DOI: 10.15825/1995-1191-2020-4-98-104

# МИКРОНОСИТЕЛИ В ВИДЕ ВОЛОКОН ИЗ НАТУРАЛЬНОГО ШЕЛКА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК

*М.М. Боброва, Л.А. Сафонова, А.Е. Ефимов, О.И. Агапова, И.И. Агапов* ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Разработка эффективных и универсальных микроносителей является актуальной задачей тканевой инженерии и регенеративной медицины. Цель данной работы – создание биосовместимых микрочастиц в виде волокон из коконов тутового шелкопряда *Bombyx mori*, изучение их структуры и биологических свойств. Материалы и методы. Для получения микрочастиц отмытые от серицина коконы тутового шелкопряда *Bombyx mori* подвергали криоизмельчению в жидком азоте. Анализ структуры полученных микрочастиц осуществляли методом сканирующей электронной микроскопии. Оценку цитотоксичности полученных волокон проводили методом МТТ с использованием культуры клеток мышиных фибробластов 3Т3. Анализ адгезии клеток проводили с использованием линии клеток гепатокарциномы человека Нер-G<sub>2</sub>, визуализацию клеток осуществляли путем окрашивания ядер флуоресцентным красителем DAPI. Результаты. Были получены микрочастицы из натурального шелка в виде цилиндрических волокон со средней длиной 200-400 мкм и диаметром 15 мкм. Показано, что поверхность полученных микрочастиц имеет шероховатый рельеф, пор обнаружено не было. Микрочастицы являются не токсичными для клеток мышиных фибробластов 3Т3, поддерживают высокий уровень адгезии клеток гепатокарциномы человека Нер-G<sub>2</sub>. Заключение. Разработанная нами методика получения биосовместимых микрочастиц из фиброина шелка в виде волокон без использования токсичных реагентов и значительных временных затрат является перспективной для культивирования клеток и доставки клеток в область повреждения для восстановления тканей и органов.

Ключевые слова: микроносители, фиброин шелка, волокна.

# NATURAL SILK FIBER MICROCARRIERS FOR CELL CULTURE

*M.M. Bobrova, L.A. Safonova, A.E. Efimov, O.I. Agapova, I.I. Agapov* Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

The development of effective and versatile microcarriers is a pressing issue in tissue engineering and regenerative medicine. The **objective** of this work is to create biocompatible fiber microparticles from the cocoons of the *Bombyx mori* silkworm, and to study their structure and biological properties. **Materials and methods.** In obtaining microparticles, the *Bombyx mori* cocoons washed from sericin were cryo-milled in liquid nitrogen. The structure of the resulting microparticles was analyzed via scanning electron microscopy. The cytotoxicity of the obtained fibers was assessed using MTT-cell culture assay of 3T3 mouse fibroblasts. Cell adhesion analysis was performed using the Hep-G<sub>2</sub> human hepatocarcinoma cell line. Cell visualization was performed by staining the nuclei with DAPI fluorescent dye. **Results.** Natural silk microparticles were obtained in the form of cylindrical fibers with 200–400 µm average length and 15 µm diameter. It was shown that the surface of the resulting microparticles has a rough relief; no pores were found. The microparticles are non-toxic for 3T3 mouse fibroblasts, they maintain a high level of adhesion by human hepatocellular carcinoma HepG<sub>2</sub> cells **Conclusion.** The method developed by us for fabrication of biocompatible silk fibroin microparticles in the form of fibers without using toxic reagents and significant time costs is promising for cell cultivation and delivery to the damaged area for tissue and organ regeneration.

Keywords: microcarriers, silk fibroin, fibers.

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

**Corresponding author:** Igor Agapov. Address: 1, Shchukinskaya str., 123182, Moscow, Russian Federation. Phone: (499) 190-66-19. E-mail: igor\_agapov@mail.ru

# введение

Традиционно используемое двухмерное культивирование клеток в некоторой степени искажает поведение клеток и их биологические функции по сравнению с клетками в нативной ткани [1, 2]. Так, при двухмерном культивировании in vitro опухолевых клеток был показан более медленный рост опухоли и более низкая лекарственная устойчивость по сравнению с опухолями in vivo, что приводит к снижению эффективности скрининга и тестирования лекарственных средств [3, 4]. Также малоэффективно терапевтическое применение культуры клеток изза низкого уровня жизнеспособности клеток, и как следствие, минимальной эффективности регенерации поврежденной ткани [5–7]. Это главным образом связано с тем, что в двухмерной культуре *in vitro* клетки не способны воссоздать эффективные и разнонаправленные взаимодействия «клетка-клетка» и «клетка-межклеточный матрикс», присутствующие в нативном микроокружении, что вызывает изменения клеточной морфологии и экспрессии генов. Чтобы получить клетки с нормальной морфологией, метаболизмом и функциями, применяется трехмерное культивирование клеток на различных микроносителях [8, 9].

В регенеративной медицине микроносители широко используются как в качестве подложки для культивирования различных типов клеток, так и в качестве средства доставки клеток в поврежденный участок ткани или органа [10]. Когда микроносители используют в качестве системы доставки, клетки остаются жизнеспособными в течение более длительного периода времени [11], что дает им возможность секретировать факторы роста и активно участвовать в новообразовании межклеточного матрикса, способствуя регенерации ткани [12]. Используются как натуральные, так и синтетические биополимеры для получения микроносителей разных типов и для регенерации различных тканей [13–16].

Одним из перспективных материалов для создания биосовместимых микроносителей для тканевой инженерии и регенеративной медицины является фиброин шелка из коконов тутового шелкопряда *Bombyx mori* [17]. Структура фиброина шелка обеспечивает уникальные свойства, позволяющие использовать его в качестве материала для тканевой инженерии. Главное преимущество шелка по сравнению с другими биосовместимыми материалами заключается в его механических свойствах. К преимуществам фиброина как материала, применяемого в регенеративной медицине, относится и то, что конструкции из него биодеградируемые и биосовместимые, они могут быть получены в мягких условиях, и их изготовление не требует особой химической обработки. Фиброин шелка способствует клеточной адгезии, пролиферации и дифференцировке, в том числе мезенхимальных стволовых клеток [18–20]. Так, микрочастицы на основе фиброина шелка используются для регенерации костной ткани [21], нервной ткани [22], доставки стволовых клеток [23]. Таким образом, фиброин обладает уникальными свойствами, которые позволяют формировать из него двухмерные и трехмерные конструкции, в том числе микроносители, и широко использовать его в качестве биосовместимого материала в различных направлениях тканевой инженерии.

В рамках данного исследования разработаны биосовместимые микроносители из коконов тутового шелкопряда *Bombyx mori* в виде волокон, исследована их структура и показана возможность применения в тканевой инженерии.

# МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Получение микроносителей

В качестве источника волокон фиброина шелка использовали коконы тутового шелкопряда Bombvx *mori*, предоставленные директором Государственного научного учреждения «Республиканская научноисследовательская станция шелководства Российской академии сельскохозяйственных наук» В.В. Богословским (Ставропольский край, г. Железноводск). На первом этапе коконы подвергали очистке от серицина по следующей методике. Навеску шелка из коконов массой 1 г кипятили на водяной бане в 500 мл бидистиллированной воды с добавлением 1260 мг соды в течение 40 минут. Затем промывали 3,6 л дистиллированной воды. Далее кипятили в 500 мл бидистиллированной воды 30 минут и промывали 3,6 л дистиллированной воды. Последнюю процедуру повторяли 3 раза. Очищенный фиброин шелка сушили на воздухе при комнатной температуре. Далее фиброин шелка массой 80 мг помещали в 3% водный раствор глицерина, инкубировали 120 минут и замораживали в жидком азоте, после чего фиброин измельчали в течение 5 минут при помощи ступки и пестика до среднего размера волокон 200-400 мкм. Полученные волокна переносили в 5 мл 70% этанола на 30 минут, а затем производили смену этанола [24].

# Анализ структуры микроносителей методом сканирующей электронной микроскопии

Исследуемые образцы волокон фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида в фосфатносолевом буфере с pH = 7,4 в течение 2 часов в темноте при 4 °C, отмывку образцов от фиксирующего раствора проводили фосфатно-солевым буфером (pH = 7,4) 5 раз по 5 минут. Затем образцы дегидратировали возрастающими концентрациями этанола. Использовали концентрации этанола 10, 20, 50, 70 и 96%, инкубируя образцы по 1 часу в этаноле каждой концентрации. После этого образцы переносили в ацетон на 30 минут, а затем производили смену ацетона.

Образцы высушивали методом перехода критической точки ( $T_{\kappa p.CO_2} = 31$  °C,  $p_{\kappa p.CO_2} = 72,8 \ \kappa \Gamma/cm^2$ ) с помощью прибора K850 (Quorum Technologies, Великобритания). Высушенные образцы покрывали слоем золота толщиной 10 нм в атмосфере аргона при ионном токе 20 мА и давлении 1 мбар с помощью вакуумной напылительной установки Q150R ES (Quorum Technologies, Великобритания), затем анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа Tescan Vega3 (Tescan, Чехия). Пространственное разрешение микроскопа 3 нм, рабочее напряжение 15 кВ. Получение и анализ изображений производили с помощью программного обеспечения VegaTC (Tescan, Чехия).

#### Анализ цитотоксичности микроносителей

В экспериментах использовали линию мышиных фибробластов 3Т3. Клетки культивировали в пластиковых флаконах в среде DMEM с низким содержанием глюкозы, содержащей 10% бычьей эмбриональной сыворотки, 0,324 мг/мл глутамина и 10 мг/мл гентамицина при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>. Смену культуральной среды производили каждые 48 часов. Монослой клеток дезагрегировали с помощью раствора трипсина-версена, производили подсчет клеток в камере Горяева и рассаживали в соотношении 1/3.

Анализ цитотоксичности всех полученных образцов проводили согласно ГОСТ ISO 10993-5-2011 [25] с помощью МТТ-теста [26] в модели линии клеток мышиных фибробластов 3Т3.

Для этого мышиные фибробласты 3Т3 культивировали в 300 мкл культуральной среды в 96-луночном планшете в термостате при 37 °С и 5% СО<sub>2</sub> в течение 3 дней. Затем производили смену культуральной среды и вносили 50 мкл суспензии волокон в лунки планшета. В качестве контроля использовали культуральный пластик. Планшеты инкубировали в термостате при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Оценку цитотоксичности проводили на 3, 5 и 7-е сутки эксперимента. Для этого в каждую лунку планшета вносили по 60 мкл раствора МТТ с концентрацией 5 мг/мл. Инкубировали в термостате при 37 °С и 5% СО<sub>2</sub> в течение 4 часов до выпадения темно-синих кристаллов формазана. Затем волокна удаляли из лунок, а планшет центрифугировали в течение 5 минут при 885 g. Супернатант удаляли, осадок формазана растворяли в 300 мкл диметилсульфоксида в течение 20 минут и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 540 нм на установке Picon (Picon incorporated company, Униплан, Россия).

#### Анализ адгезии клеток на микроносителях

В эксперименте по адгезии использовали линию клеток гепатокарциномы человека Нер-G<sub>2</sub>. Клетки инкубировали в пластиковых культуральных флаконах в смеси 1:1 сред DMEM с высоким содержанием глюкозы и Ham's F-12, содержащей 10% бычьей эмбриональной сыворотки, 0,324 мг/мл глутамина и 10 мг/мл гентамицина, при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub>.

Эксперимент проводили в 96-луночном планшете. Для проведения эксперимента суспензию волокон объемом 150 мкл переносили в лунки планшета. В качестве контроля использовали культуральный пластик. После этого в планшет вносили стерильный раствор фосфатно-солевого буфера (pH = 7,4) и инкубировали в течение 15 минут, после чего производили смену фосфатно-солевого буфера. Данную процедуру повторяли три раза. Далее в планшет вносили по 300 мкл среды инкубации на 30 минут.

Суспензию клеток в среде инкубации переносили в 96-луночные планшеты из расчета 1000 клеток в лунку. Инкубировали в термостате при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 7 дней.

Оценку адгезии проводили визуально с помощью микроскопа Carl Zeiss Axio Vert.A1 (Zeiss, Германия). Для этого образцы окрашивали флуоресцентным красителем DAPI, который связывается с ДНК клеток. Перед окрашиванием производили двукратную отмывку образцов от среды инкубации и неадгезированных клеток раствором фосфатно-солевого буфера (pH = 7,4). После этого вносили водный раствор красителя с концентрацией 3 мкг/мл из расчета 300 мкл на лунку и инкубировали в термостате при 37 °С и 5% СО<sub>2</sub> в течение 5 минут. Затем образцы двукратно отмывали от несвязавшегося красителя раствором фосфатно-солевого буфера (pH = 7,4). Полученные образцы анализировали на флуоресцентном микроскопе с помощью фильтра с диапазоном возбуждения 360-370 нм, диапазоном эмиссии 420-470 нм.

Изображения клеток получали с помощью камеры Axiocam 305 color (Carl Zeiss, Германия), полученные изображения обрабатывали в программе Zen 2.3 Blue Edition (Carl Zeiss, Германия).

## Статистическая обработка результатов

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



Рис. 1. Получение микроносителей в виде волокон: а – коконы тутового шелкопряда *Bombyx mori*; б – очищенный от серицина фиброин шелка; в – микроносители в виде волокон. Масштабный отрезок 100 мкм

Fig. 1. Fabrication of fiber microcarriers: a - Bombyx mori silkworm cocoons;  $\delta$  – sericin-free silk fibroin; B – fiber microcarriers. Scale bar 100  $\mu$ m

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках данного исследования была получена суспензия микрочастиц из коконов тутового шелкопряда Bombyx mori с помощью криоизмельчения (рис. 1). Микрочастицы представляют собой цилиндрические фрагменты волокон кокона шелкопряда со средней длиной 200-400 мкм и диаметром 15 мкм. Такая форма микрочастиц имеет высокое отношение площади поверхности к объему, а следовательно, и большую площадь поверхности, доступной для адгезии клеток и для формирования большего количества клеточных контактов по сравнению со сферическими частицами. Фиброин шелка является одним из перспективных материалов для тканевой инженерии за счет уникальной комбинации механических свойств и высокого уровня биосовместимости и может найти применение во многих областях тканевой инженерии, как в качестве самостоятельного материала для создания конструкций, так и в качестве носителя для клеточной доставки или направленной доставки лекарственных средств [27]. Преимущество предлагаемой технологии изготовления микроносителей в виде волокон заключается в получении биосовместимых носителей для клеток регулируемого размера и формы без использования токсичных реагентов и значительных временных затрат. Регулирование размера и формы микроносителя может осуществляться за счет варьирования времени криоизмельчения и объема измельчаемого отмытого фиброина шелка. Также форма микроносителей в виде волокна позволяет упростить позиционирование клеток при направленной доставке и способствует ориентированию клеток.

Структура полученных микроносителей была исследована методом сканирующей электронной микроскопии. Поверхность волокон имеет микро- и нанорельеф в виде шероховатостей (рис. 2). Данным методом не было выявлено пор в структуре микроносителей. Известно, что поверхностная структура конструкции оказывает влияние на адгезию клеток [28, 29]. Это объясняется тем, что наличие шероховатостей на поверхности субстрата увеличивает площадь поверхности, доступную для адгезии клеток. В то же время для каждой культуры клеток существует оптимальный уровень шероховатости субстрата [30].

Полученные микроносители были исследованы на цитотоксичность методом МТТ. В ходе исследования оценивали влияние образцов на количество клеток, культивированных на пластике. В качестве контроля использовали культуральный пластик.



Рис. 2. Изображение микроносителя, полученное с помощью сканирующей электронной микроскопии. Масштабный отрезок 100 мкм

Fig. 2. Image of the microcarrier obtained using scanning electron microscopy. Scale bar 100  $\mu m$ 



Рис. 3. Адгезия клеток Нер-G<sub>2</sub> на полученных микроносителях: а – изображение в проходящем свете, масштабный отрезок 200 мкм; б – флуоресцентное изображение, ядра адгезировавших клеток, окрашенных DAPI, обозначены стрелками, масштабный отрезок 20 мкм

Fig. 3. Adhesion of Hep-G2 cells on the obtained microcarriers: a - optical image, scale bar 200  $\mu$ m;  $\delta$  – fluorescent image, nuclei of DAPI-stained adherent cells are indicated by arrows, scale bar 20  $\mu$ m

В ходе эксперимента не было выявлено цитотоксического эффекта полученных волокон, количество клеток не отличалось в экспериментальных и контрольных образцах.

Анализ адгезии клеток на полученных микроносителях в виде волокон производили визуально с помощью флуоресцентного микроскопа, предварительно клетки окрашивали флуоресцентным красителем DAPI для визуализации ядер. Волокна позиционировали в лунках культуральных планшетов, в качестве контроля использовали культуральный пластик. Исследования проводили на примере линии клеток гепатокарциномы человека Hep-G<sub>2</sub>. Результаты экспериментов представлены на рис. 3.

Морфология клеток оценивалась с помощью светового микроскопа, клетки образовывали филоподии и плотно адгезировали к субстрату, при этом адгезия клеток происходила неравномерно. Было выявлено, что полученные микроносители биосовместимы, поддерживают высокий уровень адгезии клеток, что может объясняться оптимальным уровнем шероховатости волокон и биосовместимыми свойствами фиброина шелка [31, 32]. Таким образом, полученные микроносители из фиброина шелка в виде волокон являются биосовместимыми и могут быть в дальнейшем использованы в регенеративной медицине как универсальные носители для клеток, полученные без использования токсичных реагентов и значительных временных затрат.

# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках представленной работы были получены микрочастицы из коконов тутового шелкопряда *Bombyx mori* в виде волокон со средней длиной 200–400 мкм и диаметром 15 мкм. Показано, что поверхность полученных микрочастиц имеет шероховатый рельеф, пор обнаружено не было. Микрочастицы являются не токсичными для культуры клеток мышиных фибробластов 3T3, поддерживают высокий уровень адгезии клеток гепатокарциномы человека Hep-G<sub>2</sub>. Разработанная нами методика создания биосовместимых микроносителей из коконов тутового шелкопряда *Bombyx mori* в виде волокон является перспективной для культивирования клеток и доставки клеток в область повреждения для восстановления тканей и органов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. The authors declare no conflict of interest.

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Asghar W, El Assal R, Shafiee H, Pitteri S, Paulmurugan R, Demirci U. Engineering cancer microenvironments for *in vitro* 3-D tumor models. *Mater Today* (*Kidlington*). 2015; 18 (10): 539–553. doi: 10.1016/j. mattod.2015.05.002. PMID: 28458612.
- In JG, Foulke-Abel J, Estes MK, Zachos NC, Kovbasnjuk O, Donowitz M. Human mini-guts: new insights into intestinal physiology and host-pathogen interactions.

*Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016; 13 (11): 633–642. doi: 10.1038/nrgastro.2016.142. PMID: 27677718.

- 3. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Threedimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. Assay Drug Dev Technol. 2014; 12 (4): 207–218. doi: 10.1089/ adt.2014.573. PMID: 24831787.
- Skardal A, Devarasetty M, Rodman C, Atala A, Soker S. Liver-Tumor Hybrid Organoids for Modeling Tumor Growth and Drug Response In Vitro. Ann Biomed Eng. 2015; 43 (10): 2361–2373. doi: 10.1007/s10439-015-1298-3. PMID: 25777294.
- Bao J, Shi Y, Sun H, Yin X, Yang R, Li L et al. Construction of a portal implantable functional tissue-engineered liver using perfusion-decellularized matrix and hepatocytes in rats. *Cell Transplant.* 2011; 20 (5): 753–766. doi: 10.3727/096368910X536572.
- Soto-Gutierrez A, Zhang L, Medberry C, Fukumitsu K, Faulk D, Jiang H et al. A whole-organ regenerative medicine approach for liver replacement. *Tissue Eng Part* C Methods. 2011; 17 (6): 677–686. doi: 10.1089/ten. TEC.2010.0698. PMID: 21375407.
- Zhou P, Lessa N, Estrada DC, Severson EB, Lingala S, Zern MA et al. Decellularized liver matrix as a carrier for the transplantation of human fetal and primary hepatocytes in mice. *Liver Transpl.* 2011; 17 (4): 418–427. doi: 10.1002/lt.22270. PMID: 21445925.
- Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007; 8 (10): 839–845. doi: 10.1038/nrm2236. PMID: 17684528.
- Achilli TM, Meyer J, Morgan JR. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opin Biol Ther.* 2012; 12 (10): 1347–1360. doi: 10.1517/14712598.2012.707181. PMID: 22784238.
- Chen AK, Reuveny S, Oh SK. Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: achievements and future direction. *Biotechnol Adv.* 2013; 31 (7): 1032–1046. doi: 10.1016/j. biotechadv.2013.03.006. PMID: 23531528.
- 11. *Quittet MS, Touzani O, Sindji L, Cayon J, Fillesoye F, Toutain J et al.* Effects of mesenchymal stem cell therapy, in association with pharmacologically active micro-carriers releasing VEGF, in an ischaemic stroke model in the rat. *Acta Biomater.* 2015; 15: 77–88. doi: 10.1016/j. actbio.2014.12.017. PMID: 25556361.
- Georgi N, van Blitterswijk C, Karperien M. Mesenchymal stromal/stem cell-or chondrocyte-seeded microcarriers as building blocks for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2014; 20 (17–18): 2513–2523. doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0681. PMID: 24621188.
- Yang Y, Rossi FM, Putnins EE. Ex vivo expansion of rat bone marrow mesenchymal stromal cells on microcarrier beads in spin culture. *Biomaterials*. 2007; 28 (20): 3110–3120. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.03.015. PMID: 17433434.
- 14. Chen M, Wang X, Ye Z, Zhang Y, Zhou Y, Tan WS. A modular approach to the engineering of a centimeter-

sized bone tissue construct with human amniotic mesenchymal stem cells-laden microcarriers. *Biomaterials*. 2011; 32 (30): 7532–7542. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.06.054. PMID: 21774980.

- 15. *Zhou Y, Yan Z, Zhang H, Lu W, Liu S, Huang X et al.* Expansion and delivery of adipose-derived mesenchymal stem cells on three microcarriers for soft tissue regeneration. *Tissue Eng Part A.* 2011; 17 (23–24): 2981–2997. doi: 10.1089/ten.tea.2010.0707. PMID: 21875329.
- Sun LY, Hsieh DK, Syu WS, Li YS, Chiu HT, Chiou TW. Cell proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells on biodegradable microcarriers enhances in vitro differentiation potential. *Cell Prolif.* 2010; 43 (5): 445–456. doi: 10.1111/j.1365-2184.2010.00694.x. PMID: 20887551.
- Agapov II, Moisenovich MM, Vasilyeva TV, Pustovalova OL, Kon'kov AS, Arkhipova AY et al. Biodegradable matrices from regenerated silk of *Bombix mori. Dokl Biochem Biophys.* 2010; 433: 201–204. doi: 10.1134/S1607672910040149.
- Uebersax L, Merkle HP, Meinel L. Insulin-like growth factor I releasing silk fibroin scaffolds induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Control Release*. 2008; 127 (1): 12–21. doi: 10.1016/j. jconrel.2007.11.006. PMID: 18280603.
- Altman AM, Gupta V, Ríos CN, Alt EU, Mathur AB. Adhesion, migration and mechanics of human adiposetissue-derived stem cells on silk fibroin-chitosan matrix. Acta Biomater. 2010; 6 (4): 1388–1397. doi: 10.1016/j. actbio.2009.10.034. PMID: 19861180.
- Kotliarova MS, Zhuikov VA, Chudinova YV Khaidapova DD, Moisenovich AM, Kon'kov AS et al. Induction of osteogenic differentiation of osteoblast-like cells MG-63 during cultivation on fibroin microcarriers. Moscow Univ Biol Sci Bull. 2016; 71: 212–217. doi: 10.3103/ S0096392516040052.
- Luetchford KA, Chaudhuri JB, De Bank PA. Silk fibroin/gelatin microcarriers as scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2020; 106: 110116. doi: 10.1016/j.msec.2019.110116. PMID: 31753329.
- Moisenovich MM, Plotnikov EY, Moysenovich AM, Silachev DN, Danilina TI, Savchenko ES et al. Effect of Silk Fibroin on Neuroregeneration After Traumatic Brain Injury. Neurochem Res. 2019; 44 (10): 2261–2272. doi: 10.1007/s11064-018-2691-8. PMID: 30519983.
- Perteghella S, Martella E, de Girolamo L, Perucca Orfei C, Pierini M, Fumagalli V et al. Fabrication of Innovative Silk/Alginate Microcarriers for Mesenchymal Stem Cell Delivery and Tissue Regeneration. Int J Mol Sci. 2017; 18 (9): 1829. doi: 10.3390/ijms18091829. PMID: 28832547.
- 24. Агапов ИИ, Агапова ОИ, Боброва ММ, Сафонова ЛА, Ефимов АЕ. Микроноситель для клеток на основе натурального шелка и способ его получения. Патент на изобретение RU2732598 C1, 21.09.2020. Agapov II, Agapova OI, Bobrova MM, Safonova LA, Efimov AE. Mikronositel' dlya kletok na osnove natural'nogo shel-

ka i sposob ego polucheniya. Patent na izobretenie RU2732598 S1, 21.09.2020.

- 25. ГОСТ ISO 10993-1-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы *in vitro*». М.: Стандартинформ, 2014. GOST ISO 10993-1-2011 «Izdeliya meditsinskie. Otsenka biologicheskogo deystviya meditsinskikh izdeliy. Chast' 5. Issledovanie na tsitotoksichnost': metody *in vitro*». М.: Standartinform, 2014.
- 26. *Mosmann T*. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65 (1–2): 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4. PMID: 6606682.
- Kundu B, Rajkhowa R, Kundu SC, Wang X. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. Adv Drug Deliv Rev. 2013; 65 (4): 457–470. doi: 10.1016/j. addr.2012.09.043. PMID: 23137786.
- Zhang Q, Zhao Y, Yan S, Yang Y, Zhao H, Li M et al. Preparation of uniaxial multichannel silk fibroin scaffolds for guiding primary neurons. *Acta Biomater*. 2012; 8 (7): 2628–2638. doi: 10.1016/j.actbio.2012.03.033. PMID: 22465574.
- Сафонова ЛА, Боброва ММ, Агапова ОИ, Котлярова МС, Архипова АЮ, Мойсенович ММ, Агапов ИИ. Биологические свойства пленок из регенерированного фиброина шелка. Современные технологии в медицине. 2015; 7 (3): 6–13. Safonova LA, Bobrova MM, Agapova OI, Kotliarova MS, Arkhipova AYu, Moisenovich MM, Agapov II. Biological Properties of Regenerated Silk Fibroin Films. Sovremennye tehnologii v medicine. 2015; 7 (3): 6–13. [In English]. doi: 10.17691/stm2015.7.3.01.

- 30. Сургученко ВА, Пономарева АС, Ефимов АЕ, Немец ЕА, Агапов ИИ, Севастьянов ВИ. Особенности адгезии и пролиферации фибробластов мыши линии nih/3т3 на пленках из бактериального сополимера поли(3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерата) с различной шероховатостью поверхности. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2012; 14 (1): 72-77. Surguchenko VA, Ponomareva AS, Efimov AE. Nemets EA. Agapov II. Sevastianov VI. Characteristics of adhesion and proliferation of mouse nih/3t3 fibroblasts on the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) films with different surface roughness values. Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs. 2012; 14 (1): 72-77. [In Russ. English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2012-1-72-77.
- Servoli E, Maniglio D, Motta A, Predazzer R, Migliaresi C. Surface properties of silk fibroin films and their interaction with fibroblasts. *Macromol Biosci*. 2005; 5 (12): 1175–1183. doi: 10.1002/mabi.200500137. PMID: 16315185.
- 32. Соколова АИ, Боброва ММ, Сафонова ЛА, Агапова ОИ, Мойсенович ММ, Агапов ИИ. Зависимость биологических свойств скаффолдов из фиброина шелка и желатина от состава и технологии изготовления. Современные технологии в медицине. 2016; 8 (3): 6–15. Sokolova AI, Bobrova MM, Safonova LA, Agapova OI, Moisenovich MM, Agapov II. The Relation of Biological Properties of the Silk Fibroin/Gelatin Scaffolds with the Composition and Fabrication Technology. Sovremennye tehnologii v medicine. 2016; 8 (3): 6–15. [In English]. doi: 10.17691/stm2016.8.3.01.

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