

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-4-105-114

БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ТКАНЕЙ ИЗ НАТУРАЛЬНОГО ШЕЛКА КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СКАФФОЛДЫ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ И РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Л.А. Сафонова, М.М. Боброва, А.Е. Ефимов, О.И. Агапова, И.И. Агапов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Целью исследования была разработка методики получения скаффолдов на основе ткани из натурального шелка и изучение их биосовместимости *in vitro*. Для получения биodeградируемых скаффолдов на основе ткани из натурального шелка предложена обработка тканей из натурального шелка водно-спиртовым раствором хлорида кальция. Методом сканирующей электронной микроскопии выявлены различия в структуре полученных скаффолдов. Полученные скаффолды не являются токсичными для клеток, а также поддерживают адгезию и пролиферацию клеток. Проведенные исследования позволяют рассматривать полученные биodeградируемые скаффолды как перспективные конструкции для тканевой инженерии и регенеративной медицины.

Ключевые слова: шелк, ткань из натурального шелка, биodeградируемые скаффолды, скорость биodeградации.

BIODEGRADABLE MATERIALS BASED ON NATURAL SILK FABRIC AS PROMISING SCAFFOLDS FOR TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE

L.A. Safonova, M.M. Bobrova, A.E. Efimov, O.I. Agapova, I.I. Agapov

Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

Objective: to develop a method for obtaining scaffolds based on natural silk fabric and to study their biocompatibility *in vitro*. **Materials and methods.** To obtain biodegradable scaffolds based on natural silk fabric, we propose treating natural silk fabric with a water-ethanol solution of calcium chloride. Differences in the structure of the resulting scaffolds were identified via scanning electron microscopy. **Conclusion.** The resulting scaffolds are non-toxic to cells and support cell adhesion and proliferation. Our studies make it possible to consider the resulting biodegradable scaffolds as promising constructs for tissue engineering and regenerative medicine.

Keywords: silk, natural silk fabric, biodegradable scaffolds, biodegradation rate.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка биodeградируемых конструкций (скаффолдов) для восстановления поврежденных органов и тканей является одной из важнейших и актуальных задач тканевой инженерии и регенеративной медицины. Такие конструкции должны быть биосовместимыми, иметь достаточно высокие меха-

нические показатели для осуществления хирургических манипуляций, а скорость их биodeградации должна соответствовать скорости восстановления поврежденной ткани.

Одним из наиболее перспективных природных полимеров для создания таких конструкций является фиброин шелка тутового шелкопряда *Bombyx mori*.

Для корреспонденции: Агапов Игорь Иванович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (985) 231-60-42. E-mail: igor_agapov@mail.ru

Corresponding author: Igor Agapov. Address: 1, Shukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (985) 231-60-42. E-mail: igor_agapov@mail.ru

Различными группами исследователей показано успешное применение конструкций на основе фиброина шелка во множестве сфер тканевой инженерии, таких как культивирование клеток различных видов, восстановление костной и хрящевой ткани, регенерация кожи, роговицы, нервной ткани и др. [1–4].

Источником фиброина шелка могут служить как коконы тутового шелкопряда, так и коммерческие изделия из натурального шелка – шовные и тканые материалы. Использование шовных и тканых материалов не требует многостадийной обработки шелка и получения растворов регенерированного фиброина шелка, что может быть преимуществом для решения ряда задач тканевой инженерии и регенеративной медицины.

Уникальное сочетание высоких показателей механических характеристик (таких как прочность и эластичность) с биосовместимостью позволяет использовать фиброин шелка для армирования конструкций на основе ломких и непрочных материалов, обладающих более высокой биологической активностью.

Конструкции на основе фиброина шелка позиционируются в тканевой инженерии и регенеративной медицине как биodeградируемые, однако в некоторых случаях срок деградации конструкций на основе фиброина шелка может достигать 1 года [5]. Множество факторов, таких как вторичная структура полимера, технология обработки полимера в ходе получения конструкции, источник шелка и др., могут оказывать влияние на величину показателя скорости биodeградации получаемой конструкции. Структура фиброина шелка обеспечивает возможность контролировать скорость деградации конструкций на его основе, что может значительно расширить сферы применения фиброина шелка в тканевой инженерии и регенеративной медицине [6–8]. Поэтому разработка методов контроля и регуляции скорости деградации конструкций на основе фиброина шелка для увеличения эффективности и расширения сферы их применения является актуальной задачей.

Одна из стратегий работы в этом направлении заключается в использовании свободных химических групп, присутствующих в структуре молекулы фиброина шелка. Эти группы можно связывать за счет различных сшивающих агентов, таких как глутаровый альдегид и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC) [9]. Регулируя степень перешивки фиброина шелка, можно изменять скорость деградации полученного материала. Однако сшивающие агенты могут снижать биосовместимость скаффолда вследствие своей токсичности, а применение аминокислотных последовательностей не во всех случаях оказывает значительный эффект на показатели скорости его биodeградации. При этом

оба способа могут только снизить скорость деградации конструкций на основе фиброина шелка, однако в тканевой инженерии и регенеративной медицине зачастую требуется быстрая биodeградация материала для более эффективной пролиферации клеток.

Другая стратегия заключается в создании композитных материалов на основе фиброина шелка. Растворы фиброина шелка смешиваются с растворами синтетических и природных материалов, применяемых в тканевой инженерии и регенеративной медицине, таких как альгинаты, гиалуроновая кислота, желатин, коллаген, хитозан, полилактиды, поликапролактон и др. [10–15]. Это позволяет создавать композитные материалы и композитные конструкции, скорость деградации которых зависит от количественного соотношения различных веществ, входящих в состав конструкции. При этом появляется возможность, как повысить, так и понизить скорость биodeградации конструкции. Однако введение композитных добавок сопровождается изменением структуры конструкции и ее механических свойств, что ограничивает сферы применения таких конструкций в тканевой инженерии [16]. Помимо этого, деградация некоторых веществ (например, полилактидов), вводимых в состав конструкции, сопровождается образованием продуктов, которые не могут включаться в метаболизм клеток и создают неблагоприятные условия для их пролиферации, что снижает биосовместимость конструкций [17].

Ранее нами был предложен способ регуляции скорости биodeградации тканей из натурального шелка для получения биodeградируемых скаффолдов на их основе [18]. В рамках данного исследования показаны различные подходы к применению тканей из натурального шелка для получения биodeградируемых скаффолдов, изучены их структура и биосовместимость *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение биodeградируемых скаффолдов

Для получения биodeградируемых скаффолдов использовали ткани из натурального шелка. В рамках данного исследования использовали два типа ткани разной плотности: газ-шифон (плотность 15 г/м²) и атлас двусторонний (плотность 155 г/м²). Образцы тканей для исследований получали согласно способу, ранее описанному авторами [18].

Предварительно ткани подвергали отмывке от примесей по следующей методике. Лоскуты ткани кипятили на водяной бане в растворе бикарбоната натрия, приготовленном из расчета 500 мл бидистиллированной воды, 1260 мг бикарбоната натрия на 1 г ткани, 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. Лоскуты ткани высушивали на воздухе при комнатной температуре. Полученные лоскуты ткани разрезали на фрагменты 5×5 см. Таким образом были получены образцы групп 1 и 4 (табл.).

Далее фрагменты ткани подвергали обработке по следующей методике. На первом этапе ткани инкубировали в водно-спиртовом растворе хлорида кальция, содержащем 389 мг CaCl_2 , 388 мкл $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ и 544 мкл H_2O на 1 мл раствора, в течение 45 минут при температуре 37°C . Затем проводили 16 отмывок бидистиллированной водой по 30 минут каждая и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Таким образом были получены образцы групп 2 и 5 (табл.).

После этого фрагменты ткани инкубировали в растворе желатина типа А с концентрацией 20 мг/мл в течение 1 часа и высушивали на воздухе на поверхности полированного тефлона при комнатной температуре. Высушенные фрагменты ткани, обработанные раствором желатина, дополнительно подвергали фиксации в растворе, содержащем 30 мМ EDC, 8 мМ N-гидроксисукцинимид (NHS), 50 мМ дигидрофосфата натрия и 100 мМ хлорида натрия ($\text{pH} = 6$) в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем проводили 16 отмывок бидистиллированной водой по 30 минут каждая и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Таким образом были получены образцы групп 3 и 6 (табл.).

Анализ поверхностной структуры биodeградируемых скаффолдов методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ)

Образцы биodeградируемых скаффолдов размерами 8×8 мм фиксировали 2,5% раствором глутарового альдегида на фосфатно-солевом буфере с $\text{pH} = 7,4$ в течение 2 часов в темноте при 4°C , после чего проводили пятикратную отмывку образцов от фиксирующего раствора фосфатно-солевым буфером с $\text{pH} = 7,4$ по 10 минут. 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 ($T_{\text{кр. CO}_2} = 31^\circ\text{C}$, $p_{\text{кр. CO}_2} = 72,8 \text{ кг/см}^2$) с помощью установки K850 (Quorum Technologies, Великобритания). Высушенные об-

разцы 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). Полученные образцы анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа Tescan Vega3 SBU (Tescan, Чехия) при рабочем напряжении 15 кВ. Получение и анализ изображений производили с помощью программного обеспечения VegaTC (Tescan, Чехия).

Анализ цитотоксичности полученных конструкций

В экспериментах использовали линию мышечных фибробластов 3Т3. Клетки культивировали в пластиковых флаконах в среде DMEM с низким содержанием глюкозы, содержащей 10% бычьей эмбриональной сыворотки, 0,324 мг/мл глутамин и 10 мг/мл гентамицин при 37°C , 5% CO_2 . 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.

Анализ цитотоксичности всех полученных образцов проводили согласно ГОСТ ISO 10993-5-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*» с помощью МТТ-теста [19] в модели линии клеток мышечных фибробластов 3Т3.

Для этого мышечные фибробласты 3Т3 культивировали в 300 мкл культуральной среды в 96-луночной планшете в термостате при 37°C и 5% CO_2 в течение 3 дней. Образцы биodeградируемых скаффолдов размером 3×3 мм стерилизовали в автоклаве MLS-3020U (Sanyo, Япония) при 121°C в течение 15 минут. Перед проведением теста производили смену культуральной среды и вносили стерильные образцы биodeградируемых скаффолдов в лунки планшета. В качестве контроля использовали культуральный пластик. Планшеты инкубировали в термостате при 37°C , 5% CO_2 . Оценку цитотоксичности проводили на 3, 5 и 7-е сутки эксперимента. Для этого в каждую лунку планшета вносили по 60 мкл раствора МТТ с концентрацией 5 мг/мл. Инкубировали в термостате при 37°C и 5% CO_2 в течение 4 часов до выпадения темно-синих кристаллов формазана. Затем образцы биodeградируемых скаффолдов удаляли из лунок, а планшет центрифугировали в течение 5 минут при 885 g. Супернатант удаляли, осадок формазана растворяли в 300 мкл диметилсульфоксида в течение 20 минут и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 540 нм.

Анализ адгезии и пролиферативной активности клеток на полученных конструкциях

В экспериментах использовали линию клеток гепатокарциномы человека Нер-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 °С, 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.

Образцы биодеградируемых скаффолдов размером 4 × 4 мм стерилизовали в автоклаве MLS-3020U (Sanyo, Япония) при 121 °С в течение 15 минут. Стерильные образцы биодеградируемых скаффолдов размером 4 × 4 мм позиционировали в лунках стерильных 96-луночных культуральных планшетов. В качестве контроля использовали культуральный пластик. 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. Планшеты инкубировали в термостате при 37 °С и 5% CO₂.

Оценку адгезии клеток проводили визуально с помощью микроскопа Carl Zeiss Axio Vert.A1 (Zeiss, Германия). Оценку пролиферативной активности клеток проводили на 3, 5 и 7-й дни эксперимента с помощью МТТ [19]. 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. Планшеты инкубировали в термостате при 37 °С и 5% CO₂ в течение 4 часов до выпадения темно-синих кристаллов формазана, а затем 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.

Статистическая обработка данных

Статистическую значимость результатов оценивали с помощью критерия Манна–Уитни. Уровень статистической значимости α принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В рамках данного исследования были получены 6 групп образцов скаффолдов на основе двух разновидностей тканей из натурального шелка с различной плотностью (рис. 1). Состав образцов каждой группы описан в таблице.

Структура полученных скаффолдов была изучена методом СЭМ (рис. 2, 3). По данным СЭМ образцы скаффолдов на основе ткани с меньшей плотностью (группы 1–3) характеризуются регулярным расположением волокон ткани (рис. 2). Скаффолды

Таблица

Образцы скаффолдов на основе тканей из натурального шелка, полученные в ходе исследования
Samples of scaffolds based on natural silk fabric obtained during the study

Номер группы	Ткань из натурального шелка, используемая в качестве основы скаффолда	Способ обработки ткани из натурального шелка
1	Газ-шифон (плотность 15 г/м ²)	1) Отмывка ткани от примесей
2	Газ-шифон (плотность 15 г/м ²)	1) Отмывка ткани от примесей 2) Обработка водно-спиртовым раствором хлорида кальция
3	Газ-шифон (плотность 15 г/м ²)	1) Отмывка ткани от примесей 2) Обработка водно-спиртовым раствором хлорида кальция 3) Обработка раствором желатина, ковалентная перешивка раствором EDC/NHS
4	Атлас двусторонний (плотность 155 г/м ²)	1) Отмывка ткани от примесей
5	Атлас двусторонний (плотность 155 г/м ²)	1) Отмывка ткани от примесей 2) Обработка водно-спиртовым раствором хлорида кальция
6	Атлас двусторонний (плотность 155 г/м ²)	1) Отмывка ткани от примесей 2) Обработка водно-спиртовым раствором хлорида кальция 3) Обработка раствором желатина, ковалентная перешивка раствором EDC/NHS

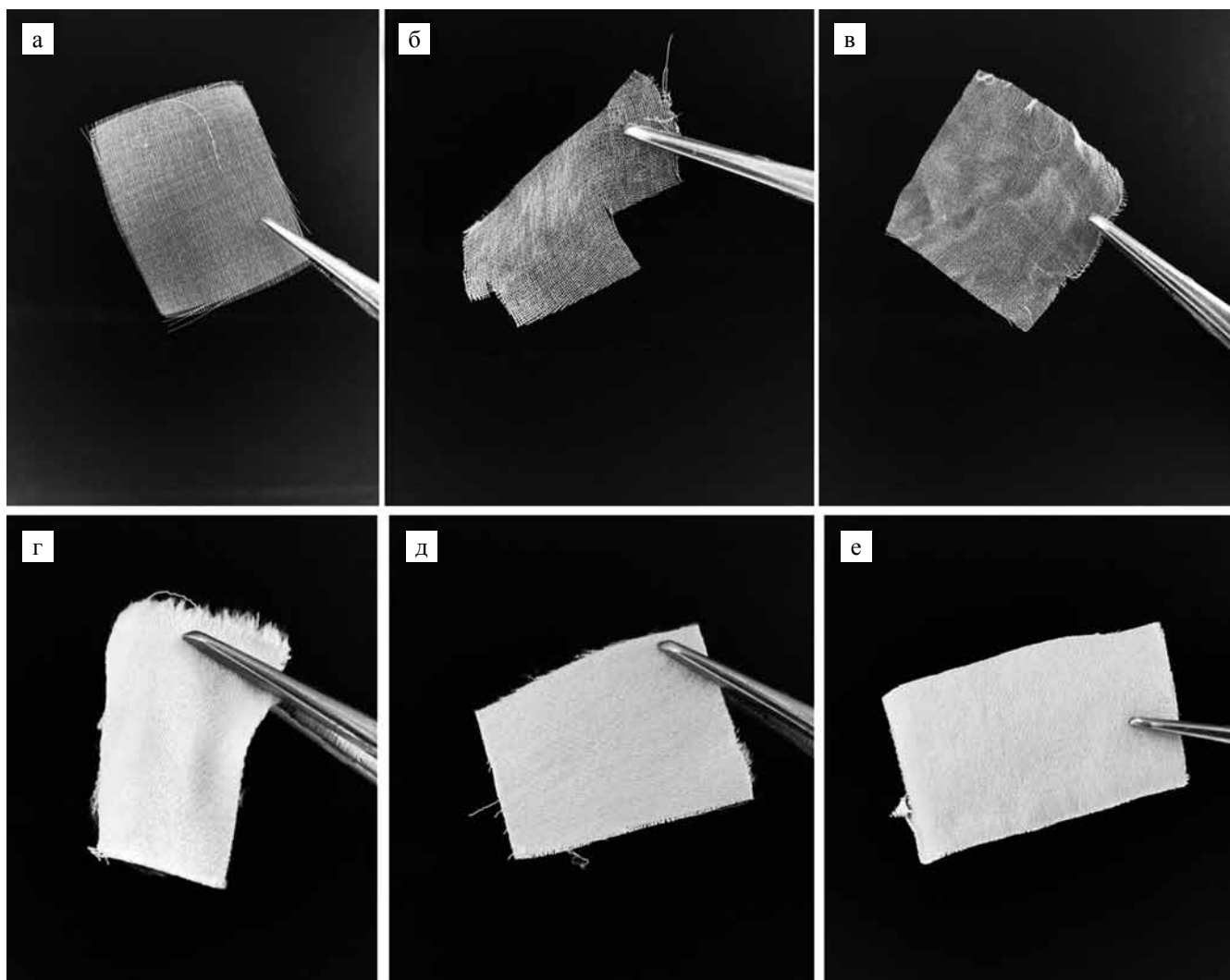


Рис. 1. Образцы скаффолдов на основе тканей из натурального шелка, полученные в ходе исследования: а – группа 1; б – группа 2; в – группа 3; г – группа 4; д – группа 5; е – группа 6

Fig. 1. Samples of scaffolds based on natural silk fabric obtained during the study: а – Group 1; б – Group 2; в – Group 3; г – Group 4; д – Group 5; е – Group 6

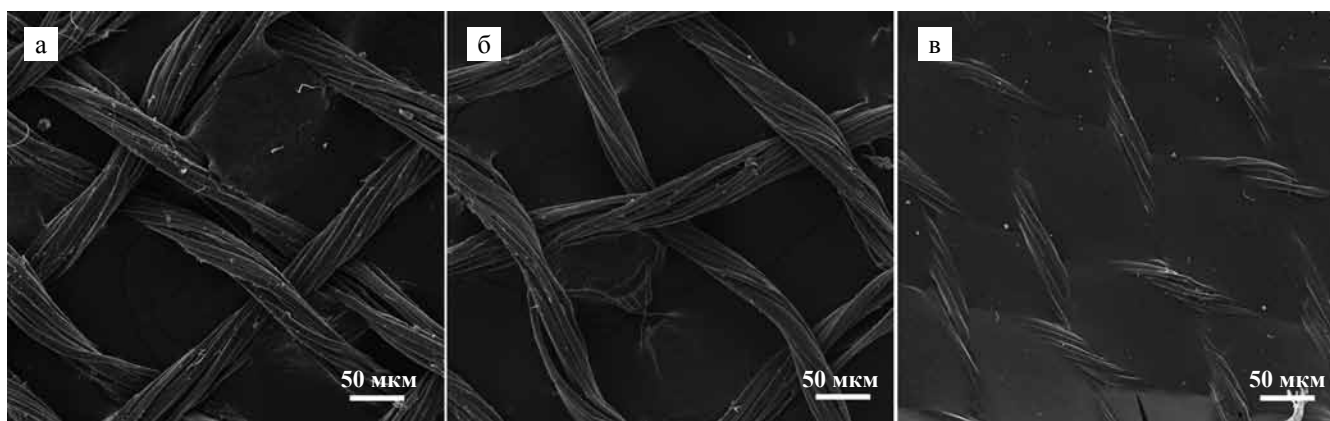


Рис. 2. Изображения образцов скаффолдов на основе ткани из натурального шелка плотностью 15 г/м^2 (газ-шифон): а – группа 1; б – группа 2; в – группа 3

Fig. 2. Images of scaffold samples based on natural silk fabric with a 15 g/m^2 density (gas-chiffon): а – Group 1; б – Group 2; в – Group 3

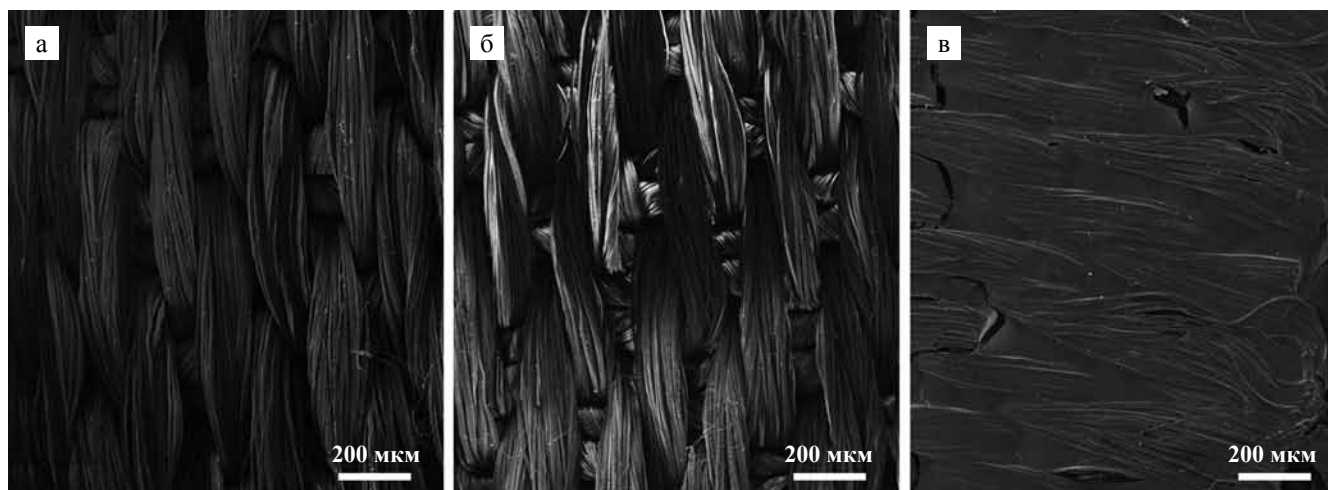


Рис. 3. Изображения образцов скаффолдов на основе ткани из натурального шелка плотностью 155 г/м² (атлас двусторонний): а – группа 4; б – группа 5; в – группа 6

Fig. 3. Images of scaffold samples based on natural silk fabric with a 155 g/m² density (double-sided satin): a – Group 4; б – Group 5; в – Group 6

групп 1 и 2 представляют собой сетку с примерными размерами ячеек 300 × 300 мкм, состоящую из одного слоя волокон ткани со средней толщиной 100–150 мкм. По данным СЭМ между образцами групп 1 и 2 (рис. 2, а, б) не было выявлено различий в поверхностной микроструктуре.

Скаффолды группы 3 представляют собой пленку из желатина, армированную волокнами ткани. При этом желатин в составе скаффолда равномерно покрывает волокна ткани, что приводит к выравниванию микрорельефа волокон ткани.

Образцы скаффолдов на основе тканей из натурального шелка с большей плотностью (группы 4–6) характеризуются плотным расположением волокон ткани с толщиной 150–200 мкм. Скаффолды группы 5 имеют более выраженный микрорельеф поверхности по сравнению со скаффолдами группы 4. Желатин образует равномерное покрытие на поверхности скаффолдов группы 3, что, как и в случае скаффолдов на основе ткани с меньшей плотностью, приводит к выравниванию микрорельефа ткани.

Далее было проведено исследование образцов всех полученных скаффолдов на цитотоксичность (рис. 4, а; 5, а), в ходе которого выявлено, что полученные образцы не оказывают токсического эффекта на клетки, что позволило провести дальнейшие исследования биосовместимости полученных скаффолдов.

Оценка адгезии клеток на полученных скаффолдах производилась на 1-е сутки эксперимента. Была выявлена адгезия клеток на всех образцах скаффолдов, морфология адгезированных клеток на различных образцах не отличалась.

Оценка пролиферативной активности клеток на полученных скаффолдах производилась на 3, 5 и 7-е сутки эксперимента (рис. 4, б; 5, б).

Пролиферативная активность клеток на образцах скаффолдов на основе ткани с меньшей плотностью (группы 1–3, рис. 4, б) равномерно увеличивалась в течение эксперимента. При этом отличий в пролиферативной активности клеток на образцах разных групп выявлено не было.

Аналогичные результаты были получены для образцов скаффолдов на основе ткани с большей плотностью, однако с 5-го по 7-й дни эксперимента пролиферативная активность клеток на образцах рассматриваемых скаффолдов не изменялась и оставалась на высоком уровне.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования были получены 6 групп образцов скаффолдов на основе тканей из натурального шелка (рис. 1). Авторами была разработана методика регулирования скорости биodeградации скаффолдов на основе ткани из натурального шелка, заключающаяся в обработке ткани из натурального шелка водно-спиртовым раствором хлорида кальция [18]. В рамках данного исследования ткани подвергали обработке раствором в течение 45 минут при температуре 37 °С. Обработка водно-спиртовым раствором хлорида кальция на водяной бане используется различными научными группами как одна из стадий получения водного раствора фиброина шелка для осуществления перехода молекул фиброина шелка в состояние α-конформации, которая способствует растворению белка [12, 20, 21]. Также известно, что скорость деградации конструкций на основе фибро-

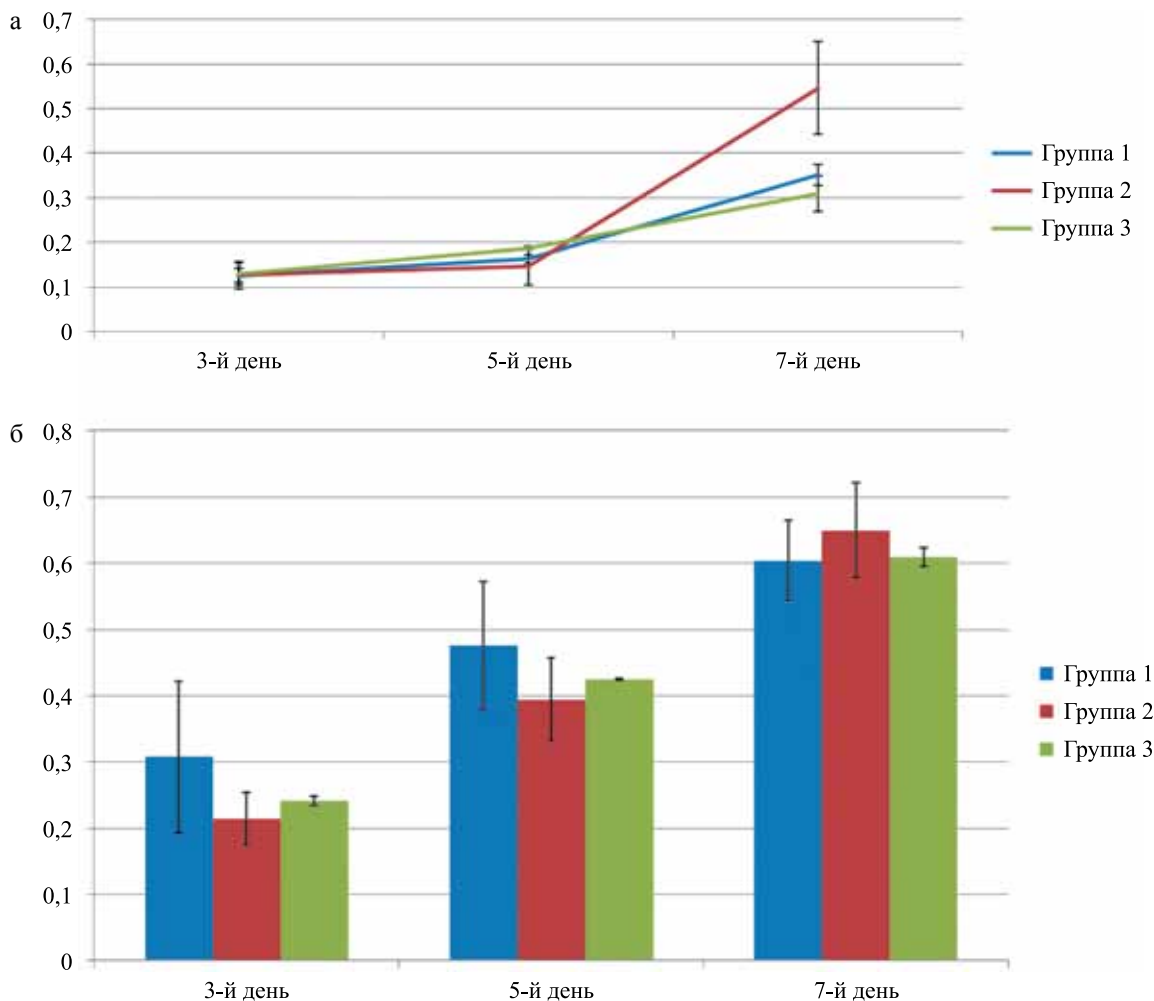


Рис. 4. Результаты исследований биосовместимости образцов скаффолдов на основе ткани из натурального шелка плотностью 15 г/м² (газ-шифон, группы 1–3): а – цитотоксичность; б – пролиферативная активность клеток линии Нер-G2. Указаны значения стандартного отклонения для 5 независимых измерений

Fig. 4. Results of biocompatibility studies of scaffold samples based on natural silk fabric with a 15 g/m² density (gas-chiffon, Groups 1–3): a – cytotoxicity; б – proliferative activity of Hep-G2 cells. Standard deviation values are shown for 5 independent measurements

ина шелка зависит от конформации молекул белка в составе конструкций. Было показано, что при увеличении доли молекул в состоянии α -спиралей скорость деградации конструкций на основе фиброина шелка увеличивается [22]. Таким образом, рассматриваемая в исследовании разработка основана на осуществлении фазового перехода фиброина шелка без его растворения за счет мягких условий, в которых проводится обработка.

Изменение поверхностной микроструктуры полученных образцов скаффолдов в результате обработки было показано методом СЭМ. В ходе исследования выявлено увеличение шероховатости скаффолда на основе ткани с большей плотностью после обработки. Аналогичный эффект после обработки ткани с меньшей плотностью не был выявлен данным методом, поэтому изучение структуры данных образцов с

высоким разрешением для выявления особенностей микро- и наноструктуры необходимо проводить с помощью методов, обеспечивающих более высокую разрешающую способность, например, сканирующей зондовой нанотомографии [23].

Протокол обработки водно-спиртовым раствором хлорида кальция, используемый в данном исследовании, не приводит к разрушению ткани и существенному изменению ее органолептических свойств, что позволяет производить дальнейшие манипуляции с обработанной тканью.

В данном исследовании образцы биodeградируемых скаффолдов на основе тканей из натурального шелка обрабатывали раствором желатина типа А. Желатин типа А широко применяется в области клеточных технологий и тканевой инженерии для улучшения биосовместимых свойств конструкций из

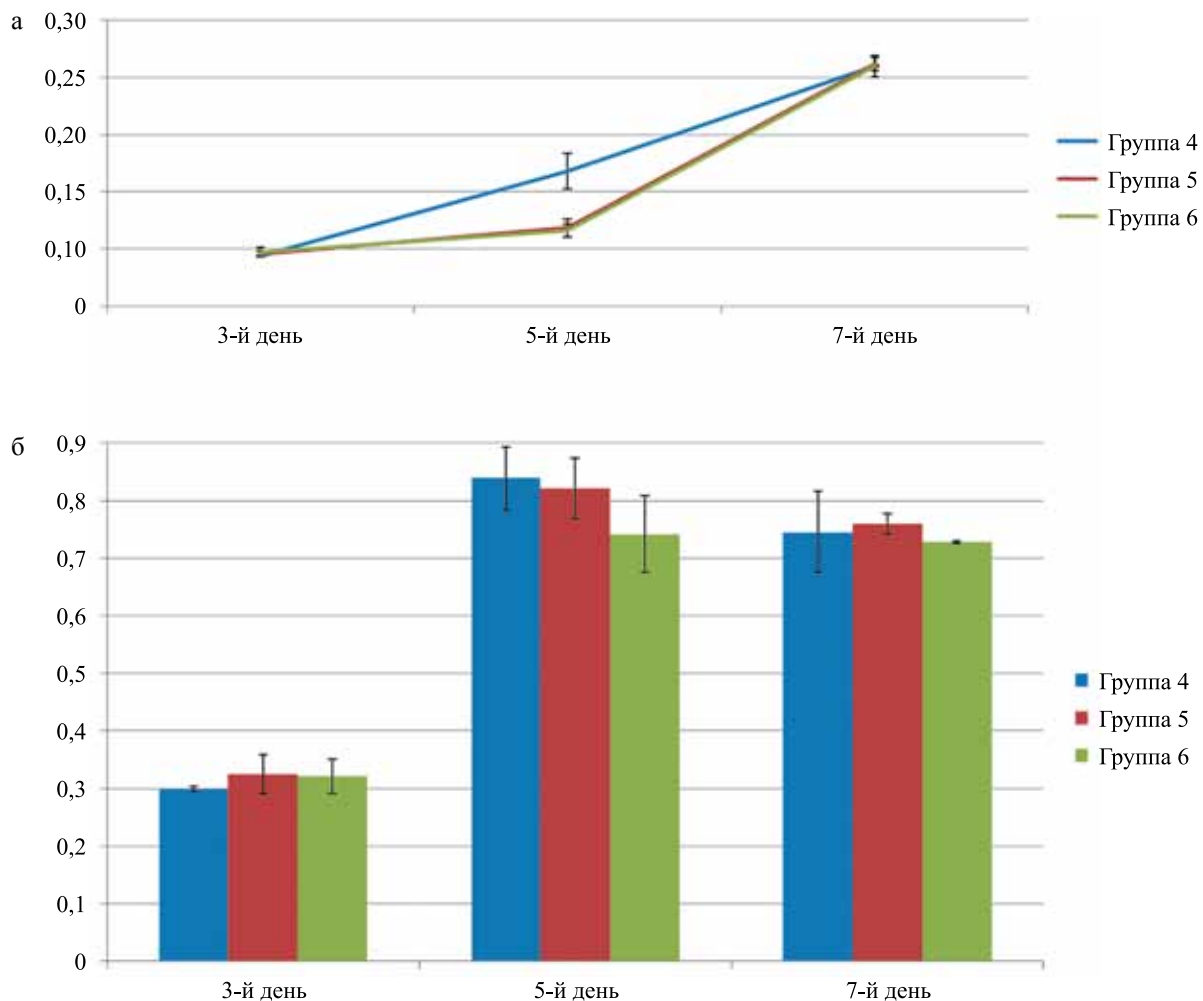


Рис. 5. Результаты исследований биосовместимости образцов скаффолдов на основе ткани из натурального шелка, плотностью 155 г/м² (атлас двусторонний, группы 4–6): а – цитотоксичность; б – пролиферативная активность клеток линии Hep-G2. Указаны значения стандартного отклонения для 5 независимых измерений

Fig. 5. Results of biocompatibility studies of scaffold samples based on natural silk fabric with a 155 g/m² density (double-sided satin, Groups 4–6): a – cytotoxicity; б – proliferative activity of Hep-G2 cells. Standard deviation values are shown for 5 independent measurements

других полимеров, а также для обеспечения гемосовместимости [24, 25]. Обработка биodeградируемых скаффолдов на основе тканей из натурального шелка желатином позволяет проиллюстрировать несколько возможных путей применения такой конструкции.

На сегодняшний день для различных задач тканевой инженерии и регенеративной медицины применяется широкий спектр полимеров природного происхождения, таких как хитозан, альгинат, желатин, коллаген и др., основным недостатком которых являются низкие показатели механических характеристик, таких как прочность и эластичность, что приводит к хрупкости конструкций, получаемых на их основе [26]. Применение тканей из натурального шелка в качестве армирующего компонента таких конструкций может обеспечить необходимые механические характеристики и расширить сферы при-

менения данных полимеров. Так, ткань с меньшей плотностью в рамках данного исследования можно рассматривать в качестве армирующего компонента пленки из желатина.

Другим перспективным направлением применения тканей из натурального шелка является их использование в качестве носителей для направленной доставки лекарственных средств с целью их постепенного высвобождения. Таким образом можно получить скаффолд с заданным сроком деградации, содержащий различные биологически активные вещества или лекарственные средства, которые будут высвобождаться из скаффолда по мере его деградации и обеспечивать эффективное восстановление органов и тканей.

Образцы полученных биodeградируемых скаффолдов не проявляют цитотоксического эффекта

и являются биосовместимыми, что проявляется в поддержании высокого уровня пролиферативной активности клеток. В ходе экспериментов не было выявлено различий в пролиферативной активности клеток между скаффолдами разных групп. Это может объясняться тем, что применение желатина снижает шероховатость поверхности скаффолдов, тем самым затрудняя адгезию клеток, что сказывается на уровне пролиферативной активности. При этом растворения желатина в составе скаффолда не происходит вследствие обработки перешивающими агентами – EDC и NHS, которые снижают скорость деградации покрытия из желатина.

Таким образом, использованный в исследовании подход к применению тканей из натурального шелка позволяет получать биосовместимые скаффолды на их основе. Использование тканей из натурального шелка является перспективным технологическим решением для получения биосовместимых биодеградируемых скаффолдов и их применения в различных областях тканевой инженерии и регенеративной медицины.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная методика позволяет получать скаффолды на основе тканей из натурального шелка. Полученные скаффолды являются биосовместимыми, что открывает возможность их применения в различных областях тканевой инженерии и регенеративной медицины. Структура полученных скаффолдов, а также динамика деградации *in vitro* и *in vivo* требуют дальнейшего детального анализа.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Koh L-D, Cheng Y, Teng C-P, Khin Y-W, Loh X-J, Tee S-Y et al. Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials. *Progress in Polymer Science*. 2015; 46: 86–110. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2015.02.001.
2. Ding Z, Han H, Fan Z, Lu H, Sang Y, Yao Y et al. Nanoscale Silk-Hydroxyapatite Hydrogels for Injectable Bone Biomaterials. *ACS applied materials & interfaces*. 2017; 9: 16913–16921. doi: 10.1021/acsami.7b03932. PMID: 28471165.
3. Kim DK, Sim BR, Khang G. Nature-derived aloe vera gel blended silk fibroin film scaffolds for cornea endothelial cell regeneration and transplantation. *ACS applied materials & interfaces*. 2016; 8: 15160–15168. doi: 10.1021/acsami.6b04901. PMID: 27243449.
4. Dinis T, Elia R, Vidal G, Dermigny Q, Denoed C, Kaplan D et al. 3D multi-channel bi-functionalized silk electrospun conduits for peripheral nerve regeneration. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2015; 41: 43–55. doi: 10.1016/j.jmbbm.2014.09.029. PMID: 25460402.
5. Wang Y, Rudym DD, Walsh A, Abrahamsen L, Kim H-J, Kim HS et al. In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. *Biomaterials*. 2008; 29: 3415–3428. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.05.002. PMID: 18502501.
6. Gupta P, Lorentz KL, Haskett DG, Cunnane EM, Ramaswamy AK, Weinbaum JS et al. Bioresorbable silk grafts for small diameter vascular tissue engineering applications: In vitro and in vivo functional analysis. *Acta Biomater*. 2020; 15 (105): 146–158. doi: 10.1016/j.actbio.2020.01.020. PMID: 31958596.
7. Hasturk O, Jordan KE, Choi J, Kaplan DL. Enzymatically crosslinked silk and silk-gelatin hydrogels with tunable gelation kinetics, mechanical properties and bioactivity for cell culture and encapsulation. *Biomaterials*. 2019; 232: 119720. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119720. PMID: 31896515.
8. Wang Y, Fan S, Li Y, Niu C, Li X, Guo Y et al. Silk fibroin/sodium alginate composite porous materials with controllable degradation. *Int J Biol Macromol*. 2019; 1 (150): 1314–1322. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.141. PMID: 31747567.
9. Ratanavaraporn J, Kanokpanont S, Damrongsakkul S. The development of injectable gelatin/silk fibroin microspheres for the dual delivery of curcumin and piperine. *J Mater Sci Mater Med*. 2014; 25 (2): 401–410. doi: 10.1007/s10856-013-5082-3. PMID: 24186150.
10. Yang W, Xu H, Lan Y, Zhu Q, Liu Y, Huang S et al. Preparation and characterisation of a novel silk fibroin/hyaluronic acid/sodium alginate scaffold for skin repair. *Int J Biol Macromol*. 2019; 1 (130): 58–67. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.120. PMID: 30797808.
11. Marcolin C, Draghi L, Tanzi M, Faré S. Electrospun silk fibroin-gelatin composite tubular matrices as scaffolds for small diameter blood vessel regeneration. *J Mater Sci Mater Med*. 2017; 28 (5): 80. doi: 10.1007/s10856-017-5884-9. PMID: 28397163.
12. Сафонова ЛА, Боброва ММ, Агапова ОИ, Архипова АЮ, Гончаренко АВ, Агапов ИИ. Пленки на основе фиброина шелка для заживления полнослойной раны кожи у крыс. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2016; 18 (3): 80–83. Safonova LA, Bobrova MM, Agapova OI, Arkhipova AYU, Goncharenko AV, Agapov II. Fibroin Silk Based Films For Rat's Full-Thickness Skin Wound Regeneration. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2016; 18 (3): 74–84. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2016-3-74-84.
13. Li T, Song X, Weng C, Wang X, Gu L, Gong X et al. Silk fibroin/carboxymethyl chitosan hydrogel with tunable biomechanical properties has application potential as cartilage scaffold. *Int J Biol Macromol*. 2019; 137: 382–391. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.245. PMID: 31271796.

14. Wang F, Wu H, Venkataraman V, Hu X. Silk fibroin-poly(lactic acid) biocomposites: Effect of protein-synthetic polymer interactions and miscibility on material properties and biological responses. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019; 104: 109890. doi: 10.1016/j.msec.2019.109890. PMID: 31500018.
15. Roy T, Maity PP, Rameshbabu AP, Das B, John A, Dutta A et al. Core-Shell Nanofibrous Scaffold Based on Polycaprolactone-Silk Fibroin Emulsion Electrospinning for Tissue Engineering Applications. *Bioengineering (Basel)*. 2018; 5 (3): 68. doi: 10.3390/bioengineering5030068. PMID: 30134543.
16. Zhou F, Zhang X, Cai D, Li J, Mu Q, Zhang W et al. Silk fibroin-chondroitin sulfate scaffold with immuno-inhibition property for articular cartilage repair. *Acta Biomater*. 2017; 63: 64–75. doi: 10.1016/j.actbio.2017.09.005. PMID: 28890259.
17. Shen Y, Tu T, Yi B, Wang X, Tang H, Liu W, Zhang Y. Electrospun acid-neutralizing fibers for the amelioration of inflammatory response. *Acta Biomater*. 2019; 97: 200–215. doi: 10.1016/j.actbio.2019.08.014. PMID: 31400522.
18. Агапов ИИ, Агапова ОИ, Ефимов АЕ, Соколов ДЮ, Боброва ММ, Сафонова ЛА. Способ получения биodeградируемых скаффолдов на основе тканей из натурального шелка. Патент на изобретение RU2653428 C1, 08.05.2018. Agapov II, Agapova OI, Efimov AE, Sokolov DYu, Bobrova MM, Safonova LA. Sposob polucheniya biodegradiruemykh skaffoldov na osnove tkaney iz natural'nogo shelka. Patent na izobrenenie RU2653428 S1, 08.05.2018.
19. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65 (1–2): 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4. PMID: 6606682.
20. Shen T, Wang T, Cheng G, Huang L, Chen L, Wu D. Dissolution behavior of silk fibroin in a low concentration CaCl₂-methanol solvent: From morphology to nanostructure. *Int J Biol Macromol*. 2018; 1 (113): 458–463. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.022. PMID: 29421494.
21. Hino T, Tanimoto M, Shimabayashi S. Change in secondary structure of silk fibroin during preparation of its microspheres by spray-drying and exposure to humid atmosphere. *J Colloid Interface Sci*. 2003; 266 (1): 68–73. doi: 10.1016/s0021-9797(03)00584-8. PMID: 12957583.
22. Hu Y, Zhang Q, You R, Wang L, Li M. The Relationship between Secondary Structure and Biodegradation Behavior of Silk Fibroin Scaffolds. *Adv Mater Sci and Eng*. 2012; 2012: 21–25. <https://doi.org/10.1155/2012/185905>.
23. Ефимов АЕ, Агапова ОИ, Сафонова ЛА, Боброва ММ, Агапов ИИ. Трехмерный анализ микро- и наноструктуры биоматериалов и клеток методом сканирующей зондовой крионанотомографии. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2017; 19 (4): 78–87. Efimov AE, Agapova OI, Safonova LA, Bobrova MM, Agapov II. Three-dimensional analysis of micro and nanostructure of biomaterials and cells by method of scanning probe nanotomography. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2017; 19 (4): 78–87. doi: 10.15825/1995-1191-2017-4-78-87.
24. Zhang F, Xu S, Wang Z. Pre-treatment optimization and properties of gelatin from freshwater fish scales. *Food Bioprod Proc*. 2011; 89: 185–193. doi: 10.1016/j.fbp.2010.05.003.
25. Su K., Wang C. Recent advances in the use of gelatin in biomedical research. *Biotechnol Lett*. 2015; 37 (11): 2139–2145. doi: 10.1007/s10529-015-1907-0. PMID: 26160110.
26. Abdulghani S, Mitchell GR. Biomaterials for In Situ Tissue Regeneration: A Review. *Biomolecules*. 2019; 9 (11): 750. doi: 10.3390/biom9110750. PMID: 31752393; PMCID: PMC6920773.

*Статья поступила в редакцию 16.10.2020 г.
The article was submitted to the journal on 16.10.2020*