

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
Биологический факультет

На правах рукописи

Коньков Андрей Сергеевич

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

03.01.06 — биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Оболенск – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» на кафедре биоинженерии Биологического факультета в г. Москва.

Научный руководитель:

Гончаренко Анна Владимировна, кандидат биологических наук,
Институт биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, отдел медицинской микробиологии, старший научный сотрудник

Официальные оппоненты:

Вейко Наталья Николаевна, доктор биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр» Российской академии наук, лаборатория молекулярной биологии, главный научный сотрудник

Матвеева Ирина Николаевна, доктор биологических наук, профессор, лауреат премии Правительства науки в области науки и техники,
Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности (ФГБНУ ВНИТИБП), заведующий отдела молекулярной биологии и вирусологии.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Саратов

Защита диссертации состоится «05» июля 2019 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ.

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 350.002.01
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 et al, 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 биодеградации (Polo-Corrales et al., 2014). Перспективным материалом является фиброин — основной фибриллярный компонент нити кокона тутового шелкопряда *Bombyx mori*. На его основе было создано несколько типов матриксов, 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 et al., 2013) или за счет иммобилизации остеоиндуктивными факторами (Koolen et al., 2016; Wang et al., 2009). Некоторые образцы матриксов из фиброина характеризовались присутствием в их структуре нерегулярных элементов, что ухудшало их способность поддерживать пролиферацию (Mobini et al., 2013). В данной работе была предпринята попытка усовершенствовать 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 матриксов созданных из регенерированного фиброина шелка *Bombyx mori* для восстановления костной ткани. Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

Задачи работы:

1. Оработка методов получения трехмерных фиброиновых матриксов, композитных матриксов из фиброина и гидроксиапатита, минерализованных и неминерализованных трехмерных микроносителей из фиброина.
2. Характеристика структуры, механических свойств и скорости деградации трехмерных фиброиновых матриксов.
3. Исследование способности трехмерных фиброиновых матриксов 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 разработанной 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 Фэнтона 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 матриксов 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. Оработана 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 мезинхимальных 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 межкафедральном заседании биологического факультета МГУ Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, протокол №13 от 24.04.2018.

Личное участие автора в получении результатов. Вся работа была выполнена соискателем самостоятельно и включала отработку методики получения трехмерных минерализованных и неминерализованных матриц из фиброина, исследование структуры, физико-химических свойств трехмерных матриц, изучение биосовместимости матриц и микроносителей в экспериментах *in vitro*, оценку биосовместимости и регенеративного потенциала матриц *in vivo* на модели искусственно созданного повреждения бедренной кости крыс, статистический анализ полученных данных, описание полученных результатов.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 9 научных работ, в том числе 7 статей, опубликованных в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК МОН РФ, 5 статей, индексируемых в библиографической базе Scopus, 2 тезисов устных и стендовых сообщений в материалах международных и всероссийских научных конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 114 листах машинописного текста. 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 источников, из них 3 публикации отечественных и 150 публикаций зарубежных авторов. Текст содержит 26 рисунков и 0 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе представлены литературные данные о регенерации костной ткани, об основных подходах в заместительной и восстановительной медицине, свойствах разных биоматериалов. Обосновывается выбор фиброина — каркасного белка нити шелка *Bombyx mori*, описываются его физико-химические и биологические свойства. Приводятся примеры использования фиброиновых матриц в инженерии костной ткани, которые созданы на основе разных технологий. Описаны их недостатки и необходимые пути для усовершенствования методов их создания. Обосновывается задача модификации существующих методов конструирования фиброиновых матриц с целью их применения в регенерации костной ткани.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. Фибробласты мыши линии NIH 3T3 были предоставлены профессором Ю. Бирайтером-Ханом Франкфуртского Университета имени Иоганна Вольфганга Гёте (60323, Германия, Франкфурт-на-Майне, Теодор-Визенгрунд Адорно Плац, 6). Клетки остеосаркомы человека линии MG-63 были предоставлены организацией «Покровский банк стволовых клеток» (199106, Россия, Санкт-Петербург, Большой проспект Васильевского Острова, д. 85).

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).

Выделение мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (МСК). Мезенхимальные стромальные клетки были выделены из костного мозга мышей инбредной линии C57BL/6. Стволовая природа выделенных стволовых клеток была подтверждена иммунофлуоресцентным анализом CD73, CD90, CD105, CD45.

Культивирование клеток на фиброиновых матриксах и микроносителях. Клетки фибробластов 3T3 культивировали на трехмерных матриксах. Суспензию фибробластов 3T3 в объеме 300 мкл вносили на матрикс в концентрации 24 000 клеток/мл. Образцы трехмерных матриц разных типов с фибробластами линии 3T3 культивировали в чашках Петри со средой DMEM, содержащей 10% телячьей сыворотки при 37°C в присутствии 5% CO₂. Параллельно клетки фибробластов 3T3 в тех же количествах культивировали на поверхности культурального пластика в 24-луночных планшетах, используя их в качестве контрольного образца.

Клетки МСК культивировали на трехмерных фиброиновых микроносителях в среде α -МЕМ с 10% фетальной телячьей сыворотки. МСК наносили на минерализованные и 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.

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

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 матриц.

Изменение уровня экспрессии щелочной фосфатазы. Дифференциация в остеогенном направлении клеток MG-63 и МСК на фиброиновых микроносителях оценивалась по уровню изменения продукции щелочной фосфатазы. В качестве контроля использовали клетки на культуральном пластике. Непосредственную оценку экспрессии щелочной фосфатазы проводили по реакции с нитрофенил-фосфатом. Детектированный сигнал уровня щелочной фосфатазы нормализовался на детектированный сигнал МТТ. Исследования проводили в условиях индукции и без индукции остеогенеза. Для индукции остеогенеза клетки культивировали в остеогенной среде (10⁻⁸ М дексаметазона (Sigma-Aldrich, США), 50 мкг/мл 2-фосфо-L-аскорбата натрия (Fluka, Германия) и 10 мМ β -глицерофосфата натрия (Sigma-Aldrich, США)).

Изготовление трехмерных матриц из фибрина. Шелк-сырец *Bombyx mori* отмывали от сопутствующего белка серицина. Отмывка от серицина включала кипячение измельченных фрагментов коконов или волокон шелка в растворе 2% 62 мМ стеарата калия (C₁₇H₃₅COOK) и 0,25% 25 мМ гидрокарбоната натрия.

При создании ФМ (фиброинового матрикса) очищенный фиброин растворяли в растворе 90% муравьиной кислоты и 10% хлорида лития и смешивали с частицами порообразователя (кристаллами хлорида натрия) в соотношении 50 мг частиц на 100 мкл раствора. Размер вносимых частиц порообразователя равен 400 мкм. Прототип матрикса последовательно погружали в 96% этанол и дистиллированную воду. При создании МФМ (минерализованного фибринового матрикса) в методику был добавлен дополнительный этап с включением в состав матрикса гидроксиапатита (порошок гидроксиапатита получен из костей крупного рогатого скота.). Соотношение гидроксиапатита к фиброину в сухом веществе матрикса составляло 1 : 9. Остальные этапы при приготовлении ФМ и МФМ полностью совпадали.

Изготовление микроносителей из фиброина. Трехмерные микроносители из фиброина были получены путем криоизмельчения трехмерных пористых матриксов. Полученный размер частиц составлял 100 – 250 мкм. Микроносители были подвергнуты минерализации, которая осуществлялась за счет осаждения кристаллов фосфата кальция из перенасыщенных растворов хлоридов натрия, кальция и магния, гидрокарбоната натрия, гидрофосфата натрия.

Механические свойства минерализованных матриксов. Механические измерения МФМ выполнены научным сотрудником В.А. Жуйковым (биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова) на реометре MCR 302 (Anton Paar, Австрия). 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.

Измерение скорости деградации матриксов. Измерение скорости деградации матриксов из фиброина определяли в растворах: 1) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), 2) в реактиве Фэнтонна, 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.

Лабораторные животные. Мыши линии Balb/c и инбредной линии C57BL/6, были получены из питомника лабораторных животных «Пушино» филиала института биоорганической химии имени М.В. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (142290, Россия, Московская область, г. Пушино, пр. Науки, д. 6). Половозрелые крысы породы Wistar были переданы из питомника Межрегионального ортопедического центра ФГУЗ КБ №81 ФМБА России (636000, Россия, Томская область, г. Северск, ул. Мира, д. 4) сотрудником Межрегионального ортопедического центра ФГУЗ КБ №81 ФМБА России (636000, Россия, Томская область, г. Северск, ул. Мира, д. 4) В.В. Гузеевым.

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. Через 2 месяца имплантированные образцы матриксов извлекали для изготовления срезов и анализа тканевого материала.

Модель повреждения бедренной кости. Оценка возможности применения матриксов для регенерации костной ткани была проведена на крысах после травматического повреждения бедренной кости. Животные были разделены на несколько групп. В первой опытной группе осуществляли имплантацию ФМ, а во второй — МФМ. В контрольной группе заполнение дефекта не производилось. Рентгеномографические исследования и извлечение имплантированных образцов для получения гистологических срезов проводились через 1, 2 и 4 неделю после создания искусственной травмы во всех группах крыс.

Гистология и приготовление образцов. При анализе тканевого материала из зоны подкожной имплантации окраску препарата проводили по методу Маллори. При анализе

тканевого материала из зоны костной травмы окраску препарата проводили в смеси гематоксилина и эозина, после декальцинации в 25% растворе Трилона Б.

Микроскопия. С помощью микроскопии в проходящем свете с использованием микроскопа Zeiss Imager A1 (Zeiss, Германия) изучали структуру матриц, срезы тканевого материала из зоны подкожной имплантации матриц и зоны костной травмы. С помощью сканирующей электронной микроскопии с использованием микроскопа S2 (Cambridge Instruments, Великобритания) изучали макро- и микроструктуру матриц и адгезию клеток к их поверхности во время культивирования. С помощью сканирующей конфокальной микроскопии с использованием микроскопа Zeiss Axiovert 200M LSM510 META (Zeiss, Германия) изучали динамику пролиферации клеток и перестройку скелета клеток, культивируемых на поверхности трехмерных матриц и микроносителей. Клетки на матрице визуализировали с помощью ядерного красителя SYTOX Green (Invitrogen, США). 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. Мезенхимальные стромальные клетки визуализировали с помощью красителя DAPI (Sigma-Aldrich, США). Для визуализации актинового цитоскелета клеток МСК и MG-63 были окрашены красителем Alexa Fluor-488 phalloidin (Zeiss, Германия). В опытах по адгезии и пролиферации клеток MG-63 материал МФМ был окрашен TRITC (Sigma-Aldrich, США). Для определения возможности минерализации микроносителей в остеоиндуктивных условиях фиброинные микроносители с клетками на 7 сутки культивирования окрашивали ализариновым красным.

Рентгеномографические исследования. Восстановление костной ткани в зоне травмы оценивали с помощью рентгеномографии на компьютерном томографе Somatom AR.NP фирмы «Siemens» (Германия). Оценка минерализации происходила через определение оптической плотности в единицах Хаунсфилда. Этот параметр оценивает степень абсорбции рентгеновского излучения анатомическими структурами организма по отношению к воде. 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 отдельно каждой кости 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.

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.

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.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Внешний вид, форма и структура матрицков. Методом выщелачивания с помощью порообразователя хлорида натрия получены трехмерные матриксы из фиброина. Размер пор был равен 400 мкм и соответствовал размеру внесенных частиц порообразователя. Световая микроскопия показала, что внесение гидроксиапатита не нарушало структуру матрикса. Преимуществом отработанной методики изготовления ФМ и МФМ является ее технологическая простота. Она легко стандартизируема и не требует таких токсичных агентов, как гексан (Uebersax et al., 2013). Введение гидроксиапатита в состав МФМ, приводило к изменению рельефа его поверхностей, которое сопровождалось появлением шероховатых структур размером несколько десятков мкм. Фиброиновые стенки матрицков обоих типов имели схожие структурные элементы размером 3 - 5 мкм (рисунок 1, 2).

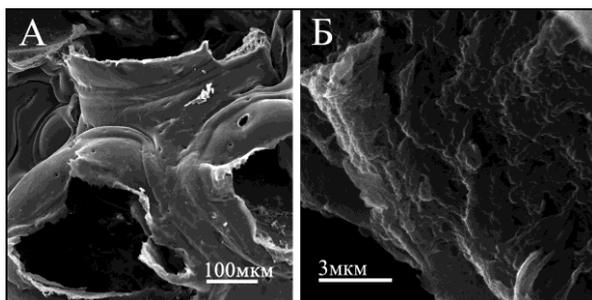


Рисунок 1 — Структура поверхности ФМ.
Макроструктура (слева) и микроструктура (справа) поверхности.

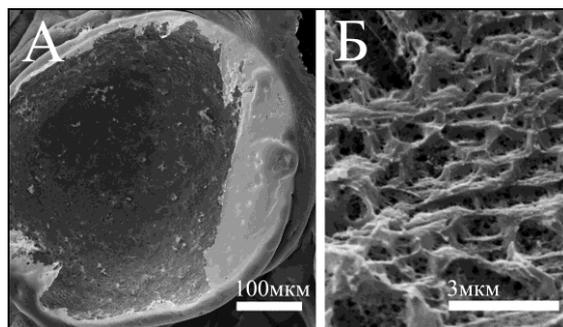


Рисунок 2 — Структура поверхности МФМ.
Макроструктура (слева) и микроструктура (справа) поверхности.

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 по сравнению с матриксами, где минерализация осуществляется за счет осаждения из перенасыщенных растворов (Zhao et al., 2009). Гидроксиапатит, применяемый в настоящем исследовании, в отличие от гидроксиапатита, используемого в других исследованиях, имеет природное происхождение.

Характеристика микроносителей. Полученные путем криоизмельчения фиброиновых матрицков микроносители имели размер 100 - 250 мкм. Минерализация микроносителей приводила к увеличению шероховатости их поверхности (рисунок 3) без изменения структуры.

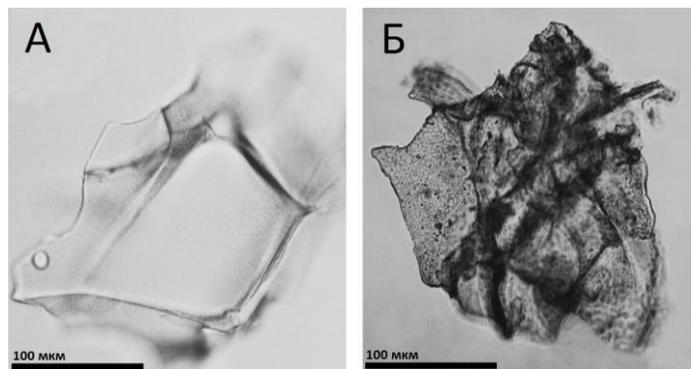


Рисунок 3 — Структура минерализованных (А) и неминерализованных (Б) микроносителей.

Использование трехмерных микроносителей для терапевтического применения привлекательно тем, что они могут быть трансплантированы в зону травмы вместе с микроносителями, на которых они культивируются. Это важное качество, которое позволяет клеткам избегать стресса при переносе и сохранять свою жизнеспособность [Chen, Reuveny, Oh, 2013].

Прочность на разрыв и растяжимость матриц. Для МФМ были определены значения силы нажатия при разном расстоянии между плитами и построен график (Рисунок 4 А). Значения сил нажатия были пересчитаны в величины давления и относительной деформации, и построен график зависимости давления от относительной деформации (Рисунок 4 Б). По тангенсу угла наклона линейной части второго графика высчитывался модуль Юнга образца МФМ. Модуль Юнга образца МФМ составил $54,5 \pm 0,5$ кПа (Рисунок 4 Б).

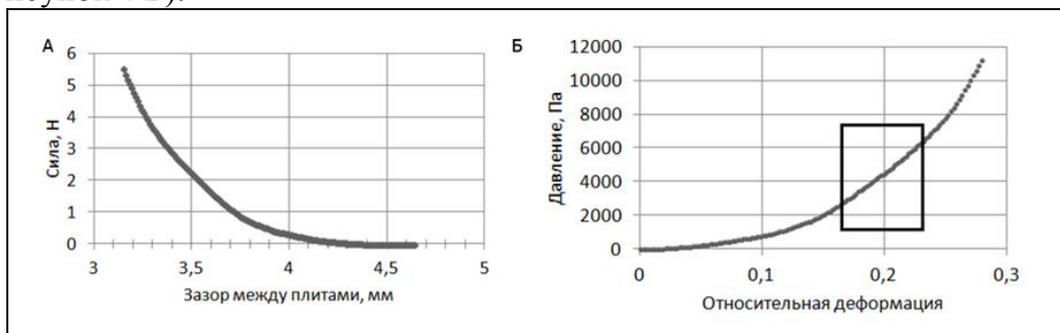


Рисунок 4 — Измерение механических свойств экспериментального образца МФМ.

А — зависимость силы нажатия в Н (ньютонх) 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.

Механические свойства кости различны для разных типов кости и разных ее участков. В работе Ши прочность на разрыв новообразованного костного материала с оставшимися фрагментами костного имплантата на начальных этапах была равна 60 кПа, что близко к значению прочности на разрыв созданного МФМ (Shi et al., 2013).

Скорость деградации матрицков. Матрицксы в реактиве Фэнтонa через 3 недели теряли 60% массы и подвергались полной деградации за 9 недель, а в ФСБ за это же время они теряли 20% своей массы (рисунок 5).

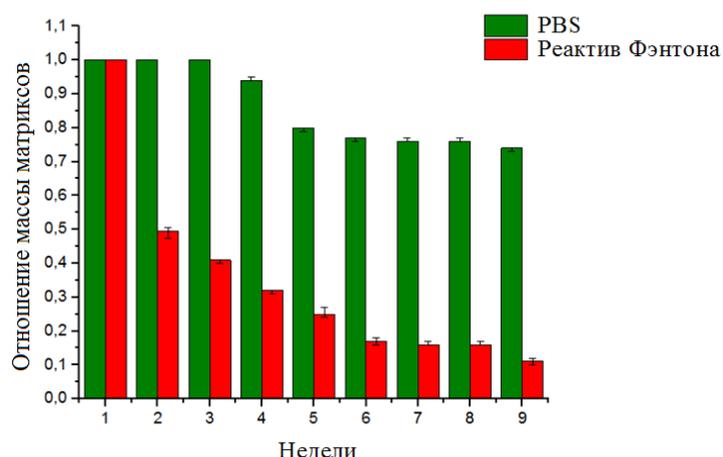


Рисунок 5 — Деградация фиброиновых матрицков в разных химических средах в течение 9 недель.

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

Скорость деградации созданных матрицков была сопоставима со скоростью деградации у матрицков-аналогов в других исследованиях. В работе Киан у матрицка, созданного методом выщелачивания, как и в нашем исследовании, через 3 недели в ФСБ не выявлено существенного изменения массы или деструкции структуры матрицков (Qian et, al.). Такая скорость деградации позволяет матрицку сохранять целостность в условиях *in vivo* до полного восстановления и замещения его материала нативной тканью.

Оценка способности разработанных матрицков поддерживать адгезию и пролиферацию клеток. Через 14 дней культивирования клетки фибробластов линии 3Т3 формировали монослой на поверхности матрицков (рисунок 6).

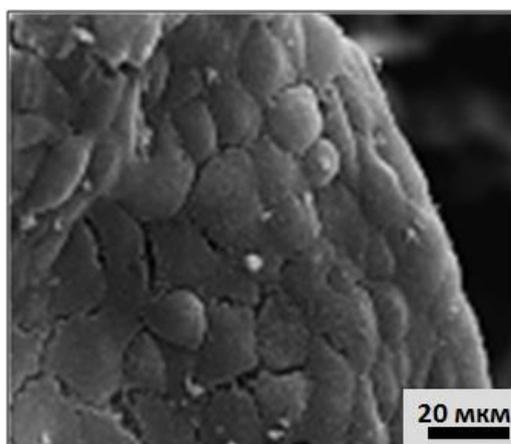


Рисунок 6 — Фибробласты мыши линии 3Т3 на поверхности фиброинового матрицка через 14 дней культивирования.

Снимок получен с помощью электронной сканирующей микроскопии

Через 4 суток культивирования фибробласты 3Т3 заполняли внутренние полости матрицков (рисунок 7, 8).

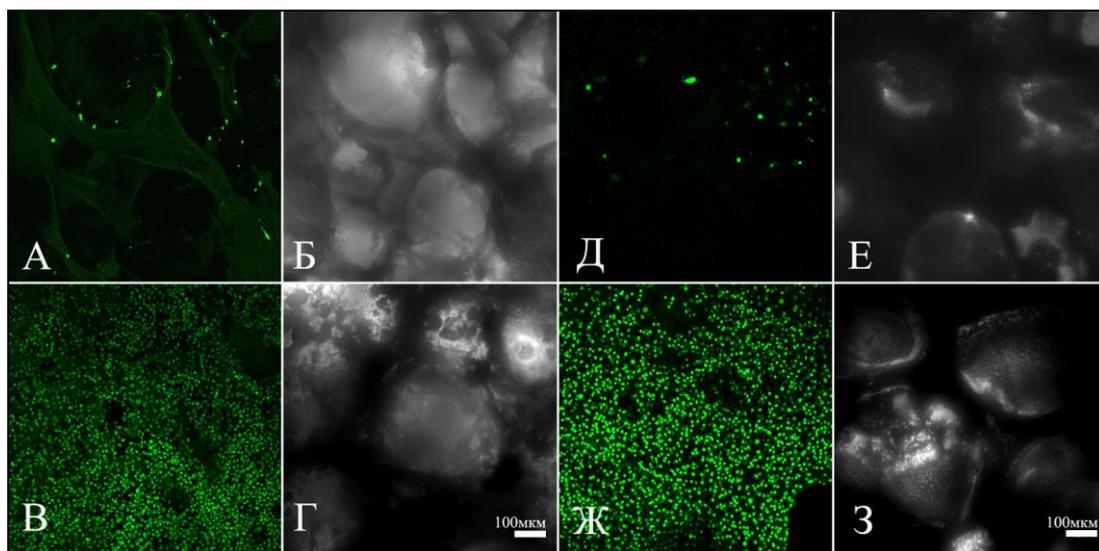


Рисунок 7 — Проплиферация фибробластов мыши линии 3Т3 на поверхности ФМ и МФМ.

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 суток культивирования; Б, Г, Е, З — поверхность матриц в проходящем свете.

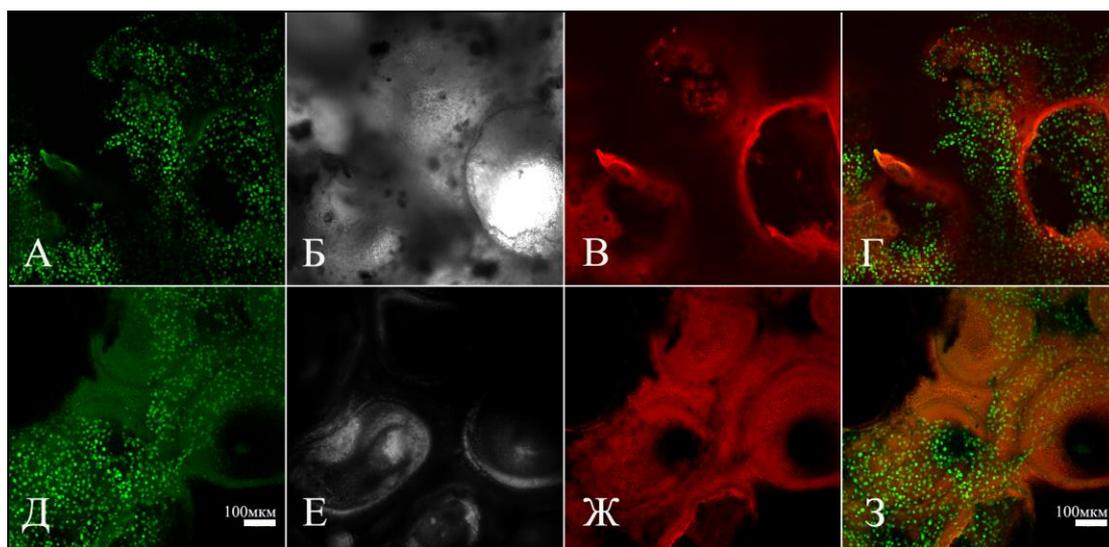


Рисунок 8 — Проплиферация фибробластов мыши линии 3Т3 на поверхности МФМ через 4 суток культивирования на разных участках матрикса.

Снимок получен с помощью конфокальной сканирующей микроскопии.

Ядра клеток окрашены SYTOX Green, матрикс окрашен красителем TRITC; А, Д, — Ядра клеток окрашены SYTOX Green; Б, Е — поверхность матриц 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 (рисунок 9). 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 (рисунок 9).

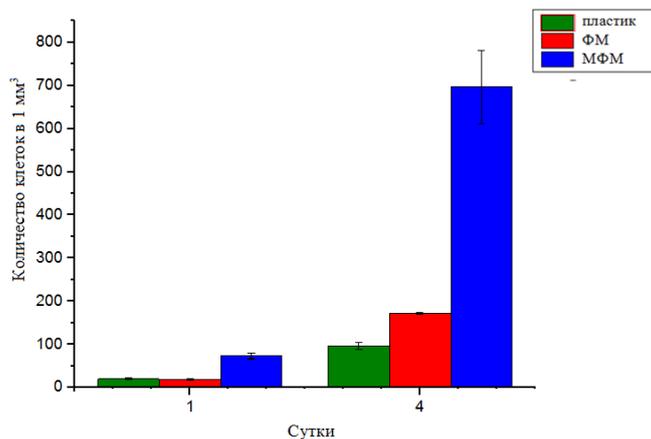


Рисунок 9 — Динамика пролиферации фибробластов мыши линии 3Т3, культивируемых на матриксах.

Зеленые столбцы — культуральный пластик; красные столбцы — ФМ; синие столбцы — МФМ.

Поверхность ФМ в равной мере обеспечивала адгезию и пролиферацию клеток фибробластов 3Т3. Адгезия на поверхности фиброина происходила без дополнительного введения в первичную последовательность фиброина RGD (аргинин-глицин-аспартат) содержащих мотивов, которые обеспечивают высокие адгезивные и пролиферативные свойства коллагена, но отсутствуют в фиброине. Пролиферация клеток фибробластов линии 3Т3 происходила без внесения в матрикс остеоиндуктивных факторов, таких как BMP-2 и IGF-I, как это было сделано в ряде исследований (Wang et al., 2009). Схожий с настоящим исследованием результат, где эффективная пролиферация клеток на поверхности фиброиновых матриксов происходила без внесения остеоиндуктивных факторов был получен в ряде недавних работ (Shen et al., 2016; Yoo et al., 2016). Введение гидроксиапатита в состав фиброиновых матриксов стимулировало пролиферацию клеток и не подавляло увеличение числа эукариотических клеток, в отличие от результатов, установленных в работе Бхамиратана (Bhumiratana et al., 2011).

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

Пролиферация мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на поверхности микроносителей. Клетки МСК активно пролиферировали на поверхности фиброиновых микроносителей (рисунок 10).

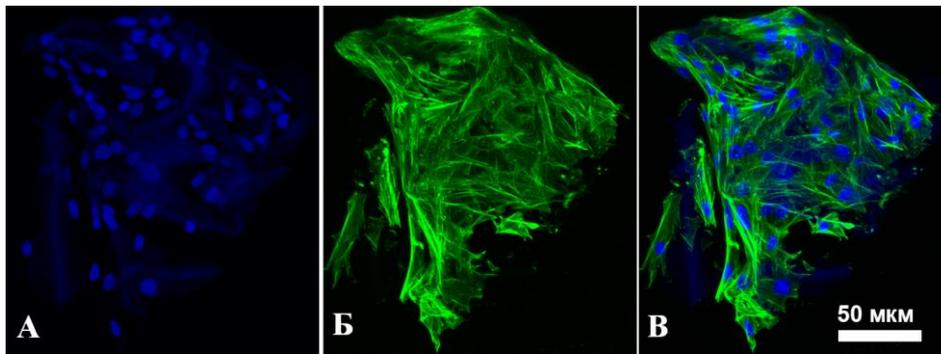


Рисунок 10 — МСК на фибриновых микроносителях на 7 день культивирования.

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 красителей phalloidin и FITC; 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 (рисунок 11 А). Наблюдаемое повышение уровня щелочной фосфатазы при культивировании клеток на минерализованных микроносителях и замедление пролиферации в условиях отсутствия индуцирующих остеогенез факторов (рисунок 11 Б) 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 (рисунок 11 В). 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 фибриновых микроносителях.

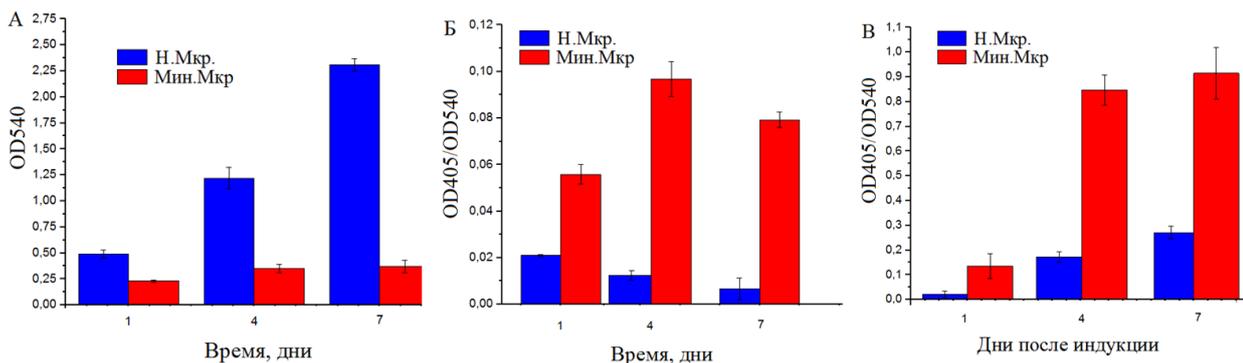


Рисунок 11 — Исследование влияния минерализации фибриновых микроносителей на пролиферацию и уровень экспрессии щелочной фосфатазы клетками МСК.

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

Пролиферация остеобласт-подобных клеток на поверхности микроносителей. Остеобласт-подобные клетки линии MG-63 активно пролиферировали на поверхности минерализованных и неминерализованных микроносителей (рисунок 12).

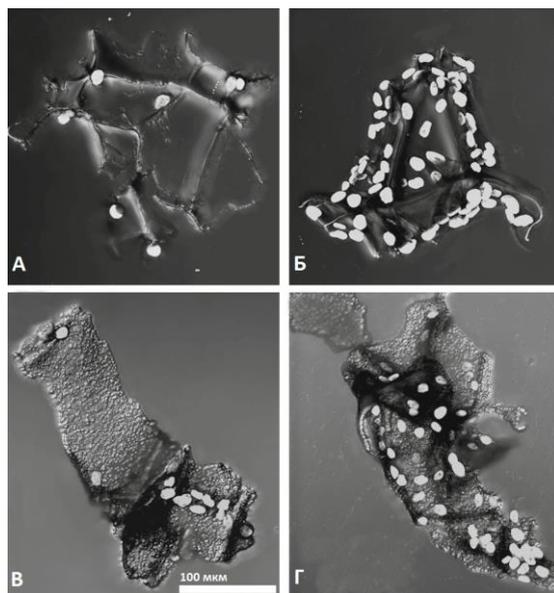


Рисунок 12 — Пролиферации остеобласт-подобных клеток MG-63 на поверхности трехмерных фибриновых микроносителей.

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.

Экспрессию в 2D- и 3D-условиях сравнили с экспрессией, индуцированной 10^{-8} М дексаметазона. Культивирование в 3D-условиях на фибриновых носителях способствовало повышению уровня щелочной фосфатазы, что указывает на способность трехмерных микроносителей к стимулированию остеогенеза даже в отсутствие индукторов. При индукции дексаметазоном различия в уровнях щелочной фосфатазы при культивировании в 2D- и 3D-условиях не были выявлены. Экспрессия щелочной фосфатазы могла стимулироваться как фибрином микроносителя, так и 3D-условиями, а также совместным действием обоих факторов. Минерализация микроносителей усиливала их остеогенный эффект.

Через 24 ч 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. Эта разница нивелировалась на 7-й день культивирования (рисунок 13).

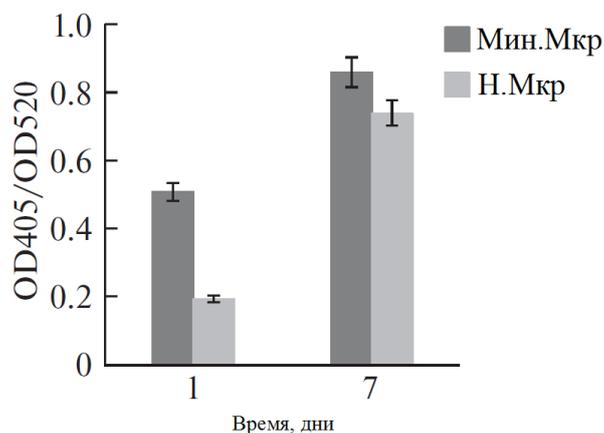


Рисунок 13 — Исследование влияния минерализации фиброинового микроносителя на пролиферацию и уровень щелочной фосфатазы остеобласт-подобных клеток MG-63.

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

Перестройка цитоскелета при адгезии клеток на микроносителях. В цитоскелете клеток MG-63, культивируемых на поверхности культурального пластика выявляются актиновые стресс-фибриллы. При культивировании клеток MG-63 на поверхности неминерализованных фиброинового микроносителя в них формировался кортикальный актин, а доля стресс-фибрилл была существенно снижена. На минерализованных фиброинового микроносителях стресс-фибриллы практически отсутствовали (рисунок 14).

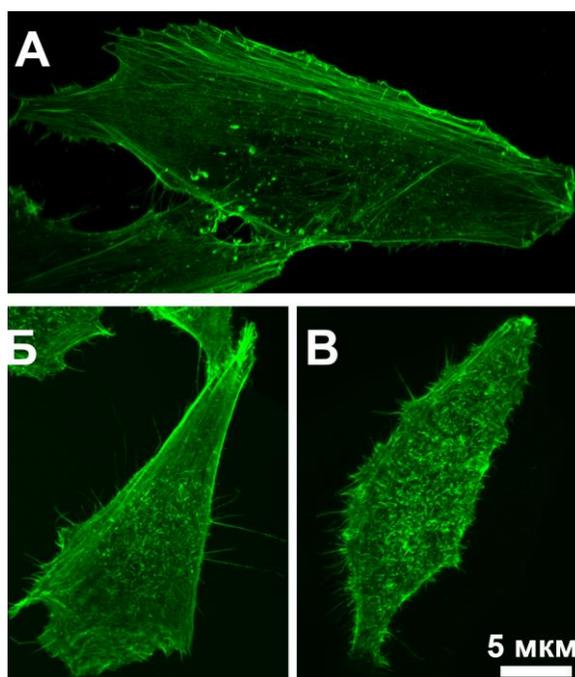


Рисунок 14 — Структура актиновых комплексов клеток остеосаркомы человека линии MG-63 на поверхностях разных носителей.

Цитоскелет окрашен красителем Alexa Fluo-488 phalloidin; А — культуральный пластик; Б — неминерализованные микроносители; В — минерализованные микроносители.

Таким образом, нами было установлено, что при культивировании на минерализованных фиброинового микроносителях остеобласт-подобных клеток MG-63 и МСК увеличивается уровень экспрессии щелочной фосфатазы, являющейся маркёром

остеогенеза. Культивирование в трехмерных условиях сопровождается реорганизацией актинового цитоскелета. Подобные микроносители перспективны для разработки биоинженерных продуктов, предназначенных для регенерации костной ткани.

Оценка биосовместимости в экспериментах *in vivo*. Через 2 месяца подкожной имплантации фиброинового матрикса, в него вросли 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).

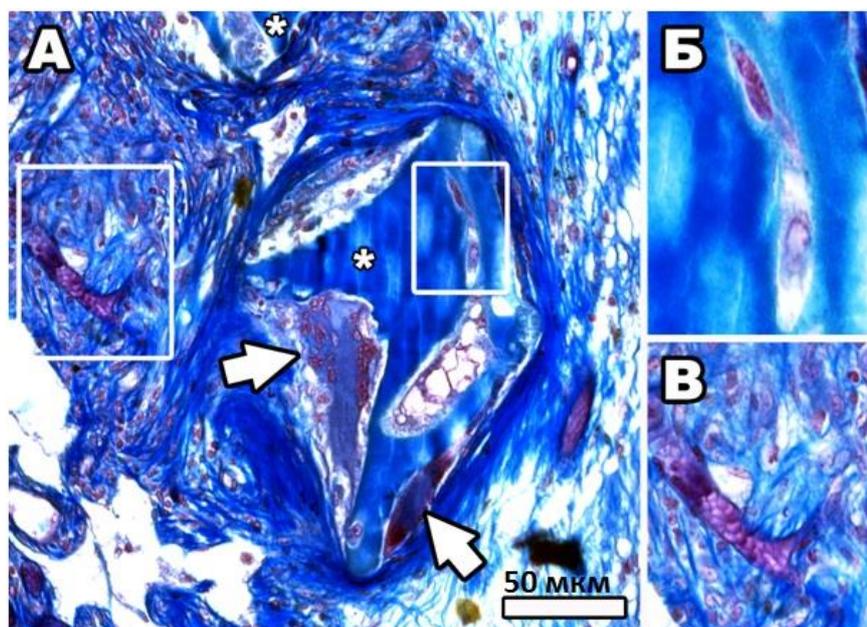


Рисунок 15 — Гистологический анализ тканей в области имплантации фиброинового матрикса через 2 месяца.

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.

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*.

Регенерация костной ткани при использовании фиброиновых имплантатов. Регенерацию костной ткани оценивали гистологическими и рентгеномографическими методами, анализируя материал, извлеченный из зоны травмы.

Гистологический анализ области имплантации. Через 1 неделю после имплантации ФМ (рисунок 16 А) материал имплантата окружен клетками стромы костного мозга. Внутри структуры матрикса также выявляются клетки этого типа (рисунок 16 Г, Д). В то время как при имплантации МФМ (рисунок 16 Б) на месте материала имплантата

формируется костная ткань (рисунок 16 Е, Ж). При этом на границе материала МФМ и новообразованной костной трабекулы (рисунок 16 Е) и внутри самого имплантата выявляются остеобласты (рисунок 16 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 16 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 16 В), но были обнаружены остеокласты, перестраивающие разрушенные фрагменты кости на периферии зоны травмы (рисунок 16 И). На периферии травмы были выявлены отдельные участки формирующейся грубоволокнистой костной ткани и клетки стромы костного мозга (рисунок 16 З, И).

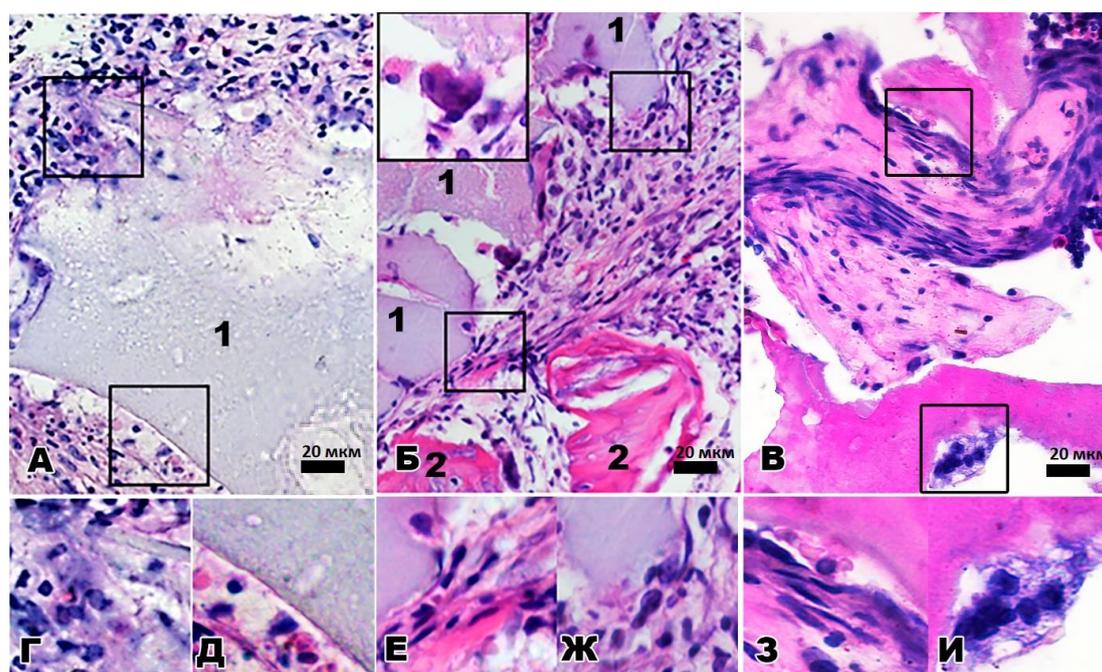


Рисунок 16 — Зона имплантации трехмерных матриксов через 1 неделю.

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 17 А) через 4 недели внутри материала имплантата формируется костная ткань (рисунок 17 А, Г), на поверхности фиброина выявляются остеогенные клетки (рисунок 17 Г). При этом костные трабекулы обнаруживаются преимущественно на периферии (рисунок 17 А). При имплантации МФМ на поверхности материала выявляется значительно больше остеогенных клеток, а костные трабекулы обнаруживаются не только на периферии имплантата (рисунок 17 Б). На поверхности материала матриксов также обнаружены остеокласты, что свидетельствует об активных процессах биорезорбции имплантатов (рисунок 12 Д). В контрольной группе в области повреждения выявлялись скопления клеток стромы костного мозга (рисунок 17 В, З).

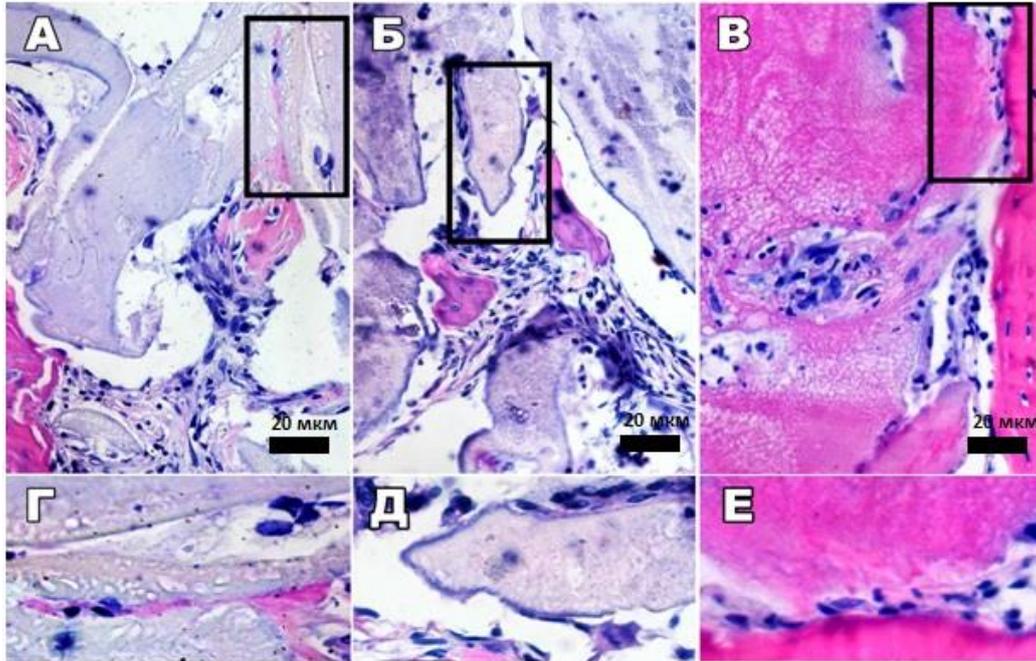


Рисунок 17 — Зона имплантации трехмерных матриксов через 4 недели.

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).

Рентгенотомографическая 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 (рисунок 18).

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) (рисунок 18).

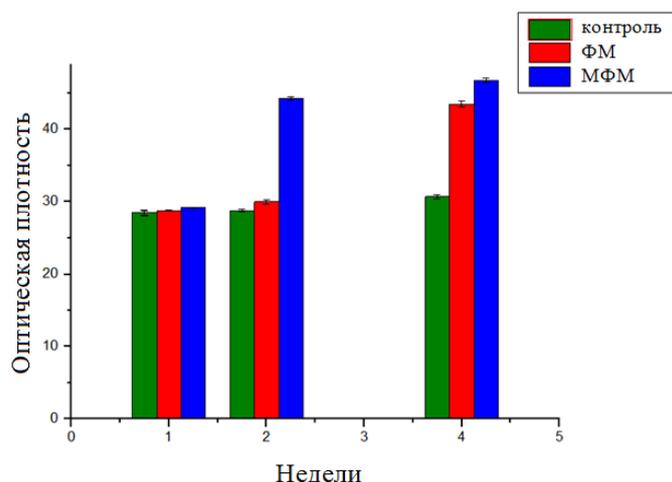


Рисунок 18 — Оптическая плотность зоны травмы после имплантации матрикса в единицах Хаунсфилда.

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

Имплантация ФМ и МФМ в костную ткань в область искусственного дефекта костной ткани приводит к ускорению неоостеогенеза по сравнению с контролем. Костная ткань и костные трабекулы формировались внутри обоих типов матриксов уже через 4 недели. Это сопоставимо со скоростью костеобразования в работе Кулен (Koolen et al. 2016), но было активнее, чем в работе Лю и Ким, где происходило через 6 недель (Lu et al. 2015; Kim et al., 2013) и в работе Хоффмана, где формирование костной ткани происходило через 8 недель (Hoffmann et al., 2013). Выраженный воспалительный ответ при имплантации разработанного материала не детектировался, что согласовалось с работой Кулен с соавторами (Koolen et al., 2016). Рентгенотомографические исследования показали, что имплантация МФМ ускоряла неоостеогенез интенсивнее, чем имплантация ФМ.

В случае имплантации МФМ присутствие остеокластов через 4 недели после введения указывало на перераспределение гидроксиапатита и перестройку структуры матрикса в условиях *in vivo*.

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Трехмерные матриксы и микроносители из фиброина могут использоваться для лечения травм опорно-двигательного аппарата в медицине и ветеринарии. При этом более целесообразно использование в терапевтической практике минерализованных вариантов.
2. Трехмерные матриксы уместно применять в случае крупных повреждений, когда важно не только вылечить травму, но восстановить саму целостность опорно-двигательного аппарата. Они могут выполнять роль биоинженерных каркасов, связывающих элементы фрагментированной костной ткани в зоне травмы.
3. Трехмерные микроносители из фиброина могут быть использованы как альтернатива матриксам, которые удобно применять в случае клеточной терапии поврежденной зоны. Результативность применения мультипотентных клеток-предшественников повышается за счет эффективной локализованной доставки, мультипотентных клеток, минимизации проблемы клеточного стресса при переносе в другую среду и остеогенных свойств самих трехмерных микроносителей.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

I. Публикации в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК

Коньков, А.С. Биосовместимые материалы из регенерированного шелка для тканевой инженерии и лекарственной терапии / **А.С. Коньков**, О.Л. Пустовалова, И.И. Агапов // Биотехнология. – 2010. – №.1. – С. 9-16. РИНЦ, ИФ = 0,496, Цит. РИНЦ – 7.

Агапов, И.И. Биодegradируемые матриксы из регенерированного шелка *Bombix mori* / И.И. Агапов, М.М. Мойсенович, Т.В. Васильева, О.Л. Пустовалова, **А.С. Коньков**, А.Ю. Архипова, О.С. Соколова, В.Г. Богуш, В.И. Севастьянов // Доклады Академии Наук. – 2010. – Т. 433. – С. 1–4. РИНЦ, ИФ = 1,035, Цит. РИНЦ – 9.

Агапов, И.И., Биокompозитные матриксы из фиброина шелка и наногидроксиапатита для регенерации костной ткани / И.И. Агапов, М.М. Мойсенович, Т.В. Дружинина, Я.А. Каменчук, К.В. Трофимов, Т.В. Васильева, **А.С. Коньков**, А.Ю. Архипова, В.В. Гузеев, М.П. Кирпичников // Доклады Академии Наук. – 2011. – Т. 440. – С. 228-230. РИНЦ, ИФ = 1,035, Цит. РИНЦ – 1, Цит. Scopus = 7

Котлярова, М.С. Индукция остеогенной дифференцировки остеобластоподобных клеток mg-63 при культивировании в трехмерных условиях на фиброиновых микроносителях / М.С. Котлярова, В.А. Жуйков, Ю.В. Чудинова, Д.Д. Хайдапова, А.М. Мойсенович, **А.С. Коньков**, Л.А. Сафонова, М.М. Боброва, А.Ю. Архипова, А.В. Гончаренко, К.В. Шайтан // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. – 2016. – № 4. – С. 34–40. РИНЦ, ИФ = 0,615

Гончаренко, А.В. Изменение морфологии актиновых филаментов и экспрессии щелочной фосфатазы при трехмерном культивировании остеобластоподобных клеток mg-63 на минерализованных фиброиновых микроносителях / А.В. Гончаренко, Н.В. Малюченко, А.М. Мойсенович, М.С. Котлярова, А.Ю. Архипова, **А.С. Коньков**, И.И. Агапов, А.В. Молочков, М.М. Мойсенович, М.П. Кирпичников // Доклады Академии наук. – 2016. – Т. 470, № 6. – С. 1–4. РИНЦ, ИФ = 1,035, Цит. РИНЦ – 3, Цит. Scopus = 4

Котлярова, М.С. Биорезорбируемые скаффолды на основе фиброина для регенерации костной ткани / М.С. Котлярова, А.Ю. Архипова, А.М. Мойсенович, Д.А. Куликов, А.В. Куликов, **А.С. Коньков**, М.А. Бобров, И.И. Агапов, М.М. Мойсенович, А.В. Молочков, А.В. Гончаренко, К.В. Шайтан // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. – 2017. – Т. 72, № 4. – С. 222–228. ИФ, РИНЦ = 0,615

Гончаренко, А.В. Остеогенная дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток на фиброиновых микроносителях / А.В. Гончаренко, М.С. Котлярова, А.М. Мойсенович, А.Ю. Архипова, **А.С. Коньков**, М.М. Мойсенович, М.П. Кирпичников // Доклады Академии наук. – 2017. – Т. 477, № 1. – С. 1–4. ИФ, РИНЦ = 1,035

II. Статьи в научных сборниках, доклады на конференциях

Коньков, А.С. Трехмерные матрицы на основе регенерированного шелка и гидроксиапатита / **А.С. Коньков**, А.Ю. Архипова, А.А. Казюлина, Т.В. Васильева, М.М. Мойсенович, В.В. Гузеев, И.И. Агапов // Материалы Международного молодежного научного форума. Ломоносов-2011. Москва. 2011. 11-15 апреля. С. 258-259.

Коньков, А.С. Биodeградируемые пленки и матрицы из регенерированного шелка в качестве основы для создания искусственных органов / **А.С. Коньков**, А.Ю. Архипова, А.А. Казюлина, Т.В. Васильева, М.М. Мойсенович, И.И. Агапов // III Евразийский конгресс по медицинской физике “Медицинская физика – 2010”. Москва. 2010. 21-25 июня. 3 том. С. 272-274.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

2D и 3D — двумерные и трехмерные условия культивирования;

3T3 (NIN 3T3) — линия эмбриональных фибробластов мыши;

ФМ — фиброиновый матрикс;

МФМ — минерализованный фиброиновый матрикс;

МСК — мезенхимальные стромальные клетки;

ГА — гидроксиапатит;

ФСБ — фосфатно-солевой буфер;

CD73, CD90, CD105, CD45 — дифференцировочные антигены лейкоцитов человека;

FITC — краситель флуоресцеин изоционат;

MG-63 — линия клеток остеосаркомы человека;

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

МТТ тест — тест для оценки жизнеспособности клеток, основанный на восстановлении клеточными оксидоредуктазными ферментами тетразолиевых красителей в формазан.

DAPI — флуоресцентный краситель 4',6-диамиидно-2-фенилиндол;

SYTOX Green — ядерный флуоресцирующий краситель

TRITC — краситель тетраметилродамин