

DOI: 10.15825/1995-1191-2015-2-37-44

# СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТРЕХМЕРНОЙ НАНОСТРУКТУРЫ ПОРИСТЫХ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ МАТРИКСОВ ИЗ РЕКОМБИНАНТНОГО СПИДРОИНА И ФИБРОИНА ШЕЛКА ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

О.И. Агапова<sup>1</sup>, А.Е. Ефимов<sup>1</sup>, М.М. Мойсенович<sup>2</sup>, В.Г. Богуш<sup>3</sup>,  
И.И. Агапов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов», Москва, Российская Федерация

**Цель.** Сравнение трехмерной наноструктуры пористых биосовместимых матриксов из фиброина шелка *Bombyx mori* и рекомбинантного спидроина rS1/9. **Материалы и методы.** Трехмерные пористые матриксы были получены методом выщелачивания. При сравнении биологических свойств показано, что адгезия и пролиферация мышинных фибробластов на двух видах матриксов различались незначительно. В сравнительных экспериментах *in vivo* показано, что регенерация костной ткани у крыс происходит быстрее при имплантации матриксов из рекомбинантного спидроина. С целью объяснения более высокой регенеративной активности матриксов из спидроина с помощью сканирующей зондовой нанотомографии была исследована трехмерная наноструктура матриксов, а также сообщаемость нанопор внутри матриксов. **Результаты.** Были обнаружены существенные отличия в плотности и объеме нанопор: в матриксах из rS1/9 интегральная плотность нанопор, зафиксированная в двухмерном атомно-силовом изображении, составляла 46 мкм<sup>-2</sup>, а степень пористости – 24%; в трехмерных структурах из фиброина шелка плотность нанопор и степень пористости были 2,4 мкм<sup>-2</sup> и 0,5% соответственно. Трехмерная реконструкция системы нанопор и образованных ими кластеров в матриксах из rS1/9 показала, что объемная доля взаимосвязанных пор в перколяционных кластерах равна 35,3% от всего объема пор, что составляет 8,4% от общего объема матрикса. **Выводы.** Метод сканирующей зондовой нанотомографии позволяет получить уникальную информацию о топологии систем нанопор искусственных биоконструкций. При сравнительном анализе наноструктуры искусственных матриксов из регенерированного шелка и рекомбинантного спидроина, полученных методом выщелачивания, показано, что скэффолды из спидроина имеют более высокую интегральную плотность нанопор, степень пористости и объемную долю взаимосвязанных пор.

**Ключевые слова:** сканирующая зондовая нанотомография, нанопористость, трехмерные биосовместимые матриксы, фиброин шелка, спидроин.

**Для корреспонденции:** Агапов Игорь Иванович. Адрес: 123182, г. Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (499) 190-66-19. E-mail: igor\_agapov@mail.ru.

**For correspondence:** Agapov Igor Ivanovich. Address: 123182, Moscow, Schukinskaya st., 1. Tel. (499) 190-66-19. E-mail: igor\_agapov@mail.ru.

# COMPARATIVE ANALYSIS OF THREE-DIMENSIONAL NANOSTRUCTURE OF POROUS BIOCOMPATIBLE SCAFFOLDS MADE OF RECOMBINANT SPIDROIN AND SILK FIBROIN FOR REGENERATIVE MEDICINE

O.I. Agapova<sup>1</sup>, A.E. Efimov<sup>1</sup>, M.M. Moisenovich<sup>2</sup>, V.G. Bogush<sup>3</sup>, I.I. Agapov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> The State Scientific Center of Russian Federation «The State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms», Moscow, Russian Federation

**Aim.** To perform a comparison of three-dimensional nanostructure of porous biocompatible scaffolds made of fibroin *Bombix mori* and recombinant spidroin rS1/9. **Materials and methods.** Three-dimensional porous scaffolds were produced by salt leaching technique. The comparison of biological characteristics of the scaffolds shows that adhesion and proliferation of mouse fibroblasts *in vitro* on these two types of scaffolds do not differ significantly. Comparative experiments *in vivo* show that regeneration of bone tissue of rats is faster with implantation of recombinant spidroin scaffolds. Three-dimensional nanostructure of scaffolds and interconnectivity of nanopores were studied with scanning probe nanotomography (SPNT) to explain higher regenerative activity of spidroin-based scaffolds. **Results.** Significant differences were detected in the integral density and volume of pores: the integral density of nanopores detected on 2D AFM images is  $46 \mu\text{m}^{-2}$  and calculated volume porosity is 24% in rS1/9-based scaffolds; in fibroin-based three-dimensional structures density of nanopores and calculated volume porosity were  $2.4 \mu\text{m}^{-2}$  and 0.5%, respectively. Three-dimensional reconstruction system of nanopores and clusters of interconnected nanopores in rS1/9-based scaffolds showed that volume fraction of pores interconnected in percolation clusters is 35.3% of the total pore volume or 8.4% of the total scaffold volume. **Conclusion.** Scanning probe nanotomography method allows obtaining unique information about topology of micro – and nanopore systems of artificial biostructures. High regenerative activity of rS1/9-based scaffolds can be explained by higher nanoporosity of the scaffolds.

*Key words:* scanning probe nanotomography, nanoporosity, three-dimensional biocompatible scaffolds, silk fibroin, spidroin.

## ВВЕДЕНИЕ

Ритм современной жизни, экология, наследственность оказывают большое влияние на человека, вносят неблагоприятные изменения в его организм, снижая качество жизни, ограничивают функциональные возможности, а в худшем случае приводят к инвалидности и сокращению продолжительности жизни. Биология, медицина, инженерия – три составляющие регенеративной медицины, которая позволяет человеку в XXI веке восстанавливать, улучшать, поддерживать функционирование организма, его тканей и органов. В связи с тем что донорство является дорогим, имеющим большое количество ограничений направлением в медицине, ученые и врачи всего мира трудятся над разработкой альтернативных методов восстановления поврежденных организма человека [1]. Регенеративная медицина на данном этапе развития использует два варианта имплантируемых биodeградируемых материалов: синтетические биоматериалы, например, поликапролактон [2], полиоксиалканоаты, которые являются полиэфирами и состоят из цепи повторяющихся остатков гликолиевых и молочных кислот, и

природные полимеры, такие как коллаген, желатин, соли альгиновой кислоты (альгинаты) [3], сополимеры  $\beta$ -оксимасляной кислоты (полиоксибутирата), фиброин шелка, белки паутины (спидроины) [4, 5]. В результате резорбции биodeградируемых полимеров в качестве промежуточных веществ иногда образуются те, которые включаются в клеточный метаболизм (гликолиевая и молочная кислоты, моносахара, аминокислоты). При этом если результат резорбции – вещества, не являющиеся частью обмена веществ клеток или тканей, то они не должны быть токсичными для организма, а их концентрация в крови – в пределах допустимого уровня.

Природные полимеры обладают большей степенью биосовместимости с организмом человека в сравнении с синтетическими. Трехмерные пористые биосовместимые искусственные матриксы (скэффолды) являются одними из самых перспективных имплантатов-носителей в регенеративной медицине, помогая организму восстанавливать его собственные ткани в месте повреждения [6]. Такая технология восстановления иногда использует направленную доставку биологически активных

веществ в поврежденный орган или ткань, с последующей аутоклеточной адгезией, пролиферацией и функционированием в месте поражения. Искусственные матриксы представляют собой носители для субстрат-зависимых клеток, служат альтернативой природному внеклеточному матриксу и регулируют развитие ткани. Как результат – регенерация происходит за счет прорастания новообразованной ткани через матриксный материал [7, 8].

Для того чтобы процесс восстановления прошел успешно, а результат соответствовал ожиданиям, кроме правильного подбора материала для изготовления матрикс должен обладать особыми свойствами, такими как:

- механическая прочность и эластичность; такая характеристика необходима для проведения хирургических действий без повреждения как самого матрикса, так и ткани пациента [9];
- пористость, т. е. доля объема пор в общем объеме матрикса; пористость определяет успех протекания клеточной адгезии и пролиферации [10];
- взаимосвязанность (сообщаемость) пор, т. е. матрикс должен обладать необходимой степенью перколяции; это необходимо для успешного межклеточного взаимодействия, качественной и равномерной миграции клеток в объеме матрикса при регенерации [11].

Пористость, а также размер пор зависят как от материала, из которого состоит матрикс, так и от технологии его изготовления. Одним из способов производства матриксов является метод выщелачивания [12]. Он заключается в использовании порообразователя (например, кристаллов хлорида натрия), который растворим в воде [13]. В данном методе размеры кристаллов соли определяют размер пор, а количество порообразователя – степень пористости.

В нашей статье с помощью метода сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ) мы сравнили нано- и микроструктуру пористых матриксов из рекомбинантного спидроина и фиброина шелка.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Изготовление пористых матриксов из рекомбинантного спидроина

Искусственный ген rS1/9 включает девять химически синтезированных мономеров 1f1 [5]. Мономер искусственного гена был получен с помощью химико-ферментативного синтеза, амплифицирован в составе плазмиды в клетках *E. coli* и клонирован в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Из клеток дрожжей-продуцентов рекомбинантный белок был выделен, очищен до 98% чистоты и использован для изготовления матриксов, которые получали методом выщелачивания. Навеска ре-

комбинантного спидроина rS1/9 массой 15 мг была растворена в 50 мкл раствора, содержащего 9М хлористый литий в 90% муравьиной кислоте, при 40 °С в течение 30 мин. Далее раствор центрифугировали 10 мин при 11 300 g, 50 мкл надосадочной жидкости смешивали со 110 мг хлорида натрия с размерами частиц соли от 200 до 400 мкм. Формировали диск, диаметр которого составлял 10 мм, а высота – 1 мм, диск высушивали при комнатной температуре (20–25 °С), обрабатывали 96% этанолом на протяжении 2 ч, затем дегазировали и полученные матриксы хранили в 70% этаноле.

### Изготовление пористых матриксов из регенерированного шелка

Натуральный шелк, полученный из коконов *B. mori*, кипятили в течение одного часа в 0,03 М  $\text{NaHCO}_3$ , после этого промывали дистиллированной водой с целью избавления от серицина. Навеска отмытого шелка весом 15 мг была растворена в 50 мкл раствора, содержащего 10% хлористого лития в 90% муравьиной кислоте, при 40 °С в течение 30 мин. Далее раствор центрифугировали 10 мин при 11 300 g, 50 мкл надосадочной жидкости смешивали со 110 мг хлорида натрия с размерами частиц соли от 200 до 400 мкм. Формировали диск, диаметр которого составлял 10 мм, а высота – 1 мм, высушивали диск при комнатной температуре (20–25 °С), обрабатывали 96% этанолом на протяжении 2 ч, затем дегазировали и хранили матриксы в 70% этаноле.

### Сравнение скорости адгезии и пролиферации фибробластов 3Т3 в матриксах

Отмытые от спирта стерильные матриксы были помещены в 24-луночные стерильные планшеты. Суспензия мышинных фибробластов 3Т3 в количестве 24 000 клеток в 1,5 мл среды DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки была нанесена на поверхность матриксов, после чего образцы инкубировались при температуре 37 °С в увлажненной атмосфере с 5% содержанием  $\text{CO}_2$  в течение часа. После адгезии клеток на поверхности матриксов образцы были промыты с целью избавления от неприкрепленных клеток. Далее матриксы с фибробластами были помещены в отсеки со свежей средой и культивировались на протяжении двух недель. Культуральная среда менялась каждые два дня. Ядра клеток окрашивались с использованием SYTOX® Green (Invitrogen; Carlsbad, USA) и подсчитывались с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа. Расчеты проводились с использованием программы 3D for LSM Version 1.4.2 (Carl Zeiss) и Imaris 6.1.5 (Bitplane AG, Zurich, Switzerland).

## Регенерация костной ткани

Крысы Wistar весом 190–220 г были разделены на три группы по 7 крыс в каждой: две группы в зависимости от типа имплантируемых матрицков и контрольная группа. Анестезирование проводилось с помощью инъекции Zoletil 100/Xylovet (CEVA Santé Animale, Libourne, France) (0,025 мг / 0,005 мг / 100 г). На поверхности бедра был сделан надрез 10 мм до надкостницы и в кости просверлено отверстие в 2 мм. Далее в отверстие вставлялся матрикс соответствующего размера, рану зашивали и закрывали повязкой. В контрольной группе после повреждения кости матрицки не имплантировались. Животные из каждой группы подвергались рентгеновской микрофотографии на 1-й и 4-й нед. после операции, затем были умерщвлены. Рентгеновские исследования были проведены с использованием компьютерного томографа (Somatom AR. HP «Siemens», Germany). Для определения диапазона сканирования были использованы томограмма и визуальные данные. Осевые срезы сняты со следующими параметрами: 110 кВ, 50 мА, глубина поля сканирования – 3 мм, шаг – 1–2 мм. Полученные изображения были использованы для оценки заживления в сравнении со здоровым корковым слоем бедренной кости согласно шкале Хаунсфилда. Индекс регенерации был рассчитан как отношение плотности регенерированной костной ткани в ране к плотности нормальной костной ткани (в единицах Хаунсфилда)  $\times 100$ .

## Сканирующая зондовая нанотомография

Трехмерная структура матрицков исследовалась с помощью сканирующей зондовой нанотомографии, с использованием комбинированной системы Ntegra Томо (ЗАО «НТМДТ», Москва), совмещающей атомно-силовую микроскоп и ультрамикротом Leica EM UC6NT (Leica Microsystems GmbH, Aust-

ria) в одном устройстве [14, 15]. Образцы матрицков были залиты в эпоксидную смолу. Для каждого из матрицков была выполнена серия последовательных срезов ультрамикротомом с использованием специализированного алмазного ножа Diatome UltraAFM 45 с последующим измерением топографии поверхности блока на атомно-силовом микроскопе (АСМ) после каждого среза. Измерения выполнялись в полуконтактном режиме с использованием зондов – кремниевых кантилеверов NSG10 с резонансной частотой 240 кГц и радиусом кривизны острия зонда не более 10 нм. Изображения были выравнены друг относительно друга в плоскости сканирования, и конечные трехмерные структуры визуализированы и проанализированы с помощью пакета программного обеспечения ImagePro AMS 6.0 (MediaCybernetics Inc., USA) с опцией трехмерного реконструирования. Для более комплексной характеристики трехмерной структуры использовались визуализация и статистический анализ объема пор и взаимосвязанных кластеров системы нанопор.

## Статистическая обработка данных

Статистический анализ результатов проводили методом дисперсионного анализа, уровень статистической значимости  $p$  принимали равным 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По данным электронной микроскопии матрицки из фиброина шелка и рекомбинантного спидроина имели видимые отличия в форме пор и их толщине. Стенки пор в матрицках из фиброина имели более однородную структуру с чешуйчатой шероховатой поверхностью, в то время как матрицки из спидроина обладали более рыхлой конструкцией с перфорированной поверхностью (рис. 1).

Мы сравнили скорость адгезии и пролиферации фибробластов 3Т3 на обоих видах матрицков. Экспе-

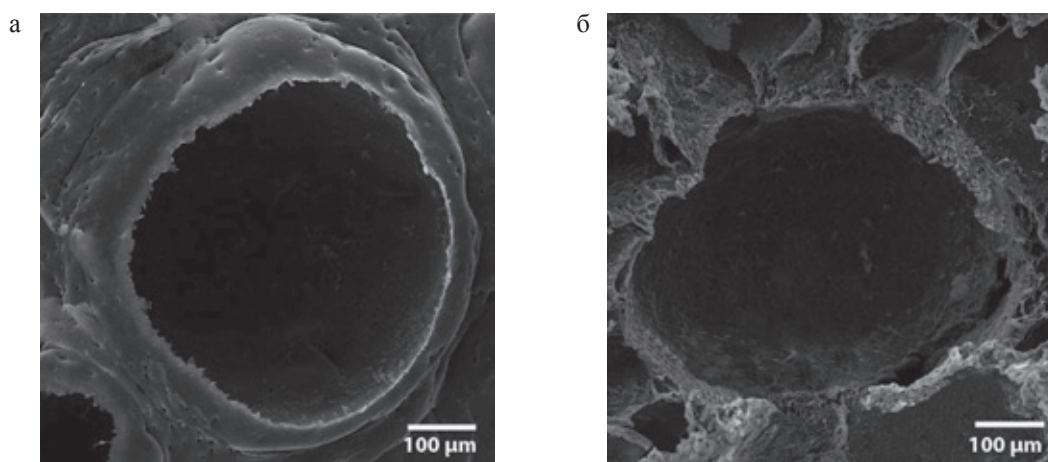


Рис. 1. Сканирующая электронная микроскопия пористых матрицков из фиброина шелка (а) и рекомбинантного спидроина (б)

рименты показали, что полная адгезия фибробластов на матриксы наблюдалась через 2–3 ч инкубации, а их морфология соответствовала данному типу клеток. На завершающем этапе культивирования в течение нескольких дней формировался монослой клеток на стенках макропор матриксов, при этом происходило вращение некоторых клеток в стенки пор. Скорость адгезии и пролиферации клеток была примерно одинакова для обоих видов матриксов (табл. 1).

При анализе регенерации костной ткани по данным рентгеновской микротомографии было показано, что процесс костной регенерации в ране, заполненной спидроиновым матриксом, был более быстрым по сравнению с фиброиновым (табл. 2).

На основе этих данных было сделано предположение, что более высокая биологическая активность матриксов из рекомбинантного спидроина может быть связана с их нанопористой структурой, которая формируется в процессе изготовления rS1/9-матрикса. С помощью методики СЗНТ нами были исследованы и визуализированы трехмерные наноструктуры, топология, а также характеристики системы макро- и нанопор двух видов матриксов: биodeградируемых конструкций из фиброина шелка и из рекомбинантного спидроина (rS1/9-матриксов).

На рис. 2, а, приведено обзорное АСМ-изображение ( $21,0 \times 30,0$  мкм<sup>2</sup>) поверхности блока залитого в эпоксидную смолу матрикса на основе фиброина шелка после среза ультрамикротомом. Анализ полученных двухмерных изображений поверхностей срезов стенок макропор, полученных с использованием сканирующего зондового микроскопа, показал, что размеры нанопор в стенках макропор составляют от 30 до 200 нм, со средним диаметром в 50 нм. Плотность (количество на единицу площади)

Таблица 1  
Адгезия (1-й день) и пролиферация (3–14-й дни) фибробластов ЗТЗ на матриксах из фиброина шелка и рекомбинантного спидроина

Время культивирования, дни	Матрикс из фиброина, количество клеток в 1 мм <sup>3</sup>	Матрикс из рекомбинантного спидроина, количество клеток в 1 мм <sup>3</sup>
1	18 ± 2	19 ± 2
3	48 ± 3	53 ± 5
14	4105 ± 320	3800 ± 304

Примечание. Указаны значения стандартного отклонения для 5 независимых измерений.

Таблица 2  
Анализ регенерации костной ткани по данным рентгеновской микротомографии

Материал	Индекс регенерации, 1-я нед. после операции	Индекс регенерации, 4-я нед. после операции
Контроль	27,2 ± 0,3	31,2 ± 0,7
Фиброин	27,9 ± 0,5	37,3 ± 0,6
Рекомбинантный спидроин	28,6 ± 0,7	46,2 ± 0,4

Примечание. Указаны значения стандартного отклонения для 5 независимых измерений.

нанопор и степень объемной нанопористости в трехмерных структурах из фиброина шелка составляют 2,4 мкм<sup>-2</sup> и 0,5% соответственно. Степень объемной нанопористости определялась при помощи программного пакета Image Analysis Nova 1.0.26.1443 (ЗАО «НТМДТ», Москва) как среднее отношение суммарной площади нанопор на АСМ-изображении к общей площади среза участка матрикса.

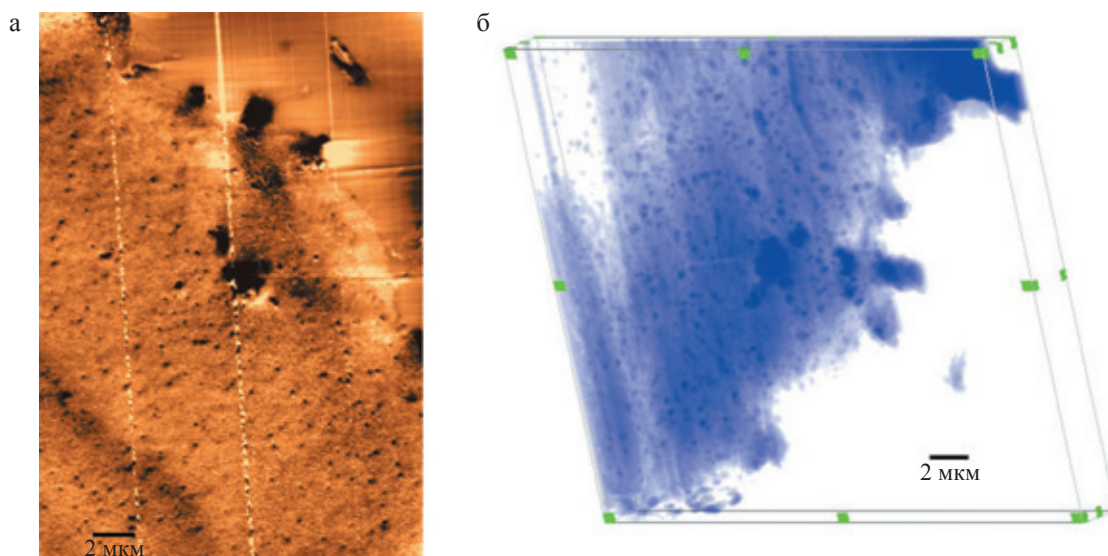


Рис. 2. Анализ наноструктуры матриксов из фиброина шелка: а – АСМ-изображение топографии поверхности блока матрикса на основе фиброина после среза ультрамикротомом, размер скана  $21,0 \times 30,0$  мкм<sup>2</sup>, диапазон вариации высоты 35 нм; б – трехмерная реконструкция структуры стенки макропоры матрикса на основе фиброина (12 срезов,  $45,5 \times 32,8 \times 1,8$  мкм<sup>3</sup>)

Для получения трехмерной реконструкции структуры матрикса в объеме была сделана серия из 12 АСМ-изображений топографии поверхности стенки макропоры после последовательных срезов ультрамикротомом толщиной в 150 нм. Изображение было получено путем совмещения всех полученных АСМ-изображений серии и визуализации в заданном объеме, учитывая физические размеры вокселей, задаваемых толщиной срезов и разрешением исходных АСМ-изображений. Конечная трехмерная структура была представлена и проанализирована с помощью программного пакета 3DConstructor Image Pro AMS 6.0 (MediaCybernetics Inc, USA). Визуализация полученной трехмерной реконструкции приведена на рис. 2, б. Статистический анализ трехмерных данных показал, что отдельные нанопоры практически не взаимосвязаны друг с другом.

Аналогичным образом были исследованы и rS1/9-матрикса. Анализ двухмерных изображений поверхностей срезов стенок макропор в rS1/9-матриксах показал, что размеры нанопор в стенках макропор составляют от 30 до 180 нм, со средним диаметром 50 нм, что сходно с размерами нанопор в фиброиновых матриксах. Однако плотность нанопор и степень пористости в трехмерных структурах из рекомбинантного спидроина rS1/9 гораздо выше и составляет  $46 \text{ мкм}^{-2}$  и 24% соответственно. На рис. 3, а, приведено АСМ-изображение ( $1,8 \times 1,8 \text{ мкм}^2$ ) поверхности блока залитого в эпоксидную смолу матрикса на основе рекомбинантного спидроина после среза ультрамикротомом.

Одним из наиболее важных параметров матрикса является взаимосвязанность нанопор. Согласно

теории перколяции, если значение объемной пористости выше стандартного объема порога перколяции для трехмерных систем, составляющего 16%, то существенная часть пор соединяется в перколяционные кластеры, которые могут быть больше размеров единичных пор [16]. Таким образом, исходя из того, что для rS1/9-матрикса степень объемной пористости составляет 24%, мы можем сделать вывод о высоком уровне взаимосвязанности пор в них, в отличие от пор в матриксах из фиброина шелка. Двухмерные АСМ-изображения показывают, что заметная часть нанопор связана друг с другом наноканалами. Тем не менее, учитывая, что вышеуказанный порог перколяции для трехмерных систем намного меньше, чем для двухмерных (44%), только трехмерный анализ нанопористой структуры может дать адекватную оценку степени взаимосвязанности и перколяции нанопор [17].

Для реконструкции и анализа трехмерной структуры нанопор в объеме матрикса была сделана серия из 13 АСМ-изображений топографии поверхности срезов стенки макропоры с областью сканирования  $15,0 \times 15,0 \text{ мкм}$  и разрешением  $1024 \times 1024$  пикселя после последовательных срезов ультрамикротомом толщиной в 70 нм. Конечная трехмерная структура была проанализирована с помощью программного пакета 3DConstructor Image Pro AMS 6.0 (MediaCybernetics Inc., USA).

Статистический анализ трехмерной реконструкции пор показал, что общий объем пористости равен 23,8% – это соответствует значению, полученному в результате анализа отдельных двухмерных изображений. Обработка полученных данных позволила визуализировать и охарактеризовать кластеры со-

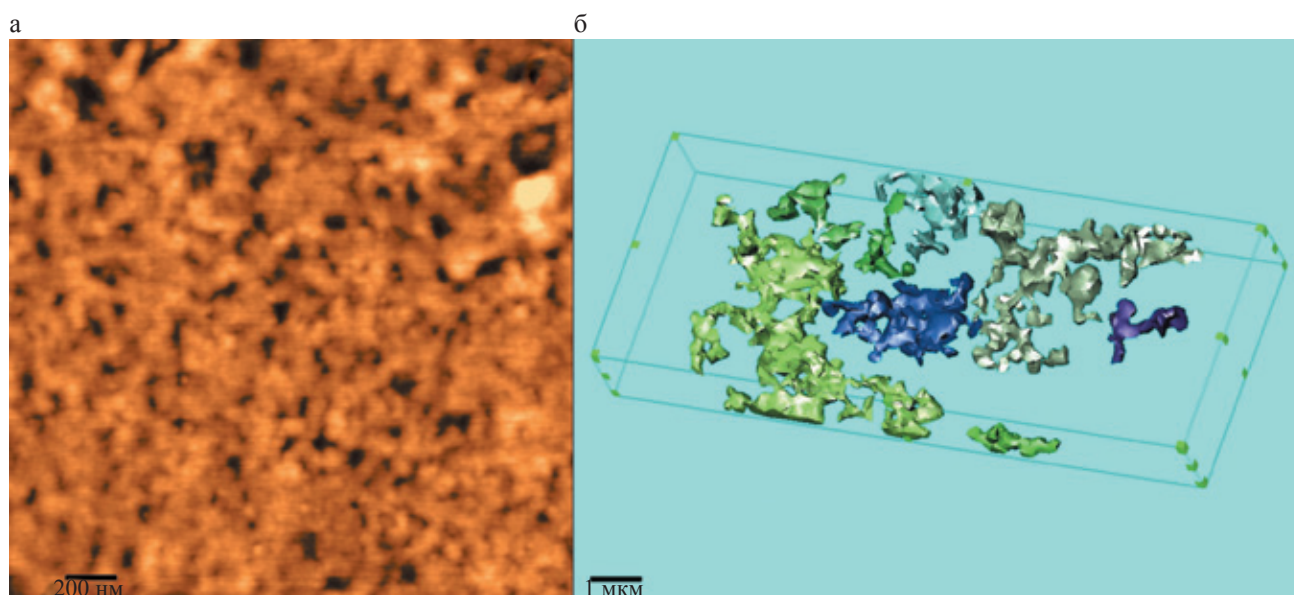


Рис. 3. Анализ наноструктуры матрикса из рекомбинантного спидроина: а – АСМ-изображение топографии поверхности блока матрикса на основе рекомбинантного спидроина rS1/9 после среза ультрамикротомом, размер скана  $1,8 \times 1,8 \text{ мкм}^2$ , диапазон вариации высоты 20 нм; б – трехмерная реконструкция кластеров взаимосвязанных нанопор в стенке макропоры матрикса на основе рекомбинантного спидроина rS1/9 ( $7,54 \times 3,28 \times 1,0 \text{ мкм}^3$ )

общающихся нанопор и определить их параметры путем построения соответствующих изоповерхностей в трехмерном объеме. Значительная часть пор взаимосвязаны друг с другом и соединяются в перколяционные кластеры размерами от 1,5 до 6 мкм. На рис. 3, б, представлено изображение нескольких соседних кластеров нанопор в объеме стенки макропоры. Объемная доля сообщающихся пор в перколяционных кластерах равна 35,3% от всего объема пор, что составляет 8,4% от общего объема матрикса.

Разница в нанопористости между фиброином шелка и rS1/9 может быть связана с их различной молекулярной организацией. Белки имеют различную аминокислотную последовательность (поли-А блоки и чередование гидрофобных и гидрофильных участков в rS1/9 и (GAGAGS)<sub>n</sub> – в фиброине), а также разную молекулярную массу (94,3 кДа у rS1/9 и 370 кДа у тяжелой цепи фиброина). Такие различия могут быть причиной формирования разных пор в матриксах во время обработки этанолом. Нанопористость матриксов из рекомбинантного спидроина может быть специфической чертой этого белка. Разница в степени нанопористости также может быть связана с частичным гидролизом фиброина в процессе растворения его в муравьиной кислоте с LiCl и влиянием продуктов гидролиза на формирование матрикса. Некоторые исследования показывают, что муравьиная кислота может оказывать существенное влияние на молекулярную массу фиброина шелка [18], в то время как белок рекомбинантного спидроина rS1/9 остается стабильным в кислотной среде [19]. Однако эта гипотеза требует дальнейших исследований.

Таким образом, предполагается, что именно внутренняя нанопористая структура матрикса из рекомбинантного спидроина объясняет его способность формировать более благоприятную среду для регенерации ткани в организме.

Сканирующая зондовая нанотомография представляется одним из наиболее перспективных методов для исследования и визуализации трехмерных наноструктур, а также характеристик совокупности микро- и нанопор в биodeградируемых трехмерных конструкциях. Степень пористости, размер и взаимосвязанность пор, отношение площади их поверхности к занимаемому ими объему в подобных материалах могут оказывать заметное влияние на эффективность их использования для регенеративной медицины [20, 21].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследований наноструктуры матриксов позволили сделать вывод о том, что различные биологические свойства матриксов связаны с их наноструктурой, а именно с размерами пор, их

сообщаемостью и объемом пористости в целом. Представленная в настоящих исследованиях технология нанотомографии позволяет проводить анализы нанопористых материалов с разрешением в несколько десятков нанометров во всех трех плоскостях.

Для эффективности регенерации плотность распределения и взаимосвязанность (перколяция) микро- и нанопор в матриксах имеют решающее значение. Взаимосвязанность структур между собой является необходимым условием для равномерного клеточного распределения и эффективного прорастания ткани *in vivo*, так как способствует активному газообмену, доставке питательных веществ, а также правильному метаболизму. Изучение размеров, плотности распределения и взаимосвязанности нанопор может помочь в изготовлении матриксов с улучшенными биологическими свойствами.

*Мы благодарим В.В. Гужеева и Т.В. Дружинину за помощь в проведении ряда экспериментов.*

*Данная работа выполнена в рамках проекта ФЦПР 2014–2020 Минобрнауки России (Соглашение № 14.604.21.0001, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60414X0001).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Manzano A, Monaghan M, Potrata B, Clayton M. The invisible issue of organ laundering. *Transplantation*. 2014; 98: 600–603. DOI: 10.1097/TP.0000000000000333.
2. van Uden S, Silva-Correia J, Corrello VM et al. Custom-tailored tissue engineered polycaprolactone scaffolds for total disc replacement. *Biofabrication*. 2015; 7: 015008. DOI: 10.1088/1758-5090/7/1/015008 (in press).
3. Balyura M, Gelfgat E, Ehrhart-Bornstein M et al. Transplantation of bovine adrenocortical cells encapsulated in alginate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015; 112: 2527–2532. DOI: 10.1073/pnas.1500242112.
4. An B, Tang-Schomer MD, Huang W He J, Jones JA, Lewis RV et al. Physical and biological regulation of neuron regenerative growth and network formation on recombinant dragline silks. *Biomaterials*. 2015; 48: 137–146. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.01.044.
5. Bogush VG, Sokolova OS, Davydova LI, Klinov DV, Sidoruk KV, Esipova NG et al. A novel model system for design of biomaterials based on recombinant analogs of spider silk proteins. *Journal of neuroimmune pharmacology*. 2009; 4: 17–27. DOI: 10.1007/s11481-008-9129-z.
6. Sheikh FA, Ju HW, Moon BM, Lee OJ, Kim JH, Park HJ et al. Hybrid scaffolds based on PLGA and silk for bone tissue engineering. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2015. DOI: 10.1002/term.1989 (in press).
7. Luo Y, Shen H, Fang Y, Cao Y, Huang J, Zhang M et al. Enhanced proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on graphene oxide-incorporated electrospun poly (lactic-co-glycolic acid) nanofi-

- brous mats. *ACS applied materials & interfaces*. 2015. DOI: 10.1021/acsami.5b00862 (in press).
8. Carballo-Molina OA, Velasco I. Hydrogels as scaffolds and delivery systems to enhance axonal regeneration after injuries. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015; 9: 13. DOI: 10.3389/fncel.2015.00013 (in press).
  9. Jeffries EM, Allen RA, Gao J, Pesce M, Wang Y. Highly elastic and suturable electrospun poly(glycerol sebacate) fibrous scaffolds. *Acta biomaterialia*. 2015. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.02.005 (in press).
  10. Gandhimathi C, Venugopal JR, Tham AY, Ramakrishna S, Kumar SD. Biomimetic hybrid nanofibrous substrates for mesenchymal stem cells differentiation into osteogenic cells. *Materials science & engineering C. Materials for biological applications*. 2015; 49: 776–785. DOI: 10.1016/j.msec.2015.01.075.
  11. Campinez MD, Ferris C, de Paz MV, Aguilar-de-Leyva A, Galbis J, Caraballo I. A new biodegradable polythiourethane as controlled release matrix polymer. *International journal of pharmaceutics*. 2015; 480: 63–72. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.01.011.
  12. Niu Y, Li L, Chen KC, Chen F, Liu X, Ye J et al. Scaffolds from alternating block polyurethanes of poly(varepsilon-caprolactone) and poly(ethylene glycol) with stimulation and guidance of nerve growth and better nerve repair than autograft. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2014. DOI: 10.1002/jbm.a.35372 (in press).
  13. Moisenovich MM, Pustovalova OL, Arhipova AY, Vasiljeva TV, Sokolova OS, Bogush VG et al. *In vitro* and *in vivo* biocompatibility studies of a recombinant analogue of spidroin 1 scaffolds. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2011; 96: 125–131. DOI: 10.1002/jbm.a.32968.
  14. Efimov AE, Tonevitsky AG, Dittrich M, Matsko NB. Atomic force microscope (AFM) combined with the ultramicrotome: a novel device for the serial section tomography and AFM/TEM complementary structural analysis of biological and polymer samples. *Journal of Microscopy*. 2007; 226 (3): 207–217. DOI: 10.1111/j.1365-2818.2007.01773.x.
  15. Mochalov KE, Efimov AE, Bobrovsky A, Agapov II, Chistyakov AA, Oleinikov VA et al. Combined Scanning Probe Nanotomography and Optical Microspectroscopy: A Correlative Technique for 3D Characterization of Nanomaterials, *ACS Nano*. 2013; 7 (10): 8953–8962. DOI: 10.1021/nn403448p.
  16. Scher H, Zallen R. Critical density in percolation processes. *J. Chem. Phys.* 1970; 53: 3759–3761. DOI: 10.1063/1.1674565.
  17. Hunt A, Ewing R. Percolation Theory for Flow in Porous Media, *Lect. Notes Phys.* Springer: Berlin Heidelberg, 2009; 771.
  18. Wang Q, Chen Q, Yang Y, Shao Z. Effect of various dissolution systems on the molecular weight of regenerated silk fibroin. *Biomacromolecules*. 2013; 14: 285–289. DOI: 10.1021/bm301741q.
  19. Sokolova OS, Bogush VG, Davydova LI, Polevova SV, Antonov SA, Neretina TV et al. The formation of a quaternary structure by recombinant analogs of spider silk proteins. *Molecular Biology*. 2010; 44: 150–157. DOI: 10.1134/S0026893310010188.
  20. Агапов ИИ, Мойсенович ММ, Васильева ТВ, Пустовалова ОЛ, Коньков АС, Архипова АЮ и др. Биодegradирuемые матриксы из регенерированного шелка *bombix mori*. Доклады Академии наук. 2010; 433 (5): 699–702. Agapov II, Moysenovich MM, Vasil'eva TV, Pustovalova OL, Kon'kov AS, Arhipova AY et al. Biodegradiruemye matriksy iz regenerirovannogo shelka *bombix mori*. Doklady Akademii nauk. 2010; 433 (5): 699–702.
  21. Биосовместимые материалы: Учебное пособие / Под. ред. В.И. Севастьянова, М.П. Кирпичникова. М.: Медицинское информационное агентство, 2011: 544. Biosovmestimye materialy: Uchebnoe posobie / Pod. red. V.I. Sevast'yanova, M.P. Kirpichnikova. M.: Medicinskoe informacionnoe agentstvo, 2011: 544.

Статья поступила в редакцию 12.03.2015 г.