



## СОДЕРЖАНИЕ

Авторы.....	5
Введение.....	7
<b>Глава 1. Полимеры природного происхождения .....</b>	<b>8</b>
1.1. Шелк.....	8
1.1.1. Возникновение шелководства.....	8
1.1.2. Получение шелка .....	9
1.1.3. Характеристика шелка.....	12
1.1.4. Фиброин как биоматериал .....	14
1.1.4.1. Биодegradируемые носители из фиброина шелка для клеточных культур и лекарственных веществ.....	20
1.1.4.1.1. Клеточные микроносители .....	20
1.1.4.1.2. Носители лекарственных веществ.....	20
1.1.4.2. Использование фиброина шелка при лечении заболеваний поджелудочной железы.....	24
1.1.4.3. Использование фиброина шелка при лечении заболеваний роговицы.....	26
1.1.4.4. Использование фиброина шелка при лечении раковых заболеваний .....	28
1.1.4.5. Применение шелка в инженерии тканей .....	33
1.1.4.5.1. Костная ткань .....	36
1.1.4.5.2. Хрящевая ткань.....	45
1.1.4.5.3. Ранозаживление.....	50
1.1.4.5.4. Связки.....	53
1.1.4.5.5. Кровеносные сосуды .....	54
1.1.4.5.6. Желудочно-кишечный тракт, мочевыделительная система .....	58
1.1.4.5.7. Нервная ткань .....	60
1.1.4.6. Антимикробные свойства фиброина шелка .....	64
1.2. Каркасный шелк паутины .....	64
1.3. Коллаген .....	70
1.4. Хитин, хитозан .....	72
1.5. Бактериальные полиоксиалканоаты – полиоксибутираты .....	74
1.6. Альгиновая кислота .....	75
<b>Глава 2. Синтетические полимеры.....</b>	<b>80</b>
2.1. Полигликолевая кислота .....	80
2.2. Полилактид .....	82
2.3. Поликапролактон .....	84
<b>Глава 3. Особенности иммунного ответа на биоматериалы .....</b>	<b>88</b>

<b>Глава 4. Способы получения и методы исследования биоматериалов.....</b>	<b>96</b>
4.1. Технологии изготовления 3D-матриц.....	96
4.1.1. Метод выщелачивания .....	96
4.1.2. Метод сублимации .....	97
4.1.3. Метод электроспиннинга .....	97
4.1.4. Метод биопринтирования.....	97
4.2. Методы исследования биоматериалов .....	98
4.2.1. Микроскопические методы исследования биоматериалов.....	98
4.2.1.1. Сканирующая электронная микроскопия .....	98
4.2.1.2. Трансмиссионная электронная микроскопия .....	99
4.2.1.3. Конфокальная микроскопия .....	101
4.2.1.4. Сканирующая зондовая микроскопия .....	102
4.2.1.5. Сканирующая зондовая нанотомография.....	104
4.2.2. Инфракрасная спектроскопия .....	105
<b>Глава 5. Исследование биологических свойств биополимеров <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> .....</b>	<b>107</b>
5.1. Матрицы из фиброина шелка и рекомбинантного спидроина: получение, сравнительный анализ .....	107
5.2. Изучение адгезии и пролиферации фибробластов 3Т3 на каркасных матрицах из рекомбинантного спидроина и фиброина шелка.....	108
5.3. Экспериментальная модель травматического повреждения бедренной кости для исследования свойств матриц <i>in vivo</i> ...	109
5.4. Тканеспецифические матрицы.....	120
<b>Заключение .....</b>	<b>122</b>
<b>Список сокращений .....</b>	<b>123</b>
<b>Список литературы.....</b>	<b>125</b>

## **Авторы**

**Ольга Игоревна Агапова** — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории бионанотехнологий ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, специалист по трехмерному структурному анализу биополимеров, клеток и тканей.

**Игорь Иванович Агапов** — доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией бионанотехнологий ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, специалист по молекулярной биологии, регенеративной медицине, автор более 150 научных работ и изобретений.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» — крупнейшее научно-практическое учреждение, выполняющее фундаментальные и прикладные исследования в области трансплантологии и искусственных органов.

Монография выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 17-75-10098).

Agapova O. I., Agapov I. I

Biodegradable products based on silk fibroin for tissue engineering and regenerative medicine

**Annotation:** The book presents modern results of studying of structure and biological properties of products based on fibroin silk and other biodegradable polymers of natural and synthetic origin. In this book authors examine the ways of obtaining biopolymers and products from them, the possibility of using them for regenerative medicine, tissue engineering, pharmaceuticals. In this monograph authors analyze advantages and disadvantages of biopolymers. The book is intended for specialists in the fields of bioengineering, bionanotechnology, structural biology, polymer chemistry, pharmaceuticals.

#### **Authors**

**Agapova Olga Igorevna** — PhD in Biology, researcher of Laboratory of Bionanotechnology, «Academician V.I.Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs», Ministry of Health of the Russian Federation.

**Agapov Igor Ivanovich** — Doctor of Science in Biology, professor, head of Laboratory of Bionanotechnology, «Academician V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs», Ministry of Health of the Russian Federation.

## **Введение**

Полимеры природного (биополимеры) и синтетического происхождения находят широкое применение в области тканевой инженерии, регенеративной медицины и фармацевтике. Биополимеры – класс полимеров, которые входят в состав животных и растительных организмов. Благодаря биосовместимости и биodeградируемости до метаболитов, участвующих в клеточных процессах, они имеют преимущество перед синтетическими полимерами. Тем не менее такие материалы, как полигликолевая кислота, полилактид и поликапролактон, благодаря своим биологическим, химическим и механическим свойствам также находят должное применение. Изучение биodeградируемых полимеров открывает новые возможности для биоинженерии и регенеративной медицины: сочетание полимеров природного и синтетического происхождения позволяет создавать конструкции с наиболее подходящими свойствами для практического применения.

# ГЛАВА I

## ПОЛИМЕРЫ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

### 1.1. Шелк

#### 1.1.1. Возникновение шелководства

Как рассказывает история, первые упоминания о шелковичном черве связаны с Древнем Китаем и датируются 2600 г. до н. э. В процессе археологических раскопок в китайской провинции Шаньси были найдены коконы тутового шелкопряда, возраст которых определяется 2000 г. до н. э. С давних времен китайцы хранили тайну разведения бабочек и гусениц шелкопряда. Тем не менее в IV в. н. э. некая китайская принцесса преподнесла своему будущему мужу, королю малой Бухары, яйца шелковичного червя в качестве подарка. В 552 году монахи принесли из путешествия по Китаю яйца шелкопряда императору Византии Юстиниану, после чего он издал указ о разведении шелкопряда в восточных областях своих владений (1). Расцвет шелководства начался в Малой Азии, чуть позже – в Испании и Северной Африке после арабских завоеваний. Из Константинополя яйца шелковичного червя были привезены в Венецию после крестового похода в 1203–1204 гг. в долину реки По, где и по сей день происходит разведение шелкопряда. На юге Франции шелководство появилось в 14 веке, а в России, под Москвой в селе Измайлово, оно зародилось в 1596 г., а чуть позже распространилось и в более благоприятных для этого южных регионах. Несмотря на разведение шелкопряда в Европе и умение обращаться с коконами, по большей части шелк поставляли именно из Китая, который по сей день является крупнейшим производителем натурального шелка (50% от производства в мире), ведь именно здесь зародилась традиция шелководства. Другими основными поставщиками шелка в мире являются Индия (15% мирового производства), Узбекистан, Бразилия, Иран, Вьетнам, Таиланд (2).

### 1.1.2. Получение шелка

Шелковая ткань красива внешне, равномерно окрашивается, она очень прочная, легкая, превосходно сохраняет тепло. В основе этих качеств лежат уникальные свойства белкового волокна нити.

Тутовый шелкопряд (*Bombyx mori*) — бабочка из семейства настоящих шелкопрядов, и именно они разводятся человеком для производства шелка. Шелкопряд был одомашнен в Китае около 3000 лет до н. э. Предположительно его близкой и, возможно, исходной формой является дикий тутовый шелкопряд (*Bombyx mandarina*), область обитания которого распространяется от северных районов Индии до северных областей Китая, Кореи, Японии, дальневосточных регионов России. Жизненный цикл одомашненных бабочек шелкопряда из-за тысячелетней селекции находится в большой зависимости от человека, в отличие от жизненного цикла диких шелкопрядов, разведение которых не является коммерчески выгодным для производства шелка (3). Предполагается, что одомашненная бабочка развивалась от шелкопрядов из регионов Китая (4). До периода неолита шелкопрядов вряд ли разводили в домашних условиях, так как для этого не были разработаны инструменты, помогающие изготавливать большое количество шелковой нити.

Чтобы понять весь этап формирования шелка, стоит рассказать о самом насекомом *Bombyx mori*.

Как правило, тутовые шелкопряды делятся на три типа:

- моновольгинные — дают одно поколение в год; чаще всего их географическая среда обитания — Европа. Яйца шелкопряда имеют период покоя, который приходится на холодное время года, перекрестное оплодотворение происходит только весной, производится шелк один раз в год;
- бивольгинные — дают два поколения в течение 12 месяцев, обычно встречаются в Китае, Корее, Японии. Процесс размножения этого типа шелкопряда происходит два раза в год. Это возможно благодаря более теплему климату;
- поливольгинные — способны к воспроизведению нескольких поколений. Этот тип шелкопряда обитает только в тропиках. Яйца откладываются женскими особями и высиживаются от 9 до 12 дней, поэтому этот тип может иметь до восьми отдельных жизненных циклов в течение года.



Бабочка шелкопряда — небольшое насекомое серовато-белого цвета с размахом крыльев от 40 до 60 мм. Как у самок, так и у самцов имеются гребенчатые усики, которые больше у представителей мужских особей. Особенностью бабочек тутового шелкопряда является то, что они практически не имеют способности к полету, самки еще более малоподвижны, их ротовой аппарат недоразвит, в связи с чем на протяжении всей жизни они не питаются, что называется афагией. Бабочке необходимо найти партнера для спаривания в течение короткого времени, так как живет она недолго — несколько дней. Самка откладывает яйца — грену — на листья тутового дерева, количество в кладке — 500–700 штук. Кладка эллиптической формы, сплюснутая по бокам, ее длина в среднем составляет около 1 мм, ширина — 0,5 мм, возможны некоторые вариации между разными породами. Откладывание яйца длится около трех суток, после чего у шелкопряда наступает диапауза, т.е. замедление обмена веществ и приостановление процессов формообразования, которая приходится на стадию яйца (5). Для моновольтинных видов характерна облигатная эмбриональная диапауза. У других типов факультативная диапауза, и они приносят несколько поколений за год. Наличие стадии диапаузы зависит от того, на протяжении какого фотопериода развивался эмбрион его родителя-самки. Так, яйца пройдут через диапаузу на ранних этапах цикла, если эмбриональное развитие самки проходило в период большой продолжительности дня в сочетании с высокими температурами. Если же самка развивалась при низких температурах и короткой продолжительности дня, откладываемые яйца будут развиваться без диапаузы. Особи, родившиеся весной при коротком дне, дают потомство, вырастающее летом, без диапаузы. Оно будет откладывать яйца, которые пройдут через диапаузы, перезимовав, и их развитие придется на весенний период. Таким образом, эти виды дают два поколения в течение года (6).

Шелковичный червь, т. е. гусеница, вылупляется из яйца размером в несколько миллиметров. В течение последующих трех дней ее вес увеличивается в десять тысяч раз. Гусеница линяет четыре раза, после чего ее окрас приобретает желтоватый оттенок. Развитие шелковичного червя длится от 26 до 32 дней. Продолжительность развития зависит от таких факторов, как температура, влажность, количество пищи, а также ее качество. Размер взрослой гусеницы составляет около 7 см. Ее пищей являются листья тутового дерева (шелковицы), таким образом, это насекомое называется монофа-



гом, т. е. питающимся одним видом кормового растения (7). Ввиду этого территория шелководства связана с произрастанием этого растения. После окукливания гусеница создает кокон, начиная с построения поддерживающего всю будущую конструкцию каркаса. Прodelывая быстрые движения головой, она укладывает шелковую нить в форме восьмерки. Количество таких равномерных движений достигает 230 000 раз, длина непрерывной нити одного кокона составляет 300–900 м, а в самых крупных коконах может достигать и до 1500 м. Кокон бывает различных оттенков, например розового, зеленого, желтого, однако для промышленного производства разводят породы с коконами белого цвета (рис. 1). Кокон формируется в течение 2–3 дней, и внутри происходит трансформация гусеницы в куколку. Бабочки высвобождаются на 15–18-й день. Однако, чтобы получить шелк, коконы собирают до появления бабочки, иначе она прогрызет кокон, тем самым повредив нить. Поэтому коконы до этой стадии не доживают и их инкубируют при температуре приблизительно в 100 °С в течение 2–2,5 часов, таким образом убивая куколку, разрушая защитный слой, что облегчает раскручивание природной конструкции на отдельные нити. Затем нити сплетаются вместе, после чего и становятся готовыми



Рис. 1. Кокон шелкопряда

для изготовления шелковой ткани. Часть коконов оставляют до появления бабочек для дальнейшего воспроизводства.

Уникальные механические, биологические, химические и физические свойства шелка, определяющие его красоту, прочность, долговечность, обуславливаются его строением, главным образом на молекулярном уровне. На основе этого можно понять, почему наряду с тканевой отраслью шелк нашел свое применение и в области медицины и фармацевтики. Например, на основе фиброина шелка было сделано ультралегкое резистивное коммутационное запоминающее устройство. Фольга памяти  $0,4 \text{ мг см}^{-2}$  в 320 раз легче силикона и в 20 раз легче офисной бумаги. Кроме того, устройство обладает высоким сопротивлением – отношение OFF/ON равно  $10^5$ , время удерживания составляет  $10^4$ , оно также характеризуется превосходной гибкостью (радиус изгиба 800 мкм) (8).

### 1.1.3. Характеристика шелка

Шелк – природное белковое волокно, нить которого состоит из фиброиновых фибрилл, покрытых слоем клееобразного белка серицина, способствующего склеиванию фибрилл при формировании кокона. В отличие от фиброина, серицин – водорастворим, при кипячении кокона образует в растворе клейкую массу. На этом основана очистка коконов, так как серицин является потенциальным аллергеном и при использовании в медицине может быть причиной аллергической реакции 1-го типа (9). В процентном соотношении доля фиброина в шелковом волокне составляет 72–81%, серицина – 19–28%, кроме того, присутствуют жиры и воск – 0,8–1,0%, красящие и другие минеральные вещества – 1,0–1,4% (10). Самым распространенным является шелк, полученный из коконов гусениц тутового шелкопряда *Bombyx mori* (11). Свойство переливаться шелковая ткань получила благодаря треугольному сечению нити, способной к преломлению падающего на нее света.

Фиброин является основным белком шелка, который получают из коконов шелкопряда *Bombyx mori* и родственных видов. Фиброин представляет собой гетеродимер, состоящий из двух ковалентно связанных дисульфидными связями полипептидных цепей: легкой цепи Fib-L с массой 26 кДа (262 аминокислоты) и тяжелой Fib-H

цепи с массой 350 кДа (5263 аминокислоты) (12), (13). Гликозилированный белок P25 с массой 30 кДа связан с Fib-L и Fib-H гидрофобными связями в единый комплекс (14). Предполагается, что этот комплекс может формироваться из шести тяжелых и шести легких цепей на одну молекулу гликолизированного белка P25 (15). Легкая цепь и тяжелая цепь фиброина, а также белок P25 кодируются в геноме шелкопряда отдельно (12). Первичную структуру фиброина составляют глицин (43%), аланин (30%), серин (12%) (16). В меньшем количестве в состав аминокислотной последовательности входят тирозин (5%), валин (2%), аспартат, глутамат и цистеин, который выполняет главную интегрирующую роль в объединении разных субъединиц в одну молекулу. Глицин, аланин и серин составляют основную структурную последовательность Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser тяжелой цепи Fib-H, доля которой – 70% всей белковой последовательности (17). Более редко встречаются похожие последовательности: Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Tyr (20%), Gly-Ala-Gly-Tyr-Gly-Ala (6%), Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ala (4%), каждая из которых составляет основу 12 регулярных гидрофобных кристаллических блоков, длина каждого из них – 413 аминокислотных остатков. Эти 12 блоков – 94% общей белковой последовательности, и разделяются они 11 нерегулярными аморфными промежуточными участками длиной в 42–43 аминокислотных остатка с отрицательным зарядом (16). В общей структуре фиброина выделяют положительно заряженный С-конец тяжелой цепи длиной в 58 аминокислотных остатков, отрицательно заряженный N-конец тяжелой цепи длиной в 151 аминокислотный остаток и последовательность легкой цепи Fib-L, обладающую амфифильностью с небольшим преобладанием отрицательного заряда. Такая структура обуславливает амфифильность молекулы фиброина шелка с существенным перевесом в сторону гидрофобности. Фиброин не растворяется в воде, а также в разбавленных растворах многих кислот и щелочей, но растворим в концентрированных растворах хлорида лития, тиоцианата лития и кальция, хлорида кальция. Благодаря тому что фиброин способен формировать и  $\alpha$ -спирали, и  $\beta$ -складки, он существует в нескольких структурных формах: 1) рыхлой, глобулярной; 2) обогащенной  $\alpha$ -спиралями аморфной форме (silk I); 3) прочной кристаллической  $\beta$ -форме (silk II). Первая форма нестабильная и механически непрочная,  $\alpha$ -форма (silk I) является устойчивой и упругой, а третья  $\beta$ -форма (silk II) обладает самой высокой прочностью на разрыв,

она устойчива к сильным механическим воздействиям, но менее упругая, чем  $\alpha$ -форма (16). Кристаллизуется белок под воздействием непредельных алифатических спиртов, метанола или этанола, высоких температур, концентрированных растворов солей, а также при доведении рН раствора фиброина шелка до изоэлектрической точки. Фиброин способен сохранять кристаллическую структуру в течение долгого времени (18). Именно насыщенная  $\beta$ -структурами форма белка задает и поддерживает форму создаваемой из фиброина тканеинженерной конструкции, обеспечивает его целостность и стабильность в водных растворах в течение долгого времени (19). В связи с этим конструкции из фиброина перед применением необходимо подвергать  $\beta$ -кристаллизации в целях сохранения их целостности и увеличения периода деградации в среде культивирования или в условиях *in vivo*. Боковые группы аминокислот, входящих в состав фиброина (аминогруппы, спиртовые, карбоксильные, тио-группы, ароматические) влияют на химические свойства белка. Доля фиброина в шелковой нити составляет 70–80% массы белка, остальная часть – это серицин, скрепляющий фибриллы в коконе, а также несколько процентов жиро- и воскоподобных веществ, неорганических анионов и катионов (менее 1%) (20), (21). Фиброин является термостабильным белком, температура его денатурации выше 127°C, его модуль упругости равен 15–17 ГПа. Конструкции из фиброина шелка обладают высокой прочностью на разрыв (610–690 МПа), что позволяет применять его в работах по созданию искусственных сухожилий (150 МПа) и костной ткани (160 МПа) (22). Раствор фиброина характеризуется высокой прозрачностью, его коэффициент пропускания видимого спектра излучения составляет 90–95%, а коэффициент преломления света фиброиновыми пленками толщиной 30–50 мкм равен 1,55 (23).

Шелкопряд вырабатывает шелковую нить, которая содержит большое количество воды, поэтому молекулы фиброина в составе шелковой нити находятся в неупорядоченном состоянии, тогда как в зрелом волокне молекулы фиброина упорядочены (24).

#### 1.1.4. Фиброин как биоматериал

Выбор материала для регенеративной медицины, а также технология изготовления биоконструкций зависят от области применения: костная ткань, кровеносные сосуды, кожа, мышечная ткань,

нервные волокна. Для успешного использования биоматериал должен обладать определенными химическими, биологическими и механическими свойствами (25), (26). К требуемым химическим свойствам можно отнести такие характеристики, как отсутствие токсичных продуктов при взаимодействии с тканями и межтканевыми жидкостями, резорбция с контролируемой скоростью внутри организма (27). К необходимым механическим свойствам относятся прочность конструкции, возможность осуществлять хирургические манипуляции. Главной биологической характеристикой для материала является его биосовместимость. Фиброин обладает всеми вышеизложенными свойствами. На основе фиброина шелка создаются композитные конструкции, что позволяет получить более функциональные изделия за счет изменения свойств конструкции вследствие взаимодействия фиброина шелка с другим материалом. Фиброин применяется в сфере регенеративной медицины в качестве материала для изготовления матриц (28), пленок (29), гидрогелей, микро- и макроносителей для клеточных культур, а также в составе конструкций для доставки лекарственных и биологически активных веществ в организме (30), (31).

В экспериментах *in vivo* продолжительность деградации инъекционных гелей из хитозана / SF (фиброина шелка) / GP (глицерофосфата) и хитозана / SF / HA (гидроксипатита) / GP значительно выше по сравнению с гидрогелем из хитозана/GP. Скорость деградации может регулироваться компонентом фиброина шелка как в отдельности, так и с помощью комбинации фиброина шелка и гидроксипатита (32).

Использование гидрогеля из фиброина шелка в качестве модулятора механики и добавление компонентов внеклеточного матрикса как клеточных адгезивных лигандов позволило сделать материал, отвердевающий с течением времени и при этом сохраняющий клеточную адгезию. При отвердевании гидрогеля образуются молекулярные комплексы путем свободнорадикального сшивания остатков тирозина в молекуле фиброина шелка и аналогичных остатков в белковых молекулах внеклеточного матрикса, полученного из левого желудочка свиней, причем степень перешивки позволяет варьировать механические свойства конструкции, а включение в состав конструкции компонентов внеклеточного матрикса позволяет обеспечить адгезию клеток. Добавление внеклеточного матрикса сердечной ткани улучшает пролиферацию и миграцию сердечных

фибробластов в системе *in vitro*. При подкожной инъекции крысам такие гели активируют миграцию клеток и васкуляризацию конструкции в системе *in vivo* (33).

При позвоночном дегенеративном заболевании инъекционный жидкий гидрогель может полностью заполнить дефект, уменьшить опасность перемещения имплантата с последующей потерей высоты диска, минимизировать операционную травму. Гидрогель химически сшит *in situ* путем двухкомпонентной реакции жидкого фиброина шелка с жидким полиуретаном при физиологической температуре. Физические свойства геля оценены с помощью тестов на ограниченное сжатие и испытаний на усталость материала. Для изучения биосовместимости проведено исследование деградации геля в различных растворах и эксперименты на животных. На модуль гидрогеля оказывают влияние геометрические параметры геля (диаметр). В результате композит может выдержать миллион циклов, естественно сопротивляясь усталости. Хорошая биосовместимость наблюдается в течение трех месяцев при экспериментах на новозеландских белых кроликах. В частности, композитные гидрогели обладают значительным клиническим достоинством, обеспечивая более сильную осевую жесткость при тесте на ограниченное сжатие, и, таким образом, потенциально могут применяться для замены студенистого ядра (34).

Имплантируемое биосовместимое и биоразлагаемое волокно из фиброина шелка и кетгута (SGFs) разработано для доставки светового излучения в глубокие ткани. Волокно обладает светорассеивающим свойством благодаря естественным неровностям поверхности и явлению рассеяния внутри волокна. В отличие от правильного оптического волокна, которому свойственно эффективно переносить свет от одной точки к другой, SGFs максимизируют свет, рассеиваемый вдоль волокна, что желательно, когда цель — повлиять на значительно большее количество клеток, что важно при необходимости активирования значительной площади внутренней ткани, а не локализованной точки (35).

Благодаря хорошей механической и термической стабильности, многогранным и универсальным условиям обработки, возможности модифицирования шелк является хорошим кандидатом для использования в сенсорных платформах, которые используют специфичность взаимодействий антиген — антитело и колориметрическую трансдукцию структуры наноструктурированного



фотонного кристалла для распознавания окружающей среды. Перспективной является разработка колориметрических датчиков на основе биополимеров, которые используют структурный цвет как механизм трансдукции (36).

Простые способы изготовления на водной основе, основанные на самосборке белка, используются для получения трехмерных сыпучих материалов из фиброина шелка, которые могут быть легко гибридизованы с водорастворимыми молекулами для получения множества твердых форматов с предварительно разработанными функциями. Управление самосборкой приводит к надежной механической обработке форматов, которые демонстрируют термопластичное поведение, давая возможность изменять форму материала на нано-, микро- и макроуровнях. В качестве наглядного примера созданы шелковые монолиты, которые могут быть собраны, отполированы и переформированы в функциональные механические компоненты с возможностью их наноструктурирования, внедрения оптических функций, нагреваемых по требованию в ответ на инфракрасный свет, способных визуализировать механическое повреждение через колориметрические химические составы, встроенные в собранный (насыпной) белковый матрикс (37).

Послойные пленки из фиброина шелка и амилоида бета-пептида с длиной в 40 аминокислот (A $\beta$ 1-40) подготовлены в целях разработки нового прототипа электрохимического иммуносенсора. Исследования *in vitro* говорят о возможности применения этих систем в качестве нового прототипа для предварительной диагностики болезни Альцгеймера (38).

Пленки из шелка помогают сохранить активность антител на поверхности биосенсоров при повышенных температурах, что показано на примере пленок из фиброина, которые использованы в качестве защитного слоя для сохранения активности модельного антитела (IgG кролика) и антитела к сердечному тропонину при комнатной температуре и при 40°C на протяжении нескольких дней. Предположительно механизм сохранения связан с образованием водородных связей между шелковым матриксом и антителом и дегидратацией интерфейса. Этот энергоэффективный и экологичный метод позволяет исключить систему холодовой цепи во время транспортировки и хранения биосенсоров на основе антител. Важно, что простой водный процесс промывки восстанавливает функциональность биосенсора, который может использоваться



в качестве диагностического устройства в машинах скорой помощи, отделениях интенсивной терапии, отделениях скорой помощи, в полевых и домашних условиях. Метод может распространяться на множество других биосенсорных платформ с учетом простого водного осаждения и удаления защитного слоя (39).

В экспериментах на крысах использована фиброиновая пенообразная матрица в виде инъектируемого материала, которая может служить в качестве каркаса для заполнения мягких тканей и использоваться как самостоятельно, так и вместе с липоасpirатами (40).

Из регенерированного фиброина шелка *Bombyx mori* созданы пленки, трехмерные матрицы и трубки. Конструкции отличаются прочностью и эластичностью, и исследования *in vitro* говорят об их возможности поддерживать адгезию и пролиферацию эукариотических клеток, а структура конструкций способствует равномерному распределению пролиферирующих клеток как на поверхности, так и в толще матрикса. Эксперименты *in vivo* с подкожной имплантацией матриксов мышам демонстрируют высокую скорость биодеградации и их способность подвергаться неоваскуляризации (41).

Для культивирования клеточной линии LNCaP рака простаты были сформированы пять видов пористых композитных матриксов на основе фиброина шелка *Bombyx mori*: с добавлением коллагена, желатина, хитозана, фиброина шелка *Antheraea pernyi* и рекомбинантного спидроина SSP. Добавление тех или иных материалов оказывает разное влияние на пористость, набухаемость, упругость формируемых матриксов. В данном случае цель — улучшение как физических, так и биохимических свойств композиции. Так, интеграция RGD-последовательности в двух видах матриксов должна поддерживать адгезию клеточной культуры. При сравнении матриксов из чистого фиброина и с добавлением хитозана композитный обладает большей пористостью, улучшая рост клеток. Матрикс из фиброина *B. mori* / *A. pernyi* и хитозана характеризуются более плотной и компактной структурой с недостаточной площадью поверхности пор для прикрепления клеток. Матрикс с коллагеном обладает сетью хорошо взаимосвязанных пор и высоким показателем упругости, что также положительно сказывается на клеточном росте. Матрикс из фиброина со спидроином или с коллагеном обладают высокой набухаемостью, что приводит к равномерному распределению лекарственных веществ в объеме матрикса. Биохимические

мическая функционализация должна поддерживать адгезию клеток благодаря RGD-последовательности в составе желатина и фиброина из *A. Pernyi*, однако в обоих случаях этого не происходит из-за низкой пористости. Данное исследование доказывает эффективность фиброиновых матриц для культивирования клеточной культуры, более того, некоторые созданные композитные матрицы показывают еще большую эффективность, чем конструкции из чистых биополимеров или синтетических полимеров (42).

Для оценки фенотипа, жизнеспособности и пролиферации клеток и экспрессии маркеров мезенхимальных стволовых клеток на трехмерных матрицах из фиброина шелка были культивированы стволовые клетки молочных зубов человека (SHEDs). Подсчет количества клеток и оценка пролиферации с помощью колониального анализа осуществлены после 24, 48, 72 и 168 часов культивирования. Морфологические особенности клеток оценены с помощью сканирующей электронной микроскопии, а их жизнеспособность и экспрессия маркеров проанализированы с помощью проточной цитометрии. С увеличением времени культивирования пролиферативная активность клеток увеличивается, уровень экспрессии CD73, CD90 или CD105 существенно не меняется до 168 часов, жизнеспособность клеток на матрице сходна с таковой на пластике. Вместе с тем микроскопические исследования показывают подходящую степень пролиферации, клеточной миграции и адгезии, особенно после 168 часов культивирования, что указывает на благоприятное влияние матриц на клетки и делает актуальными дальнейшие исследования *in vivo* (43).

Для применения в качестве покрытия силиконовых грудных имплантатов изготовлены волокнистые матрицы с помощью технологии электроспиннинга из раствора, содержащего фиброин шелка и полиэтиленоксид (ПЭО). Смесь была нанесена на имплантаты, в результате чего была получена конструкция со случайным распределением волокон, структура которой оценивалась с помощью сканирующей электронной микроскопии, измерений шероховатости и ATR-FTIR-спектроскопии (Фурье-спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения). Сравнение механических характеристик имплантатов до и после покрытия смесью веществ говорит о том, что модификация поверхности смесью фиброина шелка с ПЭО способствует увеличению модуля упругости от  $0,392 \pm 0,02$  до  $0,560 \pm 0,03$  МПа и более эластичному поведению

имплантатов груди. Человеческие фибробласты, культивированные на дисковидных имплантатах с этим покрытием, увеличивают жизнеспособность до 30% по сравнению с обычными грудными имплантатами. Данное шелковое покрытие клинически биосовместимо, обладает низкой цитотоксичностью, его физико-химические и механические свойства позволяют улучшить биосовместимость силиконовых имплантатов (44).

Пористые матриксы из фиброина шелка и поливинилового спирта потенциально могут использоваться в качестве раневого перевязочного материала благодаря низкой цитотоксичности и подходящему высвобождению загруженного в них куркумина (45).

#### **1.1.4.1. Биодеградируемые носители из фиброина шелка для клеточных культур и лекарственных веществ**

##### **1.1.4.1.1. Клеточные микроносители**

Для использования в качестве биодеградируемых микроносителей для клеток и белковых лекарственных препаратов с помощью метода эмульсификации (тип «вода-в-масле») без каких-либо поверхностно-активных веществ получены и обработаны метанолом микрочастицы из фиброина шелка. Их структура способствует прикреплению клеток и иммобилизации ферментов (46).

Из водного раствора фиброина шелка созданы трехмерные биоразлагаемые микроносители со сложной поверхностью и порами, способствующими проникновению культуральной среды, газообмену и клеточной адгезии. Фиброиновые молекулы образуют гидрофобные структуры и имеют отрицательный заряд, который стимулирует миграцию, но ингибирует клеточную адгезию. В целях повышения адгезии в состав микроносителей добавлен желатин – гидрофильный биополимер с интегрин-связывающей RGD-последовательностью. Полученные биорезорбируемые микроносители поддерживают адгезию и пролиферацию мышинных 3T3 фибробластов (47).

##### **1.1.4.1.2. Носители лекарственных веществ**

В условиях *in vivo* путем нанесения гидрогеля из фиброина шелка и полиэтиленгликоля с загруженным в него дексаметазоном