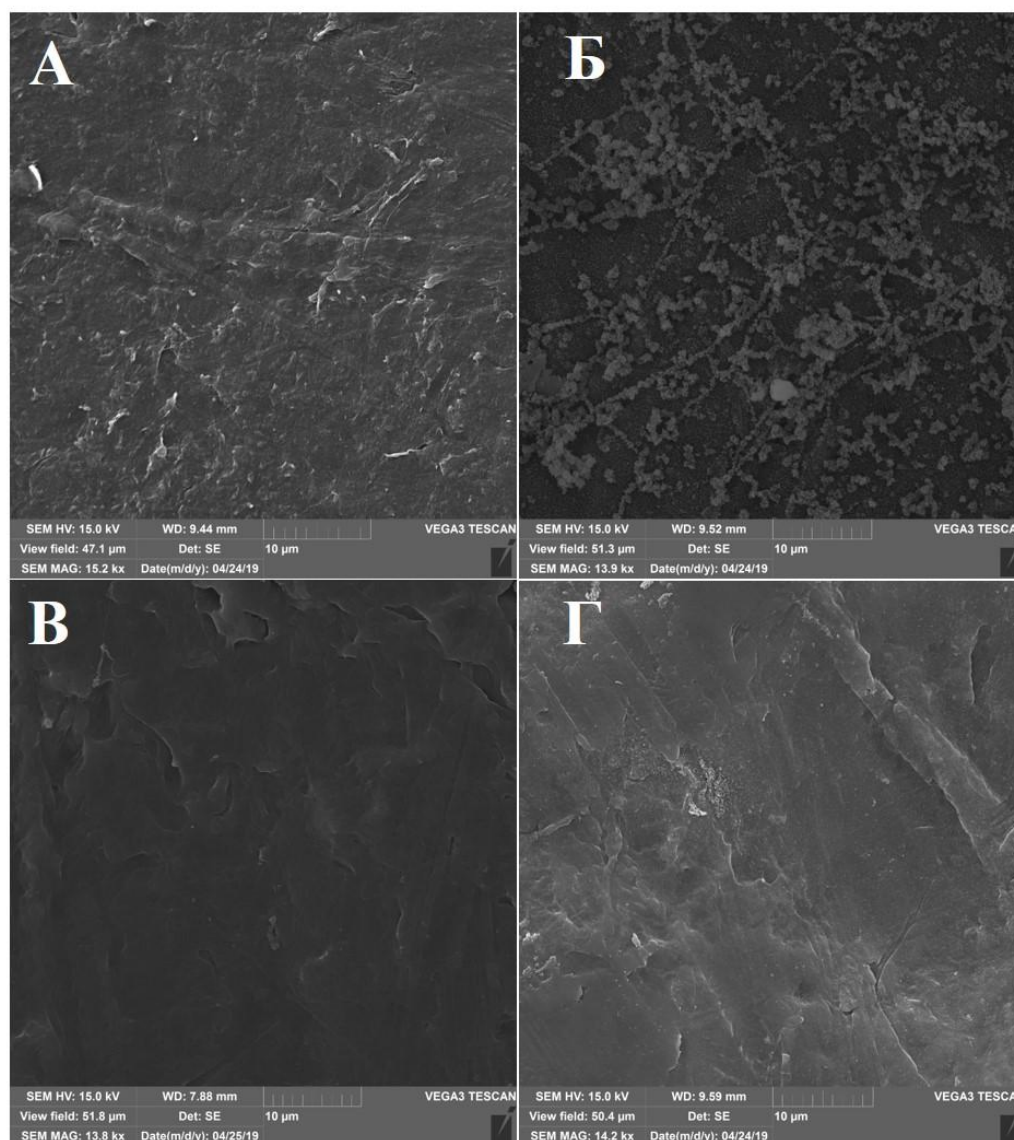


Рисунок 4. Изображения поверхности пленок, полученные методом сканирующей электронной микроскопии: А – пленка, полученная из водного раствора фиброина шелка, Б – пленка, полученная из водного раствора фиброина шелка с добавлением 30% коллагена по массе, В – пленка, полученная из раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте, Г – пленка, полученная из раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте с добавлением 30% коллагена по массе.

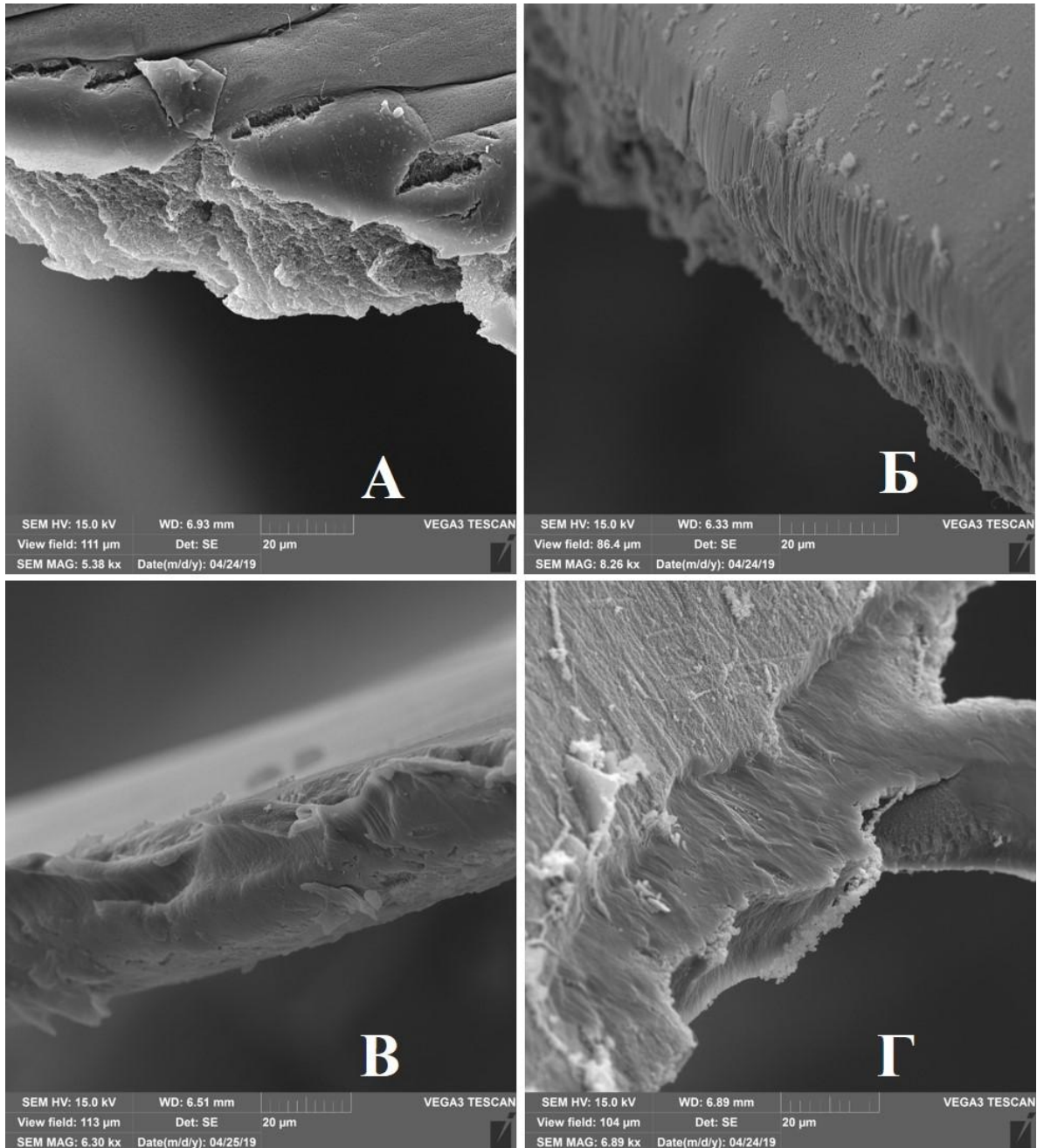


Рисунок 5. Изображения срезов пленок, полученные методом сканирующей электронной микроскопии: А – пленка, полученная из водного раствора фиброина шелка, Б – пленка, полученная из водного раствора фиброина шелка с добавлением 30% коллагена по массе, В – пленка, полученная из раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте, Г – пленка, полученная из раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте с добавлением 30% коллагена по массе.

Скаффолды, полученные методом электроспиннинга, характеризуются микроволокнистой структурой (рисунок 6). Волокна в составе скаффолдов расположены хаотично в несколько слоев и не имеют определенной ориентации. Между волокнами образуются поры различного размера. Примерная толщина волокон составляет 300-700 нм.

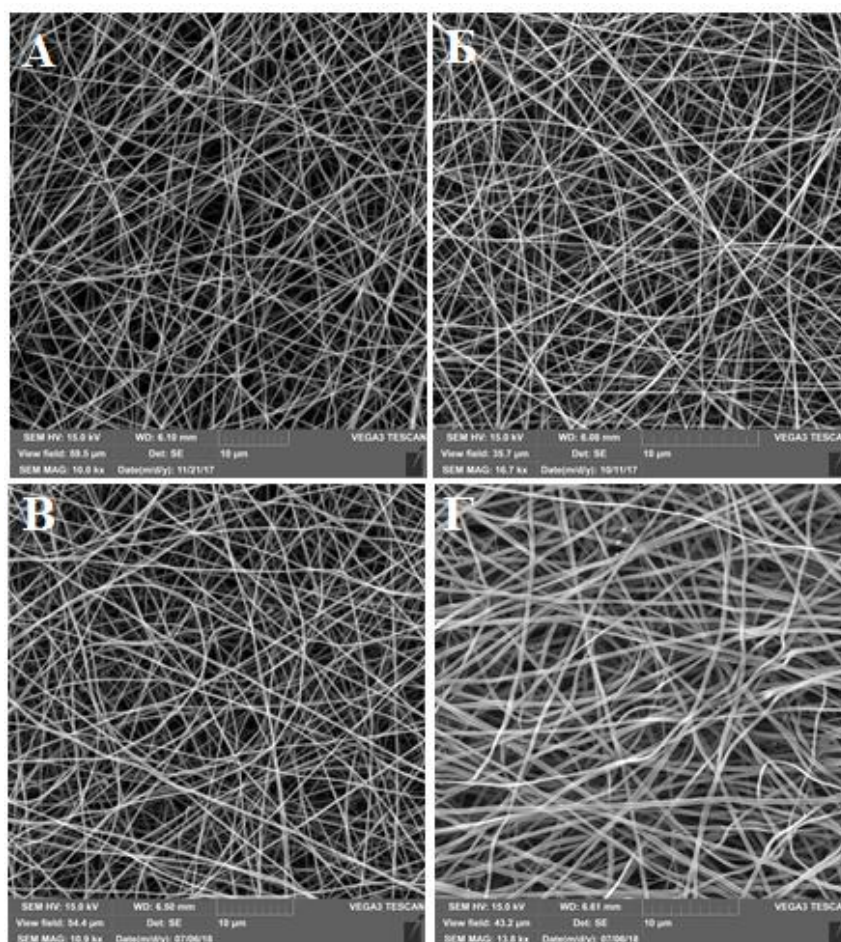


Рисунок 6. Изображения поверхности микроволокнистых скаффолдов, полученные методом сканирующей электронной микроскопии: А – скаффолд, полученный из раствора фиброина шелка в 1,1,1,3,3,3–гексафтор-пропаноле-2, Б – скаффолд, полученный из раствора фиброина шелка и желатина в 1,1,1,3,3,3–гексафтор-пропаноле-2, В – скаффолд, полученный из раствора фиброина шелка и стидроина 2E12 в 1,1,1,3,3,3–гексафтор-пропаноле-2, Г – скаффолд, полученный из раствора фиброина шелка и стидроина 2E12-RGD в 1,1,1,3,3,3–гексафтор-пропаноле-2.

Поверхность полученных пленок была исследована методом атомно-силовой микроскопии. На рисунке 7 представлены изображения поверхности пленок, полученные методом атомно-силовой микроскопии, и профили поверхности пленок по обозначенным линиям. Также были получены трехмерные изображения рельефа поверхности пленок, представленные на рисунке 8.

По полученным изображениям была произведена количественная оценка шероховатости пленок. Данные о средней шероховатости полученных пленок различного состава представлены в таблице 5, по данным которой построена гистограмма (рисунок 9). Представленные данные свидетельствуют о том, что пленки, изготовленные из водных растворов имеют меньшую шероховатость по сравнению с пленками, изготовленными из растворов в муравьиной кислоте. При этом наименьшая высота рельефа характерна для пленок из водного раствора фиброина шелка.

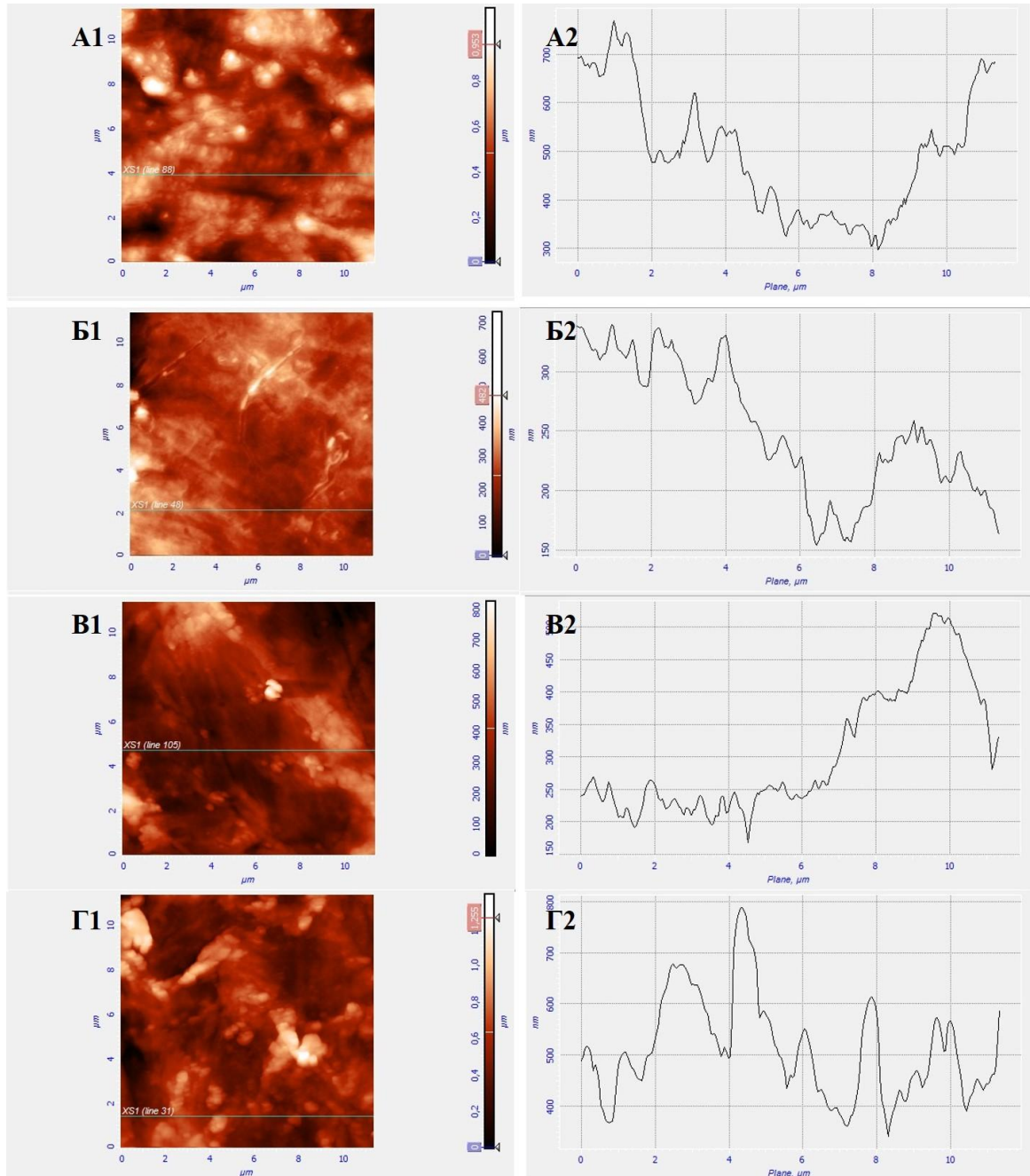


Рисунок 7. Изображения поверхности пленок, полученные методом атомно-силовой микроскопии (A1, B1, B1, Г1) и профили поверхностей по указанным линиям (A2, B2, B2, Г2). A1, A2 – пленка, полученная из водного раствора фиброина шелка, B1, B2 – пленка, полученная из водного раствора фиброина шелка с добавлением 30% коллагена по массе, B1, B2 – пленка, полученная из раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте, Г1, Г2 – пленка, полученная из раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте с добавлением 30% коллагена по массе.

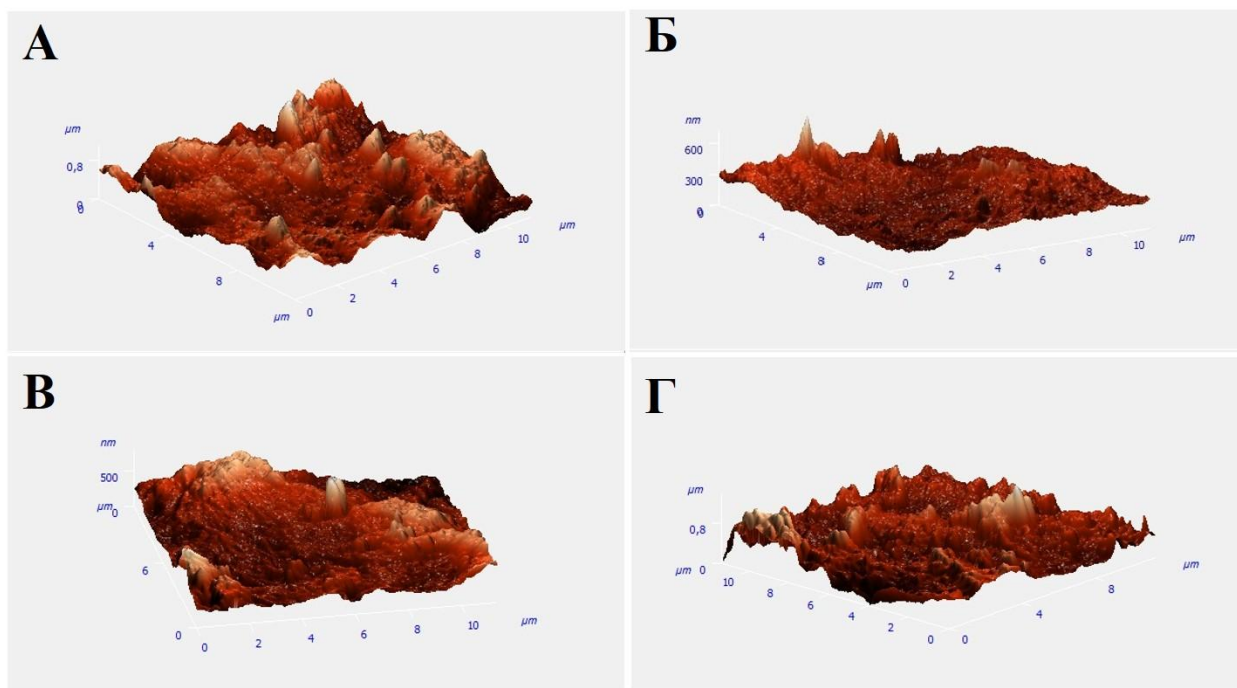


Рисунок 8. Трехмерные изображения поверхности пленок различного состава: А – пленка, полученная из водного раствора фиброина шелка, Б – пленка, полученная из водного раствора фиброина шелка с добавлением 30% коллагена по массе, В – пленка, полученная из раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте, Г – пленка, полученная из раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте с добавлением 30% коллагена по массе.

Анализ внутренней структуры полученных пленок был проведен методом сканирующей зондовой нанотомографии. При этом с помощью ультрамикротомы выполнялись поперечные срезы образцов пленок, залитых в эпоксидную смолу. Поверхность образцов после среза изучалась с использованием специализированного сканирующего зондового микроскопа.

На рисунке 10 представлены полученные изображения поверхностей поперечных срезов пленок, а также профили поверхностей срезов. Наблюдаемые объемные структуры всех четырех образцов можно охарактеризовать, как состоящие из достаточно плотно упакованных глобул размерами от 10 до 30 нм, заметных различий между структурами разных образцов при этом не было выявлено.

Таблица 5. Данные о средних шероховатостях пленок различного состава. Указаны значения стандартного отклонения для 6-ти независимых измерений.

Состав тестируемой пленки	Средняя шероховатость 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

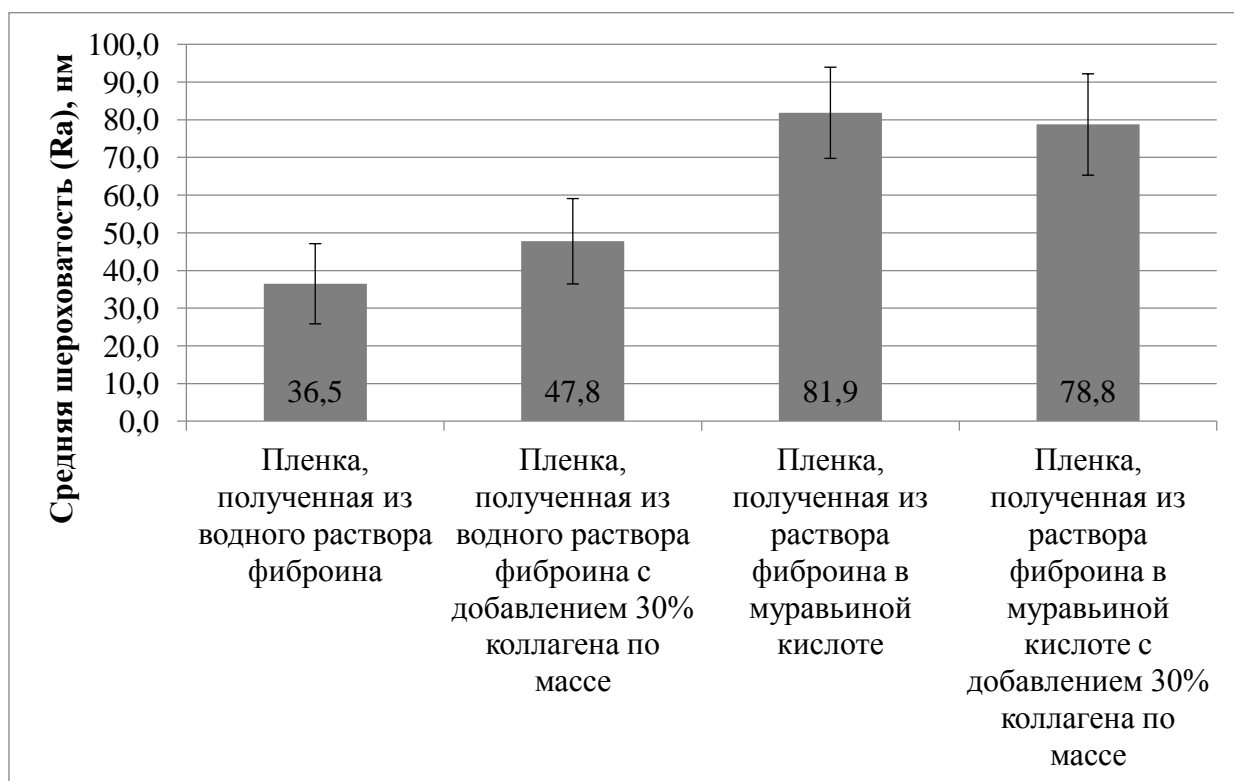


Рисунок 9. Средняя шероховатость (R_a) пленок различного состава. Указаны значения стандартного отклонения для 6-ти независимых измерений.

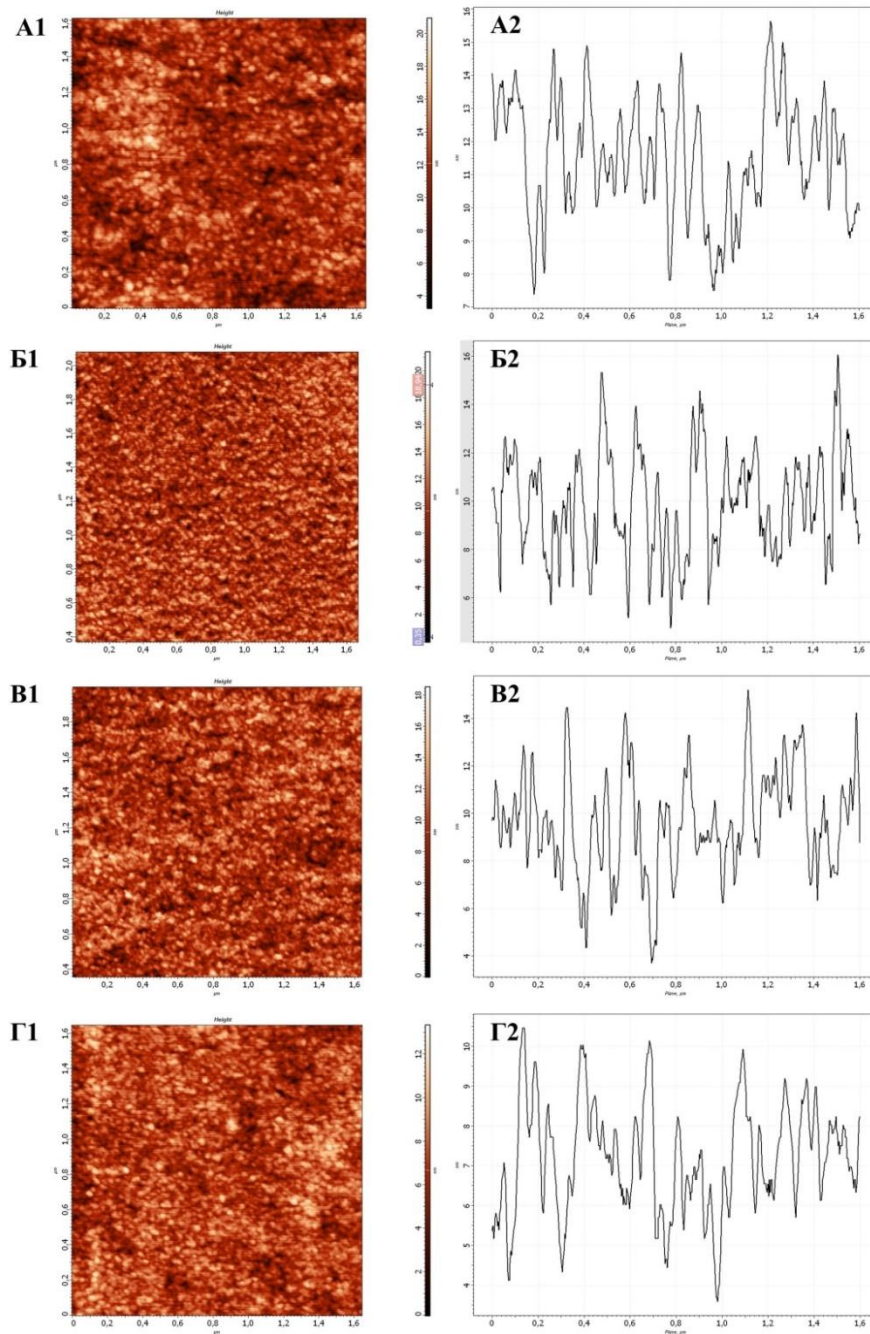


Рисунок 10. Изображения поверхности срезов пленок, полученные методом сканирующей зондовой нанотомографии (A1, Б1, В1, Г1) и профили поверхностей срезов (A2, Б2, В2, Г2). A1, A2 – пленка, полученная из водного раствора фиброина шелка, Б1, Б2 – пленка, полученная из водного раствора фиброина шелка с добавлением 30% коллагена по массе, В1, В2 – пленка, полученная из раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте, Г1, Г2 – пленка, полученная из раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте с добавлением 30% коллагена по массе.

Структура скаффолдов, полученных методом электроспиннинга была исследована методом сканирующей зондовой нанотомографии (рисунок 11, изображение скаффолда полученного из раствора фиброина шелка и спидроина 2E12 в 1,1,1,3,3,3–гексафтор-пропаноле-2 не представлено, так как имеет вид, аналогичный рисунку 11В). Для количественного анализа характеристик полученных скаффолдов были построены трехмерные реконструкции (рисунок 12). На рисунке представлена типичная трехмерная реконструкция структуры микроволокнистого скаффолда, полученного методом электроспиннинга, на примере скаффолда, полученного из раствора фиброина шелка в 1,1,1,3,3,3–гексафтор-пропаноле-2.

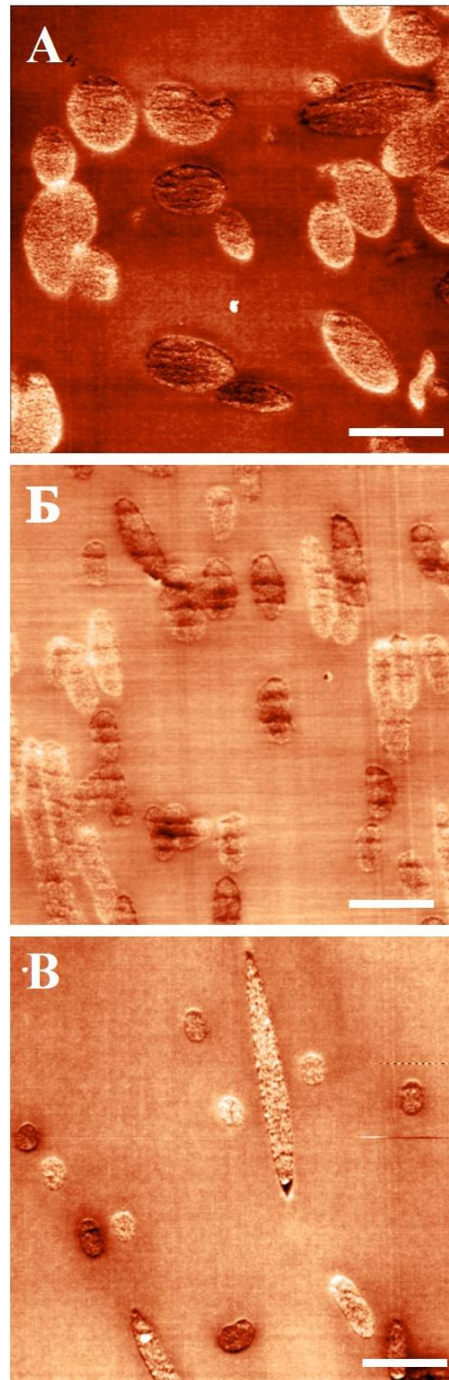


Рисунок 11. Изображения топографии поверхности среза микроволоконистых скаффолдов. А – скаффолд, полученный из раствора фиброина шелка в 1,1,1,3,3,3–гексафтор-пропаноле-2, Б – скаффолд, полученный из раствора фиброина шелка и желатина в 1,1,1,3,3,3–гексафтор-пропаноле-2, В – скаффолд, полученный из раствора фиброина шелка и спидроина 2E12-RGD в 1,1,1,3,3,3–гексафтор-пропаноле-2. Размерный отрезок – 1 мкм.

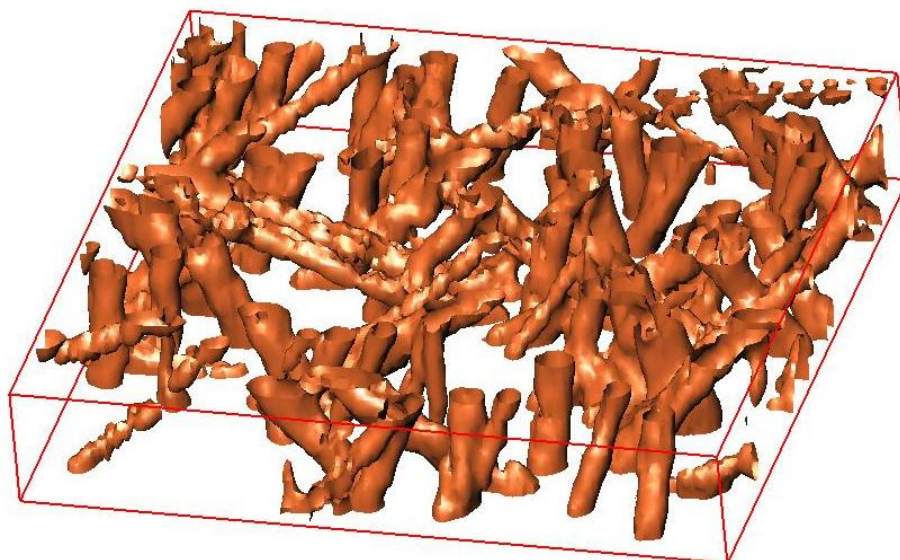


Рисунок 12. Трехмерная реконструкция микроволоконистого скаффолда на основе фиброина шелка. Область сканирования – 13,7x12,7x2,25 мкм, количество срезов – 15, толщина среза - 150 нм.

Полученные трехмерные реконструкции микроволоконистых скаффолдов были использованы для расчета объемной пористости скаффолда и отношения поверхности скаффолда к объему. Данные параметры для различных микроволоконистых скаффолдов представлены в таблице 6. Было показано, что между скаффолдами нет статистически значимых отличий в указанных параметрах и, следовательно, структуру скаффолдов можно считать аналогичной.

Также была исследована структура волокон (рисунок 13). Было показано, что волокна полимера в составе скаффолдов имеют неоднородную внутреннюю структуру и состоят из глобул размерами от 10 до 30 нм. Это согласуется с представленными выше результатами исследований внутренней структуры пленок, полученных методом полива. Можно предположить, что, в обоих случаях были детектированы глобулы фиброина шелка в составе конструкций.

Таблица 6. 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

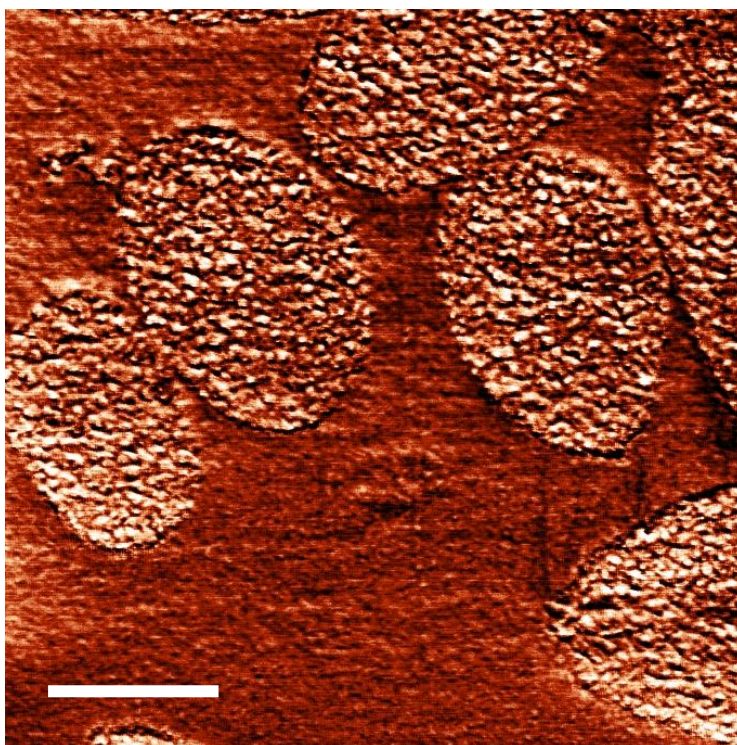


Рисунок 13. Структура волокон в составе микроволокнистого скаффолда (представлено волокно скаффолда, полученного из раствора фиброина шелка в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-пропанол-2). Размерный отрезок – 500 нм.

3.3. Исследование деградации пленок на основе фиброина шелка *in vitro*

Процесс деградации пленок был изучен в условиях двух сред: нейтральной – фосфатно-солевом буфере - и окисляющей – реактиве Фентона. В ходе эксперимента измеряли массу образцов 7, 21, 35, 49, 63, 77, 91, 105, 119, 133, 157 и 161 дни эксперимента. По полученным данным были построены кривые деградации пленок различного состава, приведенные на рисунке 14.

Форма кривых деградации пленок, полученных из водных растворов, в окисляющей среде существенно отличается. На 49 день эксперимента наблюдалась резкая потеря массы образцов пленок, содержащих в своем составе коллаген, что приводило к деструкции образца на 105 день эксперимента. В нейтральной среде существенных отличий в динамике деградации выявлено не было.

Форма кривых деградации пленок, полученных из растворов полимеров в муравьиной кислоте, существенно не отличается между собой. Однако присутствие коллагена в составе также приводит к деструкции образца на 119 день эксперимента.

Для сравнения скорости деградации образцов пленок на основе фиброина шелка была построена сводная гистограмма, отражающая изменение массы образцов по сравнению с начальной массой на 105 день эксперимента (рисунок 15). Деградация образцов в окисляющей среде происходит быстрее, чем в нейтральной. При этом потеря массы образцов на 105 день в окисляющей среде составляет в среднем 35%, что характеризует полученные пленки как деградируемые.

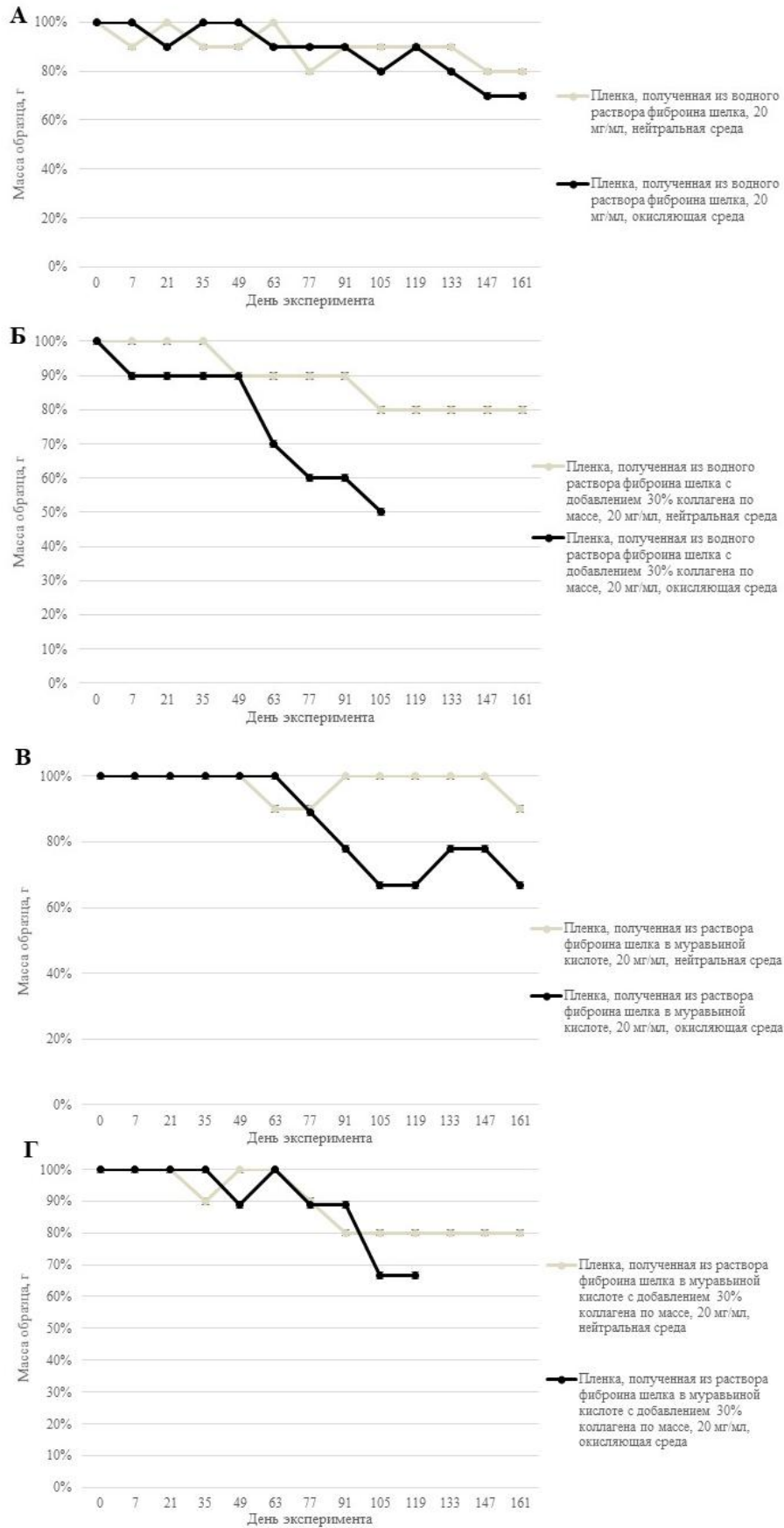


Рисунок 14. Кривые деградации пленок различного состава.

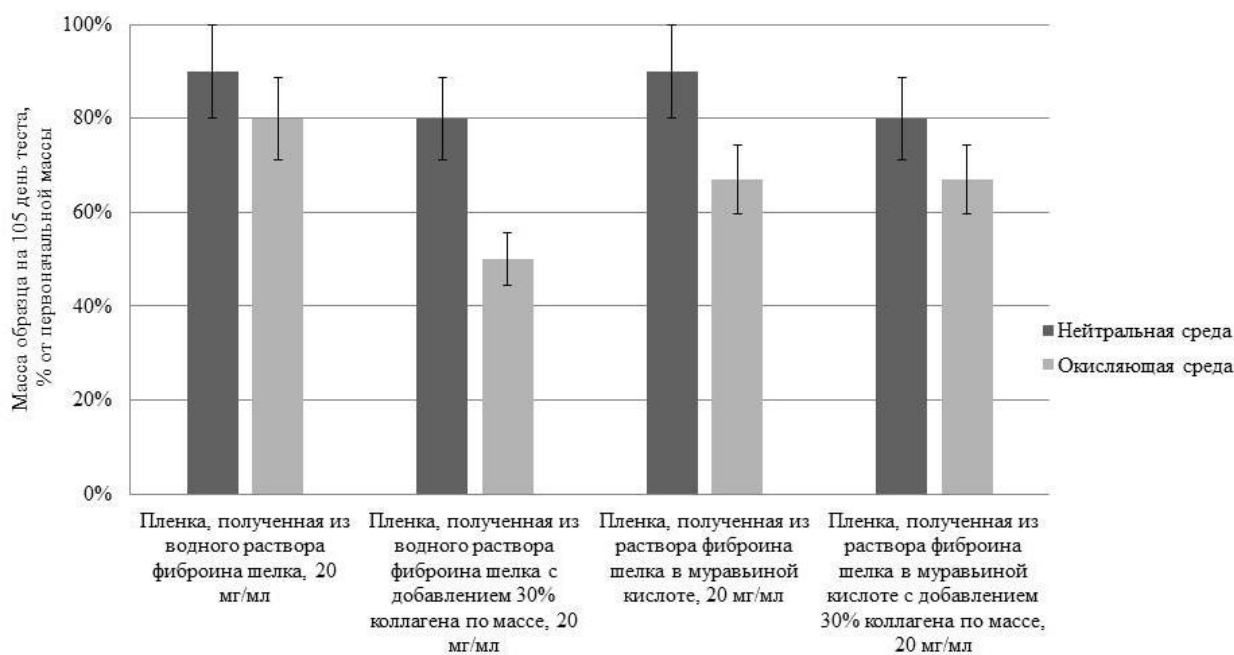


Рисунок 15. Изменение массы образцов пленок в процентах от первоначальной массы в фосфатно-солевом буфере (нейтральная среда) и реактиве Фентона (окисляющая среда) на 105 день эксперимента. Указаны значения стандартного отклонения для 3-х независимых измерений.

1.4. Исследование механических свойств пленок на основе фиброина шелка

Для исследования пленок на механическую прочность были изготовлены образцы длиной 4 см, шириной 0,5 см. Толщина полученных образцов измерялась непосредственно перед проведением испытания и варьировала от 20 до 90 мкм. Образцы подвергались деформации растяжения, в ходе которой регистрировались значения прочности на разрыв в МПа и эластичности в процентах от первоначальной длины образца, а также модуля Юнга в Н/мм². Значения измеренных показателей представлены в таблице 7.

По данным таблицы 7 были построены гистограммы, представленные на рисунках 16 и 17. Показатели прочности на разрыв пленок, содержащих коллаген,

ниже, чем показатели прочности на разрыв пленок, полученных из фиброина шелка без добавления коллагена. Показатели эластичности пленок, изготовленных из водных растворов выше, чем показатели эластичности пленок, изготовленных из растворов полимеров в муравьиной кислоте. Следует отметить, что данные, представленные на гистограмме, имеют высокие значения стандартного отклонения, что может быть связано с микроскопическими дефектами на образцах или высыханием образцов в ходе эксперимента.

Таблица 7. Значения прочности на разрыв, эластичности и модуля Юнга пленок различного состава. Указаны значения стандартного отклонения для 5-ти независимых измерений.

Состав тестируемой пленки	Прочность на разрыв, МПа	Эластичность, %	Модуль Юнга, Н/мм ²
Водный раствор фиброина	4,29±0,76	89,0±10,5	28,4±12,3
Водный раствор фиброина, содержащий 30% коллагена по массе	1,53±0,19	71,5±6,6	13,1±2,7
Раствор фиброина в муравьиной кислоте	3,09±0,51	30,0±8,4	42,8±15,0
Раствор фиброина в муравьиной кислоте, содержащий 30% коллагена по массе	1,44±0,32	37,0±7,8	10,0±6,0

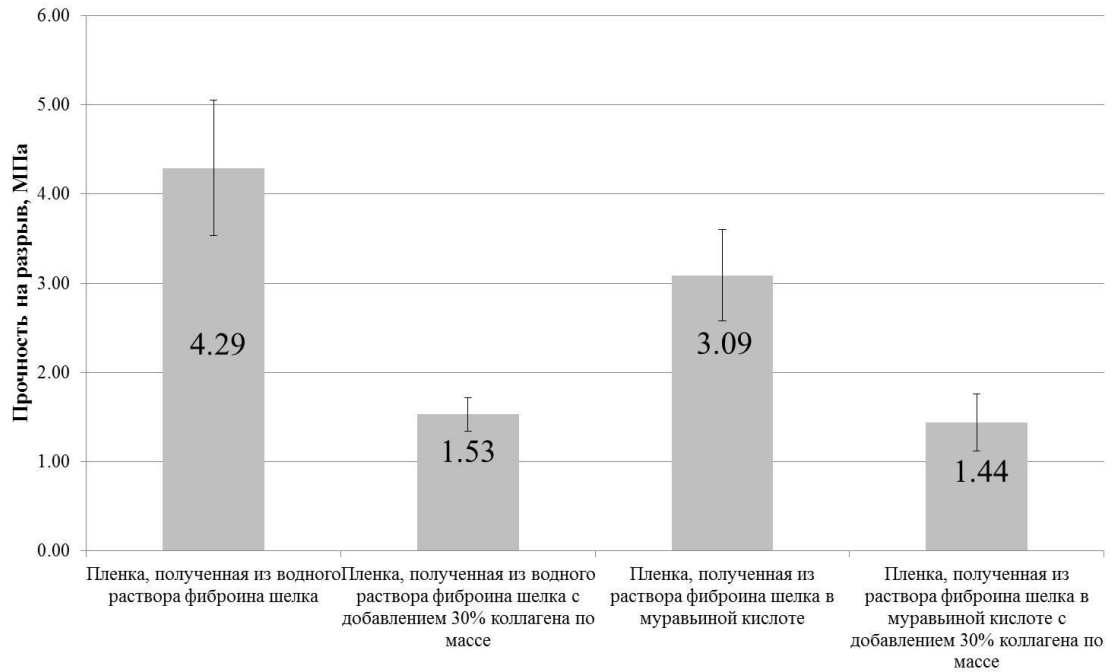


Рисунок 16. Значения прочности на разрыв пленок различного состава. Указаны значения стандартного отклонения для 5-ти независимых измерений.

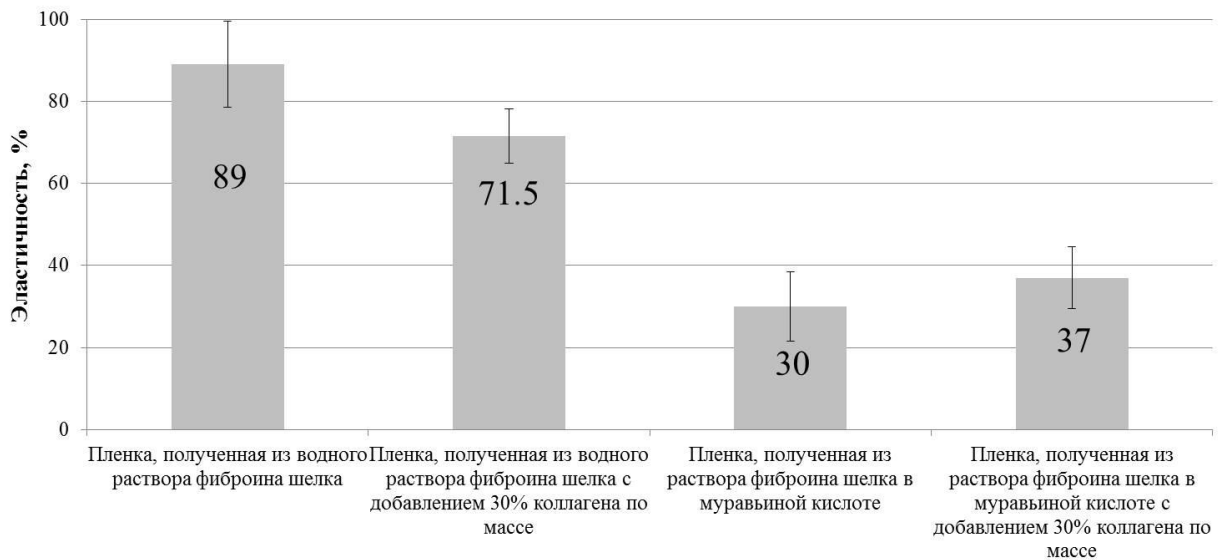


Рисунок 17. Значения эластичности пленок различного состава. Указаны значения стандартного отклонения для 5-ти независимых измерений.

1.5. Анализ цитотоксичности полученных пленок и микроволокнистых скаффолдов

Все полученные образцы были исследованы на цитотоксичность методом МТТ. В ходе исследования оценивали влияние образцов на количество клеток, культивированных на пластике. В качестве контроля использовали культуральный пластик. По полученным данным была построена гистограмма, отражающая изменение пролиферативной активности клеток в ходе эксперимента. Было показано, что пролиферативная активность клеток не уменьшалась после добавления в среду инкубации образцов полученных конструкций (рисунок 18). Это свидетельствует об отсутствии негативного эффекта полученных образцов на жизнеспособность эукариотических клеток. Таким образом, все полученные конструкции являются пригодными для дальнейших экспериментов по исследованию биосовместимости в системах *in vitro* и *in vivo*.

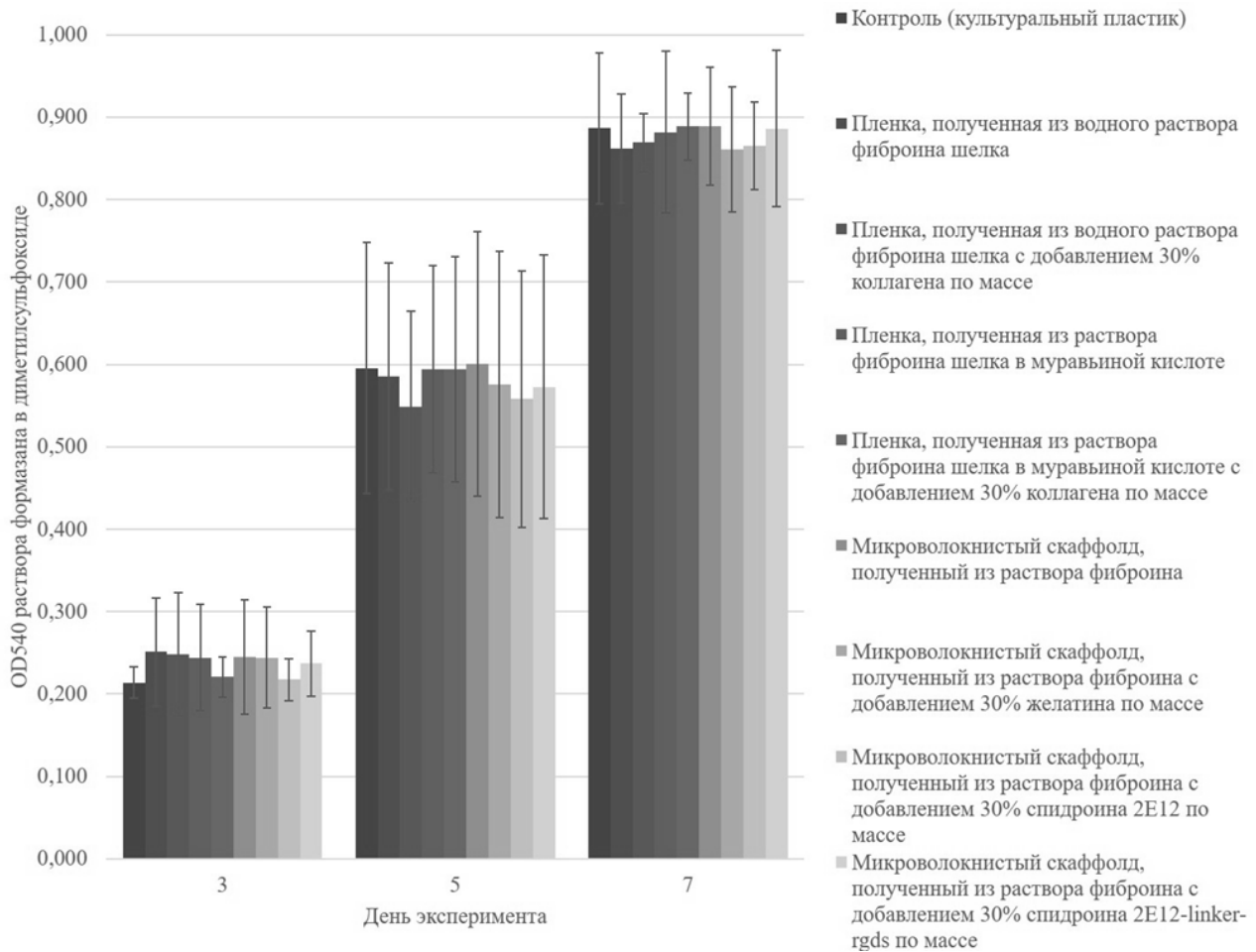


Рисунок 18. Данные о цитотоксичности полученных конструкций на 3, 5 и 7 дни эксперимента на модели пролиферации мышинных фибробластов линии 3T3. Указаны значения стандартного отклонения для 3-х независимых измерений.

1.6. Анализ биосовместимости полученных пленок и микроволокнистых скаффолдов

1.6.1. Изучение адгезии и пролиферативной активности клеток на полученных пленках и микроволокнистых скаффолдах

Анализ адгезии клеток проводили визуально с помощью светового микроскопа на 1 сутки эксперимента. Было показано, что адгезия клеток произошла на всех образцах пленок, отличий в адгезии клеток выявлено не было: морфология клеток в составе конструкций была схожей, клетки образовывали филоподии и плотно адгезировали к субстрату.

Анализ пролиферативной активности клеток на пленках различного состава проводили с помощью МТТ-теста на примере двух линий клеток – мышинных фибробластов 3Т3 (рисунок 20) и клеток гепатокарциномы человека Нер-G₂ (рисунок 19). В данном эксперименте пленки позиционировали в виде покрытий в лунках 96-луночного планшета. МТТ-тест ставили на 1, 3 и 7 сутки эксперимента.

По результатам теста все пленки поддерживают адгезию клеток обеих линий. Все полученные пленки поддерживают пролиферативную активность клеток обеих линий на уровне, сопоставимым с контролем. Введение коллагена в состав пленки не оказывает существенного влияния на адгезию и пролиферативную активность клеток.

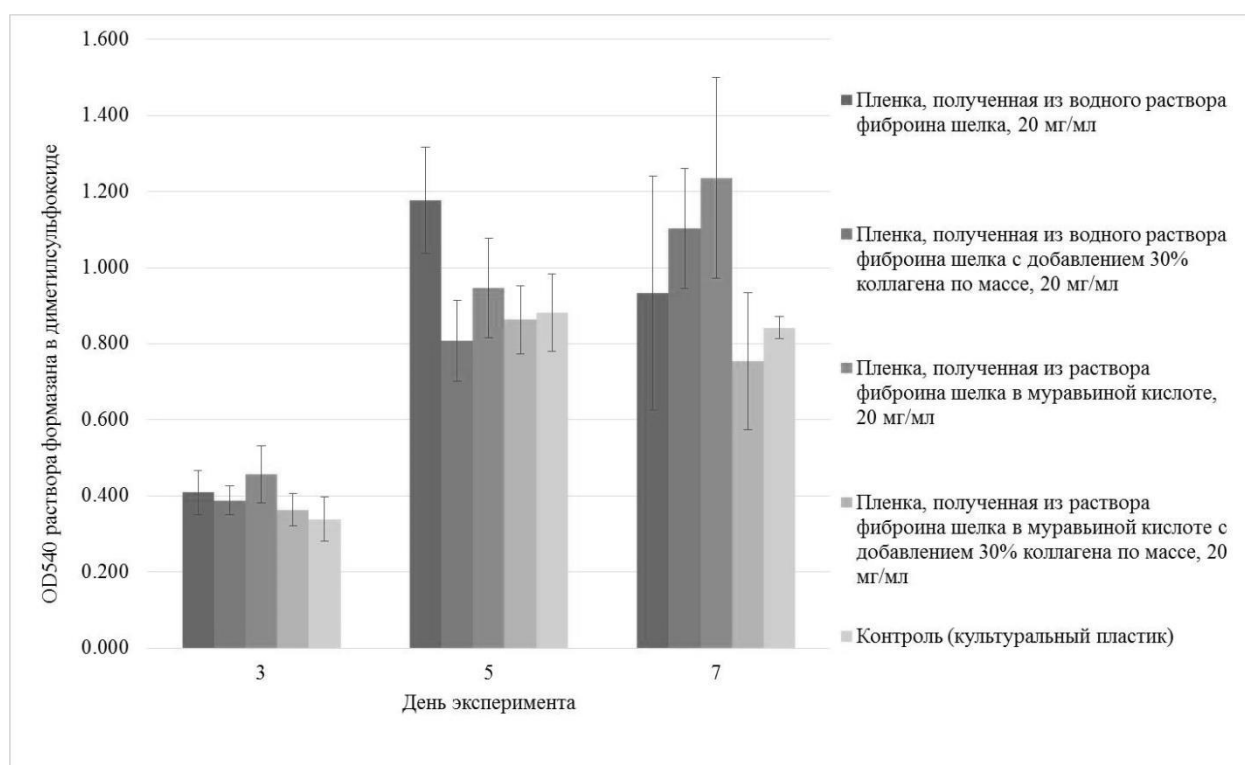


Рисунок 19. Пролиферативная активность клеток линии Нер-G₂ на пленках различного состава. Указаны значения стандартного отклонения для 5-ти независимых измерений.

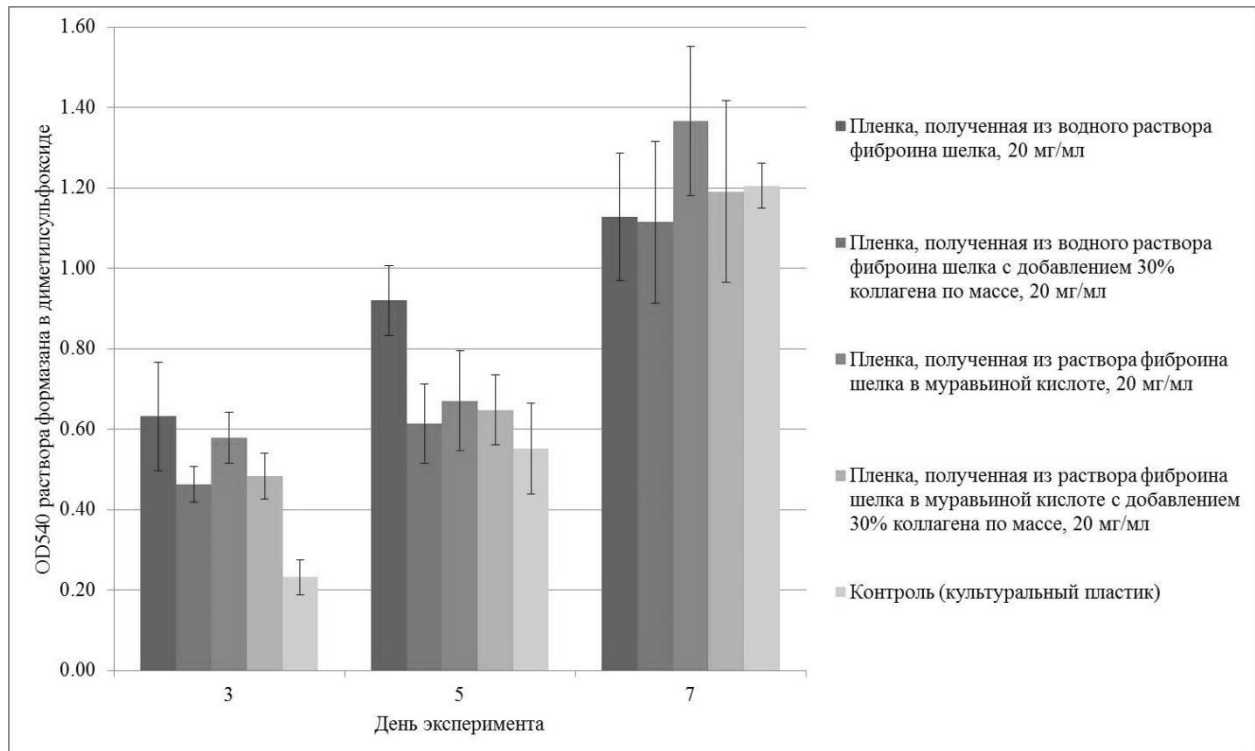


Рисунок 20. Проллиферативная активность фибробластов линии 3Т3 на пленках различного состава. Указаны значения стандартного отклонения для 5-ти независимых измерений.

Анализ адгезии и пролиферации клеток на микроволокнистых скаффолдах производили визуально с помощью флуоресцентного красителя DAPI. Для исследований использовали скаффолды, которые позиционировали на поверхности покровных стекол, в качестве контроля использовали покровные стекла без скаффолдов. По полученным изображениям проводили подсчет количества клеток на образцах скаффолдов. По результатам количественного анализа были построены гистограммы изменения количества клеток в поле микроскопа в разные дни эксперимента для двух линий клеток (рисунки 21, 22), а также были получены изображения ядер клеток на поверхности микроволокнистых скаффолдов с помощью флуоресцентного микроскопа в разные дни эксперимента (рисунки 23, 24).

В ходе эксперимента было показано, что микроволокнистые скаффолды поддерживают адгезию клеток обеих линий. Уровень адгезии клеток на образцах различного состава достоверно не отличался.

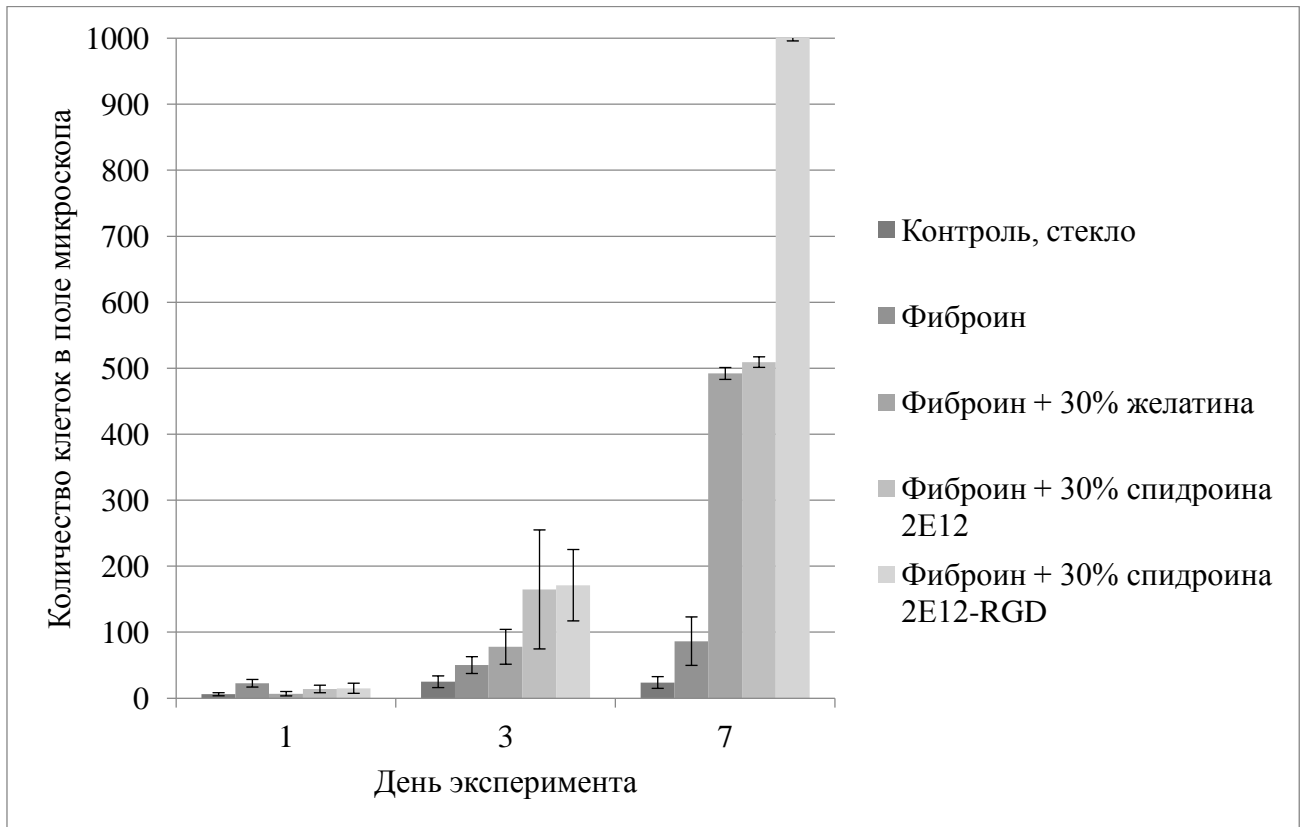


Рисунок 21. Адгезия (1 день) и пролиферативная активность (3, 7 день) клеток линии Нер-G₂ на микроволокнистых скаффолдах различного состава. Указаны значения стандартного отклонения для 10-ти независимых измерений.

Однако пролиферативная активность клеток линии Нер-G₂ на микроволокнистых скаффолдах с добавлением желатина и спидроинов на 7 день эксперимента была значительно выше и по сравнению со скаффолдами без композитных добавок, и по сравнению с контролем. При этом наибольшая пролиферативная активность клеток была зарегистрирована на микроволокнистых скаффолдах с добавлением спидроина 2E12-RGD, которые на 7 день эксперимента образовали плотный монослой.

В эксперименте с линией клеток 3T3 аналогичный эффект был отмечен на 7 день на микроволокнистых скаффолдах, содержащих желатин. Пролиферативная активность клеток на других микроволокнистых скаффолдах была значительно ниже, образование монослоя клеток не наблюдалось.

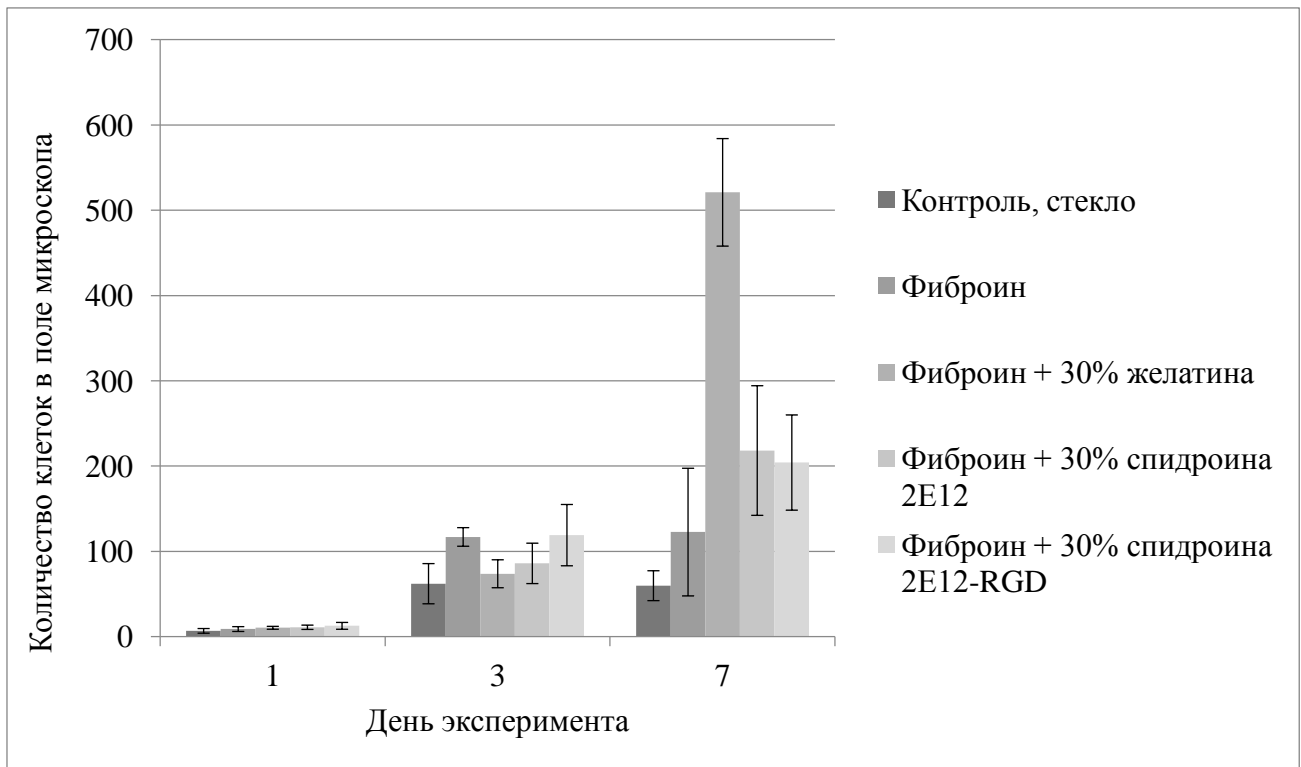


Рисунок 22. Адгезия (1 день) и пролиферативная активность (3, 7 день) клеток линии 3T3 на микроволокнистых скаффолдах различного состава. Указаны значения стандартного отклонения для 10-ти независимых измерений.

В ходе анализа методом световой микроскопии было выявлено, что адгезия клеток на образцах происходит не равномерно, в ходе пролиферации клетки проникают в более глубокие слои скаффолдов. Изображения ядер клеток, окрашенных DAPI, на микроволокнистых скаффолдах представлены на рисунки 23 и 24.

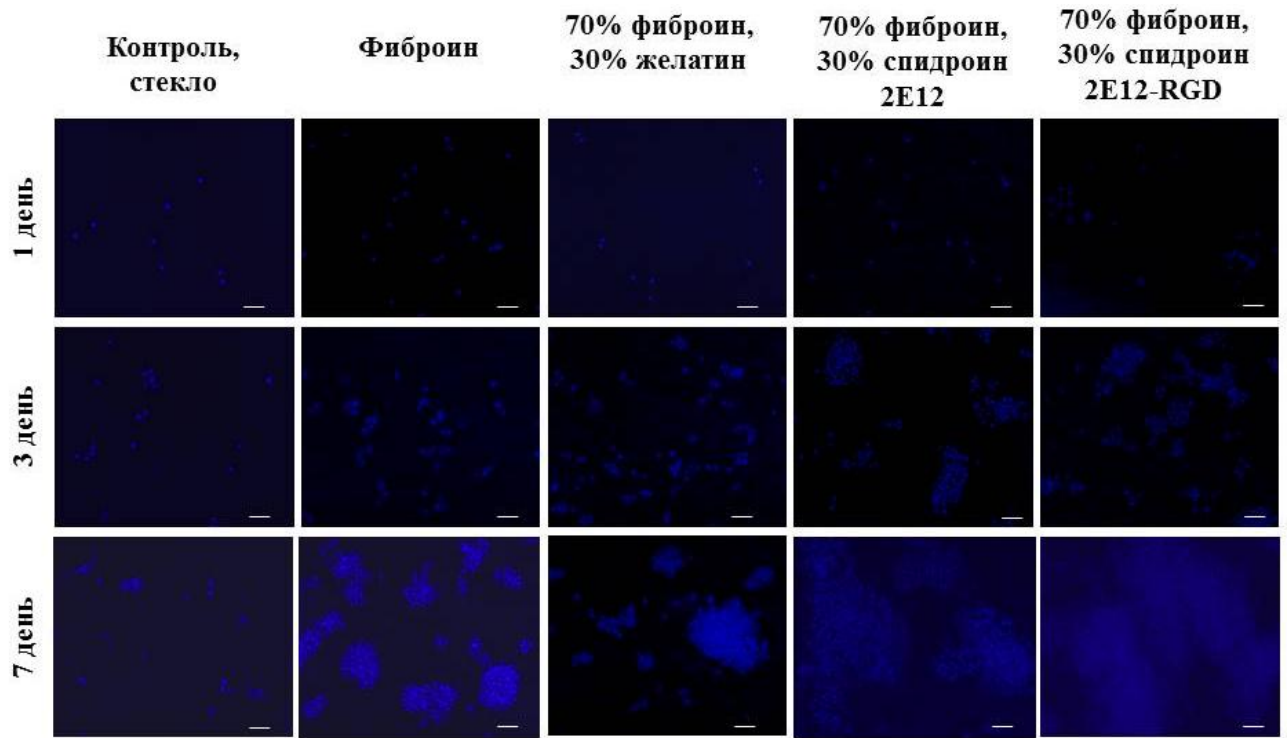


Рисунок 23. Адгезия (1 день) и пролиферативная активность (3, 7 день) клеток линии Her-G₂ на микроволокнистых скаффолдах различного состава. Окрашивание – DAPI. Размерный отрезок – 100 мкм.

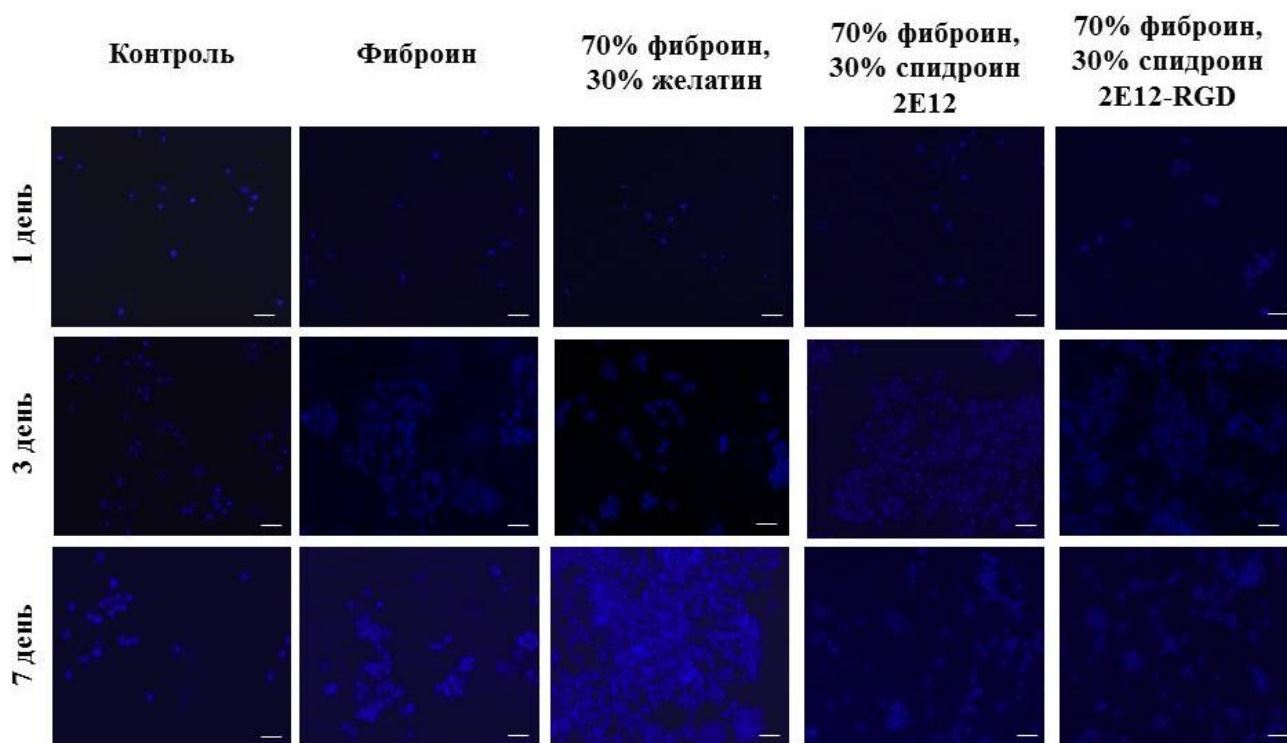


Рисунок 24. Адгезия (1 день) и пролиферативная активность (3, 7 день) клеток линии 3Т3 на микроволокнистых скаффолдах различного состава. Окрашивание – DAPI. Размерный отрезок – 100 мкм.

1.6.2. Исследование заживления полнослойной кожной раны крыс породы Wistar с помощью полученных пленок и микроволокнистых скаффолдов.

В эксперименте использовались самцы крыс породы Wistar массой 200-300 г. Экспериментальных животных разделяли на 9 групп (таблица 2). Каждой крысе моделировали полнослойную кожную рану диаметром 15 ± 1 мм с помощью хирургических ножниц и скальпеля. Животным групп №№2, 3, 4, 5 были имплантированы полученные пленки на основе фиброина шелка, животным групп №№6, 7, 8, 9 – микроволокнистые скаффолды на основе фиброина шелка. Группа №1 являлась контрольной – с животными этой группы производили все аналогичные манипуляции, однако, животным этой группы не имплантировали конструкции и на рану накладывали только стерильную марлевую повязку.

На 0-ой, 3-ий, 7-ой, 14-ый, 21-ый, 23-ий, 28-ой и 40-ой дни эксперимента получали изображения ран (рисунок 25). На рисунке не приведены изображения на 40-ой день эксперимента, так как не являются показательными, - к этому времени произошло заращание раны во всех группах, за исключением контрольной группы.

Для количественной оценки заживления раны измеряли диаметры ран 0-ой, 3-ий, 7-ой, 14-ый, 21-ый, 23-ий, 28-ой и 40-ой дни эксперимента (таблица 8). Полученные данные обрабатывали статистически и вычисляли процент уменьшения раны по формуле (1).

Таблица 8. Количественный анализ динамики заживления полнослойной кожной раны крыс породы Wistar. Указаны значения стандартного отклонения для 5-ти независимых измерений процента уменьшения раны (%).

№ группы	0 день	3 день	7 день	14 день	21 день	23 день	28 день
1	0	0	12,5±1,0	50,0±1,5	68,0±1,5	75,0±1,5	87,5±1,7
2	0	2,0±1,0	19,0±0,6	61,0±1,5	84,0±1,5	98,0±1,0	100
3	0	7,0±1,2	39,0±0,6	71,0±0,7	96,0±0,6	100	-
4	0	13,0±1,3	17,0±0,7	60,0±1,2	80,0±1,6	100	100
5	0	11,0±1,4	54,0±0,7	71,0±1,0	86,0±1,1	100	100
6	0	14,0±1,5	41,0±1,2	75,0±0,6	95,0±0,6	100	
7	0	2,0±1,7	44,0±1,0	70,0±1,5	93,0±0,6	100	
8	0	0	7,0±1,2	61,0±1,2	100		
9	0	0	23,0±1,5	64,0±0,6	100		

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 микроволокнистые скаффолды, содержащие в составе рекомбинантные спидроины. Эти скаффолды ускоряли заживление кожного покрова на 19 суток по сравнению с контролем и 3 суток по сравнению со скаффолдами, имеющими аналогичную структуру.

По полученным значениям были кривые заживления кожного покрова, отражающие изменение процента застания раны с течением времени, приведенные на рисунке 26.

Качественную оценку заживления проводили с помощью гистологических исследований. Забор образцов проводили в день полного застания раны ($A=100\%$). Полученные окрашенные срезы кожи крыс анализировали с помощью светового микроскопа (рисунок 27). На всех полученных срезах было выявлено наличие трех слоев кожи: эпидермис, дерма и гиподерма. Присутствие этих слоев свидетельствует об успешном заживлении раны.

Морфология срезов образцов кожи животных из экспериментальных групп не отличается от морфологии срезов нативной неповрежденной кожи крысы. Эпидермис кожи крысы состоит преимущественно из кератиноцитов, образующих между собой плотные контакты. Образцы кожи крыс из экспериментальных групп, в которых для заживления применяли пленки и микроволокнистые скаффолды, характеризуются интенсивной пролиферацией фибробластов в слое дермы, что свидетельствует о восстановлении дермы, и сопоставимо со строением дермы нативной кожи. Очагов воспаления на полученных срезах выявлено не было, что также является важным показателем, характеризующим успешное заживление кожного покрова.

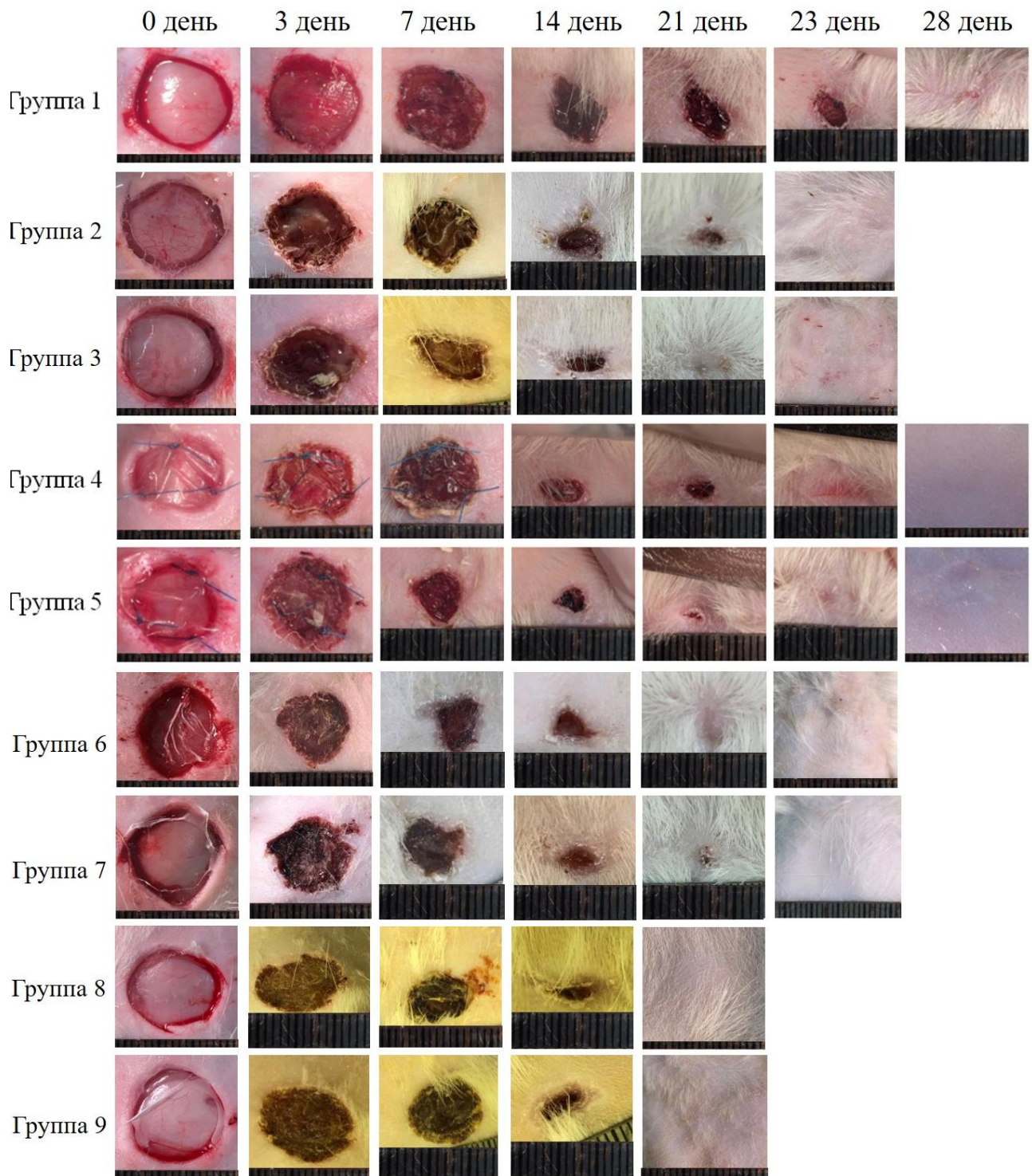


Рисунок 25. Изображения ран, полученные в течение эксперимента по заживлению полнослойной кожной раны крыс породы Wistar на 0-ой, 3-ий, 7-ой, 14-ый, 21-ый, 23-ий и 28-ой дни эксперимента.

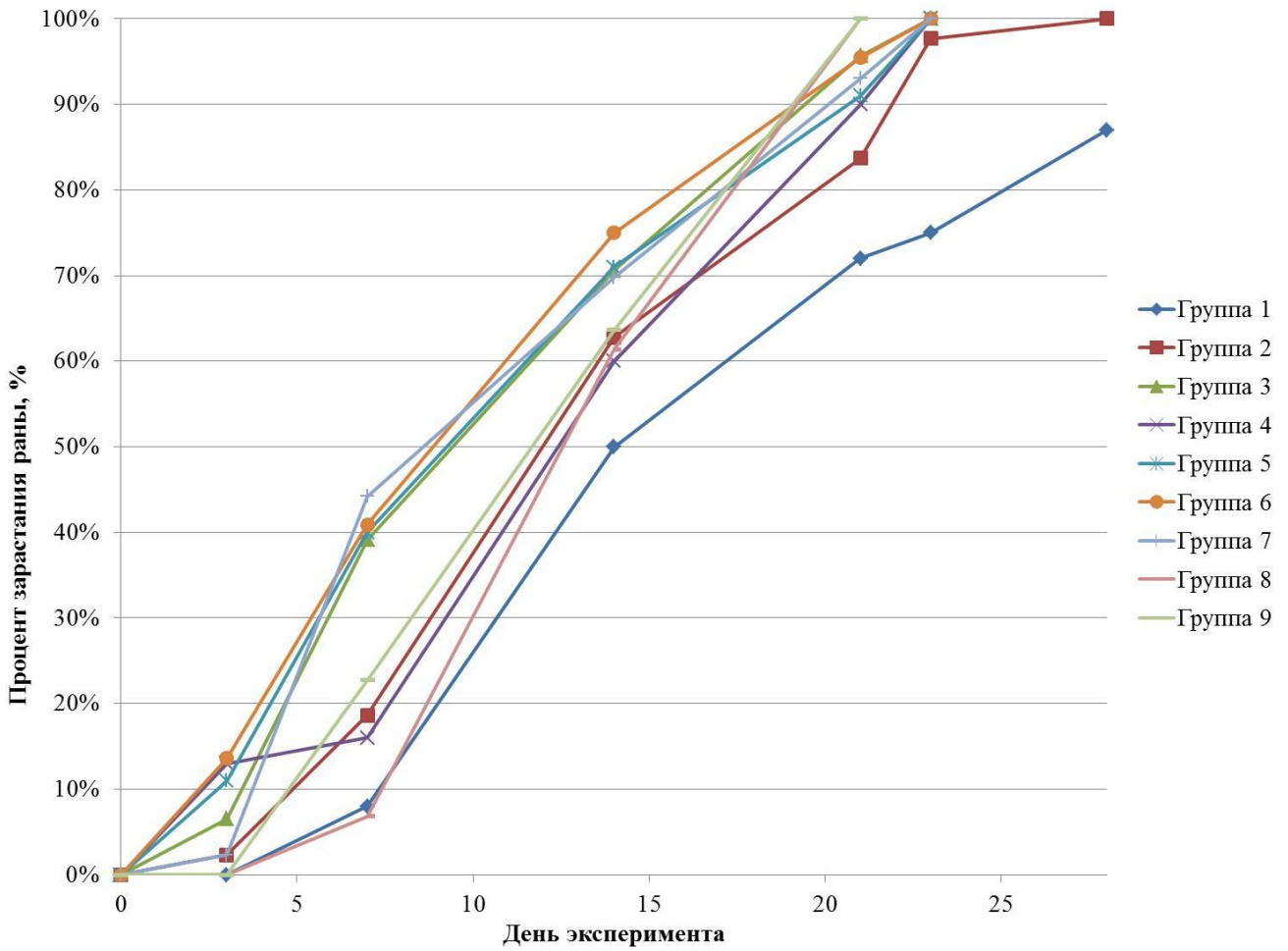


Рисунок 26. Кривые заживления кожного покрова крыс породы Wistar. Указаны значения процента застывания раны в разные дни эксперимента.

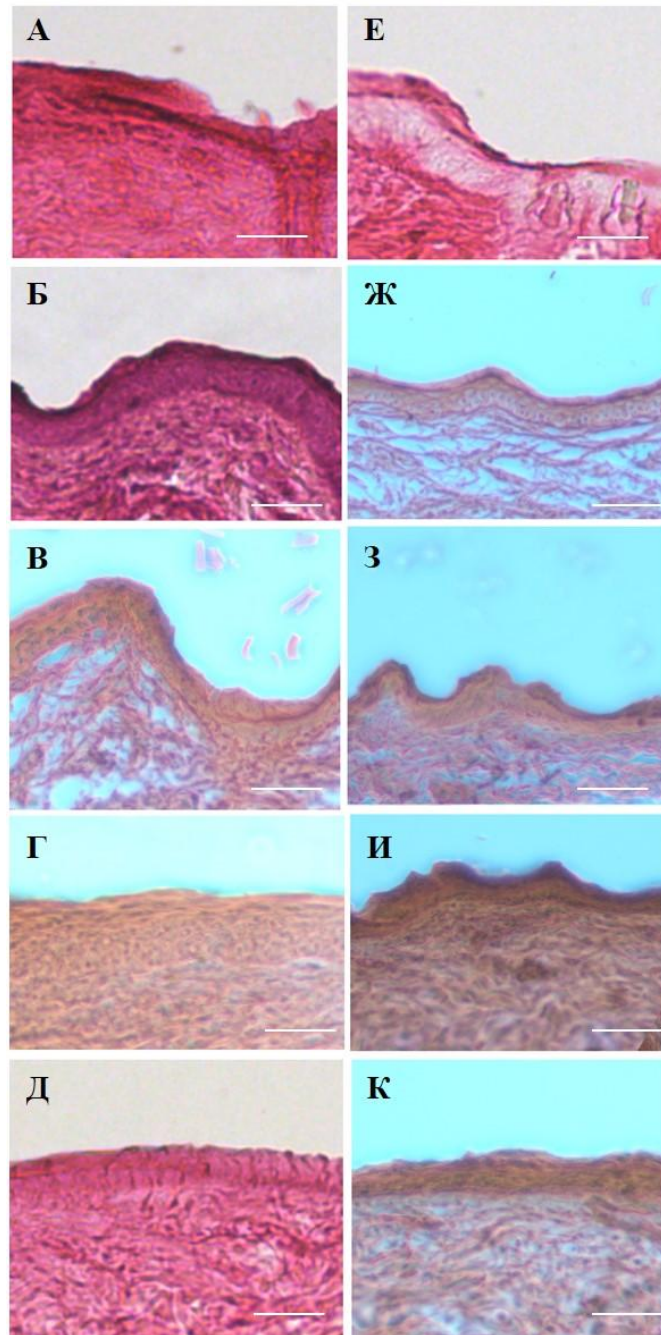


Рисунок 27. Изображения гистологических срезов кожи крыс в зоне полного заживления раны (А=100%), окрашенных гематоксилин-эозином, увеличение $\times 100$, масштаб – 100 мкм. А – нативная кожа крысы (норма), Б – группа 1 на 40 день эксперимента, В – группа 2 на 23 день эксперимента, Г – группа 3 на 23 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.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Для данного исследования были разработаны 2 группы конструкций с различной структурой – пленки, полученные методом полива, и микроволокнистые скаффолды, полученные методом электроспиннинга.

На первом этапе исследования были изготовлены 4 вида пленок из фиброина шелка тутового шелкопряда *B.mori* и коллагена I типа. Для получения пленок были выбраны два растворителя: вода и муравьиная кислота. Оба растворителя широко применяются в тканевой инженерии для различных полимеров, в том числе и фиброина шелка (Rajkhowa R. et al., 2011), при этом муравьиная кислота обладает свойством летучести, что значительно облегчает высушивание пленок в процессе их получения.

Все пленки были изготовлены методом полива на поверхность полированного тефлона и высушены при одинаковых условиях. Полученные пленки были бесцветными и имели толщину от 20 до 50 мкм (Сафонова Л.А. и др., 2015).

В качестве композитной добавки для улучшения биосовместимости пленок был выбран коллаген, полученный методом экстракции из сухожилий хвоста крыс породы Wistar (Chandrakasan G. et al., 1976). Раствор, полученный из сухожилий хвоста крыс, содержит от 60% до 85% коллагена, причем 60% от всего коллагена приходится на коллаген I типа (Kjaer M., 2004). Коллаген является самым распространенным белком межклеточного матрикса и имеет в своей структуре RGD-последовательность, к которой аффинны рецепторы-интегрины на поверхности клеток. Тройная спираль коллагена I типа содержит в своей первичной структуре 7 таких последовательностей: 4 из них находятся в первой и третьей цепях по 2 в каждой, а остальные 3 - во второй цепи (Сафонова Л.А. и др., 2015).

Конструкции второй группы – микроволокнистые скаффолды были получены методом электроспиннинга. 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. Манипуляции с параметрами позволяют получить конструкцию, структура которой имитирует структуру межклеточного матрикса восстанавливаемой ткани. Такие конструкции направляют миграцию клеток из здоровой ткани и их пролиферацию в объеме конструкции, что значительно улучшает ход регенерации ткани (Соколова А.И. и др., 2016).

Для данного исследования были получены 4 вида микроволокнистых скаффолдов на основе фиброина шелка тутового шелкопряда *B.mori* с добавлением различных полимеров. В качестве растворителя был выбран 1,1,1,3,3,3–гексафтор-пропанол-2, который обладает высокой летучестью и обеспечивает быстрое высыхание волокон на катоде. Это свойство растворителя является ключевым для получения скаффолда с правильной структурой, поскольку попадание растворителя на катод может вызвать растворение уже сформированных волокон и нарушить волокнистую структуру скаффолда (Соколова А.И. и др., 2016).

Поэтому при подборе параметров электроспиннинга было важным решение двух задач – не допустить формирования капель раствора полимера на конце иглы или на катоде при получении скаффолда и обеспечить сходную структуру всех микроволокнистых скаффолдов для дальнейшего изучения биологических свойств полученных скаффолдов. Важными параметрами для получения скаффолдов методом электроспиннинга являются концентрация раствора и скорость его подачи, диаметр иглы для подачи раствора, расстояние между иглой для подачи раствора и катодом, а также напряжение. Контроль параметров скаффолдов осуществляли путем световой микроскопии, для этого небольшое количество раствора напыляли с заданными параметрами на стекла, прикрепленные к поверхности катода. Для каждого вида скаффолдов были подобраны параметры, которые позволили решить поставленные задачи и получить микроволокнистые скаффолды со схожей структурой.

В качестве композитной добавки к фиброину шелка в составе скаффолдов предполагалось использовать коллаген, аналогичный тому, который был использован при получении пленок методом полива. Для этого раствор коллагена лиофильно высушивали, а затем полученный препарат растворяли в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-пропаноле-2. Однако растворимость коллагена в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-пропаноле-2 ограничена, вследствие чего полученный раствор не достигал требуемой концентрации. Поэтому в качестве композитной добавки было решено использовать продукт гидролиза коллагена – желатин типа А, который хорошо растворяется в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-пропаноле-2 и содержит RGD-последовательности в структуре.

В качестве другой композитной добавки был выбран рекомбинантный спидроин 2E12 и рекомбинантный спидроин 2E12-RGD, в состав которого введены дополнительные последовательности RGD для повышения его биосовместимости (Богуш В.Г. и др., 2006, Bogush V.G. et al., 2011). Включение спидроина в состав скаффолдов позволяет повысить их биосовместимость без снижения механической прочности и эластичности, что является преимуществом при имплантации скаффолдов, так как значительно облегчает проведение хирургических манипуляций.

Все полученные микроволокнистые скаффолды имели характерный молочно-белый цвет и толщину 10-30 мкм.

В ходе работы были изучены свойства полученных пленок и микроволокнистых скаффолдов, которые определяют возможность их применения в качестве конструкций для регенеративной медицины. Были изучены структура конструкций, скорость деградации *in vitro*, их механические свойства и цитотоксичность. Эти свойства определяют процессы адгезии и пролиферации клеток на поверхности конструкций как в системе *in vitro*, так и *in vivo*, а также возможность их имплантации в организм (Севастьянов В.И., 2011).

Анализ структуры всех полученных конструкций проводился двумя методами: с помощью сканирующей электронной микроскопии и с помощью сканирующей зондовой нанотомографии (Ефимов А.Е. и др., 2017).

Метод сканирующей электронной микроскопии позволил выявить на поверхности пленок микро- и нанорельеф в виде шероховатостей (Сафонова Л.А. и др., 2015). Известно, что поверхностная структура конструкции оказывает влияние на адгезию клеток (Zhang Q. et al., 2012). Это объясняется тем, что наличие шероховатостей на поверхности субстрата увеличивает площадь поверхности, доступную для адгезии клеток. В то же время, для каждой культуры клеток существует оптимальный уровень шероховатости субстрата (Сургученко В. и др., 2012).

Для количественной оценки шероховатости поверхности полученных пленок использовали метод атомно-силовой микроскопии. Средняя шероховатость поверхности пленок изготовленных из растворов полимеров в муравьиной кислоте была в диапазоне 70-90 нм, а пленок, изготовленных из водных растворов полимеров, - в диапазоне 30-60 нм. 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 (Сафонова Л.А. и др., 2015).

Внутренняя структура пленок была охарактеризована методом сканирующей зондовой нанотомографии. Данный метод имеет более высокое разрешение по сравнению со сканирующей электронной микроскопией и позволяет провести анализ внутренней структуры пленки с высоким разрешением. Внутренняя структура пленок была однородной и представляла собой плотно упакованные глобулы белка, 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, что может оказать существенное влияние на регенеративный потенциал пленки.

Несмотря на то, что отсутствие пор в структуре может вызвать накопление токсичных продуктов обмена веществ, выделяемых клетками, в области регенерации, оно также в равной степени может и способствовать регенерации.

Такая конструкция может поддерживать необходимую концентрацию питательных веществ в области регенерации и создавать барьер между восстанавливаемыми тканями и тканями, окружающими их. Аккумуляция подобных веществ в поврежденном участке ткани в первые несколько дней может стимулировать миграцию клеток здоровой ткани в область повреждения и направлять их пролиферацию, что обеспечивает ускорение процесса регенерации (Velnar T. et al., 2009). Это открывает перспективы применения пленок на основе фиброина шелка в качестве депо для направленной доставки веществ в области поврежденных тканей, а также регуляцию скорости высвобождения этих веществ.

Первичный анализ структуры микроволокнистых скаффолдов был проведен методом сканирующей электронной микроскопии. Этот метод позволил подтвердить волокнистую структуру скаффолдов и измерить толщину волокон в их составе, которая составляла 300-700 нм. Однако данный метод не позволяет получить детальной информации о структуре полученных скаффолдов и позволяет сравнить их структуру только на качественном уровне.

Дальнейший детальный анализ с высоким разрешением был проведен методом сканирующей зондовой нанотомографии. Данным методом 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. 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 микроволокнистых скаффолдов в системах *in vitro* и *in vivo*.

Пористость скаффолдов оказывает влияние не только на миграцию клеток в составе конструкции, но и определяет возможность скаффолдов пропускать различные низкомолекулярные и высокомолекулярные вещества. К таким веществам относятся факторы роста, цитокины, хемокины и другие вещества, необходимые для правильного развития ткани, компоненты межклеточного матрикса, синтезируемые клетками, такие как фибронектин, коллаген различных

типов и др. Помимо этого пористость скаффолдов обеспечивает удаление токсичных продуктов обмена веществ из области регенерации, либо их перераспределение до удаления и снижение концентрации, что может обеспечить восстановление обширных повреждений ткани.

Высокое разрешение, которым обладает метод сканирующей зондовой нанотомографии, позволяет проанализировать не только нано- и микроструктуру скаффолда, но и структуру отдельных волокон. Проведенный анализ позволил выявить рельеф в виде наношероховатостей на поверхности полученных волокон и визуализировать неоднородную внутреннюю структуру волокон, которая может оказывать значительное влияние на пролиферацию клеток в структуре скаффолдов. 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.

Одной из важнейших характеристик, определяющих пригодность конструкции для хирургии, являются его механические свойства. Для измерений были выбраны два параметра – прочность на разрыв и эластичность. Эти параметры являются наиболее важными для осуществления хирургических манипуляций, так как при хирургических манипуляциях с непрочными и ломкими конструкциями могут возникать сложности. Помимо этого, механические характеристики применяемого материала должны соответствовать механическим характеристикам нативной ткани, которая была повреждена. По результатам проведенных измерений пленки, содержащие в составе коллаген, имеют значительно меньшие показатели прочности на разрыв, по сравнению с пленками, изготовленными из чистого фиброина шелка. При этом добавление коллагена в состав пленки практически не влияет на показатель эластичности конструкции. Наиболее оптимальными механическими характеристиками обладают пленки, изготовленные из водного раствора фиброина шелка, так как имеют высокий

показатель механической прочности наряду с высоким показателем эластичности (Сафонова Л.А. и др., 2015).

Для адекватной оценки полученных данных измеренные значения механических характеристик пленок сравнили с аналогичными показателями других материалов, традиционно применяемых в тканевой инженерии – нейлона, лавсана и желатина (таблица 9) (Севастьянов В.И., 2011). Измеренные показатели попадают в диапазон, создаваемый показателями перечисленных материалов, что свидетельствует о пригодности полученных пленок для применения в хирургии.

Таблица 9. Механические характеристики материалов, применяемых в тканевой инженерии и измеренные характеристики полученных пленок.

Материал	Эластичность, %	Прочность на разрыв, МПа
Водный раствор фиброина	80,25	5,22
Водный раствор фиброина, содержащий 30% коллагена по массе	73	1,38
Раствор фиброина в муравьиной кислоте	30	3,09
Раствор фиброина, содержащий 30% коллагена по массе, в муравьиной кислоте	34	0,89
Нейлон	60-300	62-68
Лавсан	59-72	50-300
Желатин, ковалентно перешитый	102	3,22

Процесс деградации пленок был изучен в условиях двух сред: нейтральной и окисляющей. В качестве нейтральной среды использовали фосфатно-солевой

буфер, как систему, близкую по составу к внутренней среде организма. В таких условиях масса образцов за 28 дней изменилась в пределах 10%.

В качестве окисляющей среды применяли реактив Фентона, в состав которого входят соли двухвалентного железа, которое окисляется пероксидом водорода в ходе реакции Фентона, с образованием гидроксильных радикалов (Fenton H. J. H., 1894). Гидроксильные радикалы, взаимодействующие с образцом, моделируют реакции клеточного ответа на имплантат в условиях воспаления. В окисляющей среде масса образцов в среднем уменьшилась на 35%.

Деградация пленок с добавлением коллагена в окисляющих условиях сопровождалась резким ухудшением механических свойств и, как следствие, неспособностью пленки сохранять форму и его разрушением, в то время как пленки, в составе которых не было композитной добавки, сохраняли свою форму в течение всего эксперимента. Однако присутствие коллагена в составе существенно не повлияло на скорость деградации полученных пленок как в нейтральной, так и в окисляющей средах.

Динамика деградации конструкции определяет время нахождения конструкции в контакте с организмом. Полученные значения свидетельствуют о том, что пленки на основе фиброина шелка подвергаются деградации как в нейтральных условиях, так и в окисляющих, что может позволять клеткам метаболизировать аминокислоты, высвобождающиеся в процессе деградации фиброина шелка, и мигрировать в область повреждения, что способствует восстановлению поврежденных органов и тканей на месте конструкции после ее имплантации.

Дальнейшие исследования были направлены на изучение биосовместимости конструкций и оценку их регенеративного потенциала *in vivo*. Перед изучением адгезии и пролиферации клеток в составе конструкций был проведен тест на цитотоксичность, который определил пригодность образцов конструкций для дальнейших исследований. Как и ожидалось, ни одна группа полученных образцов не оказывала токсического эффекта на клетки.

Оценка адгезии и пролиферации клеток на полученных образцах проводилась на примере двух линий клеток – мышинных фибробластов линии 3Т3 и клеток гепатокарциномы человека Нер-G₂. Клетки обеих линий имеют рецепторы-интегрины, лигандом которых является RGD-последовательность, присутствующая в составе некоторых групп рассматриваемых скаффолдов. Клетки линии 3Т3 имеют множество интегринов различных типов, клетки линии Нер-G₂ имеют рецепторы-интегрины двух типов - $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ - (Rosenow F. et al., 2008).

Было выявлено, что все полученные пленки биосовместимы, при этом пролиферативная активность клеток на всех пленках увеличивается в ходе проведения эксперимента и её уровень сопоставим либо выше уровня пролиферативной активности клеток на контрольных образцах. Это может объясняться оптимальным уровнем шероховатости пленок и биосовместимыми свойствами фиброина шелка и коллагена. При этом ожидаемого увеличения пролиферативной активности клеток на поверхности пленок с добавлением коллагена выявлено не было. Это может объясняться тем, что молекулы фиброина экранируют RGD–последовательности, присутствующие в структуре коллагена, от рецепторов клеток (Сафонова Л.А. и др., 2015).

Сопоставляя данные средней шероховатости поверхности пленок, полученные методом сканирующей зондовой нанотомографии, с результатами теста по оценке пролиферативной активности клеток, можно сделать вывод о том, что полученные значения средней шероховатости пленок не оказывают влияния на пролиферативную активность клеток рассматриваемых линий в данных условиях.

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. 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.

На 7 день эксперимента ожидаемый эффект увеличения пролиферативной активности проявился на других микроволокнистых скаффолдах, содержащих композитные добавки, что также может объясняться деградацией скаффолдов и открытием RGD-последовательностей для адгезии клеток. Однако на микроволокнистых скаффолдах, содержащих желатин, клетки образовывали многослойные кластеры, что значительно затрудняло их подсчет, поэтому данный результат может быть не достоверным. Такое явление является характерным для клеток линии Нер-G₂ и связано с особенностями пролиферации данной линии клеток. Наибольшая пролиферативная активность клеток была зарегистрирована на скаффолдах с добавлением рекомбинантного спидроина, модифицированного RGD-последовательностью, - клетки в составе данных скаффолдов сформировали плотный монослой.

Анализ адгезии клеток линии 3Т3 также, как и в случае линии клеток Нер-G₂, не выявил существенных отличий между микроволокнистыми скаффолдами различного состава. Пролиферативная активность клеток на 3 день эксперимента на скаффолдах различного состава также существенно не отличалась и была сопоставима с контролем, что может быть связано, как с особенностями клеток

линии 3ТЗ, так и с экранированием RGD-последовательности. На 7 день эксперимента наибольшая пролиферативная активность клеток данной линии наблюдалась на микроволокнистых скаффолдах, содержащих желатин. Монослой клеток на данных скаффолдах не сформировался, но наблюдались обширные области с плотным монослоем.

Методика подсчета клеток в составе пленок и микроволокнистых скаффолдов отличалась. Изолированные пленки, как и пленки в виде покрытий, рассеивают свет, что значительно затрудняет детекцию клеток на их поверхности и снижает достоверность полученных данных. Микроволокнистые скаффолды значительно набухают и адгезируют к поверхности культурального пластика и стекла, поэтому оценка пролиферативной активности клеток на их поверхности методом МТТ также вызывает трудности при детекции.

Изученные свойства пленок и микроволокнистых скаффолдов позволяют рассматривать их как перспективные конструкции для регенеративной медицины, которые могут использоваться в качестве раневых покрытий (Luangbudnark W., 2012). В качестве системы для оценки регенеративного потенциала конструкций была выбрана модель заживления кожной раны крысы (Pavankumar K.N., 2013). Экспериментальным животным наносили рану диаметром 15 ± 1 мм в области лопаток с помощью хирургических ножниц. Животным в контрольной группе рану закрывали стерильной повязкой (Сафонова Л.А. и др., 2016).

Все виды конструкций были успешно имплантированы крысам. Различия в свойствах конструкций определяют ход процесса имплантации. Пленки, изготовленные из водных растворов, являются гигроскопичными и легко фиксируются на поверхности раны даже без наложения швов, а также 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, и, как следствие, разрушения структуры пленки – образования трещин, изгибов, нарушения 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 требуется поддерживать уровень влажности скаффолда, что значительно сокращает 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.

Количественная оценка заживления раны была проведена по изменению размера раны (1). Образцы всех видов ускорили заживление кожной раны по сравнению с контролем – стерильной марлевой повязкой.

При этом пленки, изготовленные из водных растворов полимеров, ускорили процесс заживления раны в большей степени, чем пленки, изготовленные из растворов полимеров в муравьиной кислоте. Такой результат можно объяснить тем, что пленки из водных растворов полимеров не требовали фиксации на поверхности раны путем пришивания, в то время как при позиционировании на ране пленок на основе растворов в муравьиной кислоте было необходимо пришивать пленку, что приводило к дополнительным повреждениям кожного покрова и осложнению хода заживления раны.

Среди микроволокнистых скаффолдов наибольший регенеративный потенциал был выявлен у скаффолдов, содержащих в составе спидроин 2E12 и спидроин 2E12-RGD. Стоит отметить, что скорость заживления кожного покрова при применении микроволокнистых скаффолдов такого состава отличалась от других микроволокнистых скаффолдов на 3 дня, однако, нельзя рассматривать этот результат как статистически значимый, так как в рамках экспериментального

временного промежутка это короткий срок для того, чтобы увидеть отличия в регенеративном потенциале.

Большой интерес представляет сравнение скорости заживления кожного покрова с помощью конструкций с различной структурой. Различий в скорости заживления полнослойной раны кожи между конструкциями аналогичного состава, полученными методами полива и электроспиннинга, выявлено не было. Ожидать эффект увеличения скорости заживления полнослойной раны кожи можно было бы в случае, когда микроволокнистые скаффолды соответствовали по структуре межклеточному матриксу кожи. В рамках данного исследования не стояла задача создать скаффолд, который будет имитировать структуру кожи. Данные конструкции наравне с пленками, полученными методом полива, характеризуются высоким регенеративным потенциалом, но не имитируют структуру здоровой ткани кожи, а также не соответствуют по толщине кожному покрову крысы.

Полученный результат также можно объяснить тем, что согласно данным литературы (Ni S. et al., 2014), адгезия и пролиферация фибробластов происходит тем быстрее, чем выше шероховатость субстрата. Это может быть другой возможной причиной более выраженного эффекта ускорения заживления ран при использовании конструкций в виде пленок, так как для них характерны более высокие показатели шероховатости по сравнению с поверхностью волокон, входящих в состав микроволокнистых скаффолдов. В настоящее время ведется разработка методик, позволяющих изменять поверхностную структуру конструкций для улучшения их адгезионных свойств и повышения пролиферативной активности кератиноцитов и фибробластов, которые играют важную роль в процессах заживления кожных ран (Karahaliloghlu Z. et al., 2015). Таким образом, конструкцию в виде пленки можно рассматривать как непористую биodeградируемую повязку, которая имеет биологическую активность и способна ускорить заживление раны.

Помимо различий в скорости заживления ран была выявлена особенность динамики заживления ран у животных групп 3 и 5, которым были

имплантированы пленки, полученные из растворов фиброина шелка с добавлением коллагена. В отличие от остальных зависимостей, рассматриваемая зависимость не имеет протяженного начального участка, а резко возрастает, начиная с 3-его дня эксперимента. По данным литературы с 3-его по 15-ый дни заживления раны фибробласты начинают активно синтезировать компоненты межклеточного матрикса кожи, в том числе коллаген (Velnar T. et al., 2009). Состав коллагена, использованного для изготовления пленок, близок к составу коллагена кожи крыс - основой матрикса кожи крыс является коллаген I типа, на долю которого приходится 80% от сухой массы матрикса дермы, а также в его состав входит коллаген III и V типов (Sen L. et. al, 2008). Технология получения раствора коллагена, используемая в данной работе, позволяет выделить из сухожилий крыс коллаген I и III типов. Таким образом, коллаген в составе пленки может стимулировать процесс заживления раны за счет образования необходимых для метаболизма клеток аминокислот при деградации под действием ферментов-коллагеназ, расщепляющих коллаген типов I и III, выделяемых фибробластами.

Аналогичный ход заживления наблюдался при применении микроволокнистых скаффолдов на основе фиброина шелка без добавления и с добавлением желатина. Это можно объяснить тем, что заживление раны начинается с ее более глубоких слоев, где микроволокнистая структура позволила клеткам мигрировать в область повреждения с более высокой скоростью, что на первых этапах помогло запустить процессы заживления.

Судить о высоком регенеративном потенциале всех полученных конструкций позволяют данные гистологических исследований, согласно которым в областях заживления не было очагов воспаления и произошло успешное восстановление всех слоев кожного покрова. 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 характеризуется рельефом в виде наношероховатостей 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 СОКРАЩЕНИЙ

DMEM – среда Игла, модифицированная по методу Дульбекко

DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол

MTT – 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромид

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биосовместимые материалы. Учебное пособие. / Под ред. В. И. Севастьянова, М.П. Кирпичникова. - М. : ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2011.
2. Биосовместимость, / Под ред. В. И. Севастьянова. - М. : ИЦ ВНИИ геосистем, 1999. - 47-87 с.
3. Биохимия: учебник для вузов. / Ред. Е. С. Северина. - М. : ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 687 с.
4. Абдеева И. А. Экспериментальные модели трансгенных растений, перспективных для новейших биотехнологий / И. А. Абдеева, И. В. Голденкова-Павлова, М. В. Мокрякова, Л. В. Волкова, В. Г. Богуш, Сидорук К.В., Юрьева Н.О., Дебабов В.Г., Пирузян Э.С. // Цитология и генетика. - 2007. - Т. 41. - № 3. - с. 55-61.
5. Агапов И. И. Биodeградируемые матриксы из регенерированного шелка *Bombyx mori* / И. И. Агапов, М. М. Мойсенович, Т. В. Васильева, О. Л. Пустовалова, А. С. Коньков, А. Ю. Архипова, О. С. Соколова, В. Г. Богуш, В. И. Севастьянов, В. Г. Дебабов, М. П. Кирпичников / Доклады академии наук. - 2010. - Т. 433. - № 5. - с. 699-702.
6. Агапов И. И. Биокomпозитные матриксы из фиброина шелка и наногидроксиапатита для регенерации костной ткани / И. И. Агапов, М. М. Мойсенович, Т. В. Дружинина, Я. А. Каменчук, К. В. Трофимов, Т. В. Васильева, А. С. Коньков, А. Ю. Архипова, О. С. Соколова, В. В. Гузеев, М. П. Кирпичников // Доклады академии наук. - 2011. - Т.440. - № 6. - с. 830-833.
7. Богуш В. Г. Получение, очистка и прядение рекомбинантного аналога спидроина 1 / Богуш В.Г., Сазыкин А.Ю., Давыдова Л.И., Мартиросян В.В., Сидорук К.В., Глазунов А.В., Акишина Р.И., Шматченко Н.А., Дебабов В.Г. // Биотехнология. - 2006. - № 4. - с. 3-12.

8. 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.
9. Мойсенович М. М. Композитные матрицы на основе фиброина шелка, желатина и гидроксиапатита для регенеративной медицины и культивирования клеток в трехмерной культуре / М. М. Мойсенович, А. Ю. Архипова, А. А. Орлова, М. С. Друцкая, С. В. Волкова, С. Е. Захаров, И. И. Агапов, М. П. Кирпичников // Acta Natur. - 2014. - Т. 6. - № 1 (20). - с. 103-109.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Сургученко В. А. Особенности адгезии и пролиферации фибробластов мыши линии NIH/3T3 на пленках из бактериального сополимера поли(3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерата) с различной шероховатостью поверхности / В. А. Сургученко, А. С. Пономарева, А. Е. Ефимов, Е. А. Немец, И. И. Агапов, В. И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. - 2012. - Т. 14. - № 1. - с. 72-77.

14. Abercombie M. Contact inhibition in tissue culture / M. Abercombie // *In Vitro*. - 1970. - v. 6(2). - p. 128-142.
15. Aldana A. A. Current advances in electrospun gelatin-based scaffolds for tissue engineering applications / A. A. Aldana, G. A. Abraham // *Int J Pharm*. - 2017. - v. 523(2). - p. 441-453.
16. Baklaushev V. P. Tissue Engineered Neural Constructs Composed of Neural Precursor Cells, Recombinant Spidroin and PRP for Neural Tissue Regeneration / V.P. Baklaushev, V. G. Bogush, V. A. Kalsin, N. N. Sovetnikov, E. M. Samoilova, V. A. Revkova, K. V. Sidoruk, M. A. Konoplyannikov, P. S. Timashev, S. L. Kotova, K. B. Yushkov, A. V. Averyanov, A. V. Troitskiy, J. E. Ahlfors // *Sci Rep*. - 2019. - v. 9(1). - p. 3161.
17. Bellas E. In vitro 3D Full-Thickness Skin-Equivalent Tissue Model Using Silk and Collagen Biomaterials / E. Bellas, M. Seiberg, J. Garlick, D. L. Kaplan // *Macromol Biosci*. – 2012. - v. 12(12). - p. 1627–1636.
18. Bhardwaj N. Silk fibroin-keratin based 3D scaffolds as a dermal substitute for skin tissue engineering / N. Bhardwaj, W. T. Sow, D. Devi, K. W. Ng, B. B. Mandal, N.-J. Cho // *Integr Biol (Camb)*. - 2015. - v. 7(1). - p. 53-63.
19. Cen L. Collagen Tissue Engineering: Development of Novel Biomaterials and Applications / L. Cen, W. Liu, L. Cui, W. Zhang, Y. Cao // *Pediatr Res*. - 2008. - v. 63(5). - p. 492-496.
20. Binan L. Differentiation of neuronal stem cells into motor neurons using electrospun poly-l-lactic acid/gelatin scaffold / L. Binan, C. Tendey, G. De Crescenzo, R. El Ayoubi, A. Ajji, M. Jolicoeur // *Biomaterials*. - 2014. - v. 35. - p. 664-674.
21. Bhattacharjee M. The role of 3D structure and protein conformation on the innate and adaptive immune responses to silk-based biomaterials / M. Bhattacharjee, E. Schultz-Thater, E. Trella, S. Miot, S. Das, M. Loparic, A. R. Ray, I. Martin, G. C. Spagnoli, S. Ghosh // *Biomaterials*. - 2013. - v. 34(33). - p. 8161-8171.

22. Blackledge T. A. Spider silk: a brief review and prospectus on research linking biomechanics and ecology in draglines and orb webs / T. A. Blackledge // *J Arachnology*. - 2012. - v. 40. - p. 1–12.
23. Bogush V. G. Recombinant analogue of spidroin 2 for biomedical materials / V. G. Bogush, K. V. Sidoruk, L. I. Davydova, I. A. Zalunin, D. G. Kozlov, M. M. Moisenovich, I. I. Agapov, M. P. Kirpichnikov, V. G. Debabov // *Dokl Biochem Biophys*. - 2011. - v. 441. - p. 276-279.
24. Bogush V. G. A novel model system for design of biomaterials based on recombinant analogs of spider silk proteins / V. G. Bogush, O. S. Sokolova, L. I. Davydova, D. V. Klinov, K. V. Sidoruk, N. G. Esipova, T. V. Neretina, I. A. Orchanskyi, V. Y. Makeev, V. G. Tumanyan, K. V. Shaitan, V. G. Debabov, M. P. Kirpichnikov // *J Neuroimmune Pharmacol*. - 2009. - v. 4(1). - p. 17-27.
25. Bray L. J. A dual-layer silk fibroin scaffold for reconstructing the human corneal limbus / L. J. Bray, A. K. George, D. W. Hutmacher, T. V. Chirila, D. G. Harkin // *Biomaterials*. - 2012. - v. 33. - p. 3529-3538.
26. Cao Y. Biodegradation of silk biomaterials / Y. Cao, B. Wang // *Int J Mol Sci*. - 2009. - v. 10(4). - p. 1514-1524.
27. Chandrakasan G. Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution / G. Chandrakasan, D. A. Torchia, K. A. Piez // *J Biol Chem*. - 1976. - v. 251(19). - p. 6062-6067.
28. Chomchalao P. Fibroin and fibroin blended three-dimensional scaffolds for rat chondrocyte cultures / P. Chomchalao, S. Pongcharoen, M. Sutheerawattananonda, W. Tiyaboonchai // *Biomed Eng Online*. - 2013. - v. 8. - p. 12-28.
29. Correia C. Development of silk-based scaffolds for tissue engineering of bone from human adipose-derived stem cells / C. Correia, S. Bhumiratana, L.-P. Yan, A. L. Oliveira, J. M. Gimble, D. Rockwood, D. L. Kaplan, R. A. Sousa, R. L. Reis, G. Vunjak-Novakovic // *Acta Biomater*. - 2012. - v. 8(7). - p. 2483–2492.

30. Deng J. A silk fibroin/chitosan scaffold in combination with bone marrow-derived mesenchymal stem cells to repair cartilage defects in the rabbit knee / J. Deng, R. She, W. Huang, Z. Dong, G. Mo, B. Liu // *J Mater Sci Mater Med.* - 2013. - v. 24(8). - p. 2037-2046.
31. Diab T. A silk hydrogel-based delivery system of bone morphogenetic protein for the treatment of large bone defects / T. Diab, E. M. Pritchard, B. A. Uhrig, J. D. Boerckel, D. L. Kaplan, R. E. Guldberg // *J Mech Behav Biomed Mater.* - 2012. - v. 11, p. 123-131.
32. Echave M. C. Recent advances in gelatin-based therapeutics / R. Hernáez-Moya, L. Iturriaga, J. L. Pedraz, R. Lakshminarayanan, A. Dolatshahi-Pirouz, N. Taebnia, G. Orive // *Expert Opin Biol Ther.* - 2019. - v. 22. - p. 1-7.
33. Farè S. In vitro study on silk fibroin textile structure for Anterior Cruciate Ligament regeneration / S. Farè, P. Torricelli, G. Giavaresi, S. Bertoldi, A. Alessandrino, T. Villa, M. Fini, M. C. Tanzi, G. Freddi // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* - 2013. - v. 33(7). - p. 3601–3608.
34. Fenton H. J. H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron / H. J. H. Fenton // *J. Chem. Soc.* - 1894. - v. 65. - p. 899–911.
35. Ghanaati S. Fine-tuning scaffolds for tissue regeneration: effects of formic acid processing on tissue reaction to silk fibroin / S. Ghanaati, C. Orth, R. E. Unger, M. Barbeck, M. J. Webber, A. Motta, C. Migliaresi, C. J. Kirkpatrick // *J Tissue Eng Regen Med.* - 2010. - v. 4. - p. 464-472.
36. Ghassemifar R. Advancing Towards a Tissue-engineered Tympanic Membrane: Silk Fibroin / R. Ghassemifar, S. Redmond, Z. T. Chirila // *J Biomater Appl.* - 2010. - v. 24(7). - p. 591-606.
37. Ghaznavi A. M. Silk Fibroin Conduits: A Cellular and Functional Assessment of Peripheral Nerve Repair / A. M. Ghaznavi, E. L. Kokai, M. L. Lovett, D. L. Kaplan, K. G. Marra // *Ann Plast Surgery.* - 2011. - v. 66(3). - p. 273–279.
38. Ghezzi C. E. Mesenchymal stem cell-seeded multilayered dense collagen-silk fibroin hybrid for tissue engineering applications / C. E. Ghezzi, B. Marelli, N.

- Muja, N. Hirota, J. G. Martin, J. E. Barralet, A. Alessandrino, G. Freddi, S. N. Nazhat // *Biotechnol J.* - 2011. - v. 6. - p. 1198–1207.
39. Gil E. S. Functionalized Silk Biomaterials for Wound Healing / E. S. Gil, B. Panilaitis, E. Bellas, D. L. Kaplan // *Adv Healthc Mater.* - 2013. - v. 2. - p. 206–217.
 40. Gomes S. R. In vitro and in vivo evaluation of electrospun nanofibers of PCL, chitosan and gelatin: A comparative study / S. R. Gomes, G. Rodrigues, G. G. Martins, M. A. Roberto, M. Mafra, C. M. R. Henriques, J. C. Silva // *Mat. Sci. Eng.* - 2015. - v. 46. - p. 348-358.
 41. Gotoh Y. Preparation of lactose–silk fibroin conjugates and their application as a scaffold for hepatocyte attachment / Y. Gotoh, S. Niimi, T. Hayakawa, T. Miyashita // *Biomaterials.* - 2004. - v. 25(6). - p. 1131–1140.
 42. Gu Y. Chitosan/silk fibroin-based, Schwann cell-derived extracellular matrix-modified scaffolds for bridging rat sciatic nerve gaps / Y. Gu, J. Zhu, C. Xue, Z. Li, F. Ding, Y. Yang, X. Gu // *Biomaterials.* - 2014. - v. 35(7). - p. 2253-2263.
 43. Guan L. Chitosan-functionalized silk fibroin 3D scaffold for keratocyte culture / L. Guan, P. Tian, H. Ge, X. Tang, H. Zhang, L. Du, P. Liu // *J Mol His.* - 2013. - v. 20. - p. 11-17.
 44. Hayashi C. Y. Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins / C. Y. Hayashi, N. H. Shipley, R. V. Lewis // *Int J Biol Macromol.* - 1999. - v. 24. - p. 271–275.
 45. He Y.-H. N-Terminal Domain of Bombyx mori Fibroin Mediates the Assembly of Silk in Response to pH Decrease / Y.-H. He, N.N. Zhang, W-F. Li, N. Jia, B.-Y. Chen, K. Zhou, J. Zhang, Y. Chen, C.-C. Zhou // *J Mol Biol.* - 2012. - v. 418(3-4). - p. 197-207.
 46. Hinman M. B. Synthetic spider silk: a modular fiber / M. B. Hinman, J. A. Jones, R. V. Lewis // *Trends Biotechnol.* - 2000. - v. 18. - p. 374–379.
 47. Hu Y. The Relationship between Secondary Structure and Biodegradation Behavior of Silk Fibroin Scaffolds / Y. Hu, Q. Zhang, R. You, L. Wang, M. Li // *Adv Mater Sci and Eng.* - 2012. - v. 2012. - p. 21-25.

48. Schultz I. Pulmonary Insulin-like Growth Factor I Delivery from Trehalose and Silk-Fibroin Microparticles / I. Schultz, F. Vollmers, T. Lühmann, J.-C. Rybak, R. Wittmann, K. Stank, H. Steckel, B. Kardziev, M. Schmidt, P. Högger, L. Meinel // *ACS Biomater Sci Eng.* - 2015. - v. 1. - p. 119–129.
49. Karahaliloghlu Z. Nanofeatured silk fibroin membranes for dermal wound healing applications / Z. Karahaliloghlu, B. Ercan, E. B. Denkbaz, T. J. Webster // *J Biomed Mater Res A.* - 2015. - v. 103(1). - p. 135-144.
50. Kasoju N. Silk fibroin based biomimetic artificial extracellular matrix for hepatic tissue engineering applications / N. Kasoju, U. Bora // *Biomed Mater.* - 2012. - v. 7(4). - p. 1-12.
51. Kim H. H. Surface-modified silk hydrogel containing hydroxyapatite nanoparticle with hyaluronic acid–dopamine conjugate / H. H. Kim, J. B. Park, M. J. Kang, Y. H. Park // *Int J Biol Macromol.* - 2014. - v. 70. - p. 516-522.
52. Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading / M. Kjaer // *Physiol Rev.* - 2004. - v. 84(2). - p. 649-698.
53. Kuboyama N. Silk fibroin-based scaffolds for bone regeneration / N. Kuboyama, H. Kiba, K. Arai, R. Uchida, Y. Tanimoto, U. K. Bhawal, Y. Abiko, S. Miyamoto, D. Knight, T. Asakura, N. Nishiyama // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* - 2013. - v. 101(2). - p. 295-302.
54. Kundu B. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations / B. Kundu, R. Rajkhowa, C. S. Kundu, X. Wang // *Adv Drug Deliv Rev.* - 2013. - v. 65. - p. 457-470.
55. Leitinger B. Transmembrane Collagen Receptors / B. Leitinger // *Annu Rev Cell Dev Biol.* - 2011. - v. 27. - p. 265–290.
56. Levin B. Grafts in myringoplasty: utilizing a silk fibroin scaffold as a novel device / B. Levin, R. Rajkhowa, S. L. Redmond, M. D. Atlas // *Exp Rev Med Dev.* - 2009. - v. 6(6). - p. 653-664.
57. Lima P. A. L. Preparation, characterization and biological test of 3D-scaffolds based on chitosan, fibroin and hydroxyapatite for bone tissue engineering / P. A.

- L. Lima, C. X. Resende, G. Soares, K. Anselme, L. E. Almeida // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* - 2013. - v. 33(6). - p. 3389–3395.
58. Li S. Vascular tissue engineering: from in vitro to in situ / S. Li, D. Sen Gupta, S. Chien // *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* - 2014. – v. 6(1). - p. 61-76.
59. Liu J. Silk Fibroin as a Biomaterial Substrate for Corneal Epithelial Cell Sheet Generation, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* / J. Liu, B. D. Lawrence, A. Liu, I. R. Schwab, L. A. Oliveira, M. A. Rosenblatt // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2012. - v. 53(7). – p. 4130-4138.
60. Liu J. Controlled-release neurotensin-loaded silk fibroin dressings improve wound healing in diabetic rat model / J. Liu, L. Yan, W. Yang, Y. Lan, Q. Zhu, H. Xu, C. Zheng, R. Guo // *Bioact Mater.* - 2019. - v. 28(4). - p. 151-159.
61. Liu S. Bilayered vascular grafts based on silk proteins / S. Liu, C. Dong, G. Lu, Q. Lu, Z. Li, D. L. Kaplan, H. Zhu // *Acta Biomater.* – 2013. – v. 9(11). – p. 8991-9003.
62. Lu G. Silk porous scaffolds with nanofibrous microstructures and tunable properties / G. Lu, S. Liu, S. Lin, D. L. Kaplan, Q. Lu // *Colloids Surf B Biointerfaces.* - 2014. - v. 120. – p. 28-37.
63. Luangbudnark W. Properties and Biocompatibility of Chitosan and Silk Fibroin Blend Films for Application in Skin Tissue Engineering / W. Luangbudnark, J. Viyoch, W. Laupattarakasem, P. Surakunprapha, P. Laupattarakasem // *The Sci World J.* - 2012. - v. 2012. - p. 1-10.
64. Luo J. Self-Assembly of Collagen-Mimetic Peptide Amphiphiles into Biofunctional Nanofiber / J. Luo, Y. Tong // *Acs Nano.* - 2011. - v. 5(10). - p. 7739-7747.
65. Mandal B.B. Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds / B. B. Mandal, C. S. Kundu // *Biomaterials.* – 2009. - v. 30. – p. 2956–2965.
66. Meng Z. X. Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering / Z. X. Meng, Y. S. Wang,

- C. Ma, W. Zheng, L. Li, Y. F. Zheng // *Mater. Sci. Eng.* - 2010. - v. 30. - p. 1204–1210.
67. Mobini S. Fabrication and characterization of regenerated silk scaffolds reinforced with natural silk fibers / S. Mobini, B. Hoyer, M. Solati-Hashjin, A. Lode, N. Nosoudi, A. Samadikuchaksaraei, M. Gelinsky // *J Biomed Mater Res A.* - 2013. - v. 101(8). - p. 2392-2404.
68. Moisenovich M.M. Novel 3D-microcarriers from recombinant spidroin for regenerative medicine / M. M. Moisenovich, N. V. Malyuchenko, A. Y. Arkhipova, M. S. Kotlyarova, L. I. Davydova, A. V. Goncharenko, O. I. Agapova, M. S. Drutskaya, V. G. Bogush, I. I. Agapov, V. G. Debabov, M. P. Kirpichnikov // *Dokl Biochem Biophys.* - 2015. - v. 463. - p. 232-235.
69. Moisenovich M.M. Tissue regeneration in vivo within recombinant spidroin 1 scaffolds / M. M. Moisenovich, O. Pustovalova, J. Shackelford, T. V. Vasiljeva, T. V. Druzhinina, Y. A. Kamenchuk, V. V. Guzeev, O. S. Sokolova, V. G. Bogush, V. G. Debabov, M. P. Kirpichnikov, I. I. Agapov // *Biomaterials.* - 2012. - v. 33(15). - p. 3887-3898.
70. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays / T. Mosmann // *J Immunol Methods.* - 1983. - v. 65(1-2). – p. 55-63.
71. Nakazawa Y. Development of Small-Diameter Vascular Grafts Based on Silk Fibroin Fibers from *Bombyx mori* for Vascular Regeneration / Y. Nakazawa, M. Sato, R. Takahashi, D. Aytemiz, C. Takabayashi, T. Tamura, S. Enomoto, M. Sata, T. Asakura // *J Biomater Sci Polym Ed.* - 2013. - v. 22. - p. 195–206.
72. Ni S. A mechanism for the enhanced attachment and proliferation of fibroblasts on anodized 316L stainless steel with nano-pit arrays / S. Ni, L. Sun, B. Ercan, L. Liu, K. Ziemer, T. J. Webster // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* - 2014. - v. 102(6). - p. 1297-1303.

73. Panas-Perez E. Development of a silk and collagen fiber scaffold for anterior cruciate ligament reconstruction / E. Panas-Perez, C. J. Gatt, M. G. Dunn // *J Mater Sci: Mater Med.* - 2013. - v. 24. – p. 257–265.
74. Panseri S. Electrospun micro- and nanofiber tubes for functional nervous regeneration in sciatic nerve transections / S. Panseri, C. Cunha, J. Lowery, U. Carro, F. Taraballi, S. Amadio, A. Vescovi, F. Gelain // *BMC Biotechnology.* - 2008. - v. 2008. - p. 8-39.
75. Parenteau-Bareil R. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications / R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin, F. Berthod // *Materials.* - 2010. - v. 3. - p. 1863-1887.
76. Park S. Multi-Interpenetrating Network (IPN) Hydrogel by Gelatin and Silk Fibroin / S. Park, S. Edwards, S. Hou, R. Boudreau, R. Yee, K. J. Jeong // *Biomater Sci.* - 2019. - v. 7(4). - p. 1276-1280.
77. Park S.-H. Intervertebral Disk Tissue Engineering Using Biphasic Silk Composite Scaffolds / S.-H. Park, E. S. Gil, H. Cho, B. B. Mandal, L. W. Tien, B.-H. Min, D. L. Kaplan // *Tissue Eng Part A.* - 2012. - v. 18(5-6). - p. 447-458.
78. Park S.-H. Annulus fibrosus tissue engineering using lamellar silk scaffolds / S.-H. Park, E. S. Gil, B. B. Manda, H. Cho, J. A. Kluge, B.-H. Min, D. L. Kaplan // *J Tissue Eng Regen Med.* - 2012. - v. 6. - p. 541-551.
79. Park S. Y. Functional recovery guided by an electrospun silk fibroin conduit after sciatic nerve injury in rats / S. Y. Park, C. S. Ki, Y. H. Park, K. G. Lee, S. W. Kang, H. W. Kweon, H. J. Kim // *J Tissue Eng Regen Med.* - 2015. - v. 9(1). - p. 66-76.
80. Pavankumar K. N. The wound healing study of silk protein based biofilms in rats / K. N. Pavankumar, K. Jayakumar, N. Chandrashekhara, H. D. Narayanswamy, K. P. Manjunatha, G. C. Nirmala // *J Cell Tissue Res.* - 2013. - v. 13(3). - p. 3989-3996.
81. Preda R. C. Bioengineered Silk Proteins to Control Cell and Tissue Functions, Protein Nanotechnology: Protocols, Instrumentation, and Applications / R. C.

- Preda, G. Leisk, F. Omenetto, D. L. Kaplan // *Methods Mol Biol.* - 2013. - v. 996. - p. 19-41.
82. Pritchard E.M. Antibiotic-Releasing Silk Biomaterials for Infection Prevention and Treatment / E. M. Pritchard, T. Valentin, B. Panilaitis, F. Omenetto, D. L. Kaplan // *Adv Funct Mater.* - 2013. - v. 23(7). - p. 854-861.
83. Qu J. Electrospun silk fibroin nanofibers in different diameters support neurite outgrowth and promote astrocyte migration / J. Qu, D. Wang, H. Wang, Y. Dong, F. Zhang, B. Zuo, H. Zhan // *J Biomed Mater Res A.* - 2013. - v. 101(9). - p. 2667-2678.
84. Raja W. K. Transdermal Delivery Devices: Fabrication, Mechanics and Drug Release from Silk / W. K. Raja, S. MacCorkle, I. M. Diwan , A. Abdurrob, J. Lu, F. G. Omenetto, D. L. Kaplan // *Small.* - 2013. - v. 9(21). - p. 3704-3713.
85. Rajkhowa R. Structure and properties of biomedical films prepared from aqueous and acidic silk fibroin solutions / R. Rajkhowa, B. Levin, S. L. Redmond, L. H. Li, L. Wang, J. R. Kanwar, M. D. Atlas, X. Wang // *J Biomed Mater Res A.* - 2011. - v. 97(1). - p. 37-45.
86. Rosenow F. Integrins as antimetastatic targets of RGD-independent snake venom components in liver metastasis / F. Rosenow, R. Ossig, D. Thormeyer, P. Gasmann, K. Schlüter, G. Brunner, J. Haier, J. A. Eble // *Neoplasia.* - 2008. - v. 10(2). - p. 168-176.
87. Sivak W. N. Delivery of chondroitinase ABC and glial cell line-derived neurotrophic factor from silk fibroin conduits enhances peripheral nerve regeneration / W. N. Sivak, J. D. White, J. M. Bliley, L. W. Tien, H. T. Liao, D. L. Kaplan, K. G. Marra1 // *J Tissue Eng Regen Med.* - 2014. – v. 2014. – p. 1-10.
88. Shadforth A. The cultivation of human retinal pigment epithelial cells on *Bombyx mori* silk fibroin / A. Shadforth, K. A. George, A. S. Kwan, V. T. Chirila, D. G. Harkin // *Biomaterials.* - 2012. - v. 33. - p. 4110-4117.
89. Shastry P. Neuroblastoma Cell Lines - a versatile in vitro model in neurobiology / P. Shastry, A. Basu, M. S. Rajadhyaksha // *Intern. J. Neuroscience.* - 2001. - v. 108. - p. 109-126.

90. She Z. Silk fibroin/chitosan scaffold: preparation, characterization, and culture with HepG2 cell / Z. She, C. Jin, Z. Huang, B. Zhang, Q. Feng, Y. Xu // *J Mater Sci: Mater Med.* - 2008. - v. 19. - p. 3545–3553.
91. Shen Y. Tympanic Membrane Repair Using Silk Fibroin and Acellular Collagen Scaffolds / Y. Shen, S. L. Redmond, B. M. Teh, S. Yan, Y. Wang, M. D. Atlas, R. J. Dilley, M. Zheng, R. J. Marano // *Laryngoscope.* - 2013. - v. 123(8). - p. 1976-1982.
92. Shen Y. Scaffolds for Tympanic Membrane Regeneration in Rats / Y. Shen, S. L. Redmond, B. M. Teh, S. Yan, Y. Wang, L. Zhou, C. A. Budgeon, R. H. Eikelboom, M. D. Atlas, R. J. Dilley, M. Zheng, R. J. Marano // *Tissue Eng Part A.* - 2013. - v. 19(5-6). - p. 657-668.
93. Shoulders M. D. Collagen Structure and Stability / M. D. Shoulders, R. T. Raines // *Annu Rev Biochem.* - 2009. - v. 78. - p. 929–958.
94. Soffer L. Silk-based electrospun tubular scaffolds for tissue-engineered vascular grafts / L. Soffer, X. Wang, X. Zhang, J. Kluge, L. Dorfmann, D. L. Kaplan, G. Leisk // *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* - 2008. - v. 19(5). - p. 653–664.
95. Song J. Electrospun Nanofibrous Silk Fibroin Membranes Containing Gelatin Nanospheres for Controlled Delivery of Biomolecules / J. Song, A. Klymov, J. Shao, Y. Zhang, W. Ji, E. Kolwijck, J. A. Jansen, S. C. G. Leeuwenburgh, F. Yang // *Adv Healthc Mater.* - 2017. - v. 6(14). – p. 1-10.
96. Subia B. Drug loading and release on tumor cells using silk fibroin–albumin nanoparticles as carriers / B. Subia, S. C. Kundu // *Nanotechnology.* - 2013. - v. 24(3). - p. 1-10.
97. Su K. Recent advances in the use of gelatin in biomedical research / K. Su, C. Wang // *Biotechnol Lett.* - 2015. - v. 37(11). - p. 2139-2145.
98. Tang X. Bridging peripheral nerve defects with a tissue engineered nerve graft composed of an in vitro cultured nerve equivalent and a silk fibroin-based scaffold / X. Tang, C. Xue, Y. Wang, F. Ding, Y. Yang, X. Gu // *Biomaterials.* - 2012. - v. 33. - p. 3860-3867.

99. Teplenin A. Functional analysis of the engineered cardiac tissue grown on recombinant spider fibromeshes / A. Teplenin, A. Krasheninnikova, N. Agladze, K. Sidoruk, O. Agapova, I. Agapov, V. Bogush, K. Agladze // *PLoS One*. - 2015. - v. 10(3). - e0121155.
100. Tokareva O. Structure-function-property-design interplay in biopolymers: spider silk / O. Tokareva, M. Jacobsen, M. Buehler, J. Wong, D. L. Kaplan // *Acta Biomater.* - 2014. - v. 10(4). - p. 1612-1626.
101. Torricelli P. Co-electrospun gelatin-poly(l-lactic acid) scaffolds: Modulation of mechanical properties and chondrocyte response as a function of composition / P. Torricelli, M. Gioffre, A. Fiorani, S. Panzavolta, C. Gualandi, M. Fini, M. L. Focarete, A. Bigi // *Mat. Sci. Eng.* - 2014. - v. 36. - p. 130-138.
102. Vasconcelos A. Novel silk fibroin/elastin wound dressings / A. Vasconcelos, A. C. Gomes, A. Cavaco-Paulo // *Acta Biomater.* - 2012. - v. 8(8). - p. 3049–3060.
103. Velnar T. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms / T. Velnar, T. Bailey, V. Smrkolj // *J Int Med Res.* - 2009. - v. 37(5). - p. 1528-1542.
104. Vepari C. Silk as a biomaterial / C. Vepari, D. L. Kaplan // *Prog Polym Sci.* - 2007. - v. 32(8-9). - p. 991-1007.
105. Wei L. G. A gelatin/collagen/polycaprolactone scaffold for skin regeneration / L. G. Wei, H. I. Chang, Y. Wang, S. H. Hsu, L. G. Dai, K. Y. Fu, N. T. Dai // *PeerJ*. - 2019. - v. 7. - e6358.
106. Yan L.-P. Bioactive macro/micro porous silk fibroin/nanosized calcium phosphate scaffolds with potential for bone-tissue-engineering applications / L.-P. Yan, J. Silva-Correia, C. Correia, S. G. Caridade, E. M. Fernandes, R. A. Sousa, J. F. Mano, J. M. Oliveira, A. L. Oliveira, R. L. Reis // *Nanomedicine (Lond.)*. - 2013. - v. 8(3). - p. 359-378.
107. Yang Z. In vitro and in vivo characterization of silk fibroin/gelatin composite scaffolds for liver tissue engineering / Z. Yang, L. Xu, F. Yin, Q. Shi, Y. Han, L.

- Zhang, H. Jin, Y. Nie, Y. Wang, X. Hao, D. Fan, X. Zhou // *J Dig Dis.* - 2012. - v. 13(3). - p. 168–178.
108. Xia Z. Fabrication and characterization of biomimetic collagen–apatite scaffolds with tunable structures for bone tissue engineering / Z. Xia, X. Yu, X. Jiang, D. H. Brody, W. D. Rowe, M. Wei // *Acta Biomater.* - 2013. - v. 9(7). - p. 7308-7319.
109. Zhaoa H. Decoration of silk fibroin by click chemistry for biomedical application / H. Zhaoa, E. Heuslera, G. Jonesa, L. Lia, V. Wernera, O. Germershaus, J. Ritzera, T. Luehmanna, L. Meinela // *J. Struct. Biol.* - 2014. - v. 186(3). - p.420-430.
110. Zhua M. Fabrication of highly interconnected porous silk fibroin scaffolds for potential use as vascular grafts / M. Zhua, K. Wanga, J. Meia, C. Lib, J. Zhanga, W. Zhenga, D. Ana, N. Xiaoa, Q. Zhaoa, D. Konga, L. Wang // *Acta Biomater.* - 2014. - v. 10(5). - p. 2014-2023.
111. Zhang F. Pre-treatment optimization and properties of gelatin from freshwater fish scales / F. Zhang, S. Xu, Z. Wang // *Food Bioprod Proc.* - 2011. - v. 89. - p.185–193.
112. Zhang Q. Preparation of uniaxial multichannel silk fibroin scaffolds for guiding primary neurons / Q. Zhang, Y. Zhao, S. Yan, Y. Yang, H. Zhao, M. Li, S. Lu, D. L. Kaplan // *Acta Biomater.* - 2012. - v. 8(7). - p. 2628–2638.
113. Zhao L. Studies on the use of recombinant spider silk protein/polyvinyl alcohol electrospinning membrane as wound dressing / L. Zhao, D. Chen, Q. Yao, M. Li // *Int J Nanomedicine.* - 2017. - v. 12. - p. 8103-8114.