

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА
Биологический факультет

На правах рукописи

КОНЬКОВ АНДРЕЙ СЕРГЕЕВИЧ

**Создание пористых матриц из регенерированного
фибрина шелка *Bombyx mori* для восстановления
костной ткани**

03.01.06 — биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.б.н. А.В. Гончаренко

Москва — 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Регенерация костной ткани	10
1.2. Основные подходы к восстановлению костной ткани.....	13
1.3. Сравнительная характеристика разных материалов	15
1.4. Физико-химические и биологические свойства фиброина.....	21
1.5. Создание прототипов биоискусственных органов и тканей на основе фиброина.....	25
1.5.1. Применение фиброина для создания биоискусственных органов и тканей.....	25
1.5.2. Влияние фиброиновых матриксов на регенерацию костной ткани	27
1.5.3. Применение фиброина в инженерии костной ткани	30
1.5.3.1. Применение фиброина для восстановления костной ткани в условиях <i>in vitro</i>	31
1.5.3.2. Применение фиброина для восстановления костной ткани в условиях <i>in vivo</i>	36
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	39
2.1. Клеточные линии	39
2.2. Среды для культивирования клеток.....	39
2.3. Выделение мезенхимальных стромальных клеток	39
2.4. Культивирование клеток на фиброиновых матриксах и микроносителях.....	40
2.5. Оценка способности поддерживать адгезию и пролиферацию	41
2.6. Изменение уровня экспрессии щелочной фосфатазы	42
2.7. Изготовление трехмерных матриксов из фиброина.....	43
2.8. Изготовление микроносителей из фиброина	46
2.9. Механические свойства матриксов	47

2.10. Измерение скорости деградации матрицсов	48
2.11. Лабораторные животные	48
2.12. Подкожная имплантация мышам линии Balb/c для оценки биосовместимости в условиях <i>in vivo</i>	48
2.13. Модель повреждения бедренной кости	49
2.14. Гистология и приготовление образцов	50
2.15. Микроскопия	52
2.16. Рентгеномографические исследования	54
2.17. Статистическая обработка результатов	55
2.18. Перечень используемых ГОСТов.....	55
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	56
3.1. Характеристика матрицсов.....	56
3.1.1. Внешний вид, форма и структура матрицсов.....	56
3.1.2. Характеристика микроносителей	59
3.1.3. Прочность на разрыв и растяжимость минерализованных матрицсов	59
3.1.4. Скорость деградации матрицсов	60
3.2. Биосовместимость фиброиновых матрицсов и микроносителей..... поддерживать адгезию и пролиферацию клеток.	61
3.3. Остеогенные свойства трехмерных фиброиновых микроносителей	64
3.3.1. Пролиферация мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на поверхности микроносителей.....	65
3.3.2. Пролиферация остеобласт-подобных клеток на поверхности микроносителей	67
3.4. Перестройка цитоскелета при адгезии клеток	71
3.5. Оценка биосовместимости в экспериментах <i>in vivo</i>	72
3.6. Регенерация костной ткани при использовании фиброиновых имплантатов	73
3.6.1. Гистологический анализ области имплантации	73

3.6.2. Рентгеномографическая оценка заживления искусственного костного дефекта при использовании фиброиновых имплантатов	76
4. ОБСУЖДЕНИЕ	78
4.1. Свойства и структура созданных трехмерных матриц и микроносителей из фиброина	78
4.2. Адгезивные и пролиферативные свойства трехмерных фиброиновых матриц и микроносителей	82
4.3. Остеогенные свойства трехмерных микроносителей из фиброина..	86
4.4. Перестройка цитоскелета при адгезии клеток на поверхности трехмерных микроносителей из фиброина	88
4.5. Биосовместимость полученных трехмерных фиброиновых матриц в условиях <i>in vivo</i>	90
4.6. Остеокондуктивные свойства полученных трехмерных матриц	91
4.7. Общий итог сравнения.....	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	95
ВЫВОДЫ	97
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	98
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	99
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА	112

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Одной из проблем современной восстановительной медицины является поиск новых технологий восстановления костной ткани. Несмотря на значительный прогресс в этой области, разработка новых подходов и усовершенствование уже существующих методик остается актуальной задачей. Ежегодно в мире при лечении травм опорно-двигательного аппарата проводится около 2,2 миллионов операций по пересадке костных трансплантатов [Polo-Corrales, Latorre-Esteves, Ramirez-Vick, 2014]. Нехватка донорского материала и проблемы, связанные с его использованием стимулировали исследования по разработке искусственных материалов, заменяющих костную ткань. О возрастании потребности в создании новых типов тканеинженерных конструкций свидетельствует рост и объем рынка искусственных костных имплантатов. Согласно данным компании «Orthoworld» с 2015 по 2016 гг. продажи костных имплантатов выросли с 46,657 до 48,158 млрд. долларов США, т.е. за один год увеличились примерно на 1,5 млрд. долларов [Orthoworld Inc. 2017]. Наиболее перспективным направлением является создание биоразлагаемых тканеинженерных конструкций (скаффолдов), способных имитировать свойства внеклеточного матрикса кости, поддерживать ее форму и целостность и служить субстратом для адгезии клеток.

Степень разработанности темы. В инженерии костной ткани создано много типов костных матриксов на основе разных материалов, но до сих пор не разработан подход, позволяющий создать костный имплантат, лишенный недостатков. Матрикссы на основе металлических и керамических материалов отличаются прочностью и биостабильностью, но провоцируют неспецифический иммунный и воспалительный ответ. Матрикссы на основе синтетических полимеров хорошо стандартизируются, но их продукты распада часто токсичны. Матрикссы на основе натуральных полимеров: коллагена, альгината, полиоксибутиратов обладают высокой биосовместимостью, но низкими механическими качествами и высокой скоростью биodeградации [Polo-Corrales, Latorre-Esteves, Ramirez-Vick,

2014]. Перспективным материалом является фиброин — основной фибриллярный компонент нити кокона тутового шелкопряда *Bombyx mori*. На его основе было создано несколько типов матриц, которые обладают высокой механической прочностью на разрыв, эластичностью, низкой иммуногенностью, отсутствием токсичности, как у самого материала, так и у продуктов его распада. Но в ряде случаев способность поддерживать адгезию и пролиферацию достигалась за счет введения в его первичную последовательность дополнительных адгезивных мотивов [Hofmann и др., 2013] или за счет иммобилизации остеоиндуктивными факторами [Koolen и др., 2016], [Wang и др., 2009]. Некоторые образцы матриц из фиброина характеризовались присутствием в их структуре нерегулярных элементов, что ухудшало их способность поддерживать пролиферацию [Mobini и др., 2013]. В данной работе была предпринята попытка создать матрикс на основе фиброина шелка, способный эффективно поддерживать адгезию и пролиферацию клеток, участвующих в регенерации костной ткани и обладающего достаточными для костного имплантата механическими свойствами.

Цель работы. Целью работы являлось исследование свойств пористых матриц созданных из фиброина шелка *Bombyx mori* для восстановления костной ткани. Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

Задачи работы:

1. Отработка методов получения трехмерных фиброиновых матриц, композитных матриц из фиброина и гидроксиапатита, минерализованных и неминерализованных трехмерных микроносителей из фиброина.
2. Характеристика структуры, механических свойств и скорости деградации трехмерных фиброиновых матриц.
3. Исследование способности трехмерных фиброиновых матриц и микроносителей поддерживать адгезию и пролиферацию эукариотических клеток, участвующих в регенерации костной ткани.

4. Исследование способности трехмерных микроносителей из фиброина поддерживать дифференцировку мезенхимальных стромальных клеток в остеогенном направлении.
5. Изучение биосовместимости фиброиновых матриксов с тканями организма при их подкожном введении.
6. Оценка влияния имплантации различных типов фиброиновых матриксов на регенерацию костной ткани в модели искусственно инициированной травмы крыс.

Научная новизна. Впервые проведены исследования нового варианта костного имплантата на основе фиброина шелка, созданного по ранее запатентованной методике в двух формах — неминерализованного ФМ и минерализованного МФМ. Модуль Юнга у МФМ был равен 54,5 кПа. Такие механические показатели соответствуют прочности на разрыв новообразованного костного материала на начальных этапах восстановления костной ткани. Созданные матриксы обладают свойствами биостабильности и биodeградируемости, распадаясь в реактиве Фэнтонна и теряя 20% своей массы в растворе фосфатно-солевого буфера за 9 недель. Показана способность имплантатов на основе фиброинового матрикса поддерживать адгезию и пролиферацию различных типов клеток: фибробластов линии NIH 3T3, остеобласт-подобных клеток MG-63 и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Показана способность микроносителей на основе фиброина поддерживать рост и дифференцировку остеобласт-подобных клеток MG-63 и мезенхимальных стромальных клеток в остеогенном направлении. Продемонстрировано влияние культивирования клеток на трехмерных фиброиновых микроносителях на морфологию клеточного цитоскелета. Показано, что при подкожной имплантации фиброиновых матриксов происходит постепенное замещение их соединительной тканью и васкуляризация зоны имплантации. ФМ и МФМ способствуют регенерации костного дефекта, замещаясь новообразованной костной тканью.

Теоретическая и практическая значимость работы. Модифицирована технология создания матриц из фиброина шелка *Bombyx mori* для восстановления костной ткани при лечении травм опорно-двигательного аппарата. Разработанная технология может служить основой для разработки изделий медицинского назначения.

Методология и методы исследования. В ходе выполнения диссертационной работы использован широкий спектр подходов, включая физико-химические, гистологические, рентгеномографические методы, конфокальную, электронную и световую микроскопию, культивирование эукариотических клеток, эксперименты на модели костной травмы крыс.

Положения, выносимые на защиту.

1. Отработана технология создания трехмерных фиброиновых матриц и микроносителей.
2. Структура, механические свойства и скорость деградации фиброиновых матриц позволяют использовать их для имплантации в поврежденную костную ткань.
3. Трехмерные микроносители на основе фиброина поддерживают дифференцировку остеобласт-подобных клеток и мезенхимальных стромальных клеток в остеогенном направлении.
4. Созданные трехмерные фиброиновые матрицы обладают биосовместимостью с клетками и тканями млекопитающих.
5. Имплантация фиброиновых матриц, созданных по отработанной технологии, способствует восстановлению костной ткани.

Степень достоверности и апробация результатов работы. Достоверность результатов, представленных в диссертационной работе, определяется комплексным подходом с использованием широкого арсенала современных методов исследования и статистической обработкой результатов. Текст диссертации был проверен на плагиат системой «Антиплагиат.РГБ».

Материалы диссертации представлены на III Евразийском конгрессе по медицинской физике «Медицинская физика — 2010» (Москва 2010), на Международном молодежном научном форуме «Ломоносов-2011» (Москва 2011). Диссертационная работа прошла апробацию на заседании кафедры биоинженерии и межкафедральной лаборатории конфокальной микроскопии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, протокол №13 апреля 24.04.2018. По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ. Из них 7 статей опубликованы в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК МОН РФ, 3 статьи индексируются в библиографической базе Scopus.

Объем диссертационной работы составляет 113 страниц. Диссертация состоит из содержания, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка используемых сокращений, списка цитируемой литературы и списка иллюстративного материала. Список литературы состоит из 153 источника, из них 3 публикации отечественных и 150 публикаций зарубежных авторов. Работа изложена на 113 листах машинописи. Текст содержит 18 рисунков и 8 графиков.

Часть работы выполнена в рамках проекта ФЦПР 2014-2020 Минобрнауки России (Соглашение № 14.604.21.0001, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60414X0001).

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Регенерация костной ткани

Регуляция формирования костной ткани осуществляется 7 сигнальными путями, координация которых регулируется геном RUNX-2 (рисунок 1). Пути WNT и FGF вовлечены в ранние фазы остеогенеза, связанные с активированием дифференциации остеобластов и процессами минерализации, синтезом коллагенов 1 и 3 типа. Пути NOTCH и Hedgehog активируются в период перехода от ранней к средней фазе остеогенеза, во время которых секретируется остеопоптин. Активация сигнального пути NOTCH подавляет дифференцировку остеобластов через белки Hes и Hey. Пути BMP и IGF, активируются в средней фазе остеогенеза, во время этого процесса в межклеточном веществе костной ткани появляется остеопоптин. Путь PDGF, на поздней стадии остеогенеза [Midha, Murab, Ghosh, 2016a].

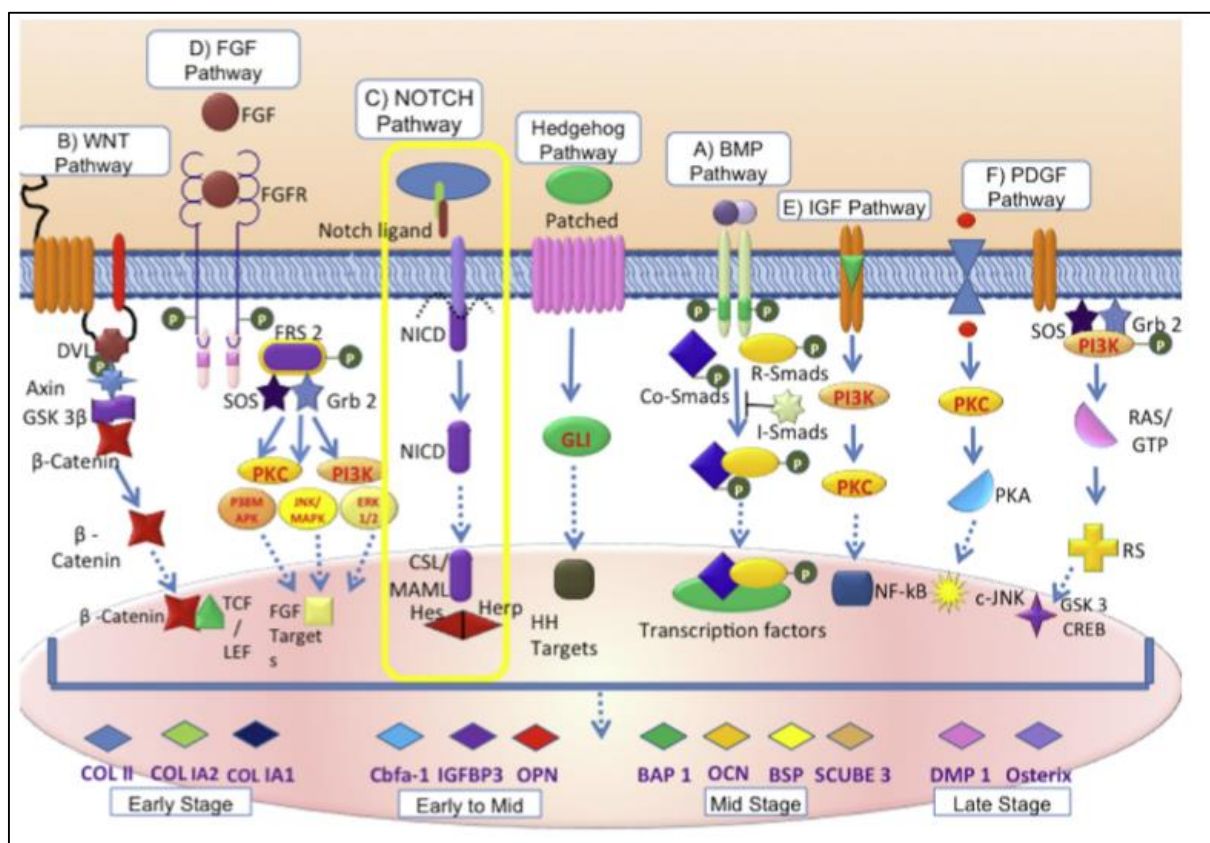


Рисунок 1 — Сигнальные пути, регулирующие формирование костной ткани. [Midha, Murab, Ghosh, 2016a]

Механизм образования костной ткани отличается в случае образования костной ткани *de novo* и при репаративном остеогенезе [Sundelacruz, Kaplan, 2009].

При образовании костной ткани *de novo* этот процесс может происходить напрямую из клеток мезенхимы и через образование хрящевой ткани. Путем прямого остеогенеза формируется ограниченное число костей, таких как кости фаланг пальцев и некоторые кости черепа. Большая часть костей формируется через образование хрящевой ткани. В этом случае на месте будущей кости из клеток мезенхимы формируется хрящ, покрытый надхрящницей [Schindeler и др., 2008]. На следующем этапе часть клеток надхрящницы дифференцируется в остеобласты, которые синтезируют костное вещество. В результате вокруг сформированного хряща формируется перихондральная костная манжетка из остеобластов и созданного ими костного вещества [Maskie и др., 2008]. После этого начинается обызвествление хряща во внутренних участках, которое сопровождается разрастанием перихондральной костной манжетки снаружи [Tuan, 2004]. На следующем этапе начинается врастание кровеносных сосудов с внешней стороны во внутренние участки обызвещенного хряща [Tuan, 2004]. Врастающие кровеносные сосуды окружены остеогенными клетками, которые превращаются в остеобласты, а на основе элементов костной ткани, окружающих костные сосуды, образуются остеоны и формируется эндохондральная кость. Внутренняя часть этой кости деградирует и заполняется клетками костного мозга. На заключительном этапе процессы оссификации затрагивают эпифизы [Maskie E.J., et al. 2008]. Хрящевая ткань сохраняется только на суставных поверхностях и в метафизе, который после завершения пубертатного периода окостеневаает [Maskie E.J., et al. 2008; Tuan RS. 2004].

При восстановлении костной ткани после повреждения в зоне травмы наблюдается не только нарушение целостности ткани этого типа, но и нарушение сосудистой сети, которое приводит к ухудшению питания клеток. Это создает иные изначальные условия для костеобразования. В области, образованные после кровотечения гематом, внедряются макрофаги, лимфоциты, гранулоциты. Они

выделяют цитокины и различные ростовые факторы, такие как TGF- β , PDGF, фактор роста фибробластов FGF-2, фактор роста сосудов VEGF, интерлейкины IL-1 и IL-6, белки BMP, фактор некроза опухоли TNF- α [Schindeler и др., 2008]. За счет этого они инициируют миграцию в зону повреждения мультипотентных клеток из надкостницы, костного мозга и окружающих мягких тканей. В результате формируется соединительнотканная провизорная мозоль, которая включает хондроциты и фибробласты, заполняющие зону травмы и сформировавшиеся на основе мигрировавших мультипотентных клеток-предшественников. Хондроциты, синтезируя межклеточное вещество, начинают ее замещение на хрящевую ткань, которая сцепляет участки перелома. [Sundelacruz, Kaplan, 2009], [Schindeler и др., 2008].

На следующем этапе начинается этап формирования костной мозоли, образующейся на основе провизорной. Это наиболее интенсивный этап репаративного остеогенеза, который характеризуется формированием зрелых остеобластов на основе преостеобластов, и их высокой синтетической активностью, которая обеспечивает образование минерализованного межклеточного матрикса. Важная роль в регуляции этого процесса обеспечивается костными морфогенетическими белками BMP. Формирующаяся на этом этапе костная ткань отличается нерегулярной структурой. На данном этапе формируется сосудистая сеть [Sundelacruz, Kaplan, 2009], [Schindeler и др., 2008].

В случае благоприятных условий восстановления костной ткани (при близком расположении костных фрагментов), процесс формирования костной мозоли может происходить сразу, минуя промежуточные этапы, в том числе путем аппозиционного роста [Schindeler и др., 2008].

На заключительном этапе происходит перестройка нерегулярной структуры костной мозоли в нормальную губчатую или кортикальную костную ткань. Этот процесс обеспечивается работой остеокластов — многоядерных клеток, которые формируются из гемопоэтических клеток. Перестройка структуры межклеточного вещества остеокластами осуществляется за счет выделения ими протеиназ, которые приводят к деградации белковых компонентов матрикса, и закисления

локусов, прилегающих к клеткам, что обеспечивает растворение элементов гидроксиапатита. В результате действия остеокластов возникают эродированные участки межклеточного матрикса, которые носят название лакун Хаушипа. Привлечение остеокластов для перестройки костной ткани инициируется зрелыми остеобластами за счет фактора RANKL, который позволяет организовать процессы резорбции и синтеза костной ткани. Остеобласты, за счет выделения другого фактора — M-CSF, влияют на сам процесс дифференцировки гемопоэтических мультипотентных клеток в остеокласты [Sundelacruz, Kaplan, 2009], [Schindeler и др., 2008].

Процессы костеобразования в ходе роста и развития и при регенерации костной ткани хотя и имеют общие механизмы, но в ряде элементов существенно отличаются. При репаративном остеогенезе перед окончательным формированием нативной костной ткани присутствует несколько промежуточных этапов, связанных с заполнением зоны травмы вначале соединительной, затем хрящевой, и, наконец, первичной костной тканью с нерегулярной структурой, которая на заключительном этапе перестраивается остеокластами. На особенности этих процессов может оказать влияние тип имплантата, его структура и выбранный материал. Поэтому важно рассмотреть существующие подходы в восстановлении костной ткани.

1.2. Основные подходы к восстановлению костной ткани

Золотым стандартом в терапии травм костной ткани в настоящее время является костный аутотрансплантат [Polo-Corrales, Latorre-Esteves, Ramirez-Vick, 2014]. Он в максимальной степени имитирует структуру костной ткани, а также отличается остеоиндуктивностью, способствуя дифференциации мезенхимальных стромальных клеток в остеобласты. В терапевтической практике костный аутотрансплантат пересаживается чаще всего из зоны подвздошного гребня, но может быть использован и материал из дистальной части бедренной или

проксимальной части большеберцовой костей [Silber и др., 2003]. Однако применение аутотрансплантатов невозможно или ограничено при утрате значительной части костного материала пациентом, обильной кровопотере или заражении костного материала. Частая альтернатива в таких случаях — использование костных аллотрансплантатов, взятых у других людей или из трупного материала, но при их применении существует риск инфицирования или отторжения организмом пациента [Mankin, Hornicek, Raskin, 2005].

По этим причинам возрастает интерес к применению и усовершенствованию таких подходов, которые основаны на прямом создании искусственных тканеинженерных конструкций, имитирующих костную ткань или обладающих остеиндуктивными свойствами [Atala, 2012]. В рамках используемых тканеинженерных подходов при создании костных имплантатов можно выделить 3 поколения технологических подходов [Polo-Corrales, Latorre-Esteves, Ramirez-Vick, 2014]. Эти поколения отличаются только временем своего появления в научно-медицинской практике, актуальные перспективные направления развиваются в рамках каждого из этих трех подходов.

Технологические приемы первого поколения предполагают, прежде всего, что имплантат при восстановлении костной ткани имеет схожие механические свойства с восстанавливаемым участком ткани. Поэтому в рамках этого подхода используются очень прочные материалы с высокой биостабильностью, которые не деградируют под влиянием физиологических систем организма — металлические и керамические. Но такие материалы провоцируют неспецифический иммунный и воспалительный ответ, который продолжается до тех пор, пока инородное тело не станет инкапсулировано фиброзной соединительной тканью, защищающей его от иммунной системы. Этот эффект может быть минимизирован, за счет модификации специальным покрытием обладающим биоактивными свойствами, что и используется в современных версиях этого подхода [Polo-Corrales, Latorre-Esteves, Ramirez-Vick, 2014].

Технологические подходы второго поколения предполагают временное заполнение области травмы имплантатом, который исчезнет из организма после

восстановления утраченной ткани [Sundelacruz, Kaplan, 2009]. В рамках этого подхода используют биоразлагаемые материалы, у которых скорость деградации соответствует скорости регенерации поврежденной костной ткани. Для этой цели используют натуральные и синтетические полимеры. Недостаток подходов второго поколения состоит в том, что материалы, обладающие такими свойствами, часто имеют не очень высокие механические показатели. Но они могут быть улучшены либо путем создания композитов с биоактивной керамикой или гидроксиапатитом, либо химической сшивкой полимерных волокон [Polo-Corrales, Latorre-Esteves, Ramirez-Vick, 2014].

Технологические подходы третьего поколения предполагают восстановление и регенерацию кости путем внесения в зону травмы клеток-предшественников костной ткани и факторов роста. Матрицы здесь выполняют вспомогательную роль, они не компенсируют функцию утраченной ткани до ее восстановления, а служат только подложками для клеток и факторов роста — в этом недостаток подходов третьего поколения. [Polo-Corrales, Latorre-Esteves, Ramirez-Vick, 2014].

Создание новых типов костных имплантатов допускает выбор одного из описанных технологических подходов. Но в настоящее время качественный прорыв в тканевой инженерии костной ткани все же требует сочетания всех трех подходов, и потому возрастает актуальность поиска подходящего для этих целей материала [Pişkin, 1997].

1.3. Сравнительная характеристика разных материалов

При создании костных имплантатов в реальной медицинской практике и в разработках научно-исследовательских центров и лабораторий наиболее часто используются материалы, описание которых дается ниже.

Металлические материалы. К стандартным хирургическим материалам, которые применяются для создания костных имплантатов, относятся: нержавеющая сталь ASTM F138, сплавы на основе кобальта ASTM F75 и ASTM F799 и титана ASTM F67 и F136. Эти материалы отличаются очень высокой

прочностью и вязкостью разрушения. Недостатки металлических материалов связаны с возможным высвобождением токсичных ионов металлов во время их износа и коррозии. Качества этих материалов могут быть модифицированы керамикой и оксидом титана, которые увеличивают адгезию фибробластов и остеогенных клеток [Haugen и др., 2013]. Очень хорошо себя зарекомендовало покрытие поверхности имплантатов на основе биоактивной керамики, гидроксиапатита, β -трикальцийфосфата и биоактивного стекла [Polo-Corrales, Latorre-Esteves, Ramirez-Vick, 2014].

Керамика давно используются при восстановлении скелета. Керамические материалы обладают отличной биосовместимостью и биологической активностью из-за сходства кристаллических и химических свойств с минеральными компонентами нативной костной ткани. Их недостатки связаны с хрупкостью и утомлением материала [Dorozhkin, 2009].

Среди прочих материалов стоит выделить биостекло и коралл. Биостекло позволяет осуществлять контроль скорости деградации, поддерживать адгезию и пролиферацию клеток, благодаря чему его активно применяли при лечении ранений уже во время Вьетнамской войны [Fu и др., 2011]. Кораллы представляют собой микроструктуры с заданными размерами пор и взаимосвязанной пористой архитектурой, подобной архитектуре трабекулярной кости. По этой причине, начиная с 70-х годов прошлого века, натуральный коралловый экзоскелет использовался клинически для лечения черепно-лицевых костных дефектов [Vuola и др., 2000]. Недостатком использования коралловых матриц являются сложности с их неоваскуляризацией.

Алифатические полиэфиры, такие как полигликолевая кислота, полимолочная кислота и поликапролактон часто используются для восстановления утраченных тканей. Достоинства полиэфиров связаны с возможностью модифицировать их различными химическими группами, контролировать их механические свойства и размер пор [Gunatillake, Adhikari, Gadegaard, 2003]. В работе Гесс на трехмерных матрицах из поликапролактона, модифицированных покрытием из коллагена и хондроитинсульфата, в течение 28 дней культивировали

мезенхимальные стромальные клетки. При дополнительном внесении в среду остеогенных факторов у клеток увеличилась экспрессия щелочной фосфатазы RUNX-2, на втором сроке культивирования возросла и экспрессия остеопонтинина [Hess и др., 2012]. Каркасы из поликапролактона, содержащие частицы гидроксиапатита, успешно использовали для восстановления дефекта голени у мышей. Через 6 недель после имплантации гистологическим анализом выявлен процесс активного костеобразования *de novo* [Chuenjitkuntaworn и др., 2010].

Коллаген — белок, который является основным фибриллярным компонентом внеклеточного матрикса соединительной ткани. Он отличается биосовместимостью и биodeградируемостью, способностью стимулировать пролиферацию и дифференцировку клеток, благодаря содержащимся в его первичной структуре RGD (аргинин-глицин-аспартат) последовательностям [Aravamudhan и др., 2013]. Недостаток коллагена — низкое качество механических свойств [Harley и др., 2007], которое может быть улучшено при использовании сополимеров [Polo-Corrales, Latorre-Estevés, Ramirez-Vick, 2014]. Коллагеновые скаффолды можно иммобилизовать факторами роста, которые вызывают остеогенную дифференциацию. Загрузка в гели фактора роста фибробластов bFGF увеличивала экспрессию таких маркеров остеогенеза как остеопонтин, остеоониктин и щелочная фосфатаза [Pitaru и др., 1993]. В другом исследовании в структуру коллагенового матрикса был иммобилизован белок BMP-4, что приводило к ускорению остеогенную дифференциацию остеобластов [Oh и др., 2012]. Коллаген стимулировал восстановление костной ткани и в условиях *in vivo* [Daei-farshbaf и др., 2014], [Xia, Villa, Wei, 2014], [Matthews и др., 2014], [Mazaki и др., 2014], [Sun и др., 2014], [Kim, Kim, Lee, 2013], [Thitiset и др., 2013]. На основе коллагена и гидроксиапатита создано много биокomпозиционных материалов: коллагеновая паста «Ossigraft» [Friedlaender и др., 2001], коллагеновые губки «Infuse» [Govender и др., 2002] и др.

Хитин и хитозан — природные полисахариды. Хитин присутствует в экзоскелетах членистоногих. Хитозанами называют производные хитина, полученные путем ацетилирования. Биосовместимость хитина и хитозанов

основана на сходстве их структурных характеристик с гликозаминогликанами, которые наряду с коллагенами, являются одними из основных компонентов межклеточного матрикса. Другими их достоинствами являются их биodeградируемость, антибактериальные свойства, легкость формирования из них разных устойчивых и прочных структур. Недостатки хитина и хитозанов — хрупкость, термическая нестабильность и высокая рыночная стоимость материала [Bhattarai, Gunn, Zhang, 2010]. Для улучшения механических свойств хитозановых матриксов не подходит метод химической сшивки, так как он подавляет пролиферацию клеток, но жесткость хитозановых матриксов можно повысить добавлением коллагенового сокомпонента [Polo-Corrales, Latorre-Esteves, Ramirez-Vick, 2014].

На основе хитозана создавали гидрогели, иммобилизованные бетта-глицерофосфатом, на которых культивировали мезенхимальные стромальные клетки костного мозга человека. В конце срока культивирования в этих клетках в условиях *in vitro* возрос уровень экспрессии сиалопротеина, щелочной фосфатазы [Wang, Stegemann, 2010]. Известен пример изготовления гидрогеля на основе хитозана, трикальцийфосфата и плазмы, богатой тромбоцитами, (тромбоциты выполняли роль резервуара факторов: PGDF, TGF- β , IGF, bFGF и VEGF) на которой культивировали мезенхимальные стромальные клетки. Гели с иммобилизованными клетками способствовали восстановлению костной ткани в зоне голени у коз [Kiuru и др., 1991]. В другой работе матриксы с мезенхимальными стромальными клетками ускоряли остеогенез в своде черепа у мышей [Costa-Pinto, Correlo, 2012].

Альгинат — линейный полисахарид, экстрагируемый из бурых морских водорослей. По своему химическому строению он схож с хитином и хитозанами [Heuwood и др., 2004]. В водных растворах при комнатной температуре в присутствии двухвалентных катионов образует гели, которые можно использовать в качестве подложки для культивирования мезенхимальных стромальных клеток [Suarez-Gonzalez и др., 2010]. При культивировании в присутствии остеогенных факторов у клеток увеличивается экспрессия таких маркеров, как щелочная

фосфатаза, RUNX-2, коллаген 1 типа [Zhou, Xu, 2011]. Композитный матрикс из альгината и кальций-фосфатного цемента вводили в костные ткани черепа крыс. Через 6 недель в зоне введения матрикса новообразованная костная ткань почти полностью замещала утраченный материал. [Lee и др., 2011]. Известна работа, где использовали матриксы, иммобилизованные факторами VEGF и BMP-2, которые вводили в зону травмы бедренной кости мышей. Часть из этих матриксов засеивали мезенхимальными стромальными клетками человека, часть из них вводили в чистом виде. Интересно, что в обоих случаях восстановление костной ткани происходило примерно с равной интенсивностью, и не было выявлено заметных отличий [Kanczler и др., 2010].

Гиалуроновая кислота — гликозаминогликан, естественный компонент межклеточного вещества мягких тканей всех позвоночных, присутствующий в высокой концентрации в остеогенных клетках предшественников. Гиалуроновая кислота отличается отсутствием иммуногенности [Nguyen, Lee, 2014], [Shih и др., 2004]. Добавление желатина в конструкции из гиалуроновой кислоты приводит к более активной экспрессии остеогенных маркеров, а при отсутствии в структуре скаффолдов желатина у культивируемых клеток были больше выражены маркеры характерные для адипоцитов [Jha и др., 2011]. Гидрогель на основе гиалуроновой кислоты, содержащий лекарственный препарат симвастатин, стимулирующий остеогенез, использовали для восстановления травмы теменной кости у кроликов. В условиях *in vitro* он способствовал дифференцировке стромальных клеток, полученных из жировой ткани человека, в остеогенном направлении, а также увеличению уровня экспрессии остеокальцина и остеопонтинина. Но через 9 недель после имплантации данного конструкта костеобразование, было лишь незначительно выше, чем в случае контроля [Вае и др., 2011]. На основе гиалуроновой кислоты созданы два медицинских пастообразных материала: с иммобилизованным в структуру гепарином Heparasil™, и без гепарина Glycosil™. В одном из исследований в структуру этих гелей вводился BMP-2. Функция гепарина состояла в стабилизации фактора BMP-2 на структуре гидрогеля. В условиях *in vivo* оба препарата стимулировали костеобразование, но в случае не

содержащего гепарин материала Glycosil™ костеобразование было в полтора раза выше. Это говорит о том, что остеогенный потенциал гиалуроновой кислоты требует усовершенствования за счет добавления остеоиндуктивных факторов [Bhakta и др., 2012].

Спидроины — опорные белки паутины являются прочным и эластичным неиммуногенным биodeградируемым материалом с медленной интенсивностью биорезорбции [Мойсенович и др., 2015], [Omenetto и др., 2010], [Gellynck и др., 2008], [He и др., 2013], [Kluge и др., 2008], [Allmeling и др., 2008], [Liebmann и др., 2008]. Они прекрасно поддерживают адгезию эукариотических клеток и стимулируют увеличение их числа [Verari, Kaplan, 2007]. Паутину сложно получить в промышленных экономических масштабах. Причин этих две: невозможность совместного культивирования пауков (из-за каннибализма) и низкая продуктивность отдельных особей. Даже если каждого паука посадить в отдельную банку и наладить паучью ферму, выход паутиной массы будет небольшим. Кроме того, натуральные спидроины сложно растворить во многих растворителях, и это затрудняет любую практическую лабораторную работу с ними. Поэтому вместо натуральных применяют рекомбинантные спидроины, которые имеют большую растворимость, а для увеличения продуктивности используют организмы продуценты: дрожжи *Pichia Pastoris* [Агапов и др., 2009], *Escherichia coli* [Xia и др., 2010] и даже табак [Menassa и др., 2004]. Но и использование продуцентов пока не решает полностью проблемы получения нужного количества спидроинов в промышленных масштабах.

Все перечисленные материалы обладают своими достоинствами, но многие из них имеют и недостатки. В восстановительной медицине предпочтительнее использовать замещаемые биodeградируемые материалы вместо неразлагаемых биостабильных. Даже самые инертные из биостабильных материалов после многолетнего нахождения в организме пациента могут вызвать неспецифический иммунный ответ [Atala, 2011], [Anderson, Rodriguez, Chang, 2008], [Raeber, Lutolf, Hubbell, 2007], [Whang и др., 1995]. Поэтому лучше использовать полимерные

материалы, чем керамику и металлические сплавы. Преимущество природных материалов по сравнению с материалами, полученными искусственным синтезом, состоит в том, что продукты распада природных материалов обычно менее токсичны и имеют большее сродство к тканям организма [Pişkin, 1997]. Однако, при их применении всегда возникает вопрос стандартизации состава [Polo-Corrales, Latorre-Esteves, Ramirez-Vick, 2014]. Среди природных материалов альгинат и хитозан легко формируются, но при этом слишком хрупки, коллаген недостаточно прочен, материалы из гиалуроновой кислоты требуют дополнительных модификаций для улучшения остеоиндуктивных и остеокондуктивных свойств. Спидроин, который идеально подходит для создания костного материала, сложно получить в промышленных масштабах. Одним из наиболее перспективных для создания костного имплантата материалов является белок шелковой нити — фиброин. В нем сочетаются достоинства вышеописанных материалов и при этом отсутствуют их недостатки.

1.4. Физико-химические и биологические свойства фиброина

Фиброин — основной фибриллярный компонент шелковой нити, ее главный структурный белок. На долю фиброина в шелковой нити приходится около 70-80% массы белка, оставшаяся часть представлена вторым компонентом шелковой нити — серицином (это гидрофильный белок с массой 20-310 кДа, выполняющий роль клея, скрепляющего фиброиновые фибриллы в коконе), несколько процентов приходится на долю жиро- и воскоподобных веществ и менее 1% на неорганические катионы и анионы [Wenk, Merkle, Meinel, 2011], [Vepari, Kaplan, 2007].

Физические свойства. Фиброин термостабильный белок. Его денатурация происходит при температуре выше 127°C, что позволяет стерилизовать его в условиях нагревания. Фиброин имеет высокую прочность на разрыв в сочетании с высокой эластичностью. Модуль упругости фиброина без серицина составляет 15-17 ГПа, а прочность на разрыв 610-690 МПа. Такая прочность на разрыв гораздо

выше чем у полилактата, которая составляет 28-50 мПа, и у перешитого коллагена, где она составляет 47-72 мПа. Это затрудняет применение коллагена и полилактата в работе с сухожилиями (прочность на разрыв составляет 150 мПа) и костью (прочность на разрыв составляет 160 мПа), но вполне позволяет использовать для этой цели фиброин [Omenetto и др., 2010], [Altman и др., 2003].

Химические свойства. Фиброин состоит из ковалентно связанной через дисульфидные мостики легкой цепи Fib-L массой 26 кДа (262 аминокислоты) и тяжелой Fib-H цепи, массой 350 кДа (5263 аминокислоты) в соотношении 1 : 1 [Wadbuа и др., 2010], [Zhou и др., 2000]. Кроме того, посредством нековалентных гидрофобных связей с Fib-L и Fib-H объединен небольшой гликозилированный белок P25 массой 30 кДа [Tanaka, Inoue, Mizuno, 1999]. Он формирует комплекс из одной легкой и одной тяжелой цепи. В литературе имеются данные, что такой комплекс может формироваться из 6 тяжелых и 6 легких цепей на одну молекулу P25 [Inoue и др., 2000]. Легкая, тяжелая цепи фиброина и белок P25 кодируются отдельно своими собственными генами [Inoue и др., 2000], [Wadbuа и др., 2010].

Первичная последовательность фиброина включает глицин (43%), аланин (30%), серин (12%), в небольших количествах присутствуют тирозин (5%), валин (2%), аспартат, глутамат и цистеин [Wadbuа и др., 2010], [Vepari, Kaplan, 2007]. Цистеин представлен единичными мономерами и он, как говорилось, выполняет главную интегрирующую роль в объединении разных субъединиц в одну молекулу. Наиболее распространенные аминокислоты (глицин, валин, серин) вместе составляют основной структурный мотив Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser тяжелой цепи Fib-H на долю которого приходится 70% всей белковой последовательности. Реже встречаются схожие повторы: Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Tyr (20%), Gly-Ala-Gly-Tyr-Gly-Ala (6%), Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ala (4%) [Wenk, Merkle, Meinel, 2011]. Каждая из этих трех последовательностей составляет основу 12 регулярных гидрофобных кристаллических блоков длиной в 413 аминокислотных остатков каждый. На долю этих 12 блоков приходится 94% общей белковой последовательности, и они разделяются 11-ю нерегулярными аморфными промежуточными участками длиной в 42-43 аминокислотных остатка с преимущественно отрицательным

зарядом [Verari, Kaplan, 2007]. Кроме этого, в общей структуре фиброина выделяются положительно заряженный С-конец тяжелой цепи длиной в 58 аминокислотных остатка, отрицательно заряженный N-конец тяжелой цепи длиной в 151 аминокислотных остатка и последовательность легкой цепи Fib-L, обладающая амфифильностью с небольшим преобладанием отрицательного заряда [Wadwa и др., 2010], [Lammel и др., 2010]. Фиброин является амфифильным белком, но с более выраженными гидрофобными свойствами. Изоэлектрическая точка (pI) фиброина = 4,2. Он нерастворим в воде, разбавленных растворах многих кислот и щелочей. Фиброин растворим в концентрированных растворах хлорида лития, тиоцианата лития и хлорида кальция [Wenk, Merkle, Meinel, 2011].

Фиброин может формировать как α -спирали, так и β -складки. Благодаря этому он существует в нескольких структурных формах 1) обогащенной α -спиралями аморфной форме (silk 1) и 2) прочной кристаллической β -форме (silk2). Вторая β -форма (silk2) устойчива к сильным механическим воздействиям, обладает высокой прочностью на разрыв, хотя ее упругие свойства ниже чем у α -формы [Verari, Kaplan, 2007]. Кристаллизация фиброина и переход в форму обогащенную β -слоями может быть осуществлен под действием непредельных алифатических спиртов метанола или этанола, высокой температуры, концентрированных растворов солей, доведением pH до изоэлектрической точки [Wenk, Merkle, Meinel, 2011]. Фиброин после такой модификации способен сохранять кристаллическое состояние долгое время. Именно обогащенная β -структурами форма фиброина способна давать форму имплантату, обеспечивать его целостность и стабильность [Inoue и др., 2000], [Verari, Kaplan, 2007].

Биологические свойства. Фиброин — биосовместимый, неиммуногенный и нетоксичный материал, в то время как второй сопутствующий белок шелковой нити — серицин обладает свойствами аллергенности. Все возможные побочные иммуногенные свойства матриксов, полученных на основе фиброина всегда связаны с недостаточно отмытым серицином. В 70-90 годы XX века предпринимались попытки использовать сырой неочищенный шелк *Bombyx mori* в создании имплантатов и биоинженерных конструкций. Шелк применяли в лечении

глазной катаракты [HK, KR., 1984] и травм трахеи у человека [Kurosaki и др., 1999]. С помощью шелка экспериментировали с восстановлением каналов мочеполовой системы в организме собак [Morrow и др., 1974], накладывали лигатурные швы на седалищный нерв [Nebel и др., 1977] и восстанавливали поврежденные участки бронхов и трахеи [Peleg, Rao, Emrich, 1986] у кроликов. Но отмечалось, что негативным свойством шелка является его высокая аллергенность. По данным Морроу аллергенность шелка была даже выше, чем у полигликолевой кислоты [Morrow и др., 1974]. И, как выяснилось относительно недавно, именно сопутствующий серицин ограничивал в течение длительного времени применение шелка в восстановительной медицине и был источником всех негативных побочных эффектов имплантатов из сырого шелка [Altman и др., 2003]. В одной из работ, где исследовалось продолжительное влияние имплантатов на организм мыши, иммунный ответ оставался низким. В течение 6 месяцев уровень экспрессии белков TNF- α , IL-6, IL-4, IL-13, IFN- γ был низким. Экспрессия этих белков полностью прекращалась через 12 месяцев [Wang и др., 2008c].

Фиброин — биodeградируемый материал с низкой интенсивностью деградации. В условиях *in vitro*, в отсутствие протеаз, он теряет лишь 4% массы в течение 7 недель. Интенсивность процессов биodeградации в условиях *in vivo* зависит от степени β -кристаллизации [Wang и др., 2008c]. Чем выше β -кристаллизация, тем медленнее резорбция. Было установлено, что с помощью искусственной кристаллизации срок использования фиброиновых имплантатов можно существенно продлить вплоть до 6 месяцев [Wang и др., 2008b].

Физические, химические и биологические свойства фиброина позволяют использовать его в качестве материала для создания трехмерного пористого матрикса, а по целому ряду своих свойств он обладает преимуществами перед другими упоминавшимися материалами-аналогами.

1.5. Создание прототипов биоискусственных органов и тканей на основе фиброина

Фиброин активно применяют в инженерии широкого круга тканей от нейроинженерии до лечения аллергического дерматита. Он легко формуется и принимает различные формы, такие как трехмерные пористые матриксы, приготовленные методом выщелачивания [Murab и др., 2013], гидрогели [Murab и др., 2015], трубки [Verari и др., 2010], пленки [Bray и др., 2011]. Ниже будет показано все разнообразие областей применения фиброина, которое даст представление о его высоком потенциале для использования в восстановительной медицине.

1.5.1. Применение фиброина для создания биоискусственных органов и тканей

Пленки из фиброина использовали для лечения дефектов **слизистых оболочек дыхательных путей**. При применении фиброинового имплантата восстанавливался нормальный ресничный эпителий, и не было обнаружено следов макрофагальной инфильтрации [Ni и др., 2008].

Фиброин использовали и для создания **искусственной кожи**, как в чистом виде, так и в сочетании с хитозаном [Chirila и др., 2008], [Altman и др., 2009]. Интересно применение фиброина для **лечения хронического аллергического дерматита** с помощью создания на его основе лечебной одежды, которую позволяют создать низкие иммунные свойства материала и возможность иммобилизовать на его основу противомикробные агенты [Mason, 2008], [Stinco, Piccirillo, Valent, 2008], [Koller и др., 2007].

Трубчатые структуры из фиброина применяли для создания прообразов **искусственных сосудов** [Verari и др., 2010], [Zhang и др., 2009], [Zhang, Vaughman, Kaplan, 2008], [Soffer и др., 2008], [Wang и др., 2008a], [Wang и др., 2008b]. Сосуды

обладали высокой эластичностью и прочностью на разрыв и имели гладкую поверхность внутреннего просвета [Zhang, Reagan, Kaplan, 2009], [Soffer и др., 2008]. Фиброин поддерживал рост клеток мышечной ткани и эндотелия, эндотелиальные клетки распластывались по поверхности, а гладкомышечные клетки прорастали в толщу матрикса [Zhang и др., 2009], [Zhang, Vaughan, Kaplan, 2008].

Использование субстратов на основе фиброина может применяться и для восстановления **нервной ткани** [Li и др., 2009], [Tang и др., 2009], [Uebersax и др., 2007]. Фиброиновый матрикс, загруженный NGF, способствовал аксональной дифференцировке [Uebersax и др., 2007].

Оптические свойства фиброина делают возможным изготовление из фиброина **искусственной роговицы** [Bray и др., 2011], [Amsden и др., 2010], [Lawrence и др., 2008]. Из этого материала делались прозрачные пленки, на поверхности которых культивировали кератоциты (роговичные фибробласты). Пленка, кроме увеличения числа эукариотических клеток, обеспечивала обмен питательными веществами и сохраняла прозрачность даже после витализации [Lawrence и др., 2009].

Фиброин допустимо использовать при создании микросфер для **направленной доставки лекарств** [Wenk, Merkle, Meinel, 2011], [Wenk и др., 2008], [Wang и др., 2007a], [Wang и др., 2007b], [Wang и др., 2007c]. Известны случаи успешного применения фиброиновых микрокапсул с куркумином [Gupta и др., 2009] и эмодином в противоопухолевой терапии [Cheema и др., 2007], и микрокапсул с аденозином при лечении эпилепсии [Boison D. et al., 2009].

Свойства фиброиновых конструкторов активно исследовали и для возможностей лечения **травм опорно-двигательного аппарата, при восстановлении связок** [Seo и др., 2009], [Spelzini и др., 2007], [Fan и др., 2008]. Новообразованная ткань связок имела высокие показатели прочности на разрыв [Fan и др., 2008]. Было показано, что фиброин может поддерживать гидродинамические свойства искусственного хряща [Tigli и др., 2009]. Фиброиновые матриксы применяли для восстановления **гиалинового хряща** [Shangkai и др., 2007].

Фиброин, бесспорно, обладает высоким технологическим потенциалом для создания матриксов, которые могут применяться для восстановления утраченных тканей и органов любого типа. Поэтому теперь необходимо более внимательно рассмотреть данные о воздействии структур фиброиновых матриксов на процессы репаративного остеогенеза.

1.5.2. Влияние фиброиновых матриксов на регенерацию костной ткани

Большое влияние на обеспечение жизнедеятельности клеток и стимуляцию остеогенеза оказывают различия в структуре и архитектуре фиброиновых матриксов.

Одним из важных параметров является пористость. Более крупный размер пор равный 100-300 мкм приводит к улучшению пролиферации клеток на его подложке, но к ухудшению дифференцировки остеогенных клеток-предшественников на ней. Матрикс с меньшим размером пор 50-100 мкм, хуже способствует пролиферации клеток, но лучше стимулирует дифференцировку в остеогенном направлении [Midha, Murab, Ghosh, 2016b]. Крупный размер пор способствует более высокой васкуляризации. Мелкий размер пор дает возможность более быстрого проникновения соединительной ткани, провоцируя его фиброзную инкапсуляцию [Midha, Murab, Ghosh, 2016b]. Но полного понимания того, как влияет размер пор на пролиферацию и дифференцировку по-прежнему нет. Известно исследование, где размер пор в трехмерном матриксе равный 400-600 мкм, поддерживал одновременно и активную дифференцировку в костном направлении, и активную пролиферацию остеогенных клеток [Correia и др., 2012].

Возможно, что влияние этого параметра несколько минимизируется за счет других факторов, таких как свойства поверхности. Одним из таких параметров может быть ее жесткость, которая определяется числом β -складчатых слоев [Kim и др., 2010]. Жесткие субстраты приводят к образованию в цитоскелете

культивируемых клеток актино-миозиновых комплексов, которые в совокупности с рядом трансмембранных белков, обеспечивают взаимодействие с белками межклеточного матрикса. Это обеспечивает распространение сигналов со стороны внешней среды, влияющих на метаболизм клетки.

Другой механизм, стимулирующий остеогенез, связан с механизмами механотрансдукции, которые передают сигналы, влияющие на метаболизм клетки, со стороны ее внеклеточного микроокружения. Он осуществляется через интегриновые комплексы. Повышение числа β -складчатых слоев через посредство интегринов активирует экспрессию гена RUNX-2 — центрального регулятора остеогенеза и ассоциированную с белком Rho протеинкиназу и киназу фокальных контактов FAK, обеспечивающую адгезию клеток [Rowlands, George, Cooper-White, 2008].

Если структура подложки трехмерных матриксов, влияет на морфологию клеток-предшественников, это может изменять направление их дифференцировки. Так округлая форма мезенхимальных стромальных клеток человека приводит к дифференцировке в адипоциты, способствуя увеличению доли жировой ткани в зоне травмы. Более упрощенная форма мезенхимальных стромальных клеток способствует их превращению в клетки костной ткани, обеспечивая лучшее восстановление повреждения [McBeath и др., 2004].

На структуру поверхности трехмерных матриксов влияет выбранная технология изготовления матрикса. В работе Ким было создано два схожих трехмерных фиброиновых матрикса, имеющих одинаковый размер пор равный 900 мкм. Сконструированные матриксы отличались выбором растворителя, использованного при изготовлении, что отразилось на разном числе β -складчатых слоев в структуре их поверхности [Kim и др., 2005]. Один матрикс был создан при использовании водных растворов, другой с помощью гексафторизопропанола. Пролиферация клеток на губчатых матриксах, изготовленных с помощью водных растворителей, была в 1,36% раз выше, чем на матриксах, изготовленных с помощью гексафторизопропанола. А экспрессия маркеров остеогенной дифференцировки, таких как коллаген 1 и 2 типа, металлопротеиназа MMP 13,

остеопонтин выявлялась только через 28 дней после культивирования на матриксах, изготовленных с помощью водных растворителей [Kim и др., 2005].

Фиброин может также стимулировать костеобразование через продукты своей деградации. При деградации фиброина возникают низкомолекулярные пептиды, обогащенные мотивами GAGAGA и GAGAGY, которые подавляют экспрессию ферментов в пути NOTCH [Park и др., 2010]. Это приводит к уменьшению транскрипционной активности гена RUNX-2, что активирует экспрессию генов, вовлеченных в ранние фазы остеогенеза. Активация экспрессии этих генов стимулирует дифференциацию остеобластов, повышение уровня экспрессии щелочной фосфатазы и таких компонентов внеклеточного матрикса формирующейся костной ткани, как коллаген 1 типа и остеокальцин [Midha, Murab, Ghosh, 2016a]. Эти выводы были подтверждены исследованиями нокаутных линий мышей, у которых были дезактивированы гены пути NOTCH [Jung и др., 2013]. Существуют данные и о прямой активации этими пептидами ранних этапов костеобразования через влияние на гены пути WNT. Установлено, что второй механизм активируется в челюстно-лицевых областях скелета [Huang, 2007].

Хотя фиброиновые конструкции обладают хорошими механическими и остеоиндуктивными свойствами, их можно усовершенствовать путем создания композитных материалов, которые кроме фиброина включают другой сокомпонент [Агапов и др., 2011]. Особенно привлекательно включение материала, имитирующего минеральное вещество костной ткани [Midha, Murab, Ghosh, 2016b]. В качестве хорошего компонента можно выбрать гидроксиапатит. Кроме имитации структуры костной ткани, установлено, что ионы кальция дополнительно активируют остеогенез. Это осуществляется через взаимодействие с особой группой рецепторов, связанных с G-белками, который активируют сигнальный путь NOTCH, вовлеченный в среднюю фазу костеобразования [Thimm и др., 2005]. Кроме того, ионы кальция активируют иной каскадный внутриклеточный путь ERK/MAPK, который в свою очередь усиливает экспрессию генов, регулирующих общий метаболизм пролиферирующих клеток [Major, Cheung, Misra, 2007]. В

литературе известна стимуляция остеогенеза через влияние на циклическую гуанозинмонофосфатпротеинкиназу второго типа [Chen и др., 2014].

В настоящее время нет полного понимания, как осуществляется взаимная регуляция остеогенных путей фиброином и гидроксиапатитом в композитных матриксах [Midha, Murab, Ghosh, 2016b]. Но успешная практика использования таких конструктов, описанная в следующей главе, говорит в пользу того, что она не должна вносить искажение в репаративный остеогенез.

Фиброиновые матриксы могут стимулировать адгезию, пролиферацию клеток и дифференцировку клеток в остеогенном направлении благодаря механизмам механотрансдукции, заданному размеру пор и за счет влияния продуктов деградации имплантата. На эти свойства влияет технология изготовления матриксов, размер порообразователя и выбор растворителя. Остеоиндуктивные и остеокондуктивные свойства матриксов можно улучшить путем введения минерального сокомпонента, имитирующего межклеточное вещество костной ткани. Хорошее представление об этом дает обзор работ в следующей главе, где описаны конкретные случаи использования фиброина в инженерии костной ткани.

1.5.3. Применение фиброина в инженерии костной ткани

Остеопродуктивные свойства трехмерных пористых матриксов из фиброина оценивались как в опытах *in vitro*, так и в опытах *in vivo*.

Для оценки выживаемости, адгезии, пролиферации и дифференцировки клеток в остеогенном направлении на фиброиновых матриксах и других структурах из этого материала выращивали разные типы клеточных культур: мезенхимальные стромальные клетки [Wang и др., 2009], остеобласт-подобные клетки MC3T3-E1 [Qian и др., 2013], клетки остеосаркомы человека линии MG-63 [Zeng и др., 2015], хондроциты и адипоциты [Midha, Murab, Ghosh, 2016b]. Сама процедура оценки этих показателей осуществлялась в большинстве исследований с помощью методов электронной микроскопии и анализа срезов, окрашенных

гематоксилином и эозином, либо через оценку экспрессии остеогенных маркеров, таких как щелочная фосфатаза, коллаген 1 типа, остеокальцин, остеопонтин и др. [Midha, Murab, Ghosh, 2016b].

1.5.3.1. Применение фиброина для восстановления костной ткани в условиях in vitro.

В работе Ванга на поверхности трехмерных матриц из фиброина культивировали мезенхимальные стромальные клетки [Wang и др., 2009]. Клетки успешно прикреплялись и пролиферировали на подложке матриц, но адгезия и пролиферация происходила в присутствии остеоиндуктивных факторов BMP-2 и IGF-I, которые дополнительно вносились с сопутствующими микросферами. Поэтому здесь трудно выделить вклад самого фиброинового конструкта и отделить его от протективного вклада молекул BMP-2 и IGF-I. Но в исследовании этой же группы авторов параллельно проводился аналогичный эксперимент, в котором в тех же условиях мезенхимальные клетки культивировали на трехмерных матрицах из альгината. Альгинат продемонстрировал худшие пролиферативные показатели по сравнению с фиброином [Wang и др., 2009].

Подложка фиброиновых матриц успешно применялась для культивирования остеобласт-подобных клеток MG-63. В течение 7 дней культивирования пролиферация клеток на них была выше, чем на культуральном пластике [Yoo и др., 2016].

В работе Киан опыты по изучению влияния трехмерных матриц на адгезию и увеличение числа эукариотических клеток проводили без внесения остеоиндуктивных факторов клеток. Клетки культивировали в течение 5 дней. К концу данного периода началось заполнение внутренних пор матрикса. Результаты МТТ теста показали, что во внутренних полостях преобладали живые клетки [Qian и др., 2013]. В этой же работе исследовалась скорость деградации матрикса. Наблюдения за распадом матрикса проводились в течение 21 дня в ФСБ (фосфатно-солевой буфер). К концу этого срока не было обнаружено какого-либо заметного уменьшения массы и деградации структуры конструкта [Qian и др., 2013].

Учитывая, что внеклеточный матрикс нативной костной ткани содержит большое количество фосфата кальция, то для дополнительного улучшения качества скаффолдов в ряде работ в структуру имплантата-матрикса вводили неорганический фосфат. В более ранних работах МФМ (минерализованные фиброиновые матриксы) создавались за счет добавления к фиброину второго сокомпонента — полиаспартата [Kim и др 2008], [Jiang и др., 2009], [Zhao и др., 2009]. В таком варианте МФМ нити фиброина выполняют основные каркасные и адгезивные функции, а нити полиаспартата используются в качестве основы, на которой осаждаются кристаллы фосфата кальция. Сама минерализация матрикса при этой технологии обеспечивалась последовательным погружением фиброинового конструкта в перенасыщенные растворы хлорида кальция (CaCl_2) и гидрофосфата натрия (Na_2HPO_4). МФМ, изготовленные по этой технологии, были разделены на две группы: в одной фиброиновые нити были модифицированы BMP-2, а в другой нет. Обе группы матриксов были засеяны мезенхимальными стромальными клетками. Клетки активно пролиферировали на подложке трехмерных матриксов [Kim и др., 2008]. Культивирование клеток продолжалось 6 месяцев. В конце периода культивирования структура трехмерных матриксов даже в отсутствие BMP-2 близко имитировала структуру нормальной костной ткани, что говорит о ведущей роли фиброиновой подложки в восстановлении травмы [Kim и др., 2008]. Главный недостаток МФМ, с включением полиаспартата — низкий уровень минерализации. Были необходимы более удобные и простые технологии создания МФМ.

В последнее время стали появляться работы, где предпринимались попытки создания композитных матриксов с непосредственным введением гидроксиапатита в структуру матрикса. На основе подобного подхода был создан МФМ в работе Бхамиратана [Bhamiratana et al., 2011]. Для оценки его пролиферативных свойств был создан ФМ (фиброиновый матрикс), после чего в течение 10 недель на поверхности обоих типов матриксов культивировали мезенхимальные стромальные клетки, без добавления остеогенных факторов. С помощью иммуногистохимического анализа установлено, что увеличение числа клеток на

матрикс с гидроксиапатитом запаздывало в сравнении с некомпозитным матриксом. Данные томографии показали, что увеличение кальцификации на обоих типах матриксов было незначительным. Но культивирование клеток сопровождалось активным перераспределением внесенного гидроксиапатита [Vhumiratana и др., 2011].

Мезенхимальные стромальные клетки культивировали на МФМ, изготовленных методом замораживания-оттаивания иммобилизованных факторами BMP-2 и SDF-1. Минерализация осуществлялась погружением матриксов в перенасыщенный ФСБ буфер и их инкубацией в присутствии ультразвука. В течение 12 недель матриксы обеспечивали равномерный процесс дифференцировки и пролиферации культивируемых клеток в остеогенном направлении [Shen и др., 2016].

В некоторых подходах при использовании матриксов в восстановлении костной ткани матриксам отводилась второстепенная роль, а основной упор делался на клеточные технологии и выбор соответствующих типов клеток. Так в исследовании Гакмак на фиброиновых конструктах совместно культивировались суставные хондроциты человека и мезенхимальные клетки костного мозга. Присутствие суставных хондроцитов человека в совместной культуре ускоряло дифференцировку мезенхимальных стромальных клеток в остеогенном направлении. Кроме того, хрящевые клетки производили значительное количество протеогликанов. Это позволяло создать тканеинженерные конструкты, объединяющие свойства хрящевой и костной ткани [Çakmak и др., 2016].

Подход, сочетающий выбор подходящей культуры клеток и оптимальной технологии изготовления матриксов, — многообещающая стратегия для репарации костно-хрящевых дефектов. Но и использование бесклеточных тканеинженерных конструкций на основе чистых матриксов по-прежнему перспективное направление инженерии костной ткани [Yoo и др., 2016]. Так, недавно была предложена новая методика изготовления фиброиновых матриксов на основе оплетки из шелковых нитей, что позволяет повысить прочность таких матриксов [Mobini и др., 2013]. По этой технологии матриксы создавались с помощью добавления

низкоконцентрированного водного раствора фиброина (с концентрацией 2-4%) в поры трехмерной оплетки из шелковых нитей, которые были предварительно отмыты от серицина. Присутствие нитевидного компонента повышает прочность даже без изменения концентрации белка. У матриксов без оплетки, полученных из 2% раствора, прочность на разрыв составляла 160 КПа, добавление нитей в структуру матриксов без оплетки, полученных из 2% раствора, повышало прочность на разрыв в зависимости от доли нитевидного компонента в составе сухого вещества до 520 КПа, а в некоторых случаях даже до 2 МПа. У матриксов без оплетки, полученных из 4% раствора, прочность на разрыв составляла 1,2 МПа. Она возрастала до 4 МПа, если доля нитевидного компонента составляла 25% сухого вещества, и достигала значений 17 МПа, если доля нитевидного компонента составляла 66% массы сухого вещества [Mobini и др., 2013]. Но усовершенствование механических свойств матриксов, отрицательно сказывалось на адгезии и пролиферации клеток из-за появления нерегулярных структур [Mobini и др., 2013]. Матриксы, созданные с использованием оплетки, несмотря на свои прекрасные механические показатели, имели много недостатков в отношении своей биосовместимости.

Наиболее частый подход в инженерии костной ткани, который используется для создания имплантатов на основе фиброина, — создание пористых матриксов. Но кроме этого существуют и иные технологические решения. Одно из них — применение трехмерных микроносителей из фиброина, которые можно использовать в качестве субстрата для культивирования и доставки клеток во время клеточной терапии [Lu и др., 2015].

Также на основе фиброина создают гидрогели, которые можно легко модифицировать противомикробными агентами. Так, в работе Ребейро для этой цели в фиброиновые гидрогели вводились наночастицы серебра и золота. Это позволяет в течение длительного времени предотвращать заражение этих материалов без ущерба для культивируемых клеток [Ribeiro и др., 2017].

Включение частиц изопоксида титана (TiO_2) в состав композитного минерализованного матрикса — перспективная технология изготовления

однородных губчатых матриц. Совместное включение наночастиц изопророксида титана (TiO_2) и гидроксиапатита в структуру фиброиновых матриц повышает эффективность восстановления костной ткани. Такие композитные матрицы обладают не только лучшей механической прочностью, но и имеют более высокие остеоиндуктивные свойства по сравнению с обычными пористыми фиброиновыми матрицами [Kim и др., 2016].

Создание композитных конструкторов на основе фиброина и хитозана — многообещающее направление в инженерии костной ткани, т.к. оно позволяет сочетать свойства разных нетоксичных биоматериалов с хорошей биосовместимостью. Группой Зенга с помощью лиофилизации и химического сшивания создан фиброиново-хитозановый матрикс, который обладает замедленными темпами деградации, способствует ранней адгезии, росту, пролиферации клеток MG-63. В работе этого коллектива были изучены структура и свойства матриц у разных вариантов фиброиново-хитозановых матриц, которые отличались соотношениями двух сокомпонентов. Особенно высокими остеоиндуктивными показателями отличались конструкции, состоящие из 40% фиброина и 60% хитозана. Они в наибольшей степени стимулировали экспрессию и секрецию белков внеклеточного матрикса остеобластами [Zeng и др., 2015].

Другой коллектив авторов использовал в костной терапии многокомпонентные композитные материалы, созданные методом электроспиннинга из нановолокон фиброина, сополимера полилактата и поли-ε-капролактона, гиалуроновой кислоты и гидроксиапатита. Они способствовали высокой скорости пролиферации и повышенной остеогенной дифференциации остеобластов [Gandhimathi и др., 2014].

В работе Ли для восстановления костной ткани применяли каркасы, состоящие из керамики с включениями фиброиновых прослоек. Фиброиновые слои способствовали лучшей имитации свойств губчатой кости у керамических матриц. Присутствие фиброина способствовало снижению хрупкости керамики и улучшало пролиферацию клеток на их поверхности. Эта работа указывает на то, что фиброин можно использовать не только как самостоятельный материал, но и

как покрытие, повышающее качество керамических заменителей костного трансплантата [Li и др., 2015].

1.5.3.2. Применение фиброина для восстановления костной ткани в условиях in vivo.

Известны публикации, где изучали воздействие фиброиновых матриксов на ткани млекопитающих в условиях *in vivo*.

В работе Виберсакса ФМ вводили в организм овец в искусственно созданные отверстия в бедренной, плечевой и большой берцовой кости [Uebersax и др., 2013]. Матрикс обладали остеокондуктивными свойствами. В поры матриксов врастали тяжи рыхлой соединительной ткани, но участки остеогенной активности появились только через 8 недель после внедрения матрикса [Uebersax и др., 2013].

Известна публикация, где для восстановления костной ткани у мышей линии Balb/c применялись матриксы, у которых в структуру белковой молекулы фиброина были введены RGD последовательности. Перед внесением в область искусственной травмы матрикс помещался в культуральную среду, содержащую мезенхимальные стромальные клетки и остеогенетические факторы. Анализ срезов продемонстрировал, что через 8 недель введения матриксов в ткани животных не было обнаружено признаков воспалительной реакции или отторжения конструкта. Сам имплантат интегрировался с организмом, костеобразование начиналось на периферии имплантата, участки нативной костной ткани сливались с фрагментами новообразованного костного материала [Hofmann и др., 2013].

Использование фиброиновых матриксов особенно актуально при восстановлении черепно-лицевых переломов. В случае лечения черепномозговых травм часто используются синтетические полиэфирные материалы, но они потенциально связаны с воспалительной реакцией и отрицательным ответом организма и могут привести к неполному ремоделированию кости. Близость к головному мозгу опасна серьезными осложнениями. Кулин разработал резорбируемые крепления на основе фиброина, содержащие частицы, иммобилизованные BMP-2. Животные были выведены из эксперимента через 1, 3,

6 месяцев, после чего анализировались гистологические процессы и оценка воспаления [Koolen и др., 2016]. Появление новообразованной костной ткани с течением времени происходило в обеих группах, но в случае иммобилизованных конструкций была выявлена большая активность остеокластов и остеобластов по всему периметру фиброиновых креплений уже через 3 месяца [Koolen и др., 2016].

Еще в одном исследовании для восстановления костей свода черепа у крыс использовались мембраны на основе фиброина. С помощью микрокомпьютерной томографии и гистологического анализа установлено, что через 12 недель после имплантации зона травмы была полностью восстановлена. Мембраны на основе фиброина обладали механической стабильностью и медленной скоростью деградации. Процесс восстановления не сопровождался воспалительными реакциями [Lu и др., 2015].

Интересные результаты о непосредственном введении МФМ в ткани живого организма для стимуляции тканеобразования получены в статье Ши с соавторами [Shi и др., 2013]. В этой работе МФМ использовали для восстановления крестообразной связки. При создании такого матрикса использовался особый низкокристаллический гидроксиапатит [Shi и др., 2013]. В работе Ши для изготовления матрикса фиброин *ex tempore* растворяли в растворе воды, спирта, хлорида кальция, смешивали со взвесью из частиц гидроксиапатита и после этого подвергали лиофильной сушке. В качестве контроля создавался ФМ без добавления частиц гидроксиапатита [Shi и др., 2013]. Присутствие низкокристаллического гидроксиапатита в условиях *in vitro*, дополнительно стимулировало увеличение числа мезенхимальных стромальных клетках [Shi и др., 2013]. Полученные Ши конструкции вводили в искусственное сквозное отверстие, заранее созданное в большеберцовой и бедренной кости новозеландских кроликов. Наблюдения за областью введения матрикса в условиях *in vivo* проводили в течение 16 недель [Shi и др., 2013]. Компьютерная томография выявила постоянное возрастание кальцификации в течение 8 недель. Анализ срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, показал, что через 16 недель в области повреждения восстанавливалось 60% костного материала [Shi и др., 2013]. Стимуляция

увеличения числа остеобластов на подложке фиброинового матрикса показана и в некоторых других работах [Cheng и др., 2013], [He и др., 2013].

Известны работы, где минерализованные матриксы, созданные с помощью введения полиаспартата, вводили в область искусственно инициированного повреждения собакам и крысам. У крыс через 8 недель в зоне травмы наблюдались признаки остеогенеза [Jiang и др., 2009]. У собак дефект в области челюстных костей полностью заполнился и исчез через 12 месяцев [Zhao и др., 2009].

В работе Динг создана технология имитации внеклеточного вещества костной ткани, которая заключается в смешении фиброиновых нановолокон с наночастицами гидроксиапатита и иммобилизацией белком BMP-2. Полученные матриксы не являются трехмерными матриксами и представляют особый тип имплантатов. Опыты в условиях *in vivo* продемонстрировали, что данные матриксы, обладают способностью к равномерному высвобождению иммобилизованного морфогенетического фактора BMP-2 [Ding и др., 2016]. Поэтому данные композитные каркасы имеют хороший потенциал в терапии костных повреждений.

Композитные МФМ, содержащие хитозан и агарозу, позволяют минимизировать эффект преждевременной резорбции кости, который может возникать при иммобилизации матриксов белком BMP-2 [Raina и др., 2016].

Все приведенные литературные данные свидетельствуют о том, что матриксы на основе фиброина удовлетворяют требованиям, необходимым для создания костного имплантата и стимулируют репаративный остеогенез. Поэтому выбор фиброина для создания костного имплантата и для выполнения цели данной работы обоснован. Так как в мировой практике применяется как ФМ, так и МФМ, то в данной работе созданы два типа трехмерных матриксов и трехмерных микроносителей из фиброина.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Клеточные линии

Фибробласты мышцы линии NIH 3T3 были предоставлены профессором Ю. Бирайтером-Ханом (Университет им. Гёте, Франкфурт-на-Майне, Германия).

Клетки остеосаркомы человека линии MG-63 были предоставлены Покровским банком стволовых клеток (Санкт-Петербург, Россия).

2.2. Среды для культивирования клеток

Для культивирования клеток фибробластов линии 3T3 использовали среду DMEM (Lonza Group Ltd, Швейцария). Для культивирования МСК использовали среду DMEM (Lonza Group Ltd, Швейцария). Для культивирования клеток MG-63 среду α -MEM (Lonza Group Ltd, Швейцария). Все среды содержали 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США), 1% заменимых аминокислот, антибиотики: 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина (Gibco).

2.3. Выделение мезенхимальных стромальных клеток

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) были выделены из костного мозга мышей инбредной линии C57BL/6. Стволовая природа выделенных стволовых клеток была подтверждена иммунофлюоресцентным анализом CD73, CD90, CD105, CD45. Тканевой материал измельчали глазными ножницами в стерильных условиях, затем погружали в 0.05% раствор трипсин-ЭДТА для его диссоциации и осаждали 5 минут при 200g.

Полученную клеточную суспензию переносили в среду для культивирования мезенхимальных стромальных клеток.

2.4. Культивирование клеток на фиброиновых матриксах и микроносителях

Культивирование фибробластов 3Т3 на трехмерных матриксах. Клетки фибробластов 3Т3 культивировали на трехмерных матриксах. Суспензию фибробластов 3Т3 в объеме 300 мкл вносили на матрикс в концентрации 24 000 клеток/мл. Образцы трехмерных матриксов разных типов с фибробластами линии 3Т3 культивировали в чашках Петри со средой DMEM, содержащей 10% телячьей сыворотки при 37°C в присутствии 5% CO₂. Параллельно клетки фибробластов 3Т3 в тех же количествах культивировали на поверхности культурального пластика в 24-луночных планшетах, используя их в качестве контрольного образца.

Культивирование МСК на трехмерных фиброиновых матриксах. Клетки МСК культивировали на трехмерных фиброиновых микроносителях в среде α -MEM с 10% фетальной телячьей сыворотки. МСК наносили на минерализованные, неминерализованные фиброиновые микроносители в соотношении 400 000 клеток на 500 мкл суспензии микроносителей в объеме 1 мл. После 3-х часов инкубирования микроносители с адгезированными клетками переносили в культуральный адгезивный флакон в объеме 10 мл для избавления от не связавшихся с микроносителями клеток. На следующие сутки суспензию микроносителей с прикрепившимися к ним клетками переносили в лунки 24-луночного планшета.

Культивирование клеток MG-63 на трехмерных фиброиновых микроносителях. Клетки MG-63 культивировали на трехмерных фиброиновых микроносителях. Суспензию 50 мкл клеток MG-63 в концентрации 800 000 клеток/мл добавляли к 50 мкл суспензии фиброиновых микроносителей вносили в ячейки 96-луночных планшетов и инкубировали при 37°C в присутствии 5% CO₂ 6 часов. После 6-часового инкубирования фиброиновые микроносители с клетками MG-63 переносили в ячейки 24-луночных планшетов, содержащих 1 мл среды

ЕМЕМ. Клетки на носителях в среде ЕМЕМ культивировали в тех же условиях при 37°C в присутствии 5% CO₂. Культуральную среду меняли раз в 3 дня.

2.5. Оценка способности поддерживать адгезию и пролиферацию

Адгезию и пролиферацию клеток на поверхности микроносителей определяли с помощью МТТ теста и с помощью сканирующей конфокальной микроскопии. Методом сканирующей электронной микроскопии и сканирующей конфокальной микроскопии детектировали адгезию фибробластов линии 3Т3 к поверхности матриксов.

Электронная микроскопия. Для анализа с помощью электронной микроскопии образцы препарата фиксировали в глутаровом альдегиде, постфиксировали 1% тетроксидом осмия, обезвоживали этанолом и ацетоном и напыляли слоем золота толщиной 20 нм. Срезы препарата с образцами матриксов, нагруженных фибробластами линии 3Т3, проводили через среднюю часть на глубине 600 мкм. Это позволяло выявлять клетки во внутренних полостях матрикса.

Конфокальная микроскопия. Подсчет числа клеток с помощью конфокальной микроскопии проводился по окрашенным SYTOX Green ядрам фибробластов мыши линии NIH 3Т3 и по окрашенным красителем DAPI клеткам МСК. Увеличение числа клеток оценивалось через их изменение на единицу объема. Визуализацию структуры цитоскелета клеток MG-63 и МСК проводили с помощью его окраски фаллоидином Alexa Fluo-488 phalloidin.

Изменение количества клеток во времени в трехмерном пространстве при культивировании клеток фиксировали в нескольких временных точках. При культивировании клеток фибробластов линии 3Т3 через 1 и 4 сутки. При культивировании клеток MG-63 через 1 и 4 сутки. При культивировании клеток МСК через 7 суток. Одновременно был поставлен контроль, где клетки культивировали в 24-луночных планшетах и изменения их количества детектировали через те же самые промежутки времени.

МТТ тест. Для оценки изменения числа клеток MG-63 и МСК в ячейки 24-луночных планшетов, содержащих фиброинозные микроносители с клетками MG-63, вносили 200 мкл раствора МТТ в концентрации 5 мг/мл в ФСБ. После инкубировали в течение 4 часов при 37°C. После инкубации суспензию микроносителей отбирали и центрифугировали при 14500g. Супернатант удаляли, осадок растворяли в растворе DMSO и проводили колориметрические измерения при $\lambda=540$ нм.

Изменение количества клеток во времени оценивали через 1 и 4 сутки. На культуральном пластике 24-луночных планшетов ставился контроль.

2.6. Изменение уровня экспрессии щелочной фосфатазы

Экспрессия щелочной фосфатазы. Дифференциация в остеогенном направлении на фиброинозных микроносителях оценивалась через оценку экспрессии щелочной фосфатазы клеток MG-63 и МСК. Для этого 20 000 клеток MG-63 добавляли к 50 мл суспензии фиброинозных микроносителей и переносили в лунки 24-луночного планшета. В случае контроля клетки MG-63 вносили на культуральный пластик планшетов.

Непосредственную оценку экспрессии щелочной фосфатазы проводили по следующему протоколу. Суспендированные в среде клетки переносили из лунки в эппендорф, отбирая излишек среды. Вносили 200 мкл лизирующего буфера, содержащего 50 mM Tris, 100 mM глицерина, 0,1% Triton X-100 (с pH=10). Проводили 2 последовательных акта замораживания-оттаивания образцов. Вносили 50 мкл 7mM раствора нитрофенил-фосфата. Инкубировали в течение 30 минут в темноте. По окончании инкубации реакцию останавливали путем добавления 50 мкл 1M раствора NaOH. Колориметрические измерения проводили при $\lambda=405$ нм.

Детектированный сигнал уровня щелочной фосфатазы нормализовался на детектированный сигнал МТТ. Эту процедуру необходимо было провести, чтобы

наблюдаемое изменение уровня экспрессии щелочной фосфатазы было независимо от общего изменения числа клеток.

Изменение остеогенной активности клеток во времени оценивали через 1 и 7 сутки.

Введение дексаметазона. Для индукции остеогенеза клетки культивировали в остеогенной среде (10⁻⁸ М дексаметазона (Sigma), 50 мкг/мл 2-фосфо-L-аскорбата натрия (Fluka, Германия) и 10 мМ β-глицерофосфата натрия (Sigma)). Сравнивая выборки на разных сроках культивирования, где в среду вносился или не вносился дексаметазон, можно выявить вклад структуры матриксов на изменение концентрации щелочной фосфатазы.

2.7. Изготовление трехмерных матриксов из фиброина

Шелк-сырец *Bombyx mori* отмывали от сопутствующего белка серицина. Отмывка от серицина включала три этапа кипячения измельченных фрагментов коконов или волокон шелка. Навеску 1 г. измельченного шелка кипятили в 500 мл раствора 2% 62 мМ поверхностно-активного вещества стеарата калия (C₁₇H₃₅COOK) и 0,25% 25 мМ гидрокарбоната натрия в течение 40 минут, затем в 500 мл 0,25% 25 мМ раствора гидрокарбоната натрия в течение 40 минут. После этого происходило заключительное кипячение в 500 мл дистиллированной воды, в течение 30 минут для удаления остатков серицина, стеарата калия, гидрокарбоната натрия и конгломератов, которое повторяли 3 раза. Между этапами шелк промывали под сильной струей дистиллированной воды (рисунок 2).



Рисунок 2 — Схема отмывки шелка от серицина и сопутствующих компонентов.

При создании ФМ очищенный фиброин растворяли в течение часа в растворе 90% муравьиной кислоты и 10% хлорида лития на водяной бане при 50-60°C. Массовая доля фиброина в растворе — 25%. Раствор фиброина готовили *ex tempore*. После приготовления вносили в лекало из тефлона, где его смешивали с частицами порообразователя (кристаллами хлорида натрия) в соотношении 50 мг частиц на 100 мкл раствора. Размер вносимых частиц порообразователя равен 400 мкм. Полученную формованную смесь сушили в сушильном шкафу при 80°C в течение 2 часов. Затвердевший прототип матрикса извлекали из лекала и погружали в 96% этанол на 2 часа, затем переносили в дистиллированную воду и погружали на 2 часа. На последнем этапе матриксы дегазировали при помощи вакуумного насоса (рисунок 3).

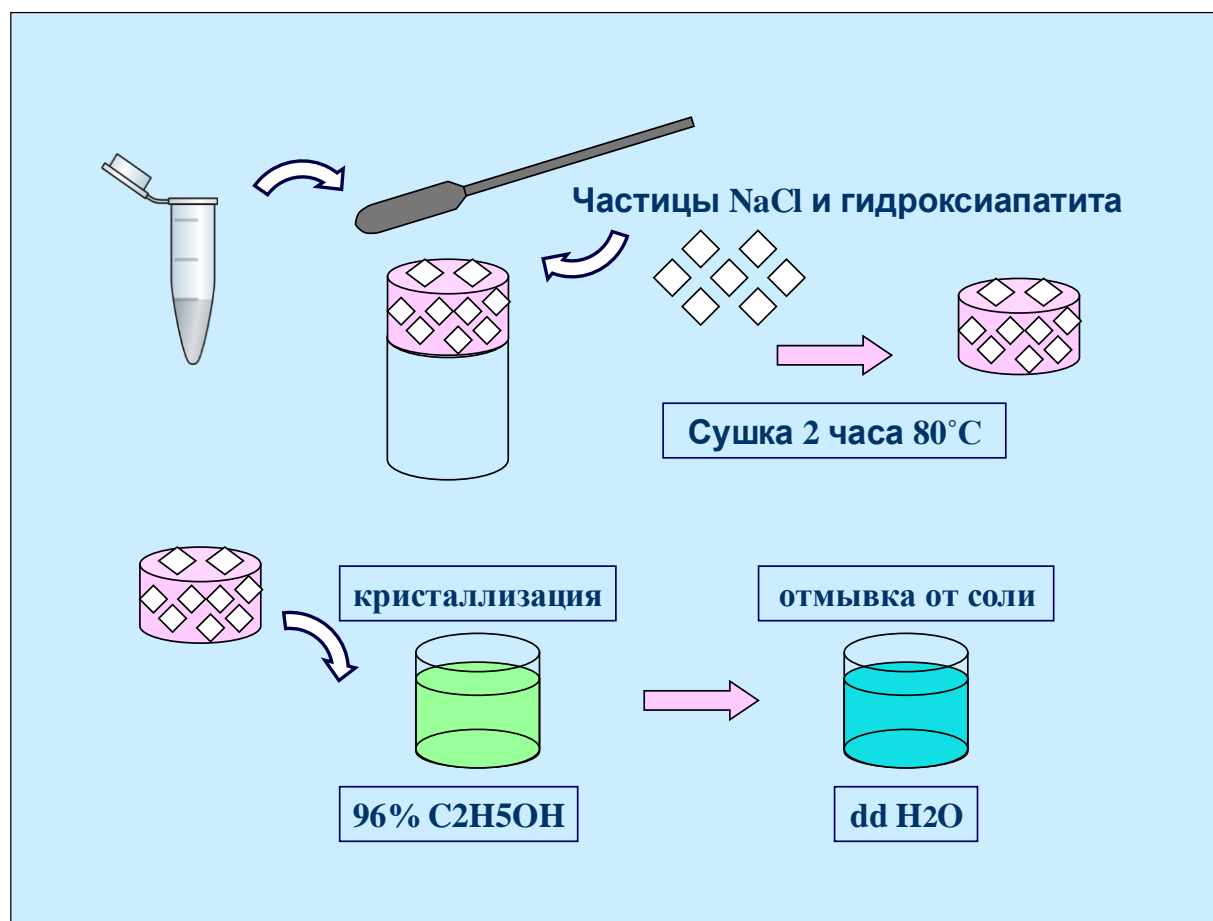


Рисунок 3 — Схема изготовления матриц из фиброина методом выщелачивания.

При создании МФМ в методику был добавлен дополнительный этап с включением в матрикс гидроксиапатита. Порошок гидроксиапатита (получен из костей крупного рогатого скота) был предоставлен сотрудником Межрегионального ортопедического центра ФГУЗ КБ №81 ФМБА России (Томская область, г. Северск) В.В. Гузеевым. Соотношение гидроксиапатита к фиброину в сухом веществе матрикса составляло 1 : 9. Во время изготовления МФМ 1,39 мг гидроксиапатита равномерно смешанного с 100 мг хлорида натрия вносили на этапе формовки в 50 мкл раствора фиброина (рисунок 2). Остальные этапы при приготовлении ФМ и МФМ полностью совпадали.

2.8. Изготовление микроносителей из фиброина

Трехмерные микроносители из фиброина были получены путем криоизмельчения трехмерных пористых матриксов. Для этого их погружали в дистиллированную воду, помещали на 12 часов в морозильную камеру при температуре -20°C , затем переносили в камеру с температурой -90°C и выдерживали еще 4 часа. После извлекали из камеры и измельчали в диспергаторе в течение 1,5 минут. Полученные фрагменты осаждали центрифугированием и пропускали через несколько сит с разными размерами ячеек. Размер отверстий сит был равен 500 мкм, 250 мкм и 100 мкм. Полученный размер частиц составлял 100 – 250 мкм.

Микроносители были подвергнуты минерализации, которая осуществлялась за счет осаждения кристаллов фосфата кальция из насыщенных растворов во время двухэтапного процесса. На первом этапе прекальцификации частицы помещались в 100 мл. водного раствора, содержащего 4 гр NaCl, 0,139 г CaCl₂, 0,152 г. MgCl₂ 6H₂O, 0,176 г. NaHCO₃, 0,089 г. Na₂HPO₄ 2H₂O (Sigma-Aldrich, Германия). Раствор насыщали диоксидом углерода и выдерживали при 37°C в течение 1 суток. На втором этапе кальцификации частицы переносили в 100 мл. другого водного раствора, содержащего 4 гр. NaCl, 0,139 г CaCl₂, 0,03 г. MgCl₂ 6H₂O, 0,088 г. NaHCO₃, 0,089 г. Na₂HPO₄ 2H₂O (Sigma-Aldrich, Германия). Раствор насыщали диоксидом углерода и выдерживали при 50°C в течение 1 суток.

Для оценки степени минерализации частицы помещали в раствор 0,5% красителя ализариновый красный (Panreac, Spain) и инкубировали в течение часа при pH = 4,1–4,3 затем отмывали водой и оценивали с помощью конфокальной лазерной микроскопии.

2.9. Механические свойства матриксов

Механические измерения МФМ выполнены научным сотрудником В.А. Жуйковым (биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова) на реометре MCR 302 (Anton Paar). Для измерения модуля Юнга матриксов использовали геометрию плита–плита с диаметром верхней плиты равной 25 мм. Значение относительной деформации матрикса при разной толщине зазора рассчитывали по формуле $e=(X_0-X)/X_0$, где X_0 — исходное расстояние между плитами равное высоте образца (4,37 мм), X — расстояние между плитами в мм при сжатии. В результате был построен график зависимости силы нажатия от расстояния между плитами. Затем, значения силы нажатия и расстояние между плитами пересчитывались в величины давления и относительной деформации, и строился график зависимости давления от относительной деформации. Модуль Юнга образца высчитывался по тангенсу угла наклона линейной части графика

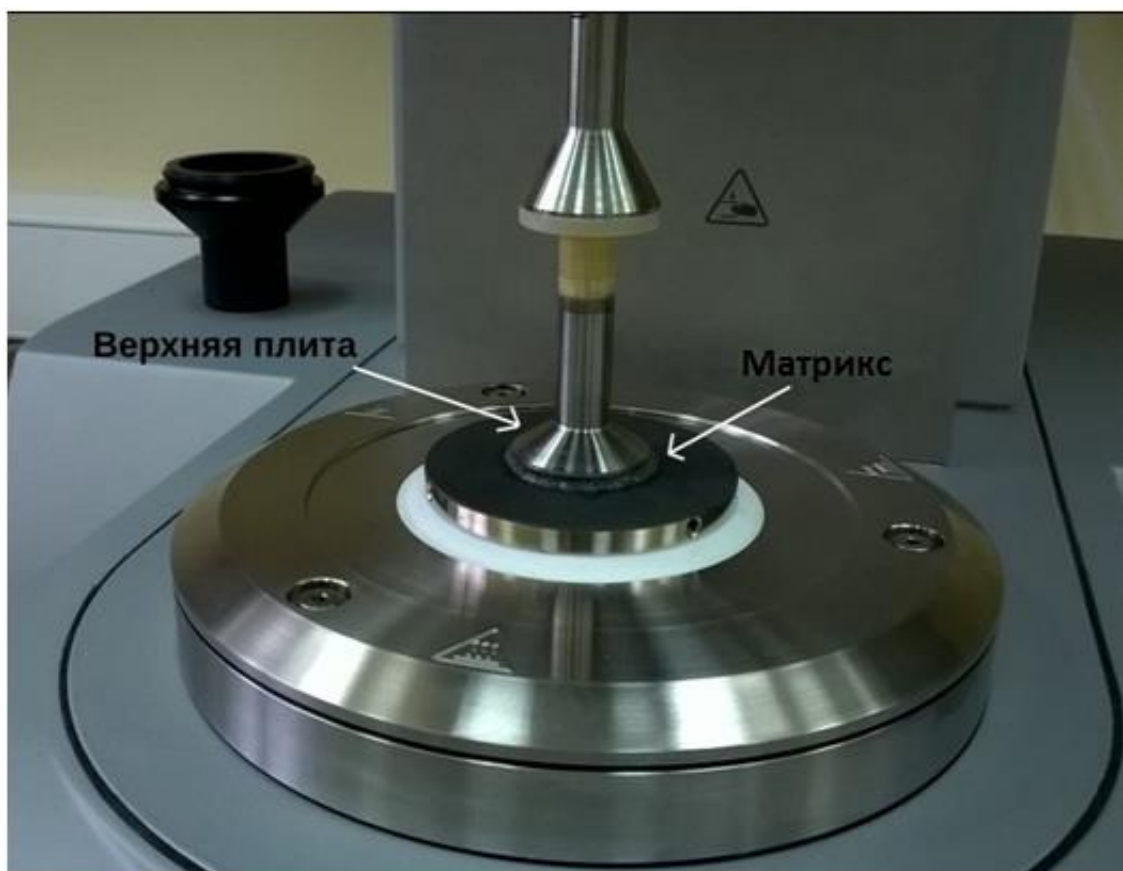


Рисунок 4 — Процесс выполнения измерений на реометре.
Матрикс помещен между плитами сжатия.

2.10. Измерение скорости деградации матриксов

Измерение скорости деградации матриксов из фиброина определяли по разработанной методике в разных растворах: 1) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), 2) в реактиве Фэнтона, содержащем 0,1 М соли Fe^{2+} и 1 мМ раствора 3% H_2O_2 . В буфер ФСБ вносили азид натрия (NaN_3) в концентрации 0,1%. Растворы меняли через 48 часов. Изменение массы регистрировали каждые 7 суток. В каждом опыте было 3 образца.

2.11. Лабораторные животные

Мыши линии Balb/c и самки инбредной линии C57BL/6 были получены из питомника лабораторных животных «Пушино» (Московская область, г. Пушино). Акклиматизация животных в виварии перед операцией составляла 7 суток.

Половозрелые крысы породы Wistar были переданы из питомника Межрегионального ортопедического центра ФГУЗ КБ №81 ФМБА России (Томская область, г. Северск) сотрудником Межрегионального ортопедического центра ФГУЗ КБ №81 ФМБА России (Томская область, г. Северск) В.В. Гузеевым.

2.12. Подкожная имплантация мышам линии Balb/c для оценки биосовместимости в условиях *in vivo*

Для оценки биосовместимости матриксов с окружающими тканями в условиях *in vivo* мышам был введен ФМ. Для этой цели матриксы длиной 12 мм, шириной 3 мм и толщиной 1 мм вводили подкожно в стерильных условиях, после чего через 2 месяца имплантированные образцы матриксов извлекали для анализа тканевого материала.

Фиброиновые матриксы вводили по следующей процедуре. Мышей наркотизировали 100 мл раствора, содержащего 1% Золетил и 0,4% Рометар (Virbac

Sante Animale, Каррос, Франция). Перед процедурой хирургического вмешательства с поверхности кожи удаляли шерсть депиляционным кремом и проводили премедикацию препаратом Римадил (Pfizer Animal Health, США) 5 мг на 1 кг веса. Образец матрикса и участок кожи в месте разреза обеззараживали 0,05% раствором хлоргексидина (Биоген, РФ). Излишки антисептика удаляли стерильными салфетками. Для имплантации делали разрез длиной 5 мм на спине животного, смещаясь относительно осевой срединной линии. Матрикс помещали с помощью стерильного пинцета в полость подкожного кармана, которую формировали с помощью заостренного шпателя, отделяя подкожные ткани от мышечного слоя. Разрез закрывали, накладывая простые узелковые хирургические швы нерассасывающейся полипропиленовой нитью. Рану обрабатывали антисептиком и закрывали медицинским клеем БФ-6 (Вертекс ЗАО, РФ). Мышей выводили из эксперимента через 2 месяца с помощью цервикальной дислокации шейных позвонков. После чего извлекали имплантированные образцы матрикса и проводили гистологический анализ тканей в зоне их введения.

2.13. Модель повреждения бедренной кости

Оценка возможности применения матриксов для регенерации костной ткани была проведена на крысах после травматического повреждения бедренной кости. Для этого по методике, искусственно создавалось сквозное повреждение кости. Операция проводилась в стерильных условиях под наркозом путем внутримышечного введения в бедренную мышцу 0,25% золетила и 0,05% ксиловета (из расчета на вес животного около 200 гр.). После выбривания операционного поля в проекции левой бедренной кости, обработки кожи 70% раствором спирта в проекции бедренной кости создавали линейный кожный разрез длиной до 25 мм. Фасции бедренной мышцы расслаивались вдоль до доступа к кости с помощью зажима типа «москит» с обнажением наружной поверхности бедренной кости. Дефект кости создавали с помощью сверла диаметром 2 мм в диафизе кости в передне-заднем направлении (сквозное отверстие). В конце

операции мышечную ткань над местом введения зашивали и накладывали кожные швы.

Акклиматизация животных в виварии перед операцией составляла 7 суток. Как до, так и после операции все животные содержались на стандартном рационе при комнатной температуре в одинаковых условиях. Процедура выведения из эксперимента осуществлялась с помощью цервикальной дислокации шейных позвонков. После чего имплантированные образцы матрикса извлекали для изготовления и анализа гистологических срезов, рентгенотомографических исследований.

Животные были разделены на две опытные и одну контрольную группы. В первой опытной группе осуществляли имплантацию ФМ, а во второй — МФМ. В контрольной группе заполнение дефекта не производилось и отверстие раны не подвергалось какой-либо восстановительной терапии. Рентгенотомографические исследования и извлечение имплантированных образцов для получения гистологических срезов, проводились через 1, 2 и 4 неделю после создания искусственной травмы во всех группах крыс.

2.14. Гистология и приготовление образцов

Приготовление и анализ тканевого материала, полученного при подкожной имплантации фибринового матрикса. Образцы тканевого материала из зоны введения матрикса промывали фосфатно-солевым буфером и фиксировали в смеси Буэна (насыщенный водный раствор пикриновой кислоты, формалин и ледяная уксусная кислота в соотношении 15 : 5 : 1). Для фиксации образцы обезвоживали в растворах этанола возрастающей концентрации (50%, 60%, 70%, 80%, 96%, 100%) по 2 часа в каждом. Спирт удаляли инкубацией в течение 2 часов в растворе изопропанола и О-ксилола в соотношении 1 : 1 и в чистом О-ксилоле (в двух сменах по 30 минут). Подготовленные образцы заливали в парафин последовательной инкубацией в расплавленной смеси Histomix® (BioVitrum, РФ)

и О-ксилола (1 : 1) в течение 1 часа и, далее, в трех сменах расплавленного Histomix® по 30 минут в каждой при 52°C. После этого образцы ткани помещали в формы для заливки блоков и заливали расплавленным парафином Histomix®. Срезы толщиной 5 мкм готовили на микротоме Ротмик-1 (Орион Медик, РФ), наклеивали на поверхность предметных стекол и депарафинизировали инкубацией в двух сменах О-ксилола (в первой 10 минут, во второй 3 минуты) в 100% этаноле в течение 1 минуты. После этого срезы ополаскивали один раз в 100% этаноле, два раза в 96% этаноле и два раза в дистиллированной воде.

Окраску препарата проводили по методу Маллори. Окрашенные препараты заключали в бальзам и изучали с помощью микроскопии.

Приготовление и анализ материала области имплантации в модели костного повреждения. Из образцов костного материала крыс были сделаны срезы. Фиксация осуществлялась в 10% нейтральном растворе Буэна. Дополнительно проводилась и декальцинация в 25% растворе Трилона Б. Фрагменты костных тканей, прилегающих к области повреждения, заливали в парафин и готовили срезы толщиной 5-6 микрон на роторном микротоме марки НМ 355S фирмы Microm. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином и изучали с помощью микроскопии. Наблюдения проводились через 1, 2 и 4 неделю после создания искусственной травмы во всех группах крыс.

Окраска материала. Окраску по Маллори проводили последовательным погружением и инкубацией в течение 2-3 минут в фуксин и фосфорно-молибденовую кислоту. Между инкубацией образцы промывали водой. На заключительном этапе образцы погружали на 1-2 минуты в раствор красителей анилинового синего, оранжевого Ж, щавелевой кислоты. Погружали в воду для удаления красителей. Погружали на 2 минуты в 96% этанол, и на 1 минуту в ксилол.

Для окраски в смеси гематоксилина и эозина срезы помещали на 2 минуты в раствор квасцового гематоксилина по Эрлиху. Промывали водой. Инкубировали в растворе эозина 1 минуту. Погружали в воду для удаления красителя. Погружали на 2 минуты в 96% этанол, и на 1 минуту в ксилол.

2.15. Микроскопия

С помощью микроскопии в проходящем свете изучали структуру матриксов, срезы тканевого материала из зоны подкожной имплантации матриксов и зоны костной травмы. С помощью сканирующей электронной микроскопии изучали макро- и микроструктуру матриксов и адгезию клеток к их поверхности во время культивирования. С помощью сканирующей конфокальной микроскопии изучали динамику пролиферации клеток, культивируемых на поверхности матриксов и микроносителей.

Микроскопия в проходящем свете. Срезы изучали с использованием микроскопа Zeiss Imager A1 (Zeiss) с объективами Zeiss EC Plan-Neofluar 40x/0,75 Ph2 и A-plan 20x/0,45 Ph2. Изображения получали с помощью камеры AxioCam MRc 5 (Zeiss), а обрабатывали с помощью программного обеспечения AxioVision 4.7.2 (Zeiss).

Сканирующая электронная микроскопия. Для сканирующей электронной микроскопии использовали микроскоп S2 (Cambridge Instruments, Кембридж, Великобритания) в режиме SEI. Разрешение микроскопа 10 нм, рабочее напряжение 20 кВ. Изображения были получены с использованием программного обеспечения MicroCapture (SMA, Россия).

Срезы в фиксированном препарате делали через среднюю часть препарата на глубине 600 мкм для выявления клеток в глубине матрикса. Подготовку срезов осуществляли по стандартной методике, которая включала фиксацию глутаровым альдегидом, постфиксацию 1% тетроксидом осмия, обезвоживание возрастающими концентрациями этанола, погружение в ацетон и высушивание. На последнем этапе готовые срезы напыляли на приборе Ion Coater IB-3 (Eiko Engineering, Мито, Япония) слоем золота толщиной 20 нм в атмосфере аргона при ионном токе 6 мА и давлении 13,332 Па.

Конфокальная микроскопия. Для сканирующей лазерной конфокальной микроскопии при изучении образцов трехмерных матриксов и трехмерных микроносителей использовали микроскоп Zeiss Axiovert 200M LSM510 META

(Carl Zeiss, Йена, Германия), с помощью которого получали серии оптических срезов на глубине до 600 мкм от поверхности матрикса, выполненных с интервалом 0,65 — 0,99 мкм. Изображения со срезов получали с помощью программных приложений (LSM Version 1.4.2, Carl Zeiss, Германия и Imaris 6.1.5, Bitplane AG, Швейцария), которые позволили количественно оценить динамику пролиферации эукариотических клеток. Установки лазера и анализирующих фильтров настраивали согласно рекомендациям производителей. В работе использовались объективы: Plan-Neofluar 10x/0,3, Plan-Neofluar 20x/0,5 и Plan-Neofluar 40x/1,3. С помощью приложения 3D for LSM Version 1.4.2 (Carl Zeiss, Йена, Германия) отделяли объект от фонового излучения. С помощью приложения Imaris 6.1.5 (Bitplane AG, Цюрих, Швейцария) разграничивали сливающиеся и накладывающиеся друг на друга объекты.

Образцы микроносителей были изучены с помощью микроскопа Eclipse Ti-E с объективом Plan Apo VC DIC N2 20× objective (Nikon Corporation, Япония). Визуализация структуры цитоскелета клеток, культивируемых на микроносителях, была изучена при помощи этой же модели микроскопа с конфокальным модулем A1 и объективом CFI S Fluor × 100/1.30 Oil.

Образцы матрикса и образцы микроносителей с прикрепившимися к их поверхности клетками перед проведением сеансов микроскопии предварительно фиксировали 4% параформальдегидом. Для его приготовления навеску 400 мг параформальдегида разводили в 9 мл дистиллированной воды и 10 мкл 1М NaOH на водяной бане при температуре 70°C. После полного растворения параформальдегида добавляли 1 мл десятикратного фосфатно-солевого буфера и доводили pH до 7 3М раствором HCl. Полученный раствор фильтровали через фильтр с диаметром отверстий 45 нм. Время фиксации — 30 минут. Фиксированные образцы обрабатывали в течение 10 минут 0,1% раствором Triton X-100 в ФСБ. Клетки на матриксе визуализировали с помощью ядерного красителя SYTOX green (Invitrogen, США) для разрушения мембран с целью создания условий для окрашивания их ядер специфическим красителем. Окрашивание

производилось 5 мМ раствором красителя, в котором образцы инкубировали в течение 20 минут в условиях непрерывного перемешивания среды.

Мезенхимальные стромальные клетки визуализировали с помощью красителя DAPI за счет прижизненной окраски ядер клеток, которая осуществлялась согласно инструкции производителя (Sigma-Aldrich, США).

В опытах по адгезии и пролиферации клеток MG-63 МФМ был окрашен TRITC.

Для визуализации актинового цитоскелета клеток МСК и MG-63 были зафиксированы 4% раствором параформальдегида в течение 20 минут, пермеабелизованы 0,1% раствором Triton X-100 в течение 10 минут и окрашены красителем Alexa Fluor-488 phalloidin (2 ед/мл) в растворе 1 х ФСБ.

Для определения возможности минерализации микроносителей в остеоиндуктивных условиях фиброинозные микроносители с клетками на 7 сутки культивирования окрашивали ализариновым красным.

2.16. Рентгеномногографические исследования

Изменение минерализации в зоне травмы оценивали с помощью рентгеномногографии. Оценка минерализации происходила через определение оптической плотности в единицах Хаунсфилда. Этот параметр оценивает степень абсорбции рентгеновского излучения анатомическими структурами организма по отношению к воде. Степень абсорбции рентгеновского излучения водой в шкале Хаунсфилда принимается равной 0. Воздух и жир имеют отрицательные значения.

Рентгеномногографические исследования были проведены по стандартной методике на компьютерном томографе Somatom AR.NP фирмы «Siemens». Аксиальные срезы выполнялись при напряжении 110 кВ, сила тока 50 мА, толщина скана 3 мм, шаг томографии от 1 мм до 2 мм, алгоритм — extremity. Реконструкция каждой кости отдельно осуществлялась с получением показателей плотности в области кортикального слоя и в области его дефекта в единицах Хаунсфилда.

Рентгенограммы в прямой и боковой проекции получены при фокусном расстоянии 45 см, режимы 40-50-0,02. Наблюдения проводились через 1, 2 и 4 неделю после создания искусственной травмы во всех группах крыс.

2.17. Статистическая обработка результатов

Все статистические параметры, характеризующие сравниваемые выборки, были рассчитаны и визуализированы с помощью программы OriginLab. Достоверность результатов оценивалась с помощью критериев Тьюки и Краскела-Уоллиса.

2.18. Перечень используемых ГОСТов

Содержание животных и условия проведения экспериментов *in vivo* соответствовали требованиям международного стандарта системы обеспечения качества, GLP (Good Laboratory Practice) и ГОСТ Р ИСО 10993-2–2009 «Требования к обращению с животными»

Хирургические процедуры осуществляли согласно ГОСТ Р ИСО 10993-6–2009 «Исследование местного действия после имплантации».

Тканевые срезы изучали с использованием микроскопии согласно ГОСТ Р ИСО 10993-6–2009.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Характеристика матриксов

3.1.1. Внешний вид, форма и структура матриксов

Методом выщелачивания с помощью порообразователя хлорида натрия получены трехмерные матриксы из фиброина. Их структура была изучена с помощью световой и электронной микроскопии.

Структура ФМ была доступна для непосредственной визуализации с помощью световой микроскопии. Полученные матриксы имели равномерную ячеистую структуру (рисунок 5). Размер пор был равен 400 мкм и соответствовал размеру внесенных частиц порообразователя. Для визуализации внутренней структуры МФМ они разрезались на несколько фрагментов. Световая микроскопия показала, что внесение гидроксиапатита не нарушало структуру матрикса.

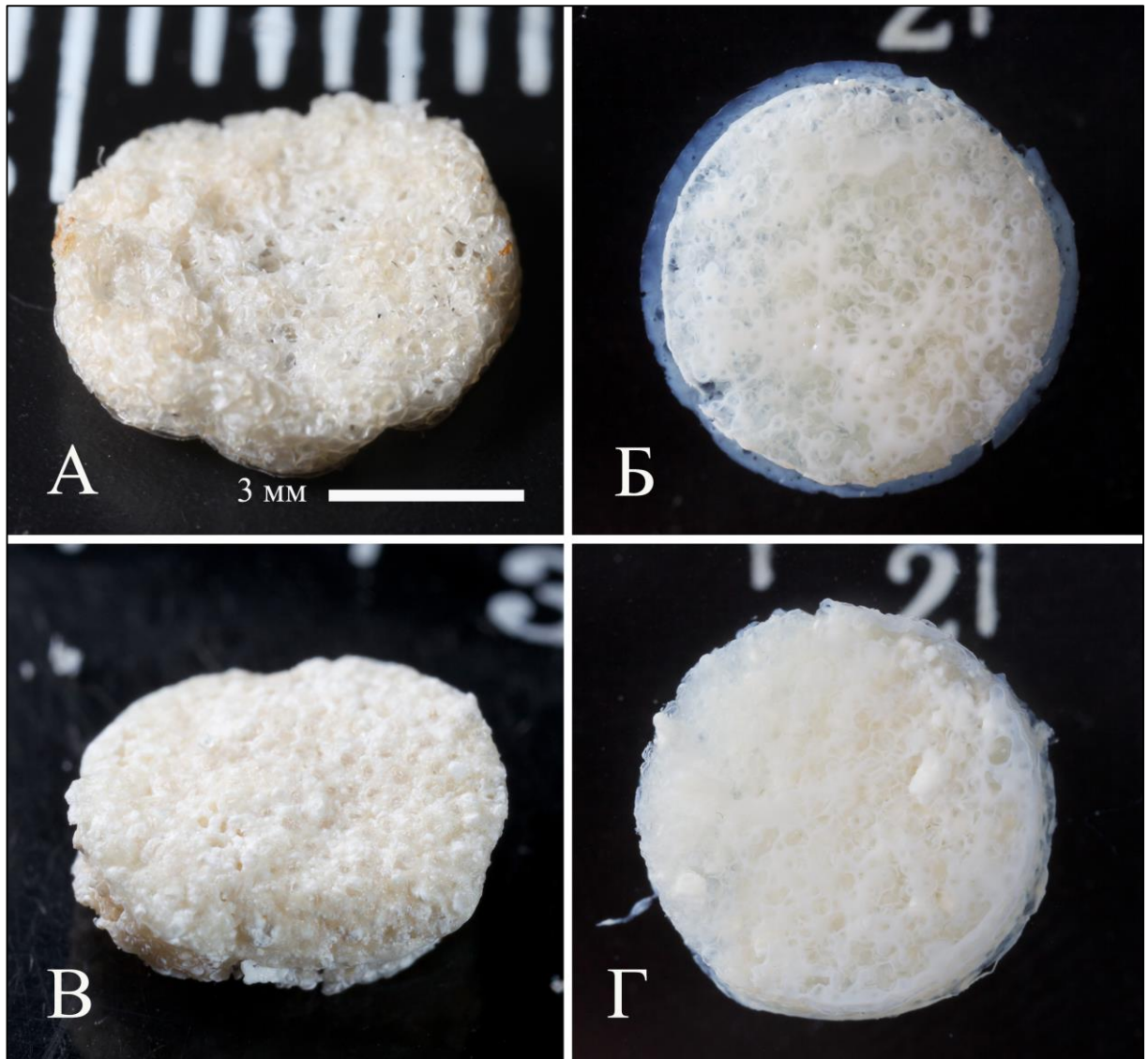


Рисунок 5 — Внешний вид матрикса из фибрина.

Пористая структура матриксов:

А — ФМ, вид сбоку; Б — ФМ, вид сверху; В — МФМ, вид сбоку; Г — МФМ, вид сверху.

С помощью электронной микроскопии установлены особенности микрорельефа матриксов обоих типов (рисунок 6, 7). Введение гидроксиапатита в состав МФМ, приводило к изменению рельефа его поверхностей, которое сопровождалось появлением шероховатых структур размером несколько десятков мкм (рисунок 7). При большем разрешении различия между матриксами не так значительны. Фибриновые стенки матриксов обоих типов имели схожие структурные элементы размером 3 - 5 мкм (рисунок 6, 7).

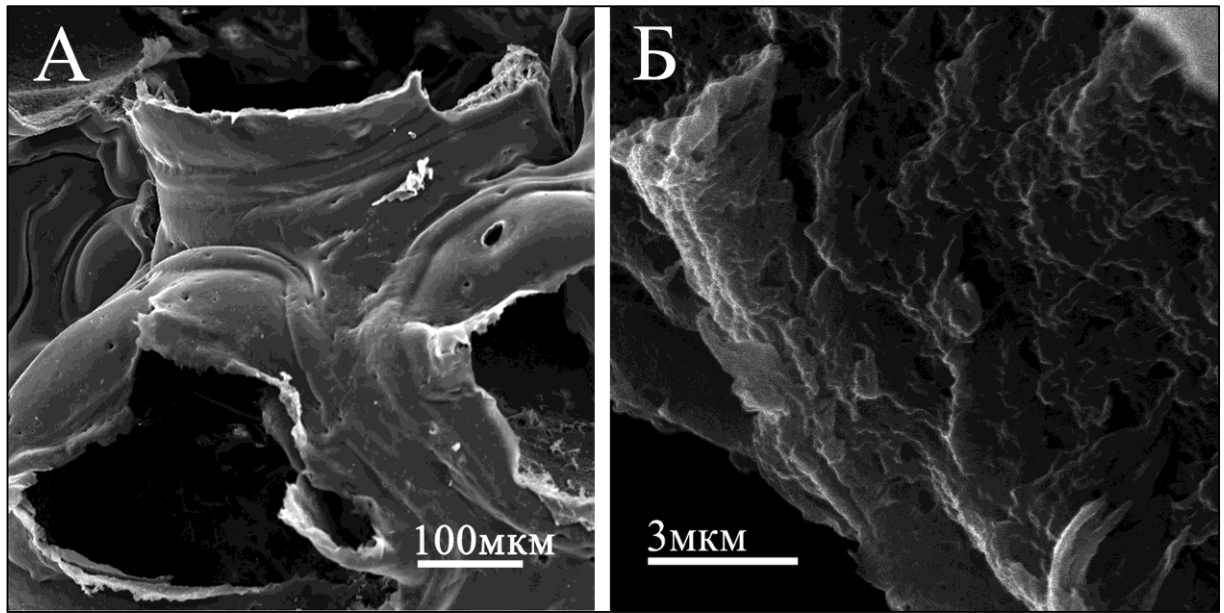


Рисунок 6 — Структура поверхности ФМ:
Макроструктура (слева) и микроструктура (справа) поверхности.

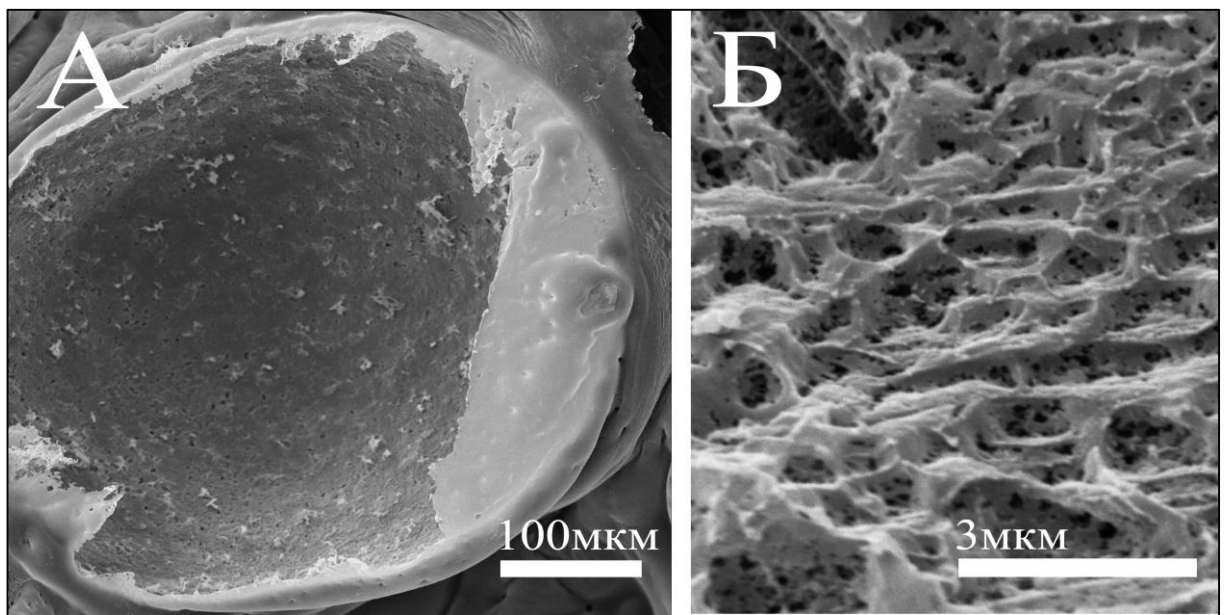


Рисунок 7 — Структура поверхности МФМ.
Макроструктура (слева) и микроструктура (справа) поверхности

3.1.2. Характеристика микроносителей

Полученные путем криоизмельчения фиброиновых матрицсов микроносители имели размер 100 - 250 мкм. С помощью сканирующей конфокальной микроскопии установлено, что минерализация микроносителей приводила к увеличению шероховатости их поверхности (рисунок 8) без изменения структуры. На минерализованных микроносителях кристаллы гидроксиапатита, равномерно распределены по всей поверхности микрочастиц.

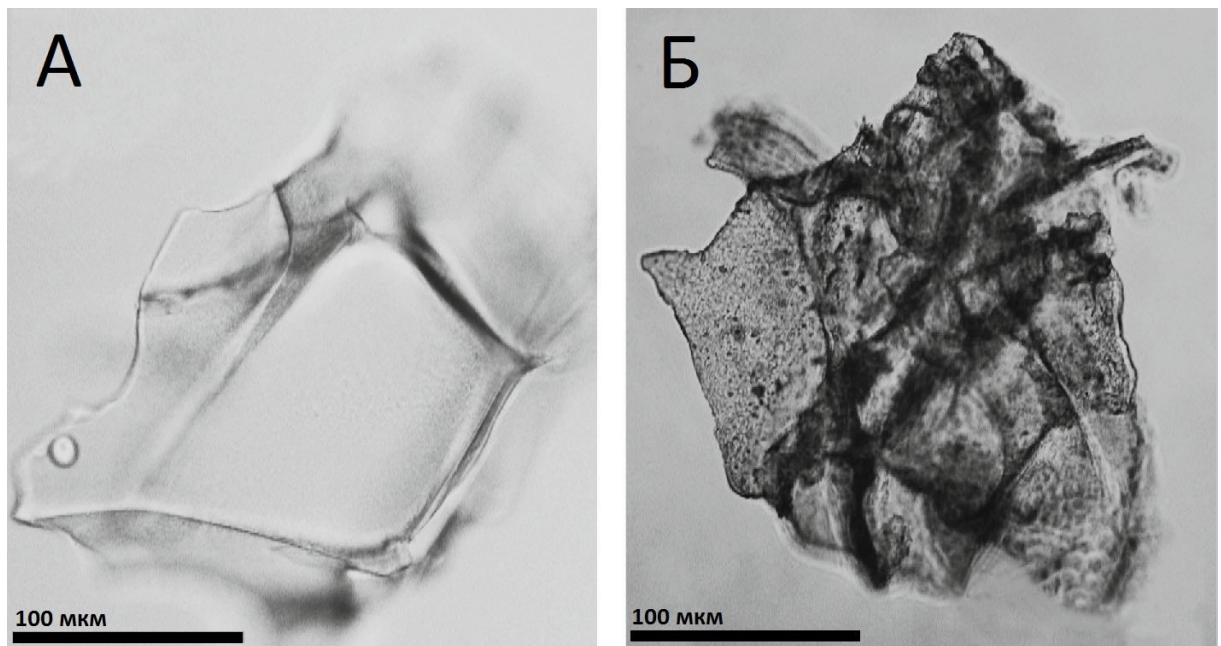


Рисунок 8 — Структура минерализованных (А) и неминерализованных (Б) микроносителей.

3.1.3. Прочность на разрыв и растяжимость минерализованных матрицсов

Для МФМ были определены значения силы нажатия при разном расстоянии между плитами и построен график (График 1А). Значения сил нажатия были пересчитаны в величины давления и относительной деформации, и построен график зависимости давления от относительной деформации (График 1Б). По тангенсу угла наклона линейной части второго графика высчитывался модуль Юнга образца МФМ (график 1Б). Модуль Юнга образца МФМ составил $54,5 \pm 0,5$ кПа (график 1).

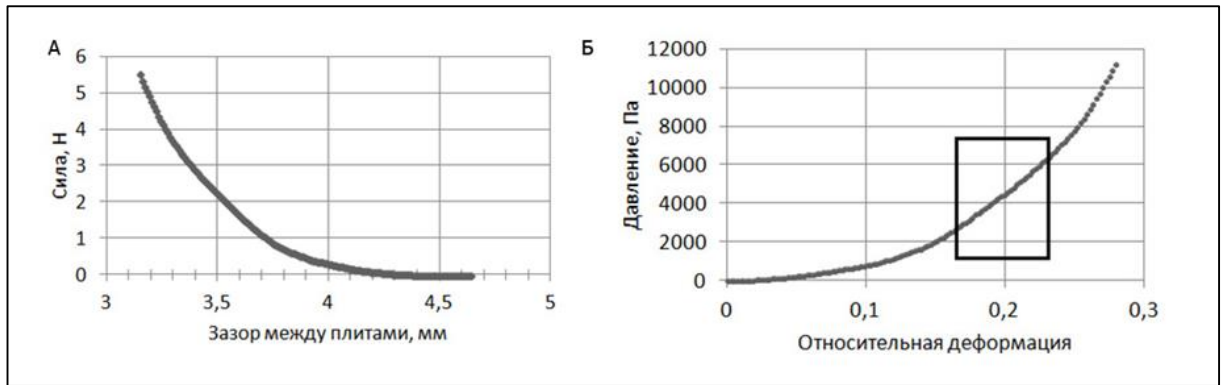


График 1 — Измерение механических свойств экспериментального образца МФМ.

А — зависимость силы нажатия в Н (ньютонсах) от расстояний между плитами реометра в мм; на графике зависимость силы нажатия возрастает справа налево; Б — зависимость давления от относительной деформации в Па; прямоугольником выделен линейный участок, где высчитывался модуль Юнга; на графике зависимость возрастает слева направо.

3.1.4. Скорость деградации матриц

Для определения скорости деградации в окислительных и нейтральных условиях, матрицы погружали в фосфатно-солевой буфер (ФСБ) и реактив Фэнтонна. Матрицы в реактиве Фэнтонна распались за 9 недель, а в ФСБ за это же время они теряли 20% своей массы (график 2). Разница в уменьшении масс сравниваемых матриц статистически достоверна.

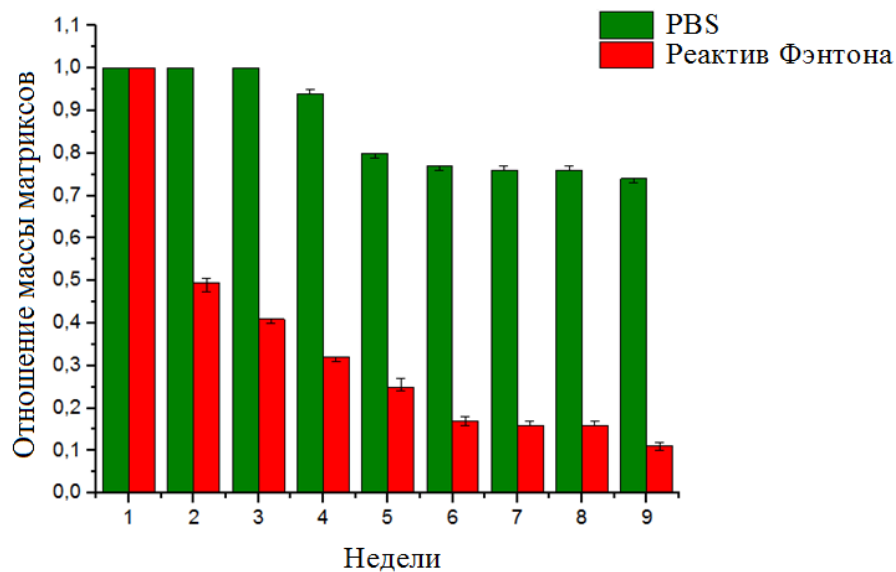


График 2 — Деградация фибриновых матриц в разных химических средах в течение 9 недель.

Зеленые столбцы — распад матриц в ФСБ; Красные столбцы — распад матриц в реактиве Фэнтонна. *Межгрупповые различия статистически достоверны $p < 0,001$

Полученные матриксы обладали пространственной целостностью и имели равномерную пористую структуру. Внесение гидроксиапатита не влияло на однородность структуры МФМ.

Была определена прочность на разрыв и растяжимость матриксов. Установлено, что матрикс на пределе своей прочности способен увеличить свою длину в 2,5 раза.

Созданные матриксы обладали способностью к деградации и одновременно характеризовались устойчивостью в жесткой среде реактива Фэнтонна в течение 9 недель.

Общие структурные, пространственные, биомеханические свойства матриксов и скорость их деградации, сделали возможным их использование в экспериментах по восстановлению костной ткани.

3.2. Биосовместимость фиброиновых матриксов и микроносителей

Для изучения биосовместимости полученных матриксов была проанализирована способность фибробластов 3Т3 и мезенхимальных стромальных клеток адгезировать и пролиферировать на поверхности матриксов.

Адгезия и пролифрация фибробластов 3Т3. Показано, что через 14 дней культивирования клетки фибробластов линии 3Т3 формировали монослой на поверхности матриксов (рисунок 9).

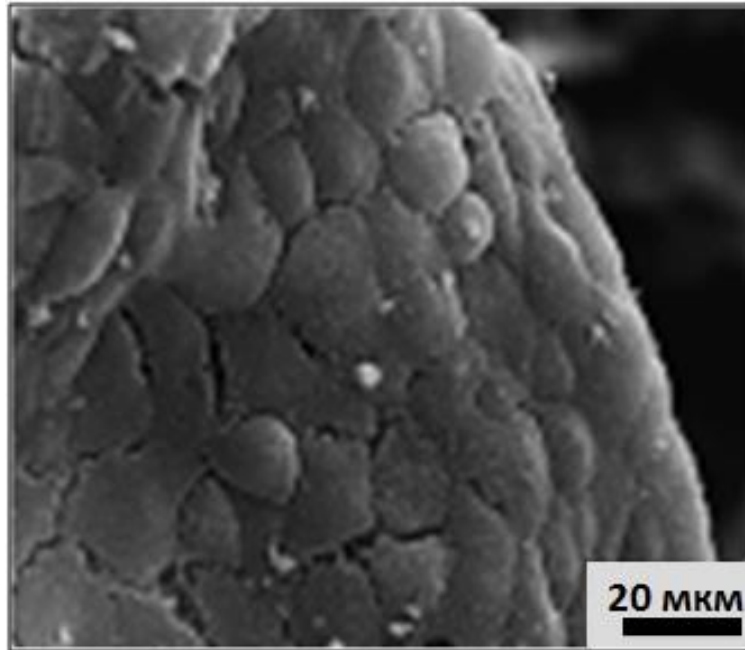


Рисунок 9 — Фибробласты мышцы линии 3Т3 на поверхности фибринового матрикса через 14 дней культивирования.

Снимок получен с помощью электронной сканирующей микроскопии

Через 4 суток культивирования фибробласты 3Т3 заполняли внутренние полости матриксов (рисунок 10, 11).

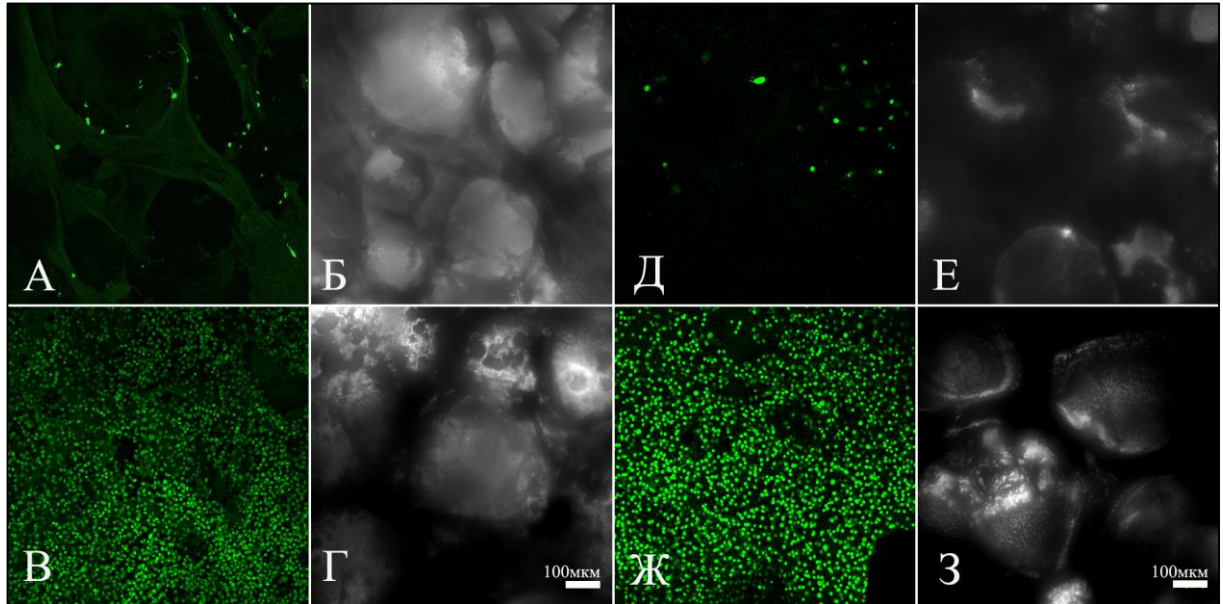


Рисунок 10 — Пролиферация фибробластов мышцы линии 3Т3 на поверхности ФМ и МФМ.

Снимок получен с помощью конфокальной сканирующей микроскопии

Ядра клеток окрашены SYTOX Green; А, Б, В, Г, — поверхность ФМ; Д, Е, Ж, З — поверхность МФМ; А, Б, Д, Е — через 1 сутки культивирования; В, Г, Ж, З — через 4 сутки культивирования; Б, Г, Е, З — поверхность матриксов в проходящем свете.

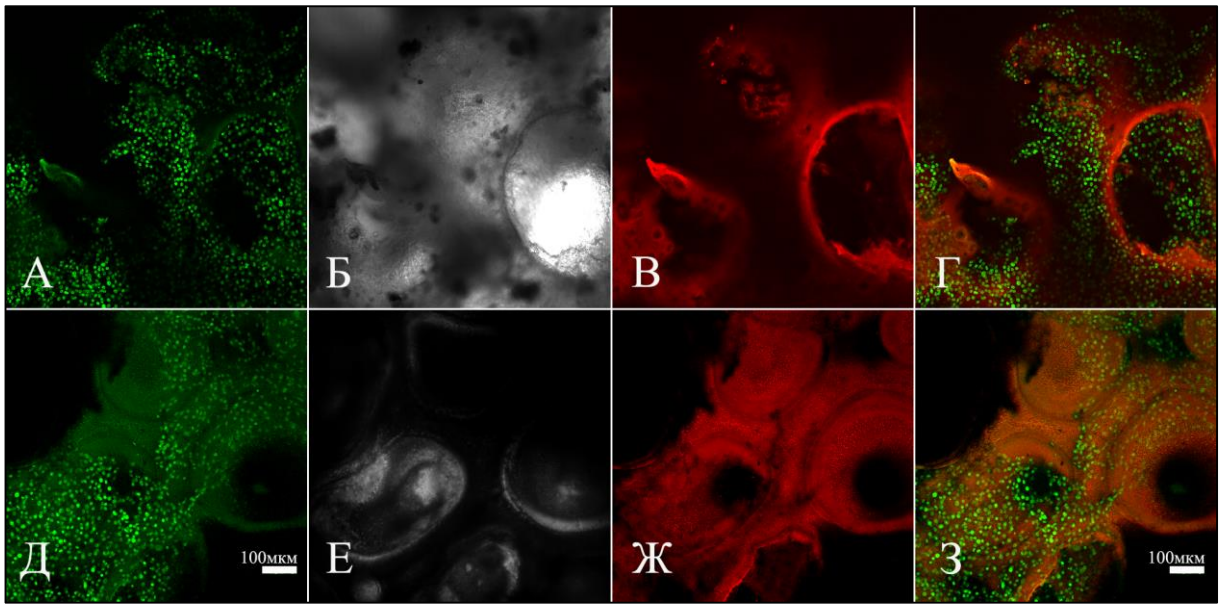


Рисунок 11 — Пролиферация фибробластов мыши линии 3Т3 на поверхности МФМ.

Снимок получен с помощью конфокальной сканирующей микроскопии

Ядра клеток окрашены SYTOX Green, матрикс окрашен красителем TRITC; А, Б, В, Г — через 1 сутки культивирования; Д, Е, Ж, З — через 4 сутки культивирования; Б, Е — поверхность матриксов в проходящем свете; В, Ж — структура МФМ матрикса окрашенная TRITC (без клеток); Г, З — структура МФМ матрикса окрашенная TRITC (с клетками).

Установлено статистически значимое увеличение числа клеток на МФМ в сравнении с ФМ через 1 сутки после начала культивирования; на МФМ оно равно 73 ± 7 клеток на 1 мм^3 , на ФМ оно равно 22 ± 2 клеток на 1 мм^3 (график 3). Установлено статистически значимое увеличение числа клеток на МФМ в сравнении с культуральным пластиком через 4 дня культивирования; на МФМ оно равно 697 ± 85 клеток на 1 мм^3 , на культуральном пластике оно равно 97 ± 8 клеток на 1 мм^2 (график 3).

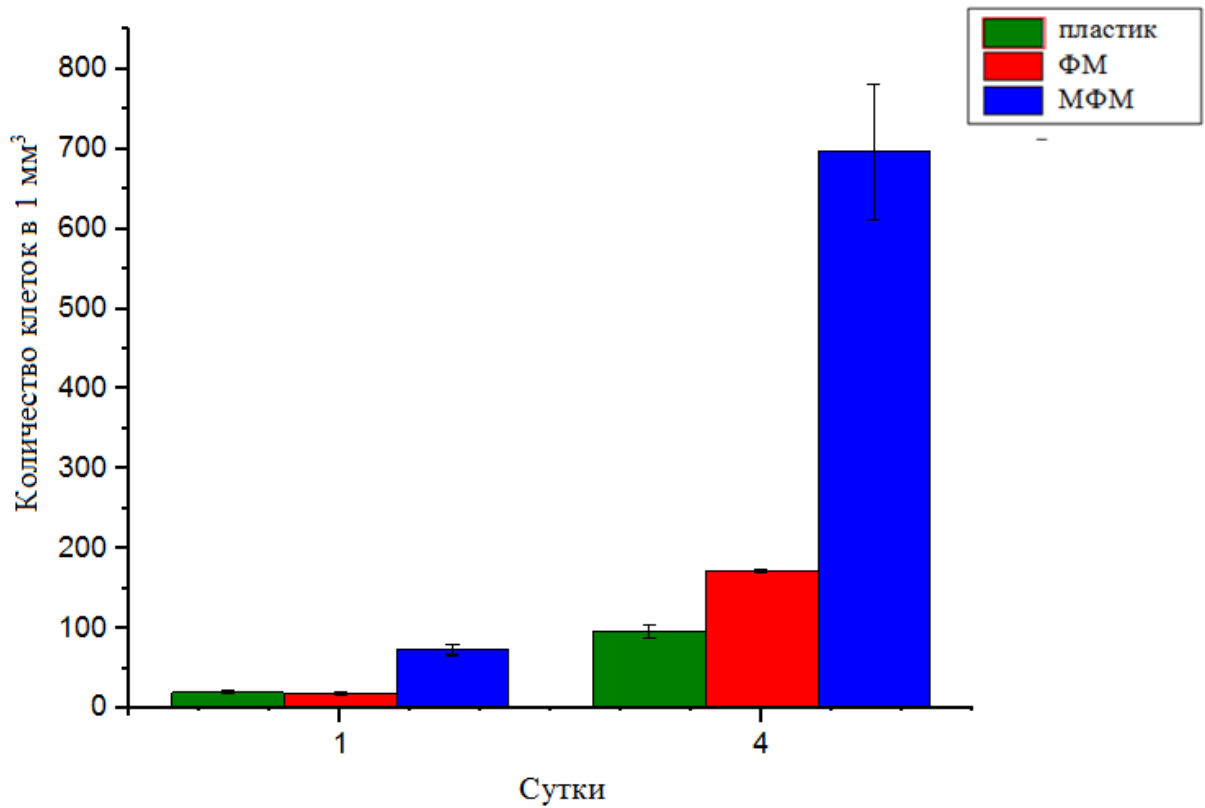


График 3 — Динамика пролиферации фибробластов мыши линии 3Т3 (на 1 мм³), культивируемых на матриксах.

Зеленые столбцы — культуральный пластик; Красные столбцы — ФМ; Синие столбцы — МФМ.

3.3. Остеогенные свойства трехмерных фиброиновых микроносителей

Оценка способности фиброиновых микроносителей поддерживать дифференцировку клеток в остеогенном направлении была изучена при культивировании на них МСК и остеобласт-подобных клеток линии MG-63.

3.3.1. Пролiferация мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на поверхности микроносителей.

Клетки МСК активно пролиферировали на поверхности фибриновых микроносителей (рисунок 12).

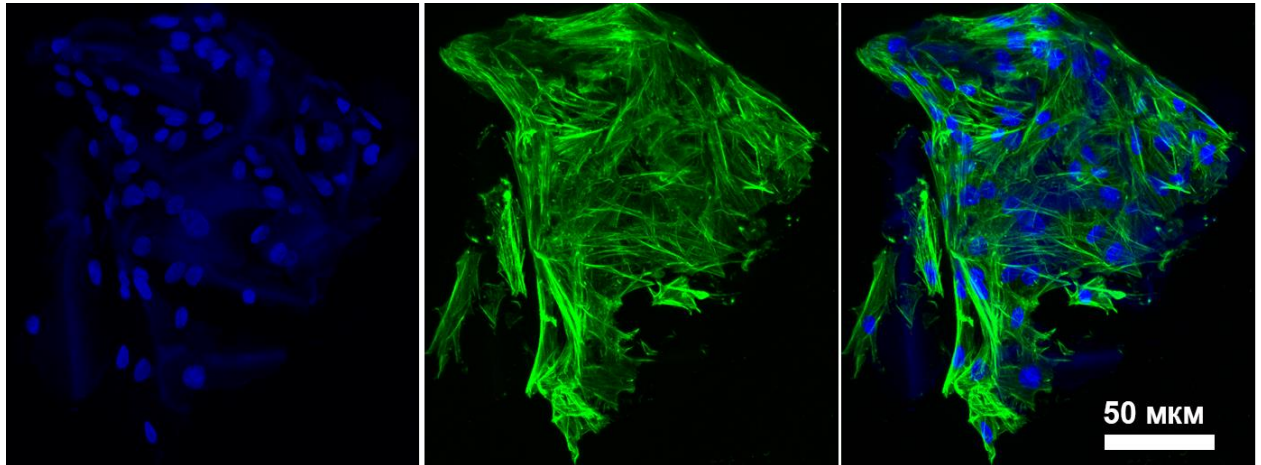


Рисунок 12 — МСК на фибриновых микроносителях на 7 день культивирования

Снимок получен с помощью конфокальной сканирующей микроскопии.

А — окрашивание DAPI клеток на микроносителе: выявлены ядра клеток (высокая интенсивность) и поверхность микроносителя (низкая интенсивность); Б — актиновый цитоскелет клеток, визуализированный с применением фаллоидин-ФИТЦ, В — наложение каналов А и Б. Представлены изображения трехмерной реконструкции на основе серии оптических срезов.

Проведенное исследование показало адгезию МСК ко всем типам исследуемых микроносителей, но пролиферация клеток на поверхности минерализованных микроносителей была значительно ниже, чем на поверхности неминерализованных микроносителей (график 4А). Наблюдаемое повышение уровня щелочной фосфатазы при культивировании клеток на минерализованных микроносителях и замедление пролиферации в условиях отсутствия индуцирующих остеогенез факторов (график 4Б) свидетельствовало о вкладе минерализации субстрата в индукцию остеогенеза и остеогенную дифференцировку клеток на поверхности микроносителей. В условиях индукции остеогенеза уровень щелочной фосфатазы увеличивался во всех экспериментальных группах, однако для клеток, культивируемых на поверхности

минерализованных микроносителей, уровень щелочной фосфатазы был значительно выше (график 4В).

Культивирование клеток в условиях индукции остеогенеза привело к минерализации поверхности микроносителей, выявляемой окрашиванием ализариновым красным, что является еще одним подтверждением остеогенной дифференцировки МСК, культивируемых на фиброиновых микроносителях.

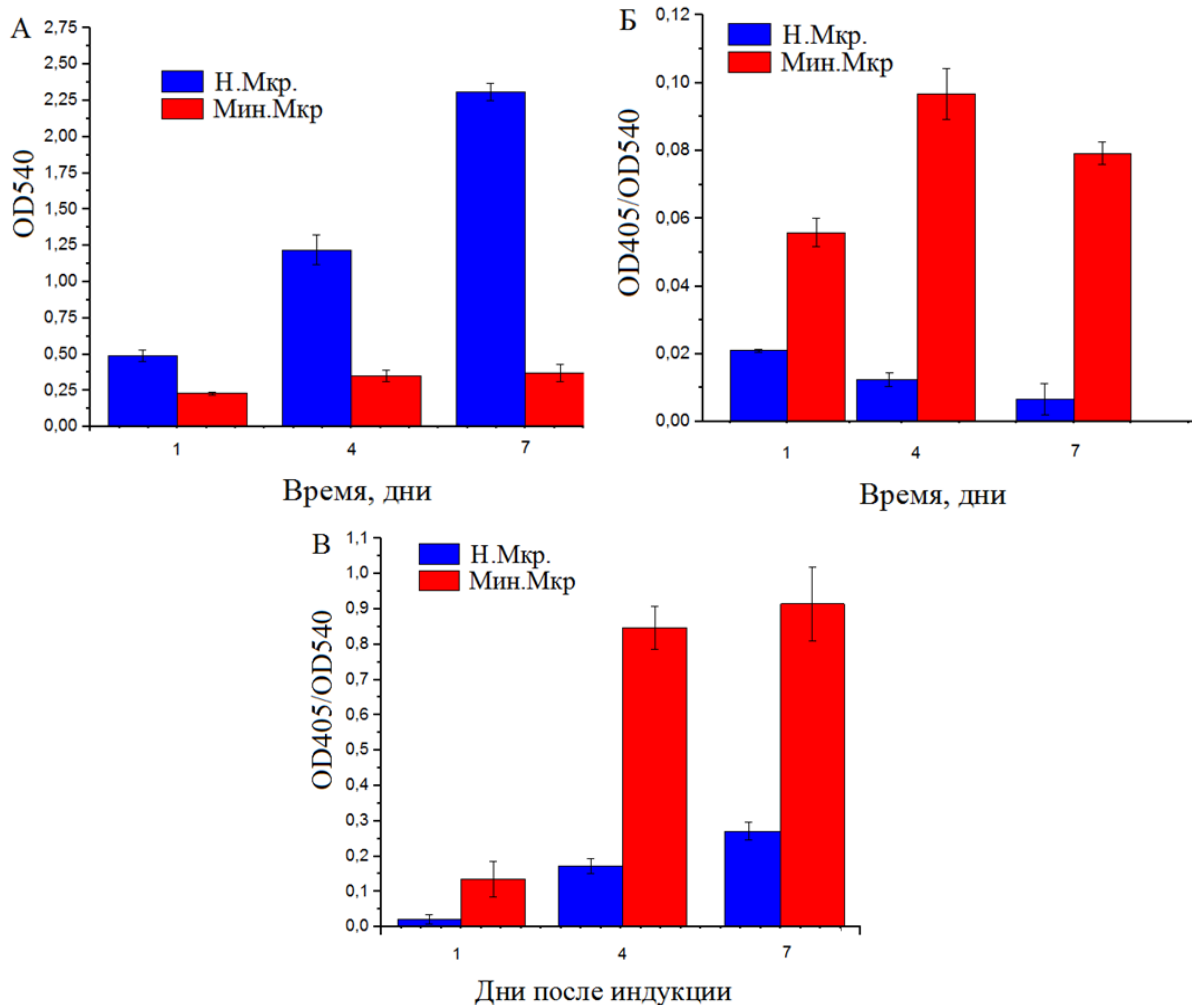


График 4 — Исследование влияния минерализации фиброиновых микроносителей на пролиферацию и уровень экспрессии щелочной фосфатазы клетками МСК.

А — пролиферация МСК на микроносителях, представлены данные МТТ-теста; Б — изменение уровня щелочной фосфатазы при культивировании МСК на микроносителях в неиндукционных условиях, представлены данные активности щелочной фосфатазы отнесенной к сигналу МТТ; В — изменение уровня щелочной фосфатазы при культивировании МСК на микроносителях в индукционных условиях, представлены данные активности щелочной фосфатазы отнесенной к сигналу МТТ. Мин.Мкр — минерализованные микроносители, Н. Мкр — неминерализованные микроносители.

3.3.2. Пролиферация остеобласт-подобных клеток на поверхности микроносителей.

Остеобласт-подобные клетки MG-63, согласно данным конфокальной микроскопии активно пролиферировали на поверхности неминерализованных и минерализованных фиброиновых микроносителей (рисунок 13). Благодаря подсчету ядер клеток, окрашенных SYTOX green, установлено, что число клеток на микроносителях обоих типов на 4 сутки было выше в сравнении с первым днем культивирования.

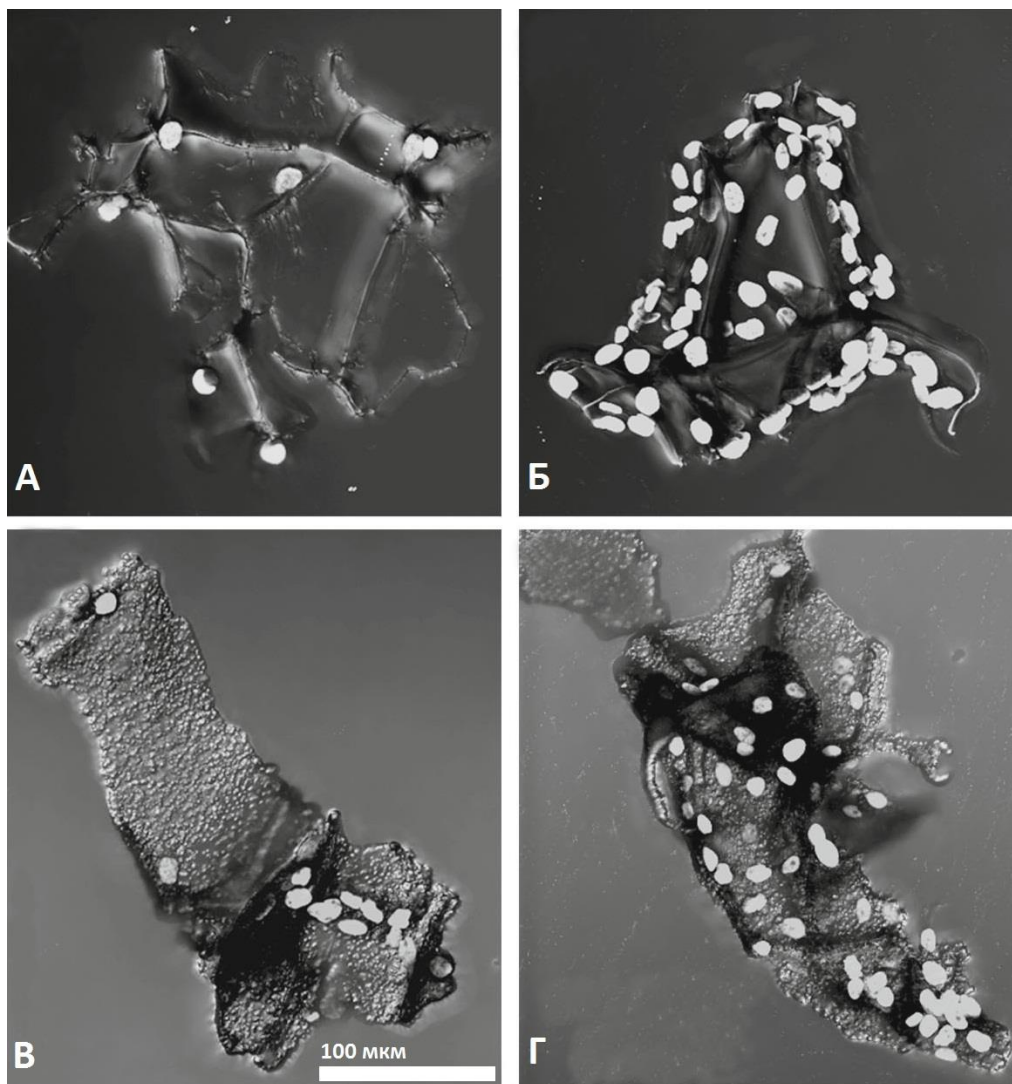


Рисунок 13 — Динамика пролиферации клеток на поверхности трехмерных фиброиновых микроносителей.

Снимок получен с помощью конфокальной сканирующей микроскопии.

Ядра клеток окрашены SYTOX green; А, Б — неминерализованных; В, Г — минерализованных микроносителей; А, В — через 1 сутки; Б, Г — через 4 дня культивирования.

С помощью измерения уровня экспрессии щелочной фосфатазы, нормированного на сигнал МТТ, определяли дифференцировку клеток в остеогенном направлении в 2D- и 3D-условиях.

Активность щелочной фосфатазы через 4 суток культивирования клеток MG-63 на поверхности микроносителей обоих типов была выше, чем у клеток на культуральном пластике. (график 5). В опыте с внесением в среду остеоиндуктора, установлено, что через 4 дня культивирования без добавления дексаметазона активность щелочной фосфатазы на поверхности фиброинового матрикса была выше в сравнении с культуральным пластиком (график 5). В условиях с внесением дексаметазона не было различий в интенсивности сигнала щелочной фосфатазы между клетками, культивируемыми на фиброиновых микроносителях и культуральном пластике (график 5).

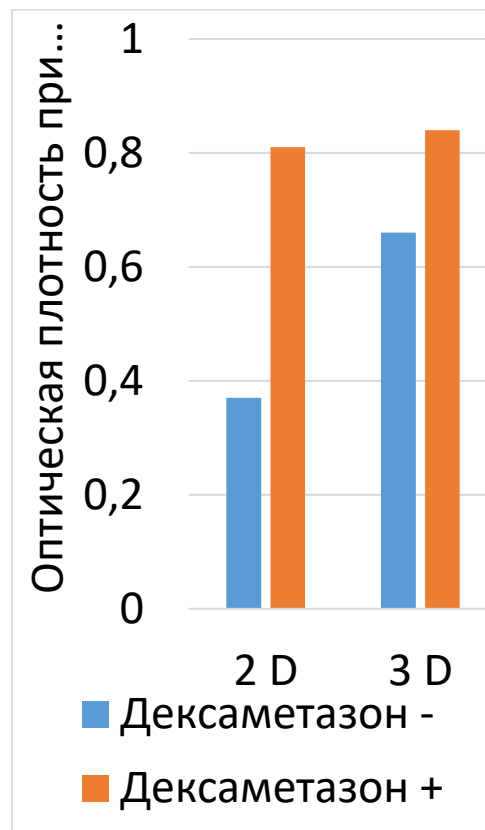


График 5 — Продукция щелочной фосфатазы через 4 дня при культивировании на пластике и фиброиновых микроносителях.

2D — культуральный пластик; 3D — фиброиновые микроносители; Синий столбец — условия культивирования без введения индуктора остеогенеза — дексаметазона; Красный столбец — условия культивирования при введении дексаметазона.

Также сранивали различия в экспрессии щелочной фосфатазы при культивировании клеток MG-63 на поверхности неминерализованных фиброиновых микроносителей. Через 1 сутки культивирования клеток MG-63 на минерализованных микроносителях уровень сигнала, отражающий активность щелочной фосфатазы, был почти в три раза выше, чем при их культивировании на неминерализованных частицах (график 6). Эта разница нивелировалась на 7-й день культивирования (график 6, 7).

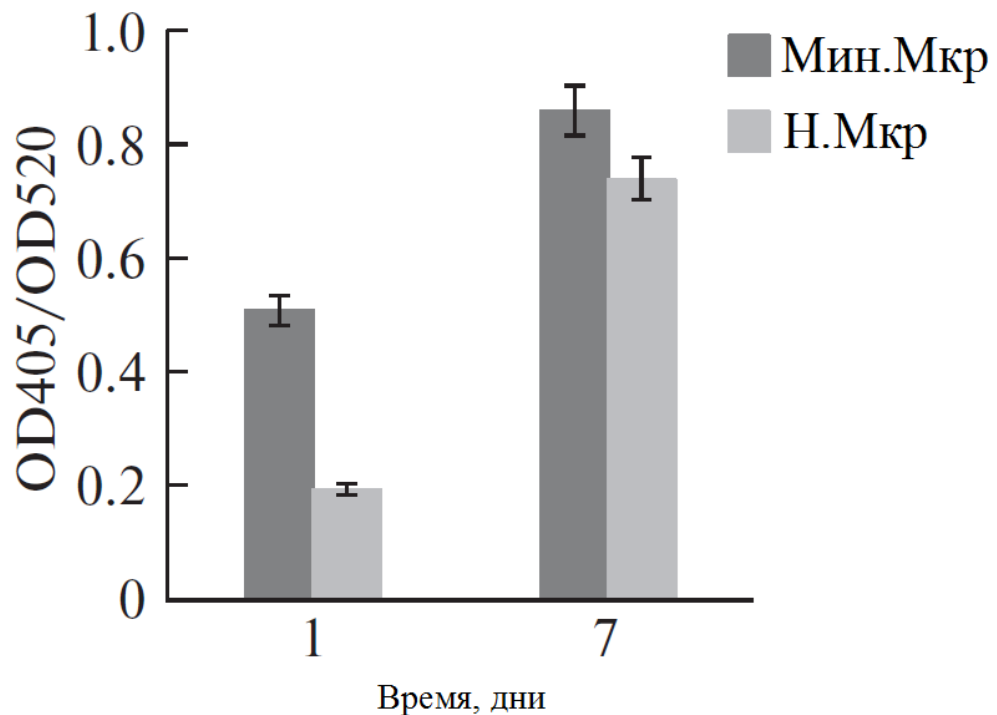


График 6 — Исследование влияния минерализации фиброиновых микроносителей на пролиферацию и уровень щелочной фосфатазы остеобласт-подобных клеток MG-63.

Мин.Мкр — минерализованные микроносители; Н.Мкр — неминерализованные микроносители.

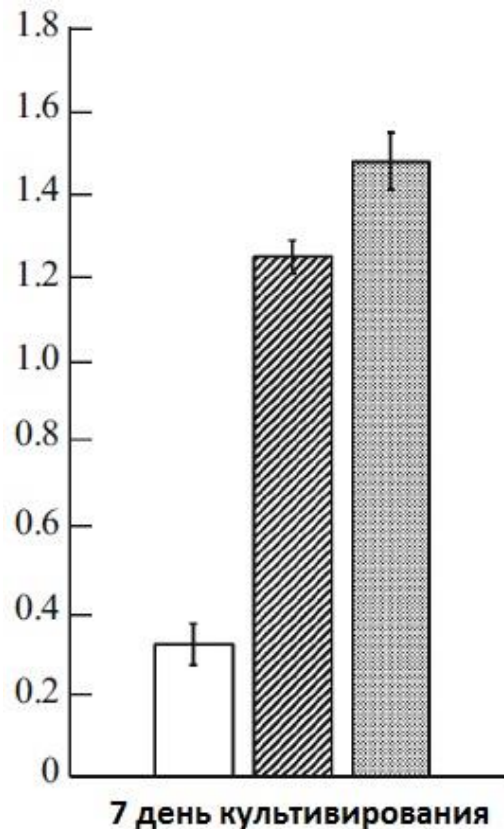


График 7 — Экспрессия щелочной фосфатазы через 7 суток культивирования клеток MG-63 на разных поверхностях.

Белый столбец — культуральный пластик; Заштрихованный столбец — неминерализованные микроносители; Серый столбец — минерализованные микроносители.

Изменение экспрессии щелочной фосфатазы свидетельствуют о дифференцировке клеток MG-63 в остеогенном направлении и указывает на способность трехмерных микроносителей к стимулированию остеогенеза даже в отсутствие индукторов. Экспрессия щелочной фосфатазы могла стимулироваться как фиброинном микроносителем, так и 3D-условиями, а также совместным действием обоих факторов. Минерализация микроносителей усиливала их остеогенный эффект.

3.4. Перестройка цитоскелета при адгезии клеток

При адгезии клеток MG-63 на фиброиновых микроносителях благодаря окраске фаллоидином Alexa Fluo-488 phalloidin выявлены перестройки цитоскелета. В цитоскелете клеток MG-63, культивируемых на поверхности культурального пластика выявляются актиновые стресс-фибриллы. При культивировании клеток MG-63 на поверхности неминерализованных фиброиновых микроносителей в них формировался кортикальный актин, а доля стресс-фибрилл была существенно снижена. На минерализованных фиброиновых микроносителях стресс-фибриллы практически отсутствовали (рисунок 14).

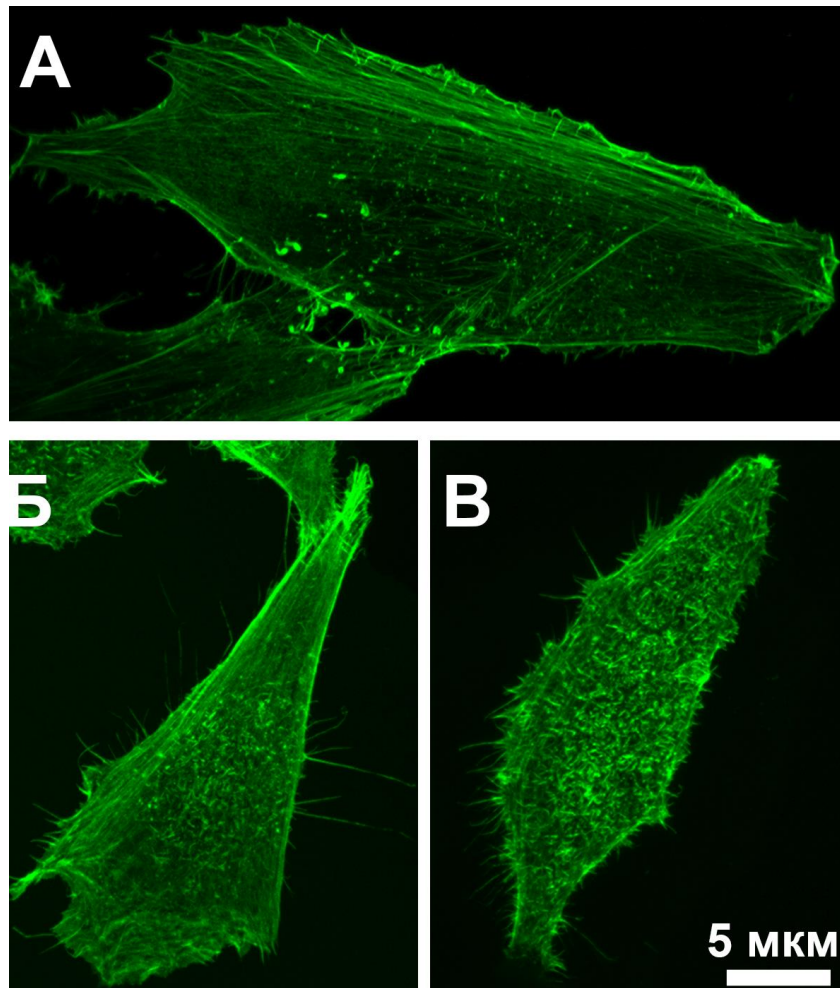


Рисунок 14 — Структура актиновых комплексов клеток остеосаркомы человека линии MG-63 на поверхностях разных носителей.

Цитоскелет окрашен красителем Alexa Fluo-488 phalloidin;

А — культуральный пластик; Б — неминерализованные микроносители; В — минерализованные микроносители.

3.5. Оценка биосовместимости в экспериментах *in vivo*

Через 2 месяца подкожной имплантации фиброинового матрикса, в него врастали тяжи грануляционной ткани (рисунок 15 А). Клетки новообразованной ткани выявлялись во внутренних структурах имплантата (рисунок 15 Б). В зонах врастания соединительной ткани обнаружены гигантские клетки инородных тел, на границе с которыми присутствуют участки эрозии фиброинового матрикса (рисунок 15 А — помечены стрелками). В грануляционной ткани, врастающей в область матрикса, на границе с фиброиновым материалом обнаружены кровеносные сосуды (рисунок 15 В).

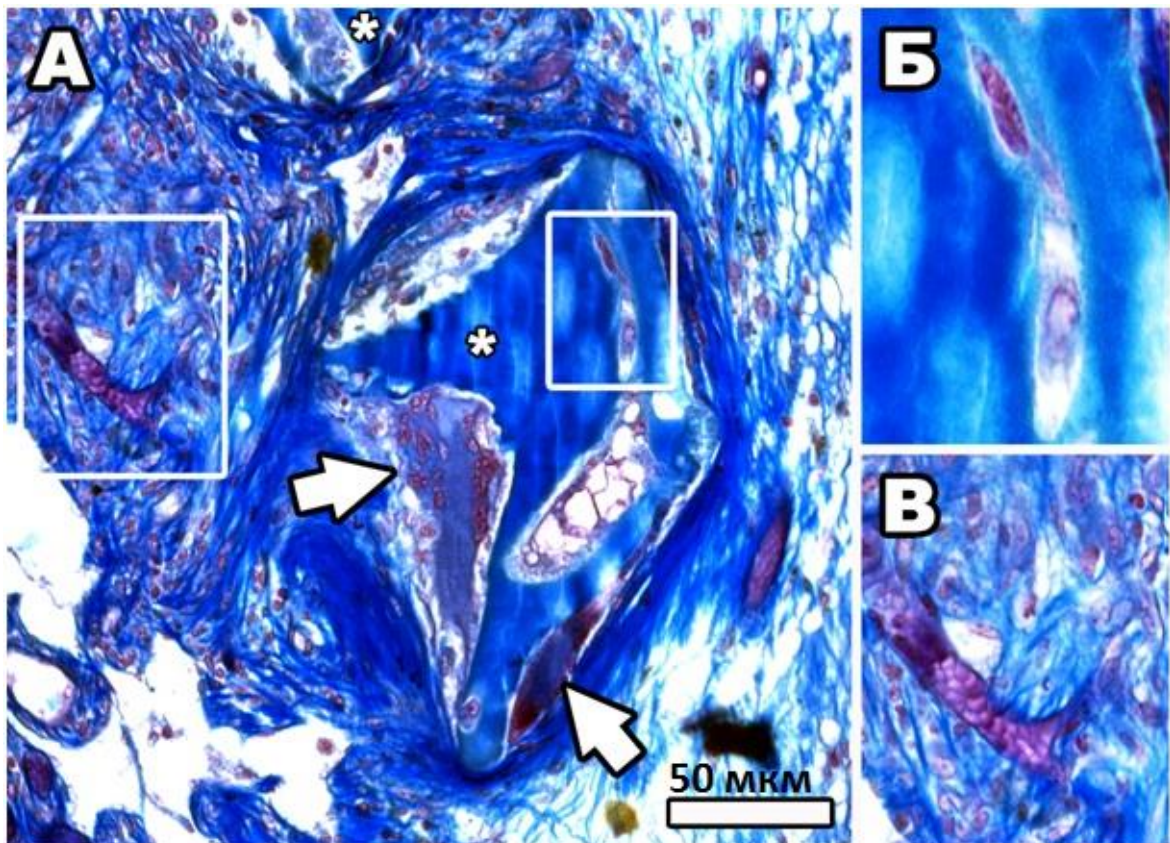


Рисунок 15 — Гистологический анализ тканей в области имплантации фиброинового матрикса через 2 месяца.

А – имплантат, окруженный рыхлой соединительнотканной капсулой с многочисленными капиллярами и сосудами. Полости внутри матрикса заполнены соединительной тканью. Выявляются гигантские клетки инородных тел (белые стрелки), контактирующие с материалом имплантата. * – помечен материал имплантата; Б – клетки соединительной ткани внутри материала матрикса; В – сосуд в соединительной ткани, заполняющей имплантат.

3.6. Регенерация костной ткани при использовании фиброиновых имплантатов

Регенерацию костной ткани оценивали гистологическими и рентгенотомографическими методами, анализируя материал, извлеченный из зоны травмы (рисунок 16).

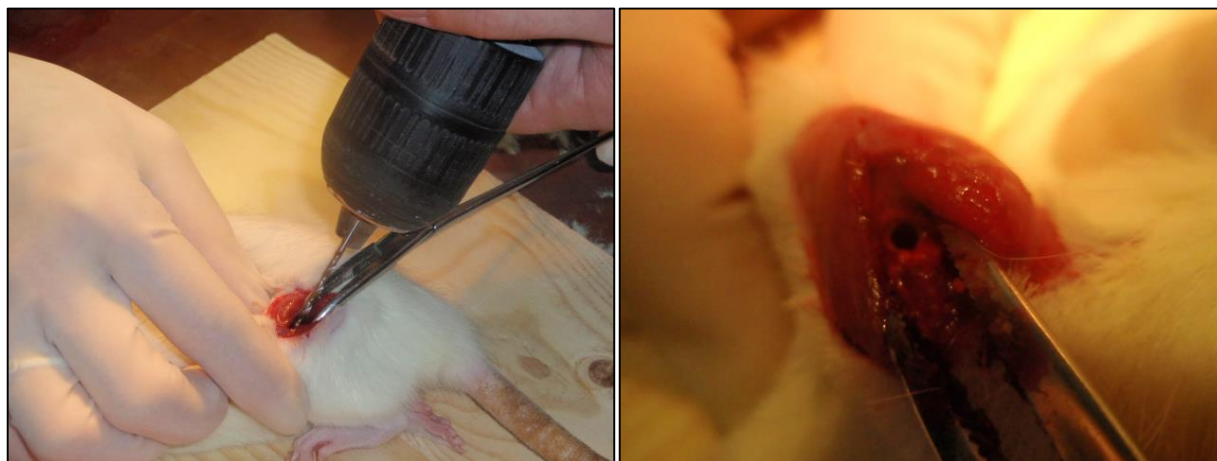


Рисунок 16 — Искусственное повреждение костной ткани крысы.

3.6.1. Гистологический анализ области имплантации

Через 1 неделю после имплантации ФМ (рисунок 17 А) материал имплантата окружен клетками стромы костного мозга. Внутри структуры матрикса также выявляются клетки этого типа (рисунок 17 Г, Д). В то время как при имплантации МФМ (рисунок 17 Б) на месте материала имплантата формируется костная ткань (рисунок 17 Г, Д). При этом на границе материала МФМ и новообразованной костной трабекулы (рисунок 17 Е) и внутри самого имплантата выявляются остеобласты (рисунок 17 Ж), т.е. костная ткань формируется, в том числе, и внутри структуры имплантата. Внутри структуры МФМ выявляются остеокласты, взаимодействующие с материалом минерализованного матрикса на основе фиброина шелка (рисунок 17 Б, обведен рамкой в верхнем левом углу), что свидетельствует о биорезорбции материала. В контрольной группе не было

обнаружено участков формирования костных трабекул и не были выявлены остеобласты (рисунок 17 В), но были обнаружены остеокласты, перестраивающие разрушенные фрагменты кости на периферии зоны травмы (рисунок 17 И). На периферии травмы были выявлены отдельные участки формирующейся грубоволокнистой костной ткани и клетки стромы костного мозга (рисунок 17 З, И).

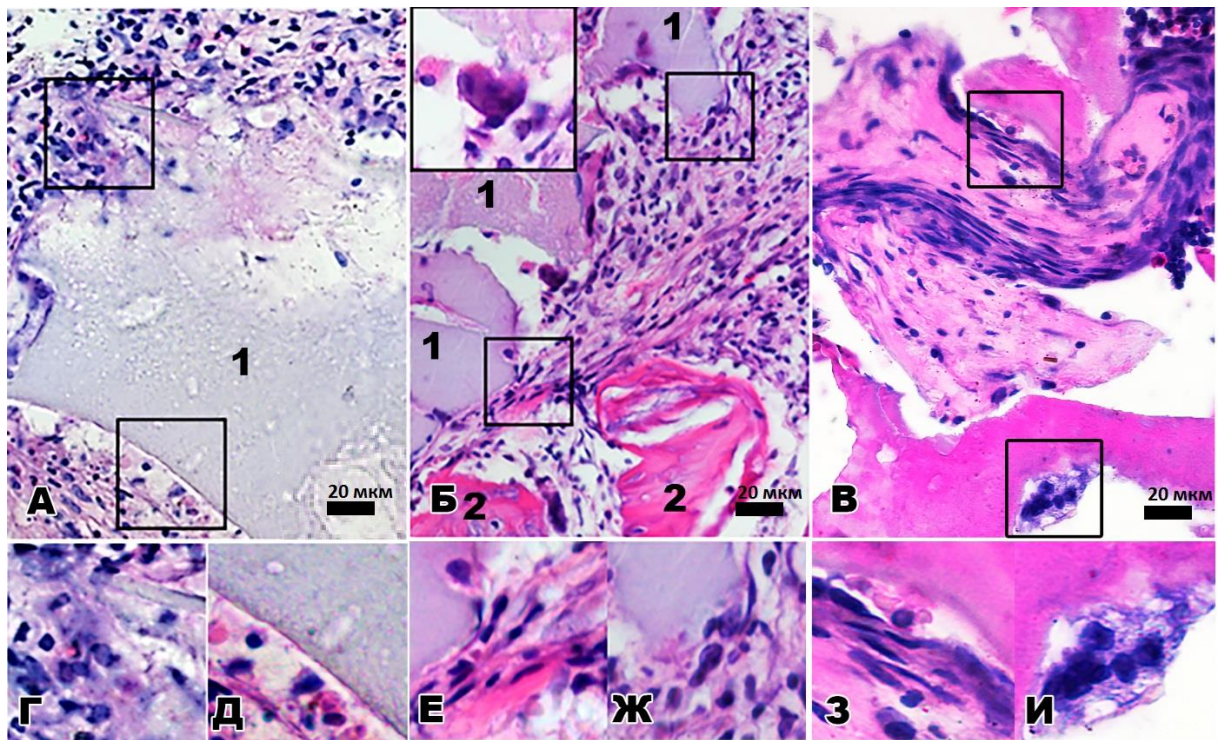


Рисунок 17 — Зона имплантации трехмерных матриц через 1 неделю.

А, Г, Д – ФМ; Б, Е, Ж – МФМ; В, И, З – контроль; цифрами отмечены: 1 – материал имплантата (окрашен фиолетовым) и 2 – новообразованная костная ткань (окрашена сиреневым).

Г, Д – рамкой выделены клетки стромы костного мозга на границе с ФМ. Б – рамкой в верхнем левом углу выделен остеокласт на границе МФМ. Е, Ж – рамкой выделены скопления остеогенных клеток на границе МФМ. З – рамкой выделены участки грубоволокнистой костной ткани с клетками стромы костного мозга на границе участка сохранившейся кортикальной кости (окрашена сиреневым). И – остеокласт, перестраивающий разрушенные фрагменты кости на периферии зоны травмы.

При имплантации ФМ (рисунок 18 А) через 4 недели внутри материала имплантата формируется костная ткань (рисунок 18 А, Г), на поверхности фиброина выявляются остеогенные клетки (рисунок 18 Г). При этом костные трабекулы обнаруживаются преимущественно на периферии (рисунок 18 А). При имплантации МФМ на поверхности материала выявляется значительно больше

остеогенных клеток, а костные трабекулы обнаруживаются не только на периферии имплантата (рисунок 18 Б, Д). На поверхности материала матриксов также обнаружены остеокласты, что свидетельствует об активных процессах биорезорбции имплантатов. В контрольной группе в области повреждения выявлялись скопления клеток стромы костного мозга (рисунок 18 В, З).

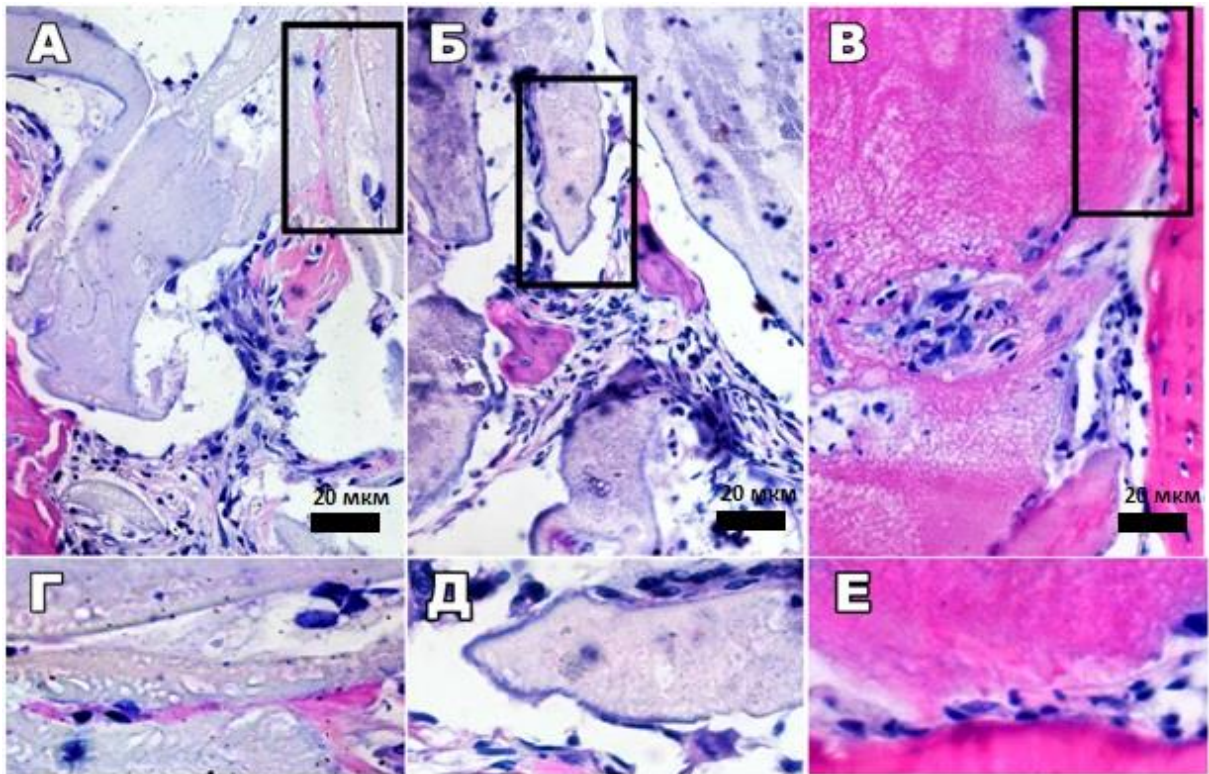


Рисунок 18 — Зона имплантации трехмерных матриксов через 4 недели.

А, Г – ФМ; Б, Д – МФМ; В, Е – контроль.

Г – рамкой выделена новообразованная костная трабекула (окрашена сиреневым) с остеогенными клетками, врастающая в материал ФМ (окрашен бледно-фиолетовым). Д – рамкой выделены скопления остеогенных клеток на границе МФМ (окрашен фиолетовым) и остеокласт (справа внизу). Новообразованные костные трабекулы с остеоцитами (окрашены сиреневым). Е – рамкой выделены границы нативного участка сохранившейся костной ткани (окрашена сиреневым).

3.6.2. Рентгеноматомографическая оценка заживления искусственного костного дефекта при использовании фиброиновых имплантатов

У крыс, которым ввели МФМ возрастание оптической плотности выявлено между 1 (29.2 ± 0.1) и 4 (46.8 ± 0.3) неделями наблюдения. У крыс, которым ввели ФМ статистически значимое возрастание оптической плотности выявлено между 1 (28.8 ± 0.06) и 4 (43.5 ± 0.4) неделями наблюдения. В контрольной группе возрастание оптической плотности выявлено между 1 (28.2 ± 0.3) и 4 (30.7 ± 0.3) неделями и между 2 (28.8 ± 0.2) и 4 (30.7 ± 0.3) неделями наблюдения, но не установлено возрастания оптической плотности между 1 (28.2 ± 0.3) и 2 (28.8 ± 0.2) неделями наблюдения (график 8).

При сравнении возрастания оптической плотности в разных группах статистически значимые различия выявлены в следующих случаях. В группе с МФМ (29.2 ± 0.1) по сравнению с контролем после 1 недели (28.2 ± 0.3). В группе с МФМ (44.3 ± 0.2) по сравнению с контролем после 2 недель (28.8 ± 0.2). В группе с МФМ (46.8 ± 0.3) по сравнению с контролем после 4 недель (30.7 ± 0.3). В группе с МФМ (44.3 ± 0.2) по сравнению с ФМ (30 ± 0.3) после 2 недель. В группе с ФМ (43.5 ± 0.4) по сравнению с контролем после 4 недель (30.7 ± 0.3) (график 8).

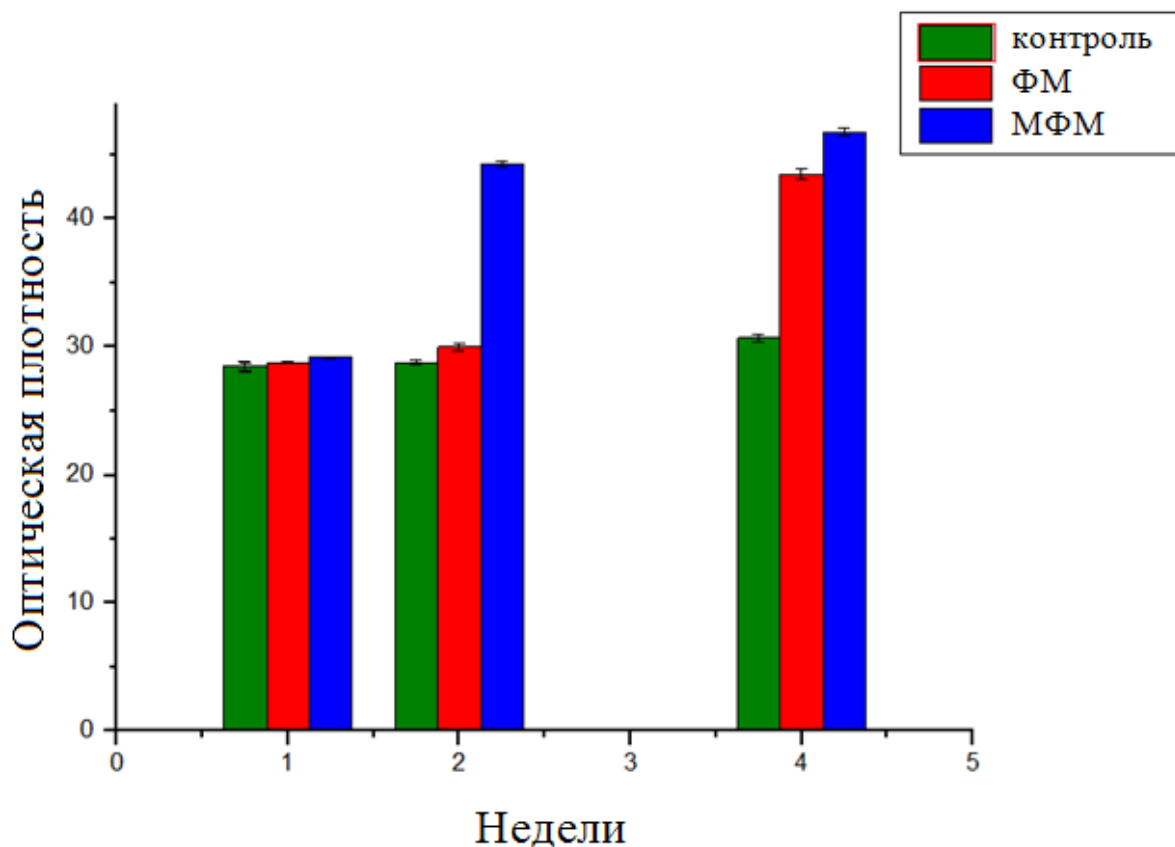


График 6 — Оптическая плотность зоны травмы после имплантации матрикса в единицах Хаунсфилда.

Зеленые столбцы — контроль; Красные столбцы — ФМ; Синие столбцы — МФМ.

Рентгеномографические исследования показали ускорение процесса восстановления костной ткани при использовании фиброиновых имплантатов. В случае имплантации МФМ и ФМ оно происходило интенсивнее, чем в контроле. В случае имплантации МФМ оно происходило интенсивнее, чем в случае имплантации ФМ.

Эксперименты показали, что имплантация ФМ и МФМ в область искусственного дефекта костной ткани приводит к ускорению неоостеогенеза по сравнению с контролем. Имплантация МФМ ускоряет неоостеогенез в большей степени, чем имплантация ФМ.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

В мировой литературе существуют схожие исследования, где изучалась возможность применения фиброиновых матриц в восстановлении костных повреждений. Хотя подходы к изготовлению самого матрикса и способы его минерализации значительно отличались в разных исследованиях, но, при всех различиях, существуют и общие элементы, которые позволяют сравнить матриксы, созданные по технологии, приведенной в данной работе, с существующими аналогами и адекватно оценить их преимущества и недостатки.

4.1. Свойства и структура созданных трехмерных матриц и микроносителей из фиброина

На основе технологии выщелачивания были созданы трехмерные матриксы и микроносители из фиброина.

Структура трехмерных матриц. Были созданы два типа матриц: ФМ и МФМ. Трехмерные ФМ и МФМ, созданные по данной технологии, обладали равномерной ячеистой структурой без замкнутых полостей. Введение гидроксиапатита в структуру МФМ приводило к увеличению шероховатости поверхности без изменения макроструктуры матрикса. Размер полостей соответствовал размеру внесенных частиц порообразователя. Данный параметр отличает их от аналогов, созданных в работах Мобини [Mobini и др., 2013] и Виберсакса [Uebersax и др., 2013]. В настоящем исследовании выбор хлорида натрия в качестве порообразователя не приводит к ухудшению взаимопроницаемости полостей матрикса, как это наблюдается в работе Виберсакса [Uebersax и др., 2013].

Изготовление трехмерных матриц из фиброина. Трехмерные матриксы были изготовлены на основе технологии выщелачивания по описанной в разделе «Материалы и методы» методике.

Преимуществом разработанной методики изготовления ФМ и МФМ является ее технологическая простота. Конструирование матрикса не связано со сложными этапами формовки с парафиновыми шариками и отмывкой порообразователя в токсичном гексане [Uebersax и др., 2013]. Она легко стандартизируема в отличие от технологии изготовления матрикса на основе оплетки из шелковых нитей [Mobini и др., 2013]. Ее основные этапы: растворение очищенного фиброина, смешение его с частицами порообразователя и β -кристаллизация.

Предварительно исходный материал фиброина был очищен от сопутствующего белка серицина. Технология очистки шелка от серицина в настоящем исследовании напоминала технологию очистки шелка в других работах [Kim и др., 2008], [Meinel и др., 2004], [Sofia и др., 2001], но была несколько модифицирована. Она включала большее число кипячений и отмывок, что позволяло лучше очистить фиброиновый материал. Таким образом, удалось получить очищенный фиброин, который использовался на следующих этапах при создании матриксов и микроносителей.

Для растворения очищенного от серицина фиброина использовалась смесь хлорида лития и муравьиной кислоты. Известны случаи успешного применения этой смеси для растворения биополимеров [Агапов и др., 2009]. Во многих исследованиях для растворения фиброина часто также использовался водный раствор бромида лития [Kim и др., 2008], [Sofia и др., 2001]. Но предварительные опыты показали лучшее растворение очищенного фиброина в смеси хлорида лития и муравьиной кислоты в сравнении с водным раствором 9 М хлорида лития. В качестве порообразователя, как и в большинстве других работ, использованы кристаллы хлорида натрия [Jiang и др., 2009], [Zhao и др., 2009], [Kim и др., 2008]. Если в большинстве исследований размер порообразователя в среднем составлял 850 - 1000 мкм [Jiang и др., 2009], [Zhao и др., 2009], [Kim и др., 2008], то в данной работе был выбран меньший размер порообразователя — 400 мкм. Это связано с тем, что существуют данные о том, что именно данный размер внутренних полостей наиболее благоприятно влияет на жизнедеятельность и пролиферацию эукариотических клеток [Hofmann и др., 2013], [Lee и др., 2007].

Для образования β -структур во вторичной структуре фиброина матриксы обрабатывали непредельными алифатическими спиртами [Wenk, Merkle, Meinel, 2011]. В мировой литературе для этой цели чаще используют метанол [Jiang и др., 2009], [Kim и др., 2008], [Kirker-Head и др., 2007], но в данном исследовании было принято решение использовать этанол по причине его меньшей токсичности.

Внесение гидроксиапатита в МФМ. При создании МФМ гидроксиапатит равномерно смешивали с порообразователем и вносили на этапе формовки в раствор фиброина. Матриксы, созданные по такой технологии, имеют более высокий уровень минерализации [Shi и др., 2013], [Bhumiratana и др., 2011] по сравнению с матриксами, полученными по другой технологии, где минерализация осуществляется за счет осаждения из перенасыщенных растворов кристаллов солей на нитях полиаспартата (он вводится как сокопонент вместе с фиброином [Kim и др., 2008], [Jiang и др., 2009], [Zhao и др., 2009]). Подход введения гидроксиапатита на этапе формовки чаще используется в более поздних работах. Гидроксиапатит, применяемый в настоящем исследовании, имеет природное происхождение в отличие от схожих конструкторов [Shi и др., 2013]. Используемая в настоящем исследовании методика изготовления ФМ и МФМ была разработана и реализована в опытах *in vivo* и *in vitro* еще в 2009-2011 годах, в то время как в мировой литературе схожие технологические подходы стали появляться в более позднее время.

Трехмерные микроносители. На основе фиброиновых матриксов по методике, описанной в разделе «Материалы и методы», созданы трехмерные микроносители — новый тип материалов, который можно рассматривать как альтернативу матриксам [Lu и др., 2015], [Ribeiro и др., 2017]. Были сконструированы два типа микроносителей: минерализованные и неминерализованные, размер которых составлял 100 - 250 мкм

Использование трехмерных микроносителей для терапевтического применения привлекательно тем, что они могут быть трансплантированы в зону травмы без удаления субстрата, на котором они культивируются. Данный факт

позволяет клеткам избегать стресса при переносе и сохранять свою жизнеспособность [Chen, Reuveny, Oh, 2013].

Исследование свойств матриксов включало в себя несколько этапов, во время которых были охарактеризованы их механические свойства и скорость деградации в разных химических средах.

Механические свойства трехмерных матриксов. Модуль Юнга созданных образцов МФМ составил 54,5 кПа.

Механические свойства кости отличаются на разных уровнях структурной организации, откуда могут быть разночтения результатов ряда статей. Поэтому желательно проводить изучение механических свойств кости на разных уровнях организации костного материала. Но этот вопрос еще не является до конца решенным. Поэтому адекватное сравнение механических свойств созданных матриксов с матриксами созданными другими группами исследователей пока сложно осуществить однозначно.

Механические свойства полученных матриксов, хотя и отличались прочностью, несколько уступали механическим свойствам матриксов в других исследованиях [Qian и др., 2013], [Shi и др., 2013], особенно в работе Мобини [Mobini и др., 2013]. Но у матриксов, разработанных Мобини, существуют недостатки, связанные с адгезивными свойствами. В работе Ши, изучалась прочность на разрыв не самих матриксов, а новообразованного костного материала с оставшимися фрагментами костного имплантата, извлеченного на разных сроках из области повреждения. Этот показатель, на начальных этапах костеобразования был равен 60 Кпа, что близко к значению прочности на разрыв МФМ в настоящей работе равного 55 кПа.

Скорость деградации матриксов. Трехмерные матриксы из фиброина в реактиве Фэнтона полностью распались за 9 недель. Матриксы из фиброина в ФСБ через 9 недель утрачивали 20% своей исходной массы.

Реактив Фэнтона, является стандартным тестирующим раствором, оценивающим химическую устойчивость органических полимеров в агрессивной

окислительной среде и широко применяется для этой цели в органической химии [Goldstein, Meyerstein, Czapski, 1993]. Таким образом, была изучена скорость биodeградации полученных матриксов в модельной системе, имитирующей окислительную деградацию органических молекул *in vitro*.

Погружение матриксов в фосфатно-солевой буфер, который близок по составу солевому раствору межтканевой жидкости (без сопутствующих белков), имитировало процессы распада матрикса в нейтральной среде без воздействия разрушающих ферментов.

Скорость деградации полученных матриксов была сопоставима со скоростью деградации у матриксов-аналогов в других исследованиях. В работе Киан у матрикса, созданного методом выщелачивания, через 3 недели в ФСБ не выявлено существенного изменения массы или деструкции структуры матриксов. В ФСБ, содержащем коллагеназу, матрикс терял 30% массы [Qian и др., 2013]. В нашем исследовании через 3 недели в реактиве Фэнтонна матрикс терял 60% массы. Такая скорость деградации позволяет матриксу сохранять свою структуру в условиях *in vivo* до полного восстановления и замещения его материала нативной тканью.

Обращает на себя внимание, что наши опыты с подробным изучением интенсивности деградации опубликованы раньше, чем в работах коллег.

Сравнение механических свойств и интенсивности деградации созданных матриксов с существующими аналогами, демонстрирует хорошее качество матриксов по этим параметрам.

4.2. Адгезивные и пролиферативные свойства трехмерных фиброиновых матриксов и микроносителей

Клетки фибробластов 3Т3 адгезировали к поверхности матриксов и через 14 дней формировали монослой. В течение всего периода наблюдений происходило увеличение числа клеток на ФМ и МФМ. Клетки не испытывали угнетения во внутренних слоях из-за недостаточной диффузии питательных веществ и

затрудненного вывода продуктов обмена, в пользу чего свидетельствовала установленная при помощи конфокальной микроскопии положительная динамика в увеличении числа клеток на поверхности матриксов обоих типов. Введение гидроксиапатита в структуру матрикса не только не подавляет жизнедеятельность эукариотических клеток, но и способствует увеличению их числа.

Методы оценки адгезии и пролиферации. Для изучения общей способности трехмерных матриксов обеспечивать адгезию и заполнение полостей матриксов были выбраны клетки фибробластов линии 3Т3 а для изучения адгезивных и пролиферативных свойств трехмерных носителей — клетки МСК и остеобласт-подобные клетки MG-63. В схожих исследованиях использовались мезенхимальные стромальные клетки [Mandal, Kundu, 2009], [Wang и др., 2009], остеобласт-подобные клетки MG-63 [Yoo и др., 2016], остеобласты [Zeng и др., 2015], [Gandhimathi и др., 2014].

В настоящей работе были выбраны фибробласты линии 3Т3 и МСК, в силу того, что данные типы клеток оказывают значительное влияние на процессы регенерации различных тканей. Способность матриксов и микроносителей поддерживать пролиферацию и адгезию этих клеток является важным показателем их общих адгезивных и пролиферативных свойств. Остеобласт-подобные клетки MG-63 были выбраны в силу их способности дифференцироваться непосредственно в клетки костной ткани. На первом этапе при культивировании фибробластов линии 3Т3 была охарактеризована общая способность созданных фиброиновых конструкторов поддерживать адгезию и пролиферацию эукариотических клеток. На втором этапе после полученной общей характеристики их пролиферативных и адгезивных свойств оценивалась способность фиброиновых конструкторов обеспечить дифференцировку в остеогенном направлении. Она была осуществлена при культивировании МСК и остеобласт-подобных клеток MG-63.

Клетки фибробластов линии 3Т3 остеобласт-подобных клеток MG-63 на матриксе визуализировали благодаря конфокальной микроскопии с помощью ядерного красителя SYTOX Green nucleic acid stain (Invitrogen, США), обладающим высокой афинностью к нуклеиновым кислотам. Краситель SYTOX Green, способен

связываться с ДНК и вызывать увеличение флюоресценции в 500 раз, что позволяет минимизировать нежелательное побочное свечение, так как многие биологические и небиологические структуры обладают неспецифической флюоресценцией. И хотя краситель SYTOX Green окрашивает мертвые клетки, проникая через поврежденную мембрану ядер, в данном тесте он использовался для общего подсчета клеток. Такой подход является корректным и может применяться для подсчета любых, в том числе живых, клеток в силу присутствия в фиксаторе разрушающего мембраны неионного детергента Triton X-100. Этот детергент делает ядра всех клеток доступными для окрашивания из-за специально создаваемого им нарушения целостности плазматических и ядерных мембран. В мировой литературе известны примеры использования красителя SYTOX Green в сочетании с детергентом Triton X-100 для общего подсчета клеток в аналогичных целях [Moisenovich и др., 2011]. Подсчет количества ядер на трехмерных изображениях осуществлялся автоматически: определялось количество структур однородных по цвету, соответствующих по объему ядрам изучаемых клеток. Проблема наложения объектов при подсчете клеток на срезах с высокой плотностью объектов решалась благодаря использованию приложения Imaris 6.1.5. Это приложение позволяет подсчитывать сливающиеся из-за близкого расположения объекты, благодаря алгоритму, который определяет границы объекта, вычисляя его геометрический центр.

Мезенхимальные стромальные клетки визуализировали с помощью красителя DAPI.

Адгезивные и пролиферативные свойства ФМ. Поверхность ФМ обеспечивала адгезию и пролиферацию клеток фибробластов линии 3Т3. Адгезия на поверхности фиброина происходила без дополнительного введения в первичную последовательность фиброина RGD мотивов [Uebersax и др., 2013]. В сходной методике Киан, где RGD мотивы также не вводились, прикрепление 80% клеток к поверхности матриксов происходило через 4 часа [Qian и др., 2013]. Макроструктура матриксов не оказывала нерегулярного и подавляющего влияния на увеличение числа эукариотических клеток, в отличие от высокопрочных

матрицков, разработанных Мобини на основе нитевидной оплетки. Повышение их механической прочности сопровождалось замедлением динамики пролиферации клеток на их поверхности [Mobini и др., 2013]. Пролиферация клеток фибробластов линии 3T3 и мезенхимальных стромальных клеток происходила без внесения остеоиндуктивных факторов, таких как BMP-2 и IGF-I, как это было сделано в ряде исследований [Wang и др., 2009]. Схожий с настоящим исследованием результат где эффективная пролиферация клеток на поверхности фиброиновых матрицков происходила без внесения остеоиндуктивных факторов был получен в ряде недавних работ [Shen и др., 2016], [Yoo и др., 2016].

Полученные результаты свидетельствует о том, что структура созданных матрицков обладает высокими адгезивными и пролиферативными свойствами в сравнении с другими конструктами из фиброина. Структура созданных матрицков может обеспечить адгезию и пролиферацию разных типов эукариотических клеток-предшественников.

Адгезивные и пролиферативные свойства МФМ. Введение гидроксиапатита в структуру фиброиновых матрицков стимулировало пролиферацию клеток, как и в большинстве исследований [Shen и др., 2016], [Çakmak и др., 2016], [Cheng и др., 2013], [He и др., 2013], [Jiang и др., 2013], [Shi и др., 2013]. Введенный гидроксиапатит не подавлял увеличение числа эукариотических клеток, как в работе Бхамиратана [Bhumiratana и др., 2011].

Адгезивные и пролиферативные свойства трехмерных микроносителей. Согласно данным конфокальной микроскопии микроносители, созданные в данной работе, ускоряют пролиферацию эукариотических клеток МСК и остеобласт-подобных клеток MG-63 на их поверхности. Это соответствует данным о пролиферативных свойствах схожих фиброиновых конструктов в отношении эукариотических клеток, созданных другими научными группами [Ribeiro и др., 2017], [Lu и др., 2015]. [Lu и др., 2015]. Так как микроносители были получены на основе фиброиновых матрицков, для которых была доказана способность к адгезии и пролиферации разных типов клеточных линий, то адгезивные и пролиферативные свойства микроносителей было целесообразно исследовать по

отношению к МСК, которые обладают высокой мультипотентностью, и остеобласт-подобным клеткам MG-63, которые могут дифференцироваться в остеогенном направлении.

ФМ и МФМ, минерализованные и неминерализованные фиброиновые трехмерные микроносители, созданные в настоящей работе, как и в других аналогичных исследованиях, обеспечивают адгезию и стимулируют увеличение числа эукариотических клеток разных типов: фибробластов линии 3Т3, остеобласт-подобных клеток MG-63, мезенхимальных стромальных клеток.

Адгезивные свойства разработанных матриксов выше, чем у матриксов, созданных другими группами исследователей. Стимулирующее влияние гидроксиапатита на увеличение числа эукариотических клеток в составе МФМ продемонстрировано ранее, чем в большинстве других работ со схожими исследованиями.

4.3. Остеогенные свойства трехмерных микроносителей из фиброина

Микроносители, созданные в данной работе, не только ускоряют пролиферацию клеток на их поверхности, но и стимулируют дифференцировку в остеогенном направлении, что было установлено через изменение уровня экспрессии щелочной фосфатазы МСК и остеобласт-подобных клеток MG-63, которая достоверно возрастала.

Тест на изменение уровня экспрессии щелочной фосфатазы, широко используется для оценки дифференцировки клеток в остеогенном направлении [Mobini и др., 2013], [Qian и др., 2013]. Повышение уровня экспрессии щелочной фосфатазы свидетельствует об активации этого процесса. Чтобы убедиться в том, что увеличение активности щелочной фосфатазы связано именно с повышением уровня ее экспрессии, сигнал активности щелочной фосфатазы был нормирован на

сигнал МТТ. В ином случае наблюдаемое увеличение сигнала щелочной фосфатазы может быть результатом увеличения числа клеток. Нормирование сигнала щелочной фосфатазы на сигнал МТТ позволяет детектировать изменение данного сигнала в результате экспрессии вне зависимости от числа клеток в среде культивирования. Сигнал повышения уровня щелочной фосфатазы достоверно возрастал вне зависимости от количества клеток на поверхности микроносителей и культурального пластика.

Для подтверждения того, что подложка фиброиновых микроносителей оказывает стимулирующее влияние на остеогенную дифференцировку клеток, были проведены дополнительные опыты с внесением дексаметазона — остеоиндуктора, который вызывает повышение экспрессии щелочной фосфатазы.

Установлено, что при культивировании остеобласт-подобных клеток MG-63 в условиях с внесением дексаметазона через 4 дня культивирования не было различий в интенсивности сигнала щелочной фосфатазы между клетками, культивируемыми на фиброиновых микроносителях и культуральном пластике (график 5). А в условиях без внесения дексаметазона через 4 дня культивирования активность щелочной фосфатазы на поверхности фиброинового матрикса была выше в сравнении с культуральным пластиком (график 5). Поэтому подложка фиброиновых микроносителей достоверно способствует повышению уровня экспрессии щелочной фосфатазы, что является признаком дифференцировки в остеогенном направлении. В этом отношении остеоиндуктивные свойства фиброиновых микроносителей сопоставимы с аналогичными свойствами у схожих типов конструкторов, которые создаются другими научными группами [Ribeiro и др., 2017], [Lu и др., 2015].

Минерализация микроносителей стимулирует повышение экспрессии щелочной фосфатазы, что было установлено при культивировании остеобласт-подобных клеток MG-63 и МСК. Оно более выражено на ранних этапах и уменьшается к концу периода культивирования. Индукция дексаметазоном не выявила различий в дифференцировке клеток между культуральным пластиком и неминерализованными трехмерными микроносителями, но выявила различия

между клетками, культивированными на разных типах трехмерных микроносителей. Введение остеоиндуктора увеличило экспрессию клетками щелочной фосфатазы на поверхности минерализованных микроносителей по сравнению с неминерализованными. Эти результаты указывают на дополнительное стимулирование минеральным соком компонентом дифференцировки клеток в остеогенном направлении.

Обнаружено, что при культивировании МСК на поверхности микроносителей пролиферация клеток на поверхности минерализованных микроносителей была значительно ниже, чем на поверхности неминерализованных микроносителей. В сочетании с обнаруженным повышением экспрессии щелочной фосфатазы у клеток, культивируемых на минерализованных микроносителях, этот результат должен наблюдаться в случае прекращения пролиферации клетками, которые переходят к дифференцировке. Это служит еще одним доказательством стимулирования фиброиновыми микроносителями дифференцировки в остеогенном направлении.

4.4. Перестройка цитоскелета при адгезии клеток на поверхности трехмерных микроносителей из фиброина

Окраска фаллоидином Alexa Fluor-488 phalloidin выявила перестройки цитоскелета клеток MG-63 при адгезии на фиброиновых микроносителях и изменение их морфологии. Если в цитоскелете клеток MG-63, культивируемых на поверхности культурального пластика присутствуют стресс-фибриллы из актина, то у клеток MG-63, культивируемых на поверхности фиброиновых микроносителей обоих типов формировался кортикальный актин. Также обнаружена разница в структуре цитоскелета между клетками, культивируемыми на поверхности минерализованных и неминерализованных микроносителей. Если у клеток на поверхности неминерализованных микроносителей стресс-фибриллы, характерные для стрессового состояния клеток выявляются в отдельных случаях,

то у клеток на поверхности минерализованных фиброинового микроносителей они практически отсутствуют.

Выявленная с помощью фаллоидина перестройка цитоскелета клеток MG-63, культивируемых на поверхности фиброинового микроносителя указывает на то, что пролиферация, адгезия и дифференцировка на фиброиновых конструктах сопровождается реорганизацией цитоскелета. Передача остеогенных сигналов опосредуется взаимодействиями между цитоскелетом культивируемых клеток и внеклеточными структурами матриц и микроносителей. Это взаимодействие осуществляется через интегриновые комплексы, которые активируют MAP-киназный путь, ассоциированную Rho протеинкиназу и киназу фокальных контактов FAK [Rowlands, George, Cooper-White, 2008]. Фиброин в этом играет главную роль, т.к. изменение цитоскелета и морфологии клеток по сравнению с культуральным пластиком происходит одновременно и на минерализованных, и на неминерализованных микроносителях. Но введение гидроксиапатита дополнительно стабилизирует и ускоряет этот процесс. Хе предполагает, что стимуляция увеличения числа клеток гидроксиапатитом связана с повышением гидрофильности поверхности матрикса [He и др., 2013], поэтому она также связана с механизмами трансдукции. Но возможен и иной механизм остеоиндукции гидроксиапатитом. Он связан с влиянием ионов кальция на активацию сигнального пути NOTCH и каскадного внутриклеточного пути ERK/MAPK, управляющих процессами костеобразования [Thimm и др., 2005]. Учитывая, что трехмерные фиброиновые микроносители изготовлены на основе трехмерных матриц, то пролиферативные свойства фиброиновой подложки и гидроксиапатита связаны с теми же механизмами.

Исследования на трехмерных фиброиновых микроносителях дали ценную информацию о факторах, обеспечивающих остеондуктивные свойства разработанных фиброиновых конструктов. Культивирование в трехмерных условиях сопровождается реорганизацией актинового цитоскелета. Подобные микроносители перспективны для разработки биоинженерных продуктов, предназначенных для регенерации костной ткани.

4.5. Биосовместимость полученных трехмерных фиброиновых матриксов в условиях *in vivo*

Подкожная имплантация матрикса мышам Balb/c сопровождалась активным тканеобразованием и неоваскуляризацией, что окончательно убеждает в отсутствующей или низкой тканевой токсичности структуры фиброинового матрикса в условиях *in vivo* [Sieminski A.L., Gooch K.J., 2000]. Разработанный трехмерный матрикс способен интегрироваться с окружающими тканями млекопитающих, не вызывая отторжения.

Свойства матрикса при имплантации в условиях *in vivo* могут сильно отличаться от его свойств в условиях *in vitro*. Матрикс, будучи введенным в организм пациента, вступает во взаимодействие не только с клетками определенного типа ткани, но и со всей совокупностью его регуляторных и сигнальных систем. Важным лимитирующим фактором является возможность отторжения имплантата [Meinel и др., 2005]. Хотя сам фиброин как материал может быть совместим с тканями организма, макроструктуры матрикса могут спровоцировать отторжение имплантата. Поэтому для изучения интеграции матрикса с тканями организма в условиях *in vivo* была создана данная экспериментальная модель. Влияние фиброиновых микроносителей в условиях *in vivo* не изучалось, т.к. их изготовление основано на измельчении трехмерных фиброиновых матриксов. Они содержат те же самые макроструктуры и поэтому их физиологическое влияние на организм должно быть сходным с влиянием трехмерных фиброиновых матриксов.

Гистологическое исследование показало — созданный фиброиновый матрикс и продукты его деградации не оказывают угнетающего действия на окружающие ткани. Это позволяет сделать вывод о том, что созданные матриксы из фиброина биосовместимы и могут быть использованы в условиях *in vivo*.

4.6. Остеокондуктивные свойства полученных трехмерных матриксов

На крысах породы Wistar была создана модель, где оценивались остеокондуктивные свойства созданных матриксов. Для этого крысам по описанной в разделе «Материалы и методы» методике в область инициированного повреждения в бедренной кости ввели два типа матриксов: ФМ и МФМ. После операции и пробуждения от наркоза животные были активны и не проявляли признаков дискомфорта.

Остеокондуктивные свойства полученных трехмерных матриксов. В случае введения в зону травмы МФМ статистически достоверное возрастание степени минерализации началось раньше (через 2 недели наблюдений), чем в группе с введенным ФМ, а также в контрольной группе. В контрольной группе наблюдалось статистически достоверное возрастание оптической плотности, но оно было небольшим.

Регенеративные процессы восстановления костной ткани при введении ФМ и МФМ ускорялись в сравнении с контрольной группой. В контрольной группе (где матриксы не вводили) были выявлены только признаки формирования грубоволокнистой костной ткани, а в группах с имплантированными матриксами на поздних сроках образовывались участки новообразованной костной ткани. В случае имплантации МФМ процессы восстановления повреждения происходили интенсивнее. Если после имплантации ФМ на границе материала матрикса, появление костных трабекул отмечалось только через 4 недели к концу срока наблюдения, то в этот же срок после имплантации МФМ начались процессы замещения и перестройки ткани. Исследованные матриксы ускоряют регенеративные процессы и способствуют восстановлению утраченного костного материала в зоне травмы. В контрольной группе процессы восстановления костной ткани отставали и не приводили к формированию полноценных новообразованных

фрагментов костной ткани. Восстановление травмы оценивалось с помощью оценки общей минерализации и анализа гистохимических срезов.

Гистологический анализ зоны травмы. Гистологический анализ в зоне травмы оценивался с помощью гистохимических срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, как и в ряде других исследований [Lu и др., 2015], [Kim и др., 2013], [Hofmann и др., 2013]. Хотя в некоторых работах для этой цели использовали окрашивание трихромом по Массону [Koolen и др., 2016], окраску по Косу и толуидином синим [Uebersax и др., 2013].

Оценка минерализации. Степень минерализации травмированной области и ее изменение во времени оценивали через повышение оптической плотности, которую определяли с помощью рентгенологического томографа. Оптическую плотность определяли в единицах Хаунсфилда, которые оценивают степень абсорбции рентгеновского излучения анатомическими структурами организма по отношению к воде. Степень абсорбции рентгеновского излучения водой в шкале Хаунсфилда принимается равной 0. Воздух и жир имеют отрицательные значения, костное вещество положительные значения. Поэтому увеличение единиц Хаунсфилда в зоне травмы свидетельствует в пользу восстановления травмы [Sharurian и др., 2006].

Чтобы сравнить osteoconductive свойства матрикса с существующими аналогами в условиях *in vivo* целесообразно рассмотреть ФМ и МФМ по отдельности, потому как, согласно литературе, в условиях *in vivo* ряд параметров матриксов значительно варьировал и зависел от технологии изготовления [Wang и др., 2008c].

Оsteoconductive свойства ФМ. Имплантация ФМ и МФМ в костную ткань в область искусственного дефекта костной ткани приводит к ускорению neoosteogenesis по сравнению с контролем. Костная ткань и костные trabeculae формировались внутри обоих типов матриксов уже через 4 недели. Это сопоставимо со скоростью костеобразования в работе Кулен [Koolen и др., 2016], но было активнее, чем в работе Лю и Ким, где происходило через 6 недель [Lu и др., 2015], [Kim и др., 2013] и в работе Хоффмана, где формирование костной ткани

происходило через 8 недель [Hofmann и др., 2013]. В исследовании Виберсакса после 8 недель наблюдений участки обизвествленного остеоида с отдельными остеоцитами только начинали возникать на периферии имплантата [Uebersax и др., 2013].

Выраженный воспалительный ответ при имплантации разработанного материала не детектировался, что согласовалось с работой Кулен с соавторами [Koolen и др., 2016]. В работе Хоффмана этот аспект был изучен подробно. Там число лимфоцитов было незначительным и ответ нейтрофилов, которые представляют собой первую линию обороны организма при вторжении инородных тел, не был выражен [Hofmann и др., 2013]. Это дополнительно усиливает вывод о том, что имплантируемый ФМ также не вызовет воспалительного ответа.

Остеокондуктивные свойства МФМ. Приведенные данные свидетельствуют об ускорении минерализации в случае введения МФМ. Возрастание кальцификации и заметное зарастание раны после 8 недель установлено в работе Ши [Shi и др., 2013]. Композитный матрикс, полученный в работе Бхамиратана [Bhumiratana и др., 2011], обладая высоким сходством с матриксом настоящего исследования, не вводился в костную ткань лабораторных животных. Но в условиях *in vitro* в нем было выявлено активное перераспределение внесенного гидроксиапатита. В МФМ присутствие остеокластов через 4 недели после введения указывало на перераспределение гидроксиапатита матрикса в условиях *in vivo*.

4.7. Общий итог сравнения

Данные о влиянии трехмерных фиброиновых матриц и трехмерных микроносителей на адгезию, пролиферацию эукариотических клеток и их дифференцировку в остеогенном направлении, стимуляцию костеобразования в условиях *in vivo* в данном исследовании сопоставимы с результатами по этим показателям, полученным в других работах.

Так как интенсивные процессы повышения минерализации и нормального замещения материала имплантата костной тканью наблюдались при введении матриц обоих типов — как ФМ, так и МФМ — следовательно, в обоих случаях главная роль в восстановлении травмы принадлежит фиброину [Schindeler и др., 2008].

Результаты данной работы и сравнение их с литературными данными, позволяют сделать вывод о том, что созданные трехмерные фиброиновые матрицы и трехмерные микроносители можно применять для восстановления костной ткани.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы были получены минерализованные и неминерализованные трехмерные фиброиновые матриксы, а также минерализованные и неминерализованные микроносители.

Созданные ФМ и МФМ имели равномерную ячеистую структуру, с диаметром пор равным 400 мкм и наиболее благоприятным для жизнедеятельности и пролиферации эукариотических клеток размером полостей. Трехмерные носители размером 100 - 250 мкм были созданы на основе трехмерных матриксов. Они позволяют вносить в зону травмы остеогенные клетки из культуры, избегая ферментативного снятия клеток с поверхности культурального пластика.

Введение гидроксиапатита не изменило макроструктуры матриксов и микроносителей, но привело к изменению микрорельефа поверхности в виде появления микроструктур размером в несколько мкм.

Модуль Юнга у МФМ был равен 54,5 кПа. Такие механические показатели позволяют использовать матрикс для частичного восполнения функции утраченной костной ткани до ее восстановления.

Созданные матриксы были стабильны на протяжении длительного времени, предположительно достаточного для временного поддержания целостности кости в процессе ее регенерации и способны впоследствии деградировать. В реактиве Фэнтонна матриксы распадались за 9 недель. В растворе ФСБ за 9 недель теряли 20% своей массы. Это качество позволяет им исчезнуть из организма после выполнения своих функций.

ФМ и МФМ, неминерализованные и минерализованные микроносители поддерживают адгезию и пролиферацию различных типов эукариотических клеток: фибробластов линии 3Т3, остеобласт-подобных клеток линии MG-63 и мезенхимальных стромальных клеток.

Трехмерные микроносители в условиях *in vitro* способствовали дифференцировке клеток MG-63 и МСК в остеогенном направлении.

Продемонстрирована биосовместимость разработанных фиброиновых матриксов при подкожной имплантации.

Имплантация матриксов в область костного повреждения способствовала восстановлению целостности кости и костеобразования *de novo*. Минерализация матрикса ускоряла процесс восстановления костной ткани. Проведенная работа позволяет сформулировать основные выводы:

ВЫВОДЫ

1. Отработан метод получения биodeградируемых трехмерных матриц из фиброина, композитных матриц из фиброина и гидроксиапатита, трехмерных микроносителей из фиброина и фиброина и гидроксиапатита.
2. Матрицы обладают однородной структурой, высокой прочностью на разрыв, устойчивостью к пространственным деформациям и медленной скоростью деградации.
3. Поверхность и структура трехмерных матриц и микроносителей поддерживают адгезию и пролиферацию различных типов эукариотических клеток на поверхности матриц.
4. При подкожной имплантации матриц происходит постепенное замещение материала матрикса соединительной тканью и прорастание его кровеносными сосудами.
5. Трехмерные микроносители из фиброина поддерживают дифференцировку остеобласт-подобных и мезенхимальных стромальных клеток в остеогенном направлении.
6. Трансплантация фиброиновых матриц в зону костной травмы, способствует образованию костной ткани в зоне повреждения. Минерализация матрикса ускоряет регенерацию костной ткани.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ФМ — фиброиновый матрикс;

МФМ — минерализованный фиброиновый матрикс;

МСК — мезенхимальные стромальные клетки;

ФСБ — фосфатно-солевой буфер;

ВМР — костные морфогенетические белки;

dH₂O — дистиллированная вода;

FGF-2 — фактор роста фибробластов;

IGF-I — инсулиноподобный фактор роста-1;

IL — интерлекины;

МТТ тест — тест для оценки метаболической активности клеток;

PDGF — тромбоцитарный фактор роста;

RGD — триаминокислотная последовательность из аргинина, глицина и аспартата, участвующая в адгезии клеток;

TGF- β — трансформирующий ростовой фактор бета;

TNF- α — фактор некроза опухолей;

VEGF — фактор роста сосудов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Агапов И.И. и др. Трехмерный матрикс из рекомбинантного белка паутины для тканевой инженерии // Доклады Академии наук. 2009. Т. 426. № 1. С. 115–118.
2. Агапов И.И. и др. Биокompозитные матриксы из фиброина шелка и наногидроксиапатита для регенерации костной ткани // Доклады Академии наук. 2011. Т. 440. № 6. С. 1–4.
3. Мойсенович М.М. и др. Новые 3D-микроносители из рекомбинантного спидроина для использования в регенеративной медицине // Доклады Академии наук. 2015. Т. 463. № 4. С. 479–482.
4. Allmeling C. и др. Spider silk fibres in artificial nerve constructs promote peripheral nerve regeneration // Cell Prolif. 2008. Т. 41. № 3. С. 408–420.
5. Altman A.M. и др. IFATS Collection: Human Adipose-Derived Stem Cells Seeded on a Silk Fibroin-Chitosan Scaffold Enhance Wound Repair in a Murine Soft Tissue Injury Model // Stem Cells. 2009. Т. 27. № 1. С. 250–258.
6. Altman G.H. и др. Silk-based biomaterials // Biomaterials. 2003. Т. 24. № 3. С. 401–416.
7. Amsden J.J. и др. Rapid nanoimprinting of silk fibroin films for biophotonic applications // Adv. Mater. 2010. Т. 22. № 15. С. 1746–1749.
8. Anderson J.M., Rodriguez A., Chang D.T. Foreign body reaction to biomaterials // Semin. Immunol. 2008. Т. 20. № 2. С. 86–100.
9. Aravamudhan A. и др. Cellulose and collagen derived micro-nano structured scaffolds for bone tissue engineering // J. Biomed. Nanotechnol. 2013. Т. 9. № 4. С. 719–731.
10. Atala A. Principles of regenerative medicine. : Elsevier/Academic Press, 2011. 1182 с.
11. Atala A. Regenerative medicine strategies // J. Pediatr. Surg. 2012. Т. 47. № 1. С. 17–28.
12. Bae M.S. и др. Photo-cured hyaluronic acid-based hydrogels containing simvastatin

- as a bone tissue regeneration scaffold // *Biomaterials*. 2011. Т. 32. № 32. С. 8161–8171.
13. Bhakta G. и др. Hyaluronic acid-based hydrogels functionalized with heparin that support controlled release of bioactive BMP-2 // *Biomaterials*. 2012. Т. 33. № 26. С. 6113–6122.
14. Bhattarai N., Gunn J., Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010. Т. 62. № 1. С. 83–99.
15. Bhumiratana S. и др. Nucleation and growth of mineralized bone matrix on silk-hydroxyapatite composite scaffolds // *Biomaterials*. 2011. Т. 32. № 11. С. 2812–2820.
16. Bray L.J. и др. Human corneal epithelial equivalents constructed on *Bombyx mori* silk fibroin membranes // *Biomaterials*. 2011. Т. 32. № 22. С. 5086–5091.
17. Çakmak S. и др. A Silk Fibroin and Peptide Amphiphile-Based Co-Culture Model for Osteochondral Tissue Engineering // *Macromol. Biosci.* 2016. Т. 16. № 8. С. 1212–1226.
18. Cheema S.K. и др. Silk fibroin mediated delivery of liposomal emodin to breast cancer cells // *Int. J. Pharm.* 2007. Т. 341. № 1–2. С. 221–229.
19. Chen A.K.-L., Reuveny S., Oh S.K.W. Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: Achievements and future direction // *Biotechnol. Adv.* 2013. Т. 31. № 7. С. 1032–1046.
20. Chen J. и др. Epithelial sodium channel enhanced osteogenesis via cGMP/PKGII/ENaC signaling in rat osteoblast // *Mol. Biol. Rep.* 2014. Т. 41. № 4. С. 2161–2169.
21. Cheng N. и др. The osteogenic potential of mesoporous bioglasses/silk and non-mesoporous bioglasses/silk scaffolds in ovariectomized rats: In vitro and in vivo evaluation // *PLoS One*. 2013. Т. 8. № 11. С. e81014.
22. Chirila T. и др. *Bombyx mori* silk fibroin membranes as potential substrata for epithelial constructs used in the management of ocular surface disorders // *Tissue Eng. A*. 2008. Т. 14. № 7. С. 1203.
23. Chuenjitkuntaworn B. и др. Polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds: Preparation, characterization, and in vitro and in vivo biological responses of human primary bone cells // *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 2010. Т. 94. № 1. С. 241–251.

24. Correia C. и др. Development of silk-based scaffolds for tissue engineering of bone from human adipose-derived stem cells // *Acta Biomater.* 2012. Т. 8. № 7. С. 2483–2492.
25. Costa-Pinto A., Correlo V. Chitosan–poly (butylene succinate) scaffolds and human bone marrow stromal cells induce bone repair in a mouse calvaria model // *J. tissue ...* 2012. Т. 6. № 1. С. 21–8.
26. Daei-farshbaf N. и др. Bioceramic-collagen scaffolds loaded with human adipose-tissue derived stem cells for bone tissue engineering // *Mol. Biol. Rep.* 2014. Т. 41. № 2. С. 741–749.
27. Ding Z. и др. Silk–Hydroxyapatite Nanoscale Scaffolds with Programmable Growth Factor Delivery for Bone Repair // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2016. Т. 8. № 37. С. 24463–24470.
28. Dorozhkin S. V. Calcium orthophosphate cements and concretes // *Materials (Basel).* 2009. Т. 2. № 1. С. 221–291.
29. Fan H. и др. In vivo study of anterior cruciate ligament regeneration using mesenchymal stem cells and silk scaffold // *Biomaterials.* 2008. Т. 29. № 23. С. 3324–3337.
30. Friedlaender G.E. и др. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. // *J. Bone Joint Surg. Am.* 2001. Т. 83–A Suppl. № Pt 2. С. 5.
31. Fu Q. и др. Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives. // *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 2011. Т. 31. № 7. С. 1245–1256.
32. Gandhimathi C. и др. Biocomposite nanofibrous strategies for the controlled release of biomolecules for skin tissue regeneration // *Int. J. Nanomedicine.* 2014. Т. 9. № 1. С. 4709–4722.
33. Gellynck K. и др. Silkworm and spider silk scaffolds for chondrocyte support // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2008. Т. 19. № 11. С. 3399–3409.
34. Goldstein S., Meyerstein D., Czapski G. The Fenton reagents // *Free Radic. Biol. Med.* 1993. Т. 15. № 4. С. 435–445.

35. Govender S. и др. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients // *J Bone Jt. Surg Am.* 2002. Т. 84–А. № 12. С. 2123–2134.
36. Gunatillake P.A., Adhikari R., Gadegaard N. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering // *Eur. Cells Mater.* 2003. Т. 5. С. 1–16.
37. Gupta V. и др. Fabrication and characterization of silk fibroin-derived curcumin nanoparticles for cancer therapy. // *Int. J. Nanomedicine.* 2009. Т. 4. С. 115–122.
38. Harley B.A. и др. Mechanical characterization of collagen-glycosaminoglycan scaffolds // *Acta Biomater.* 2007. Т. 3. № 4. С. 463–474.
39. Haugen H.J. и др. Porous ceramic titanium dioxide scaffolds promote bone formation in rabbit peri-implant cortical defect model // *Acta Biomater.* 2013. Т. 9. № 2. С. 5390–5399.
40. He P. и др. Enhanced osteoinductivity and osteoconductivity through hydroxyapatite coating of silk-based tissue-engineered ligament scaffold // *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 2013. Т. 101 А. № 2. С. 555–566.
41. Hess R. и др. Synergistic effect of defined artificial extracellular matrices and pulsed electric fields on osteogenic differentiation of human MSCs // *Biomaterials.* 2012. Т. 33. № 35. С. 8975–8985.
42. Heywood H.K. и др. Cellular utilization determines viability and matrix distribution profiles in chondrocyte-seeded alginate constructs // *Tissue Eng.* 2004. Т. 10. № 9/10. С. 1467–1479.
43. HK S., KR. K. Adverse reactions to virgin silk sutures in cataract surgery // *Ophthalmology.* 1984. Т. 91. С. 479–483.
44. Hofmann S. и др. Remodeling of tissue-engineered bone structures in vivo // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2013. Т. 85. № 1. С. 119–129.
45. Huang W. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation // *Front. Biosci.* 2007. Т. 12. № 8–12. С. 3068.
46. Inoue S. и др. Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio // *J. Biol. Chem.* 2000. Т. 275. № 51. С. 40517–40528.

47. Jha A.K. и др. Controlling the adhesion and differentiation of mesenchymal stem cells using hyaluronic acid-based, doubly crosslinked networks // *Biomaterials*. 2011. Т. 32. № 10. С. 2466–2478.
48. Jiang J. и др. Hydroxyapatite/regenerated silk fibroin scaffold-enhanced osteoinductivity and osteoconductivity of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells // *Biotechnol. Lett.* 2013. Т. 35. № 4. С. 657–661.
49. Jiang X. и др. Mandibular repair in rats with premineralized silk scaffolds and BMP-2-modified bMSCs // *Biomaterials*. 2009. Т. 30. № 27. С. 4522–4532.
50. Jung S.-R. и др. Silk proteins stimulate osteoblast differentiation by suppressing the Notch signaling pathway in mesenchymal stem cells. // *Nutr. Res.* 2013. Т. 33. № 2. С. 162–70.
51. Kanczler J.M. и др. The effect of the delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenic protein-2 to osteoprogenitor cell populations on bone formation // *Biomaterials*. 2010. Т. 31. № 6. С. 1242–1250.
52. Kim B.S., Kim J.S., Lee J. Kim // *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 2013. Т. 101 A. № 9. С. 2661–2666.
53. Kim H.J. и др. Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells // *Biomaterials*. 2005. Т. 26. № 21. С. 4442–4452.
54. Kim H.J. и др. Bone tissue engineering with premineralized silk scaffolds // *Bone*. 2008. Т. 42. № 6. С. 1226–1234.
55. Kim J.-H. и др. A novel in vivo platform for studying alveolar bone regeneration in rat. // *J. Tissue Eng.* 2013. Т. 4. С. 2041731413517705.
56. Kim J.-H. и др. Osteoinductive silk fibroin/titanium dioxide/hydroxyapatite hybrid scaffold for bone tissue engineering // *Int. J. Biol. Macromol.* 2016. Т. 82. С. 160–167.
57. Kim K. и др. Stereolithographic Bone Scaffold Design Parameters: Osteogenic Differentiation and Signal Expression // *Tissue Eng. Part B Rev.* 2010. Т. 16. № 5. С. 523–539.
58. Kirker-Head C. и др. BMP-silk composite matrices heal critically sized femoral defects // *Bone*. 2007. Т. 41. № 2. С. 247–255.

59. Kiuru J. и др. Cytoskeleton-dependent release of human platelet epidermal growth factor. // *Life Sci.* 1991. Т. 49. № 26. С. 1997–2003.
60. Kluge J.A. и др. Spider silks and their applications // *Trends Biotechnol.* 2008. Т. 26. № 5. С. 244–251.
61. Koller D.Y. и др. Action of a silk fabric treated with AEGIS??? in children with atopic dermatitis: A 3-month trial // *Pediatr. Allergy Immunol.* 2007. Т. 18. № 4. С. 335–338.
62. Koolen P.G.L. и др. Increased Osteoid Formation in BMP-2–Loaded Silk-Based Screws // *Plast. Reconstr. Surg.* 2016. Т. 137. № 5. С. 808e–817e.
63. Kurosaki S. и др. Fibroin allergy. IgE mediated hypersensitivity to silk suture materials. // *Nippon Ika Daigaku zasshi.* 1999. Т. 66. № 1. С. 41–44.
64. Lammel A.S. и др. Controlling silk fibroin particle features for drug delivery // *Biomaterials.* 2010. Т. 31. № 16. С. 4583–4591.
65. Lawrence B.D. и др. Bioactive silk protein biomaterial systems for optical devices // *Biomacromolecules.* 2008. Т. 9. № 4. С. 1214–1220.
66. Lawrence B.D. и др. Silk film biomaterials for cornea tissue engineering // *Biomaterials.* 2009. Т. 30. № 7. С. 1299–1308.
67. Lee G.S. и др. Direct deposited porous scaffolds of calcium phosphate cement with alginate for drug delivery and bone tissue engineering // *Acta Biomater.* 2011. Т. 7. № 8. С. 3178–3186.
68. Lee J.J. и др. Investigation on biodegradable PLGA scaffold with various pore size structure for skin tissue engineering // *Curr. Appl. Phys.* 2007. Т. 7. № SUPPL.1.
69. Li J.J. и др. Silk coating on a bioactive ceramic scaffold for bone regeneration: effective enhancement of mechanical and *in vitro* osteogenic properties towards load-bearing applications // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2015. С. n/a-n/a.
70. Li T. и др. Human mesenchymal stem cell grafts engineered to release adenosine reduce chronic seizures in a mouse model of CA3-selective epileptogenesis. // *Epilepsy Res.* 2009. Т. 84. № 2–3. С. 238–41.
71. Liebmann B. и др. Formulation of poorly water-soluble substances using self-assembling spider silk protein // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 2008. Т.

331. № 1–2. С. 126–132.

72. Lu S. и др. A novel silk fibroin nanofibrous membrane for guided bone regeneration: a study in rat calvarial defects. // *Am. J. Transl. Res.* 2015. Т. 7. № 11. С. 2244–53.

73. Mackie E.J. и др. Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2008. Т. 40. № 1. С. 46–62.

74. Major M.L., Cheung H.S., Misra R.P. Basic calcium phosphate crystals activate c-fos expression through a Ras/ERK dependent signaling mechanism // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. Т. 355. № 3. С. 654–660.

75. Mandal B.B., Kundu S.C. Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds // *Biomaterials.* 2009. Т. 30. № 15. С. 2956–2965.

76. Mankin H.J., Hornicek F.J., Raskin K. a. Infection in massive bone allografts. // *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2005. № 432. С. 210–216.

77. Mason R. Fabrics for atopic dermatitis // *J. Fam. Health Care.* 2008. Т. 18. № 2. С. 63–65.

78. Matthews B.G. и др. Enhanced osteoblastogenesis in three-dimensional collagen gels. // *Bonekey Rep.* 2014. Т. 3. № April. С. 560.

79. Mazaki T. и др. A novel, visible light-induced, rapidly cross-linkable gelatin scaffold for osteochondral tissue engineering. // *Sci. Rep.* 2014. Т. 4. С. 4457.

80. McBeath R. и др. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment // *Dev. Cell.* 2004. Т. 6. № 4. С. 483–495.

81. Meinel L. и др. Engineering bone-like tissue in vitro using human bone marrow stem cells and silk scaffolds // *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 2004. Т. 71. № 1. С. 25–34.

82. Meinel L. и др. The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo // *Biomaterials.* 2005. Т. 26. № 2. С. 147–155.

83. Menassa R. и др. Spider dragline silk proteins in transgenic tobacco leaves: Accumulation and field production // *Plant Biotechnol. J.* 2004. Т. 2. № 5. С. 431–438.

84. Midha S., Murab S., Ghosh S. Osteogenic signaling on silk-based matrices // *Biomaterials.* 2016a. Т. 97. С. 133–153.

85. Midha S., Murab S., Ghosh S. Osteogenic signaling on silk-based matrices // *Biomaterials*. 2016b. Т. 97. С. 133–153.
86. Mobini S. и др. Fabrication and characterization of regenerated silk scaffolds reinforced with natural silk fibers for bone tissue engineering // *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 2013. Т. 101 А. № 8. С. 2392–2404.
87. Moisenovich M.M. и др. In vitro and in vivo biocompatibility studies of a recombinant analogue of spidroin 1 scaffolds // *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 2011. Т. 96 А. № 1. С. 125–131.
88. Morrow F.A. и др. In vivo comparison of polyglycolic acid, chromic catgut and silk in tissue of the genitourinary tract: an experimental study of tissue retrieval and calculogenesis. // *J. Urol.* 1974. Т. 112. № 5. С. 655–8.
89. Murab S. и др. Matrix-Embedded Cytokines to Simulate Osteoarthritis-Like Cartilage Microenvironments // *Tissue Eng. Part A*. 2013. Т. 19. № 15–16. С. 1733–1753.
90. Murab S. и др. Glucosamine loaded injectable silk-in-silk integrated system modulate mechanical properties in bovine ex-vivo degenerated intervertebral disc model // *Biomaterials*. 2015. Т. 55. С. 64–83.
91. Nebel L. и др. Autograft suture in peripheral nerves // *Eur. Surg. Res.* 1977. Т. 9. № 3. С. 224–234.
92. Nguyen T.B.L., Lee B.-T. A combination of biphasic calcium phosphate scaffold with hyaluronic acid-gelatin hydrogel as a new tool for bone regeneration. // *Tissue Eng. Part A*. 2014. Т. 20. № 13–14. С. 1993–2004.
93. Ni Y. и др. Radiologic and histologic characterization of silk fibroin as scaffold coating for rabbit tracheal defect repair // *Otolaryngol. - Head Neck Surg.* 2008. Т. 139. № 2. С. 256–261.
94. Oh S.-A. и др. Collagen Three-Dimensional Hydrogel Matrix Carrying Basic Fibroblast Growth Factor for the Cultivation of Mesenchymal Stem Cells and Osteogenic Differentiation // *Tissue Eng. Part A*. 2012. Т. 18. № 9–10. С. 1087–1100.
95. Omenetto F.G. и др. New opportunities for an ancient material. // *Science*. 2010. Т. 329. № 5991. С. 528–31.

96. Park S.H. и др. Relationships between degradability of silk scaffolds and osteogenesis // *Biomaterials*. 2010. Т. 31. № 24. С. 6162–6172.
97. Peleg H., Rao U.N., Emrich L.J. An experimental comparison of suture materials for tracheal and bronchial anastomoses. // *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1986. Т. 34. № 6. С. 384–8.
98. Pişkin E. Biomaterials in Different Forms for Tissue Engineering: An Overview // *Mater. Sci. Forum*. 1997. Т. 250. С. 1–14.
99. Pitaru S. и др. Effect of basic fibroblast growth factor on the growth and differentiation of adult stromal bone marrow cells: enhanced development of mineralized bone-like tissue in culture. // *J. Bone Miner. Res.* 1993. Т. 8. № 8. С. 919–29.
100. Polo-Corrales L., Latorre-Esteves M., Ramirez-Vick J.E. Scaffold Design for Bone Regeneration // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2014. Т. 14. № 1. С. 15–56.
101. Qian J. и др. Preparation and in vitro characterization of biomorphic silk fibroin scaffolds for bone tissue engineering. // *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2013. С. 1–11.
102. Raeber G.P., Lutolf M.P., Hubbell J.A. Mechanisms of 3-D migration and matrix remodeling of fibroblasts within artificial ECMs // *Acta Biomater.* 2007. Т. 3. № 5. С. 615–629.
103. Raina D.B. и др. Biocomposite macroporous cryogels as potential carrier scaffolds for bone active agents augmenting bone regeneration // *J. Control. Release*. 2016. Т. 235. С. 365–378.
104. Ribeiro M. и др. Antibacterial silk fibroin/nanohydroxyapatite hydrogels with silver and gold nanoparticles for bone regeneration // *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 2017. Т. 13. № 1. С. 231–239.
105. Rowlands A.S., George P.A., Cooper-White J.J. Directing osteogenic and myogenic differentiation of MSCs: interplay of stiffness and adhesive ligand presentation // *AJP Cell Physiol*. 2008. Т. 295. № 4. С. C1037–C1044.
106. Schindeler A. и др. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2008. Т. 19. № 5. С. 459–466.
107. Seo Y.-K. и др. Increase in cell migration and angiogenesis in a composite silk

- scaffold for tissue-engineered ligaments // *J. Orthop. Res.* 2009. Т. 27. № 4. С. 495–503.
108. Shangkai С. и др. Transplantation of Allogeneic Chondrocytes Cultured in Fibroin Sponge and Stirring Chamber to Promote Cartilage Regeneration // *Tissue Eng.* 2007. Т. 13. № 3. С. 483–492.
109. Shapurian Т. и др. Quantitative evaluation of bone density using the Hounsfield index. // *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 2006. Т. 21. № 2. С. 290–7.
110. Shen X. и др. Sequential and sustained release of SDF-1 and BMP-2 from silk fibroin-nanohydroxyapatite scaffold for the enhancement of bone regeneration // *Biomaterials.* 2016. Т. 106. С. 205–216.
111. Shi P. и др. Variation of the effect of calcium phosphate enhancement of implanted silk fibroin ligament bone integration // *Biomaterials.* 2013. Т. 34. № 24. С. 5947–5957.
112. Shih H.N. и др. Reduction in experimental peridural adhesion with the use of a crosslinked hyaluronate/collagen membrane // *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 2004. Т. 71. № 2. С. 421–428.
113. Silber J.S. и др. Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion // *Spine (Phila. Pa. 1976).* 2003. Т. 28. № 2. С. 134–139.
114. Soffer L. и др. Silk-based electrospun tubular scaffolds for tissue-engineered vascular grafts. // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2008. Т. 19. № 5. С. 653–64.
115. Sofia S. и др. Functionalized silk-based biomaterials for bone formation // *J. Biomed. Mater. Res.* 2001. Т. 54. № 1. С. 139–148.
116. Spelzini F. и др. Tensile strength and host response towards silk and type I polypropylene implants used for augmentation of fascial repair in a rat model // *Gynecol. Obstet. Invest.* 2007. Т. 63. № 3. С. 155–162.
117. Stinco G., Piccirillo F., Valent F. A randomized double-blind study to investigate the clinical efficacy of adding a non-migrating antimicrobial to a special silk fabric in the treatment of atopic dermatitis // *Dermatology.* 2008. Т. 217. № 3. С. 191–195.
118. Suarez-Gonzalez D. и др. Controlled nucleation of hydroxyapatite on alginate

- scaffolds for stem cell-based bone tissue engineering // *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 2010. Т. 95. № 1. С. 222–234.
119. Sun H. и др. Controlling stem cell-mediated bone regeneration through tailored mechanical properties of collagen scaffolds // *Biomaterials*. 2014. Т. 35. № 4. С. 1176–1184.
120. Sundelacruz S., Kaplan D.L. Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2009. Т. 20. № 6. С. 646–655.
121. Tanaka K., Inoue S., Mizuno S. Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori* // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1999. Т. 29. № 3. С. 269–276.
122. Tang X. и др. Evaluation on *in vitro* biocompatibility of silk fibroin-based biomaterials with primarily cultured hippocampal neurons // *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 2009. Т. 91A. № 1. С. 166–174.
123. Thimm J. и др. Calcium-dependent open/closed conformations and interfacial energy maps of reconstituted hemichannels // *J. Biol. Chem.* 2005. Т. 280. № 11. С. 10646–10654.
124. Thitiset T. и др. Development of collagen/demineralized bone powder scaffolds and periosteum-derived cells for bone tissue engineering application // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. Т. 14. № 1. С. 2056–2071.
125. Tigli R.S. и др. Comparative chondrogenesis of human cell sources in 3D scaffolds // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2009. Т. 3. № 5. С. 348–360.
126. Tuan R.S. Biology of developmental and regenerative skeletogenesis. // *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2004. Т. 427. № 427 Suppl. С. S105-17.
127. Uebersax L. и др. Silk fibroin matrices for the controlled release of nerve growth factor (NGF) // *Biomaterials*. 2007. Т. 28. № 30. С. 4449–4460.
128. Uebersax L. и др. Biocompatibility and osteoconduction of macroporous silk fibroin implants in cortical defects in sheep // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2013. Т. 85. № 1. С. 107–118.
129. Verari C. и др. Surface modification of silk fibroin with poly(ethylene glycol) for

- antiadhesion and antithrombotic applications // *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 2010. Т. 93. № 2. С. 595–606.
130. Vepari C., Kaplan D.L. Silk as a biomaterial // *Prog. Polym. Sci.* 2007. Т. 32. № 8–9. С. 991–1007.
131. Vuola J. и др. Natural coral as bone-defect-filling material // *J. Biomed. Mater. Res.* 2000. Т. 51. № 1. С. 117–122.
132. Wadbuu P. и др. Different properties of electrospun fibrous scaffolds of separated heavy-chain and light-chain fibroins of *Bombyx mori* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2010. Т. 46. № 5. С. 493–501.
133. Wang L., Stegemann J.P. Thermogelling chitosan and collagen composite hydrogels initiated with β -glycerophosphate for bone tissue engineering // *Biomaterials*. 2010. Т. 31. № 14. С. 3976–3985.
134. Wang S. и др. The anticoagulant ability of ferulic acid and its applications for improving the blood compatibility of silk fibroin. // *Biomed. Mater.* 2008a. Т. 3. № 4. С. 44106.
135. Wang X. и др. Silk microspheres for encapsulation and controlled release // *J. Control. Release*. 2007a. Т. 117. № 3. С. 360–370.
136. Wang X. и др. Silk coatings on PLGA and alginate microspheres for protein delivery // *Biomaterials*. 2007b. Т. 28. № 28. С. 4161–4169.
137. Wang X. и др. Nanolayer biomaterial coatings of silk fibroin for controlled release // *J. Control. Release*. 2007c. Т. 121. № 3. С. 190–199.
138. Wang X. и др. Controlled release from multilayer silk biomaterial coatings to modulate vascular cell responses // *Biomaterials*. 2008b. Т. 29. № 7. С. 894–903.
139. Wang X. и др. Growth factor gradients via microsphere delivery in biopolymer scaffolds for osteochondral tissue engineering // *J. Control. Release*. 2009. Т. 134. № 2. С. 81–90.
140. Wang Y. и др. In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds // *Biomaterials*. 2008c. Т. 29. № 24–25. С. 3415–3428.
141. Wenk E. и др. Silk fibroin spheres as a platform for controlled drug delivery // *J. Control. Release*. 2008. Т. 132. № 1. С. 26–34.

142. Wenk E., Merkle H.P., Meinel L. Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications // *J. Control. Release*. 2011. Т. 150. № 2. С. 128–141.
143. Whang K. и др. A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds // *Polymer (Guildf)*. 1995. Т. 36. № 4. С. 837–842.
144. Xia X.-X. и др. Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010. Т. 107. С. 14059–14063.
145. Xia Z., Villa M.M., Wei M. A Biomimetic Collagen-Apatite Scaffold with a Multi-Level Lamellar Structure for Bone Tissue Engineering. // *J. Mater. Chem. B. Mater. Biol. Med.* 2014. Т. 2. № 14. С. 1998–2007.
146. Yoo C.-K. и др. Cell attachment and proliferation of osteoblast-like MG63 cells on silk fibroin membrane for guided bone regeneration // *Maxillofac. Plast. Reconstr. Surg.* 2016. Т. 38. № 1. С. 17.
147. Zeng S. и др. Characterization of Silk Fibroin/Chitosan 3D Porous Scaffold and In Vitro Cytology. // *PLoS One*. 2015. Т. 10. № 6. С. e0128658.
148. Zhang X. и др. Dynamic culture conditions to generate silk-based tissue-engineered vascular grafts // *Biomaterials*. 2009. Т. 30. № 19. С. 3213–3223.
149. Zhang X., Baughman C.B., Kaplan D.L. In vitro evaluation of electrospun silk fibroin scaffolds for vascular cell growth // *Biomaterials*. 2008. Т. 29. № 14. С. 2217–2227.
150. Zhang X., Reagan M.R., Kaplan D.L. Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009. Т. 61. № 12. С. 988–1006.
151. Zhao J. и др. Apatite-coated silk fibroin scaffolds to healing mandibular border defects in canines // *Bone*. 2009. Т. 45. № 3. С. 517–527.
152. Zhou C.Z. и др. Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene. // *Nucleic Acids Res.* 2000. Т. 28. № 12. С. 2413–9.
153. Zhou H., Xu H.H.K. The fast release of stem cells from alginate-fibrin microbeads in injectable scaffolds for bone tissue engineering // *Biomaterials*. 2011. Т. 32. № 30. С. 7503–7513.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Рисунок 1 — Сигнальные пути, регулирующие формирование костной ткани. [Midha, Murab, Ghosh, 2016a]

Рисунок 2 — Схема отмывки шелка от серицина и сопутствующих компонентов.

Рисунок 3 — Схема изготовления матриксов из фиброина методом выщелачивания.

Рисунок 4 — Процесс выполнения измерений на реометре. Матрикс помещен между плитами сжатия.

Рисунок 5 — Внешний вид матрикса из фиброина.

Рисунок 6 — Структура поверхности ФМ.

Рисунок 7 — Структура поверхности МФМ.

Рисунок 8 — Структура минерализованных (А) и неминерализованных (Б) микроносителей.

Рисунок 9 — Фибробласты мышцы линии 3Т3 на поверхности фиброинового матрикса через 14 дней культивирования.

Рисунок 10 — Пролиферация фибробластов мышцы линии 3Т3 на поверхности ФМ и МФМ.

Рисунок 11 — Пролиферация фибробластов мышцы линии 3Т3 на поверхности МФМ.

Рисунок 12 — МСК на фиброиновых микроносителях на 7 день культивирования

Рисунок 13 — Динамика пролиферации клеток на поверхности трехмерных фиброиновых микроносителей.

Рисунок 14 — Структура актиновых комплексов клеток остеосаркомы человека линии MG-63 на поверхностях разных носителей.

Рисунок 15 — Гистологический анализ тканей в области имплантации фиброинового матрикса через 2 месяца.

Рисунок 16 — Искусственное повреждение костной ткани крысы.

Рисунок 17 — Зона имплантации трехмерных матриц через 1 неделю.

Рисунок 18 — Зона имплантации трехмерных матриц через 4 недели.

График 1 — Измерение механических свойств экспериментального образца МФМ.

График 2 — Деградация фиброиновых матриц в разных химических средах в течение 9 недель.

График 3 — Динамика пролиферации фибробластов мышцы линии 3Т3 (на 1 мм³), культивируемых на матриксах.

График 4 — Исследование влияния минерализации фиброиновых микроносителей на пролиферацию и уровень экспрессии щелочной фосфатазы клетками МСК.

График 5 — Продукция щелочной фосфатазы через 4 дня при культивировании на пластике и фиброиновых микроносителях.

График 6 — Исследование влияния минерализации фиброиновых микроносителей на пролиферацию и уровень щелочной фосфатазы остеобласт-подобных клеток MG-63.

График 7 — Экспрессия щелочной фосфатазы через 7 суток культивирования клеток MG-63 на разных поверхностях.

График 8 — Оптическая плотность зоны травмы после имплантации матрикса в единицах Хаунсфилда.