

DOI: 10.15825/1995-1191-2025-2-100-111

РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ТКАНЕВЫХ СКАФФОЛДОВ ИЗ НАТУРАЛЬНОГО ШЕЛКА

Е.И. Подболотова^{1, 2}, Л.А. Кирсанова¹, Е.Г. Кузнецова¹, Н.В. Грудинин¹,
А.Р. Пашутин^{1, 2}, О.И. Агапова¹, А.Е. Ефимов¹, Е.А. Немец¹, Ю.Б. Басок¹, И.И. Агапов¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет)», Долгопрудный, Российская Федерация

Цель: исследование биодegradации тканевых скаффолдов из натурального шелка в условиях *in vitro* и *in vivo* для оценки их перспектив в тканевой инженерии. **Материалы и методы.** Были использованы два типа тканевых скаффолдов из натурального шелка: «Фиброплен-Атлас» и «Фиброплен-Газ», а также их модифицированные версии. Биодegradацию *in vitro* изучали в растворе Фентона. Исследования *in vivo* проводили на крысах с гистологическим и морфометрическим анализом имплантатов через 4, 14 и 56 суток. **Результаты.** Исследования биодegradации *in vitro* показали, что «Фиброплен-Газ» полностью разлагается за <15 суток, а «Фиброплен-Атлас» сохраняется до 45 суток. Исследования *in vivo* выявили постепенную резорбцию всех образцов, с более выраженной дegradацией у «Фиброплен-Газ». Гистологическое исследование показало макрофагальную реакцию с образованием гигантских клеток инородного тела и признаки васкуляризации имплантата. Морфометрия подтвердила уменьшение площади сечения нитей, особенно в модифицированных образцах. **Заключение.** Модификация тканевых скаффолдов влияет на их биодegradацию, воспалительный ответ и васкуляризацию.

Ключевые слова: шелк, биодegradация, тканевая инженерия.

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF BIODEGRADABLE SILK FIBROIN SCAFFOLDS

Е.И. Podbolotova^{1, 2}, L.A. Kirsanova¹, E.G. Kuznetsova¹, N.V. Grudinina¹, A.R. Pashutin^{1, 2},
O.I. Agapova¹, A.E. Efimov¹, E.A. Nemets¹, Yu.B. Basok¹, I.I. Agapov¹

¹ Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

² Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Moscow Oblast, Russian Federation

Objective: to investigate the biodegradation of natural silk-based tissue scaffolds (NS-TS) under *in vitro* and *in vivo* conditions, assessing their potential for tissue engineering applications. **Materials and methods.** Two types of NS-TS, Fibroplen-Atlas and Fibroplen-Gas, along with their modified versions, were analyzed. *In vitro* biodegradation was assessed in Fenton's solution, while *in vivo* studies were conducted on rats, with histological and morphometric analysis of the implants at 4, 14, and 56 days post-implantation. **Results.** *In vitro* biodegradation studies showed that Fibroplen-Gas completely degraded in <15 days, whereas Fibroplen-Atlas persisted for up to 45 days. *In vivo* analysis showed gradual resorption of all scaffolds, with Fibroplen-Gas exhibiting more pronounced degradation. Histological examination revealed a macrophage response, formation of foreign-body giant cells, and signs of implant vascularization. Morphometry confirmed a reduction in filament cross-sectional area, particularly in modified samples. **Conclusion.** Modifications of NS-TS influence their biodegradation rate, inflammatory response, and vascularization.

Keywords: silk, biodegradation, tissue engineering.

Для корреспонденции: Агапов Игорь Иванович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.
Тел. (495) 231-60-42. E-mail: igor_agapov@mail.ru

Corresponding author: Igor Agapov. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.
Phone: (495) 231-60-42. E-mail: igor_agapov@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Разработка биodeградируемых материалов для лечения ран и замещения дефектов тканей является одной из ключевых задач современной медицины и биоинженерии. Традиционные подходы, такие как использование аутологичных трансплантатов, имеют ряд ограничений, включая недостаточную доступность донорского материала, риск осложнений в донорской области, возможное отторжение трансплантата и невозможность полного восстановления сложной анатомии поврежденных структур [1, 2]. Эффективное восстановление поврежденных тканей требует не только инновационных подходов, но и создания новых биоматериалов, которые могут удовлетворять специфическим требованиям клинической практики. В последние десятилетия биоматериалы, особенно природного происхождения, привлекают все большее внимание. Они обладают уникальными свойствами, такими как биосовместимость, биоразлагаемость и возможность модификации в зависимости от потребностей пациента [3]. Среди множества биоматериалов особое внимание уделяется шелку, который благодаря своим физико-химическим и биологическим характеристикам становится перспективной основой для создания медицинских изделий [4].

Шелк, получаемый из коконов шелкопряда *Bombyx mori*, представляет собой природный белковый полимер, состоящий преимущественно из фиброина и серицина. Фиброин обладает уникальными механическими свойствами, такими как высокая прочность на разрыв и эластичность, что делает его особенно привлекательным для использования в медицине [5, 6]. Шелк характеризуется высокой биосовместимостью, что способствует минимизации иммунных реакций организма, и контролируемой биodeградацией, что особенно важно при создании имплантируемых материалов для долгосрочного использования [7]. Эти свойства делают шелк идеальным кандидатом для разработки материалов, используемых в тканевой инженерии и для лечения ран [8].

В последние годы шелк активно исследуют в качестве основы для создания различных медицинских изделий. В частности, разработаны биodeградируемые материалы на основе фиброина шелка для замещения костной ткани [9, 10]. Эти материалы, состоящие из фиброина шелка, фосфатов кальция и других биологически активных компонентов, продемонстрировали хорошие биологические характеристики и потенциал для использования в костной инженерии, особенно в области восстановления дефектов костной ткани. Кроме того, шелк используют для создания скаффолдов – трехмерных структур, которые поддерживают рост и дифференцировку клеток. Такие скаффолды могут быть использованы для

регенерации различных тканей, включая костную, хрящевую, кожную и нервную ткань [11–13], а также ткань роговицы [14]. Такой подход представляет собой одну из многообещающих альтернатив традиционным методам восстановления тканей.

Одним из ключевых преимуществ шелка является высокая гибкость в модификации его свойств в зависимости от требований конкретного применения. Изменяя условия обработки, можно регулировать скорость биodeградации материала, его механические свойства и взаимодействие с клетками, что открывает широкие перспективы для создания персонализированных медицинских изделий, которые будут идеально адаптированы под нужды пациента [15, 16]. Кроме того, шелк обладает низкой иммуногенностью, что снижает риск отторжения имплантатов и развития воспалительных реакций. Это особенно важно для создания материалов, предназначенных для длительной имплантации [17, 18], и актуально при создании изделий для лечения хронических заболеваний и восстановления поврежденных тканей.

Несмотря на очевидные преимущества шелка, его использование в медицине сопряжено с рядом вызовов. Необходимо тщательно контролировать процесс его получения и обработки, чтобы обеспечить стабильность свойств материала и его безопасность для пациента. Каждое изменение в технологии производства может существенно повлиять на механические, биологические и химические свойства материала, что требует строгих стандартов и дополнительных исследований для подтверждения их эффективности в долгосрочной перспективе.

Таким образом, несмотря на значительный потенциал шелка как биоматериала, его применение в медицинских технологиях требует дальнейших исследований. Разработка новых методов модификации и оптимизации свойств шелковых материалов откроет новые возможности для их успешного внедрения в клиническую практику и использование в различных областях медицины, включая тканевую инженерию и восстановление поврежденных тканей. В статье исследуются свойства тканевых скаффолдов из натурального шелка, их потенциал для применения в медицине, а также возможные пути оптимизации их характеристик.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение образцов «Фиброплен-Газ 0» и «Фиброплен-Атлас 0»

Для создания биodeградируемых тканевых скаффолдов использовали ткани из натурального шелка, состоящие исключительно из шелкового волокна и не содержащие посторонних примесей (декларация о соответствии EAC N RU Д-CN.PA09.B.91575/23, Tianjin Textile Industrial Supply And Sale Co., Ltd,

Китай). В исследовании применяли два типа шелковых тканей с различной плотностью: 15 и 155 г/м². Процесс подготовки образцов тканей включал несколько этапов, описанных ранее [19]. Сначала ткань кипятили в растворе бикарбоната натрия на водяной бане в течение 40 минут, затем промывали в дистиллированной воде и повторно кипятили 30 минут. Процедуру повторяли трижды, после чего скаффолды сушили при комнатной температуре на воздухе. Полученные образцы в дальнейшем обозначены как «Фиброплен-Газ 0» (менее плотная ткань) и «Фиброплен-Атлас 0» (более плотная ткань).

Получение модифицированных образцов «Фиброплен-Газ 80» и «Фиброплен-Атлас 80»

Образцы «Фиброплен-Газ 0» и «Фиброплен-Атлас 0» инкубировали в водно-спиртовом растворе хлорида кальция в молярном соотношении 1 : 2 : 8 при температуре 46 °С в течение 352 минут для образцов «Фиброплен-Газ 0» и 216 минут для образцов «Фиброплен-Атлас 0» (80% от времени полной деструкции ткани). После обработки модифицированные образцы тщательно промывали дистиллированной водой и сушили на воздухе при комнатной температуре. Полученные образцы в дальнейшем обозначены как «Фиброплен-Газ 80» и «Фиброплен-Атлас 80».

Исследование биодеградации *in vitro*

Биодеградацию образцов *in vitro* исследовали в соответствии с ГОСТ 10993-13-2009 («Оценка биологического действия медицинских изделий»). Образцы инкубировали в 40 мл раствора Фентона, содержащего 100 мкМ FeSO₄ и 1 мМ H₂O₂, при температуре 37 °С.

Раствор окислителя заменяли каждые 3 дня. По окончании инкубации образцы промывали в 40 мл дистиллированной воды, высушивали в термостате при 37 °С в течение 48 часов, затем досушивали в вакуумном сушильном шкафу Binder VD-54 (Германия) при остаточном давлении 10–20 мм рт. ст. в течение 24 часов.

Оценку биодеградации проводили гравиметрически на аналитических весах Sartorius CPA-225D (Германия). Оценивали изменение веса образца до и после эксперимента.

Исследование биодеградации *in vivo*

Эксперимент *in vivo* проводили на самцах крыс породы Wistar массой 250–300 г, полученных из питомника лабораторных животных «Кролинфо» (Высоково, Орехово-Зуевский городской округ, Россия). Животные адаптировались к условиям содержания в течение 7 дней до начала эксперимента. В течение

всего исследования крысы содержали изолированно в одиночных клетках, они получали стандартный корм и имели свободный доступ к воде. Температуру вивария поддерживали на уровне 22 ± 2 °С, относительная влажность 55–65%, а световой режим соответствовал циклу 12 часов света / 12 часов темноты. Перед операцией животные получали общий наркоз препаратом «Золетил 100» в дозе 15 мг/кг массы тела, вводимый внутримышечно. В качестве антисептической обработки использовали 0,05% раствор хлоргексидина, которым обрабатывали кожу в области лопаток. Для исключения механического раздражения операционного поля и снижения риска инфицирования шерсть в зоне вмешательства удаляли машинкой.

После обработки кожи стерильными хирургическими ножницами и скальпелем формировали подкожный карман. В сформированную полость помещали образец шелковой ткани размером 1×1 см, который фиксировали четырьмя узловыми швами с использованием монофиламентных полипропиленовых хирургических нитей Prolene 4/0 (Ethicon, США).

Швы обеспечивали плотное прилегание имплантата к подкожным тканям и предотвращали его смещение. После размещения материала карман зашивали узловыми швами.

Продолжительность эксперимента составляла 4, 14 и 56 суток, после чего животных подвергали эвтаназии. После подтверждения биологической смерти проводили эксплантацию имплантатов с прилегающими тканями для последующего гистологического исследования.

Гистологическое исследование

После эксплантации образцы фиксировали в 10% забуференном растворе формалина (не менее 24 часов) и подвергали стандартной процедуре обезвоживания в спиртах восходящей концентрации (50, 60, 70, 80, 96% этанола). Затем образцы заливали в парафин и готовили срезы толщиной 5–6 мкм на микротоме RM2245 (Leica, Германия).

Гистологические срезы окрашивали:

- гематоксилином Майера и эозином (BioVitrum, Россия) – для оценки общей структуры тканей;
- по методу Массона (BioVitrum, Россия) – для выявления общего коллагена.

Препараты анализировали с использованием микроскопа Eclipse 50i (Nikon, Япония), оснащенного цифровой камерой.

При оценке гистологических препаратов учитывали:

- клеточную реакцию (присутствие макрофагов, гигантских клеток инородных тел, лимфоцитов, гранулоцитов);
- васкуляризацию (формирование капилляров);
- формирование соединительно-тканной капсулы;
- степень биорезорбции материала.

Морфометрический анализ

Морфометрическое исследование площади сечения нитей в гистологических препаратах проводили в программе ImageJ (версия 1.49v, National Institute of Health, США). Для анализа выбирали 40 поперечных сечений нитей каждого типа с четкими контурами, не перекрытых соседними структурами.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ выполнялся в IBM SPSS Statistics 26. Оценку распределения данных проводили с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Для проверки значимости различий использовали:

- U-критерий Манна–Уитни (для двух выборок);
- критерий Краскела–Уоллиса (для трех и более групп);
- критерий Тьюки (для множественных сравнений).

Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные с ненормальным распределением

представлены в виде медианы (Me) и межквартильного размаха (Q1–Q3).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Исследования биодеградации *in vitro*

Образцы шелка «Фиброплен-Атлас» с различной предварительной обработкой показали различия в скорости биодеградации (табл. 1). Для образцов «Фиброплен-Атлас 0» на 15-й день наблюдали медленную деградацию – потеря массы составила 5%. К 30-му дню деградация ускорилась и потеря массы достигла 44%, а на 45-й день составила 79%. Образцы «Фиброплен-Газ» продемонстрировали полную деградацию менее чем за 15 дней. Во всех временных точках анализировали по 5 образцов каждого типа.

Из полученных данных можно сделать вывод, что предварительная обработка шелка оказывает влияние на его биодеградацию *in vitro*. Таким образом, выбор обработки материала может быть критически важен для разработки материалов с требуемой скоростью деградации для различных биомедицинских применений.

Исследования биодеградации *in vivo* (морфологическое исследование)

Имплантация 4 суток (немодифицированные образцы)

«Фиброплен-Газ 0»

В исследуемом контрольном образце «Фиброплен-Газ 0» после 4 суток имплантации обнаружен крупный фрагмент поперечно-полосатой мышечной ткани с прилежащим тонким фиброзным слоем и рыхлой соединительной тканью (рис. 1, а), в которой выявлены фрагменты имплантата, представленные

Таблица 1

Влияние предварительной обработки шелка на характер его деградации

Effect of pretreatment on silk degradation profile

	15 дней	30 дней / Δ 15–30 дней	45 дней / Δ 30–45 дней
«Фиброплен-Атлас 0»	5%	44% / 39%	79% / 35%
«Фиброплен-Атлас 80»	5%	49% / 44%	86% / 37%
«Фиброплен-Газ»	Все образцы полностью деградировали менее чем за 15 дней		

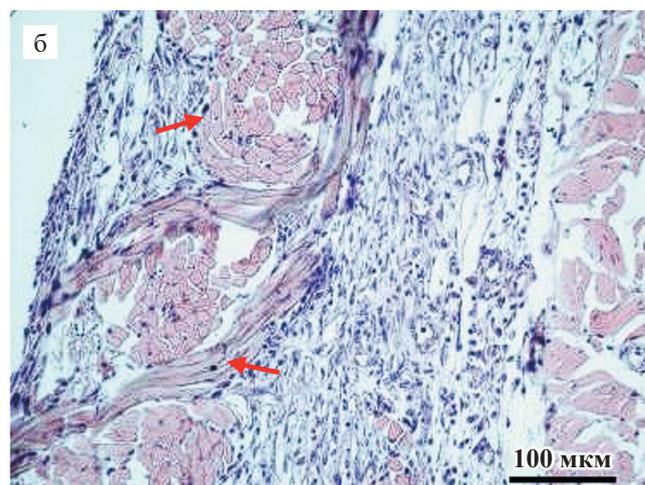
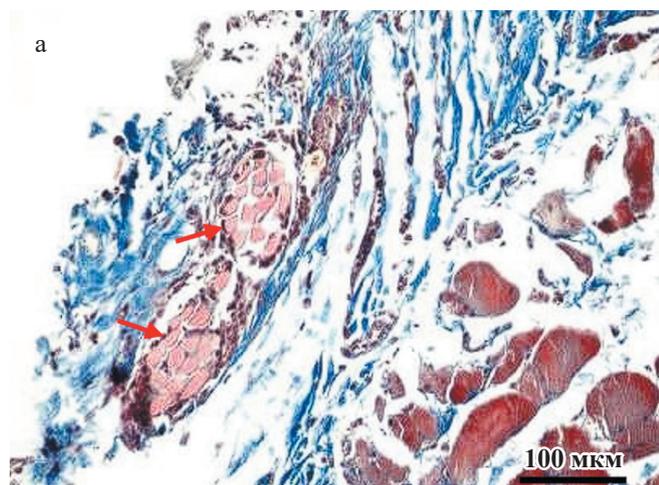


Рис. 1. Образцы после 4 суток имплантации: а – «Фиброплен-Газ 0»; б – «Фиброплен-Атлас 0». Окрашивание гематоксилином и эозином. Стрелками обозначены фрагменты имплантата. $\times 200$

Fig. 1. Samples at 4 days post-implantation: а – Fibroplene-Gas 0, H&E stain; б – Fibroplene-Atlas 0, H&E stain. Arrows indicate implant fragments. $200\times$

поперечными и продольными сечениями гомогенных нитей. При окрашивании гематоксилином и эозином нити приобретают нежный кремовый цвет, а при окраске по Массону – бледно-розовый. Наблюдается умеренная клеточная реакция на имплантат с участием макрофагов, гигантских клеток инородных тел (ГКИТ), немногочисленных лимфоцитов и одиночных гранулоцитов. Также отмечены лишь слабые признаки макрофагальной резорбции материала имплантата. В прилежащей мышечной ткани признаки воспаления не обнаружены. Степень воспалительной реакции в целом выражена слабо и носит лимфоидно-макрофагальный характер.

«Фиброплен-Атлас 0»

На рис. 1, б, представлена гистологическая картина контрольного образца «Фиброплен-Атлас 0», где виден фрагмент поперечно-полосатой мышечной ткани с прилежащим фиброзным слоем и рыхлой соединительной тканью, в которой выявлен имплантат. По периметру имплантата зафиксирована рыхлая соединительная ткань с выраженной гиперклеточностью (обилие фибробластов, гистиоцитов, лимфоцитов) и многочисленными полнокровными капиллярами. Наблюдаемая морфологическая картина соответствует признакам формирования грануляционной ткани. Также отмечено крайне малое содержание ГКИТ, выявить удастся лишь одиночные.

Гранулоциты в окружении имплантата в целом немногочисленны, однако в препарате выявлен очаг выраженной инфильтрации, что можно расценивать как картину незавершенной острой фазы воспаления. Признаки биорезорбции практически не видны.

Имплантация 14 суток (немодифицированные образцы)

«Фиброплен-Газ 0»

В исследуемом образце жировая ткань, в толще которой обнаружен имплантат «Фиброплен-Газ 0» (рис. 2, а). Фрагменты имплантата окружены тонкими соединительно-тканевыми тяжами, среди которых выявлены тонкостенные полнокровные сосуды, что свидетельствует о процессе инкапсуляции и васкуляризации имплантата. Непосредственно вокруг нитей имплантата обнаружены многочисленные макрофаги и ГКИТ, наблюдаются признаки биорезорбции. Кроме того, обнаружены немногочисленные лимфоциты и одиночные гранулоциты. Воспалительная реакция носит преимущественно макрофагальный характер.

«Фиброплен-Атлас 0»

Имплантат по периметру окружен рыхлой соединительной тканью (рис. 2, б). В непосредственной близости к имплантату, параллельно длинной оси, обнаружены тонкие соединительно-тканевые тяжи, что, вероятно, может служить признаком формирования капсулы. Наблюдается рост соединительно-тканевых волокон и тонкостенных сосудов в толщу имплантата. Вокруг нитей материала имплантата зафиксированы многочисленные макрофаги, ГКИТ, эпителиоидные клетки. Однако при этом признаки биорезорбции выражены слабо, и большая часть материала имплантата остается интактной. В целом воспалительная реакция носит макрофагальный характер с небольшой примесью лимфоцитов и одиночных гранулоцитов.

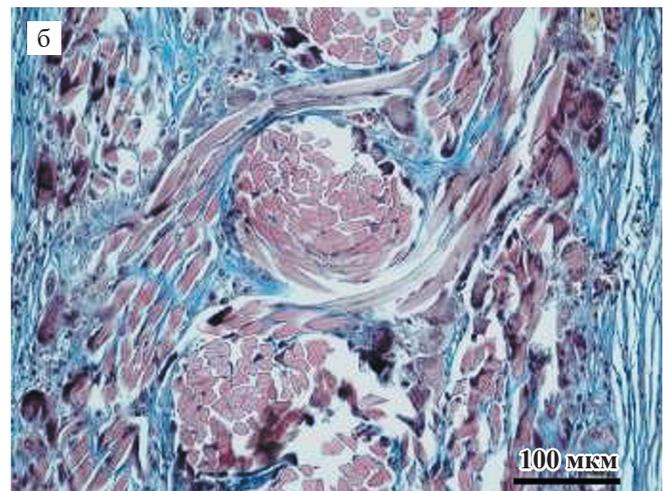
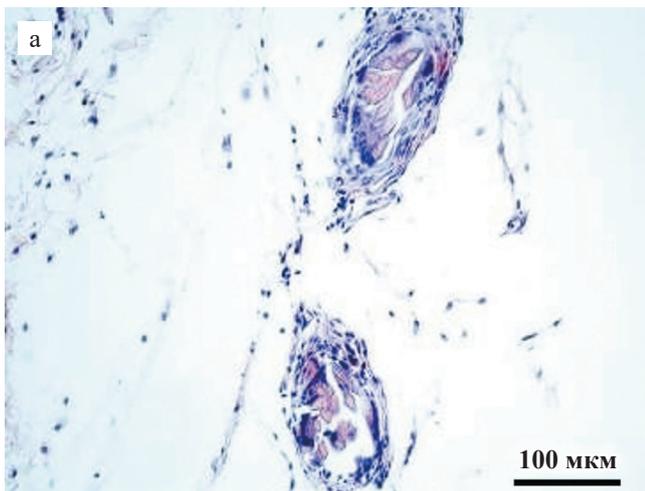


Рис. 2. Образцы после 14 суток имплантации: а – «Фиброплен-Газ 0», окрашивание гематоксилином и эозином; б – «Фиброплен-Атлас 0», окрашивание по Массону. $\times 200$

Fig. 2. Samples at 14 days post-implantation: а – Fibroplene-Gas 0, H&E stain; б – Fibroplene-Atlas 0, Masson's trichrome stain. $200\times$

Имплантация 56 суток (немодифицированные образцы)

«Фиброплен-Газ 0»

Имплантат погружен в прослойку рыхлой соединительной ткани с прилежащими фрагментами поперечно-полосатой мышечной ткани (рис. 3, а). Наблюдается продолжение макрофагальной реакции с участием ГКИТ и частичная резорбция материала имплантата. Также отмечены признаки васкуляризации. По периметру имплантата зафиксировано формирование ограничительной соединительно-тканной капсулы. Капсула тонкая, местами пенетрированная капиллярами. Кроме того, наблюдается инкапсуляция коллагеновыми волокнами отдельных нитей имплантата. Признаки биорезорбции и инкапсуляции нитей выглядят более выражено по сравнению с предыдущим сроком наблюдения (14 суток).

«Фиброплен-Атлас 0»

В образце зафиксирован имплантат в окружении рыхлой соединительной и жировой ткани (рис. 3, б). Воспалительная реакция выражена слабо и носит макрофагальный характер, ГКИТ немногочисленны и выявлены большей частью в периферической зоне имплантата, прилежащей к окружающим тканям. Значительная доля материала имплантата при этом выглядит интактной, без признаков резорбции. Васкуляризация проявляется в появлении полнокровных капилляров среди нитей имплантата. По периметру имплантата обнаружена тонкая соединительно-тканная капсула, местами пенетрированная капиллярами. Кроме того, наблюдается инкапсуляция коллагеновыми волокнами отдельных нитей имплантата.

Имплантация 4 суток (модифицированные образцы)

«Фиброплен-Газ 80»

Гистологическая картина представлена поперечно-полосатой мышечной тканью с прилежащим широким слоем рыхлой соединительной ткани с признаками воспалительной инфильтрации (рис. 4, а). Выявлены гранулоциты, лимфоциты, тучные клетки, макрофаги, многочисленные полнокровные капилляры и фибробласты. Наблюдаемая морфологическая картина позволяет высказать предположение о формировании грануляционной ткани. В образце локально обнаружены одиночные ГКИТ. Следует отметить, что на том же сроке наблюдения в эксперименте с немодифицированными образцами «Фиброплен-Газ 0» воспалительная реакция на имплантат была выражена слабо и носила лимфоидно-макрофагальный характер.

«Фиброплен-Атлас 80»

В исследуемом образце гистологическая картина представлена поперечно-полосатой мышечной тканью с прилежащим тонким фиброзным слоем и прослойкой рыхлой соединительной ткани, по границе которой зафиксированы многочисленные фрагменты имплантата в виде преимущественно поперечных и реже – продольных сечений нитей (рис. 4, б). Воспалительная реакция на имплантат характеризуется обилием макрофагов, присутствием ГКИТ, лимфоцитов. Гранулоциты немногочисленны и обнаружены в основном в просвете капилляров в рыхлой соединительной ткани. Отмечены признаки резорбции имплантата, осуществляемой как ГКИТ, так и одиночными макрофагами, проникающими

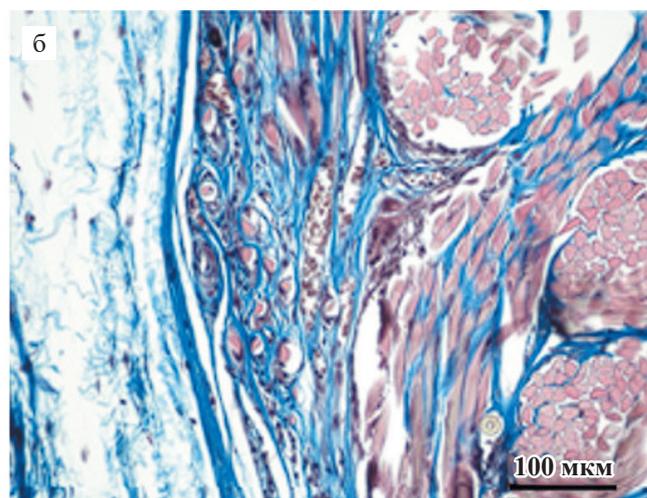
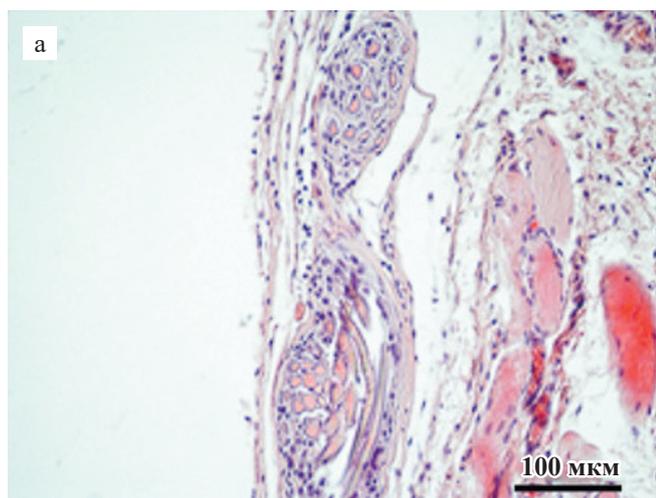


Рис. 3. Образцы после 56 суток имплантации: а – «Фиброплен-Газ 0», окрашивание гематоксилином и эозином; б – «Фиброплен-Атлас 0», окрашивание по Массону. $\times 200$

Fig. 3. Samples at 56 days post-implantation: а – Fibroplene-Gas 0, H&E stain; б – Fibroplene-Atlas 0, Masson's trichrome stain. $200\times$

между нитями имплантата, а непосредственно в имплантате наблюдается появление тонкостенных сосудов, заполненных эритроцитами. Прилежащая мышечная ткань при этом без видимых изменений.

Следует отметить, что на том же сроке наблюдения в эксперименте с немодифицированными образцами «Фиброплен-Атлас 0» воспалительная реакция имела признаки незавершенной острой фазы процесса, тогда как в образцах «Фиброплен-Атлас 80» реакция носила лимфоидно-макрофагальный характер.

В результате проведенного морфологического исследования показано, что гистологическая картина представленных модифицированных образцов на сроке наблюдения 4 суток обладает следующими особенностями:

- а) в образцах «Фиброплен-Газ 80» выявлены признаки острой фазы воспалительной реакции, тогда как в образцах «Фиброплен-Атлас 80» воспалительная реакция носит лимфоидно-макрофагальный характер;
- б) во всех образцах наблюдаются признаки частичной биорезорбции имплантата, при этом в образцах «Фиброплен-Атлас 80» отмечена хорошая сохранность материала, где большая часть остается интактной;
- в) признаки васкуляризации выявлены только в одном из представленных образцов – «Фиброплен-Атлас 80»;
- г) в образцах «Фиброплен-Газ 80» замечены признаки умеренного воспаления в прилежащих к имплантату тканях.

Имплантация 14 суток (модифицированные образцы)

«Фиброплен-Газ 80»

В представленном образце обнаружен имплантат, окруженный рыхлой соединительной тканью (рис. 5, а). Наблюдается макрофагальная реакция на имплантат с образованием многочисленных ГКИТ и частичная резорбция имплантата. В воспалительном инфильтрате также выявлены одиночные лимфоциты и гранулоциты. Также в толще имплантата зафиксированы признаки васкуляризации в виде одиночных капилляров. Инкапсуляция в целом выражена слабо, однако при этом наблюдается интенсивное прорастание соединительно-тканых волокон вглубь имплантата. Прилежащая рыхлая соединительная ткань без видимых признаков изменений.

На том же сроке наблюдения в эксперименте с немодифицированными образцами «Фиброплен-Газ» были получены сходные результаты: воспалительная реакция носила преимущественно макрофагальный характер, были выявлены соединительно-тканые тяжи в толще имплантата, а также зафиксированы признаки биорезорбции и васкуляризации имплантата.

«Фиброплен-Атлас 80»

Гистологическая картина демонстрирует имплантат, окруженный рыхлой соединительной тканью (рис. 5, б). По периметру имплантата видна рыхлая, неравномерной толщины капсула. Наблюдается лимфоидно-макрофагальная реакция на имплантат с участием ГКИТ. Лимфоциты при этом зафиксированы в несколько большем количестве, чем в образцах «Фиброплен-Газ 80». Также определены признаки

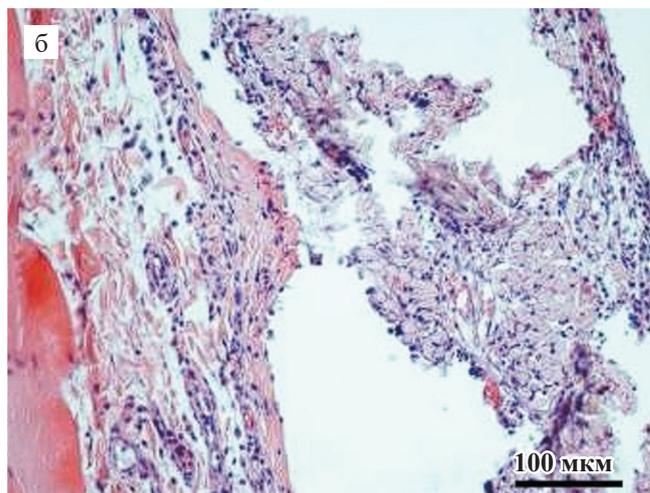
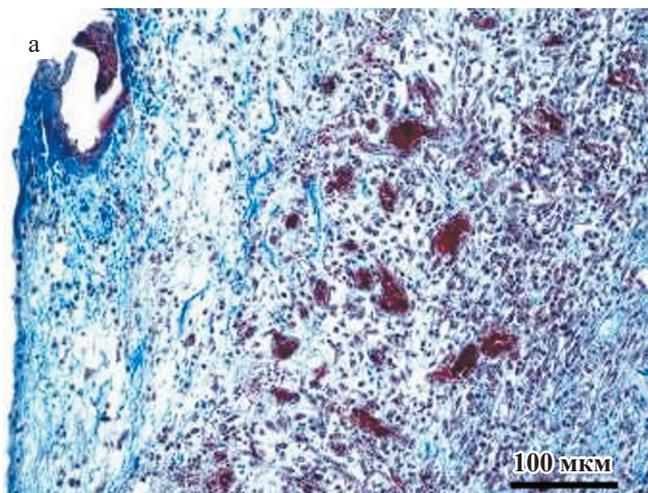


Рис. 4. Образцы после 4 суток имплантации: а – «Фиброплен-Газ 80», окрашивание по Массону; б – «Фиброплен-Атлас 80», окрашивание гематоксилином и эозином. ×200

Fig. 4. Samples at 4 days post-implantation: a – Fibroplene-Gas 80, Masson’s trichrome stain; б – Fibroplene-Atlas 80, H&E stain. 200×

частичной резорбции имплантата. Наблюдается васкуляризация и рост соединительно-тканых тяжей в толщу имплантата. В прилежащей рыхлой соединительной ткани обнаружены полнокровные сосуды, а также лимфоциты, макрофаги (в большем количестве, чем в предыдущих образцах) и одиночные плазмоциты.

Морфологическая картина в общих чертах сходна с таковой, полученной в эксперименте с немодифицированными образцами «Фиброплен-Атлас» на том же сроке наблюдения. Однако следует отметить, что степень фиброзирования, васкуляризации и биорезорбции в модифицированных образцах выше, чем в немодифицированных. Кроме того, некоторые различия выявляются и в составе воспалительного инфильтрата, где было зафиксировано несколько большее относительно немодифицированных образцов количество лимфоцитов и реакция носила лимфоидно-макрофагальный характер.

Гистологическая картина представленных образцов «Фиброплен-Газ» и «Фиброплен-Атлас» на сроке наблюдения 14 суток имеет следующие особенности:

- а) преобладание гигантоклеточного компонента в воспалительном инфильтрате (наиболее выражено в образце «Фиброплен-Газ 80»);
- б) формирование соединительно-тканной капсулы по периметру имплантата (наименее выражено в образце «Фиброплен-Газ 80»);
- в) рост соединительно-тканых волокон в толщу имплантата с частичным его замещением;
- г) васкуляризация имплантата;
- д) частичная резорбция материала имплантата.

Имплантация 56 суток (модифицированные образцы)

«Фиброплен-Газ 80»

В исследуемом образце имплантат «Фиброплен-Газ 80» обнаружен в прослойке рыхлой соединительной ткани (рис. 6, а). Отмечена макрофагальная реакция на имплантат с участием ГКИТ и признаки продолжающейся резорбции. Васкуляризация имплантата выражена слабо, зафиксированы лишь одиночные капилляры. Сформированной соединительно-тканной капсулы по периметру имплантата не наблюдается. Зафиксирована лишь инкапсуляция отдельных нитей и/или волокон. Прилежащие к имплантату ткани без видимых признаков изменений.

Следует отметить, что полученные результаты частично сходны с таковыми, полученными при изучении контрольных образцов «Фиброплен-Газ 0», в частности, макрофагальный характер воспалительной реакции и степень васкуляризации имплантата. Однако в контрольных образцах в отличие от модифицированных было зафиксировано формирование ограничительной капсулы по периметру имплантата, а биорезорбция материала выглядела более заметной.

«Фиброплен-Атлас 80»

Гистологическая картина представляет имплантат в окружении рыхлой соединительной ткани и фрагмент прилежащей поперечно-полосатой мышечной ткани (рис. 6, б). Продолжается макрофагальная реакция на имплантат с участием ГКИТ. Наблюдается дальнейшая резорбция материала имплантата. Признаки васкуляризации имплантата незначительны. Сформированной соединительно-тканной капсулы по периметру имплантата нет, отмечена лишь инкап-

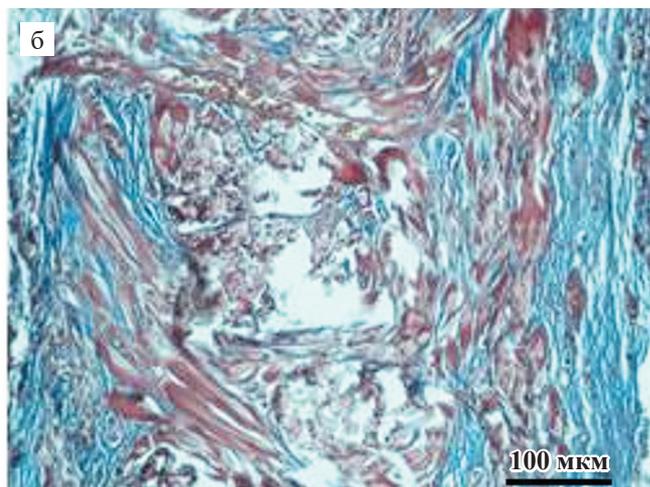
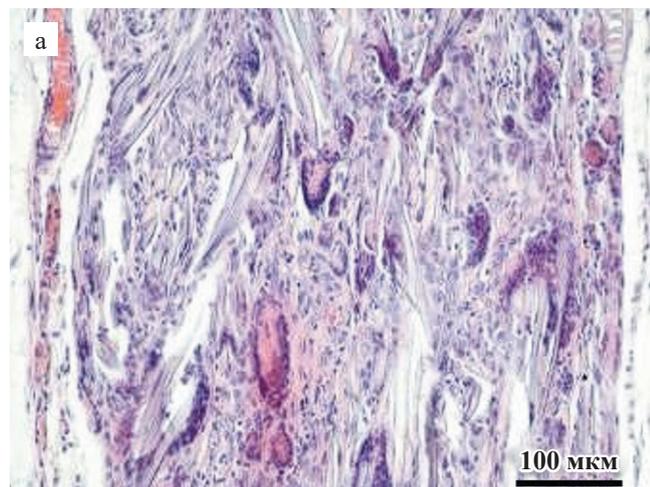


Рис. 5. Образцы после 14 суток имплантации: а – «Фиброплен-Газ 80», окрашивание гематоксилином и эозином; б – «Фиброплен-Атлас 80», окрашивание по Массону. $\times 200$

Fig. 5. Samples at 14 days post-implantation: a – Fibroplene-Gas 80, H&E stain; б – Fibroplene-Atlas 80, Masson's trichrome stain. $200\times$

суляция коллагеновыми волокнами отдельных нитей имплантата. В прилежащих к имплантату тканях видимых признаков изменений не выявлено.

На том же сроке наблюдения в контрольных образцах «Фиброплен-Атлас 0» воспалительная реакция также носила макрофагальный характер, однако

была выражена слабее. При этом доля материала имплантата, сохранившегося интактным, не подвергшимся биорезорбции, была более значительной. Кроме того, по периметру имплантата была обнаружена сформированная тонкая соединительно-тканная капсула.

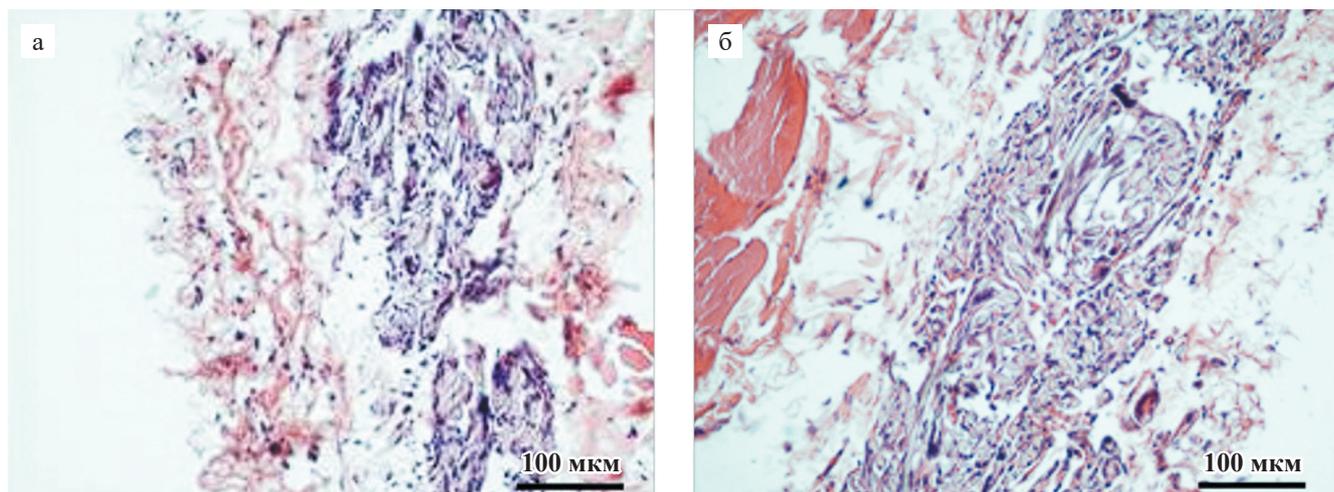


Рис. 6. Образцы после 56 суток имплантации: а – «Фиброплен-Газ 80»; б – «Фиброплен-Атлас 80». Окрашивание гематоксилином и эозином. ×200

Fig. 6. Samples at 56 days post-implantation: a – Fibroplen-Gas 80, H&E stain; б – Fibroplen-Atlas 80, H&E stain. 200×

Таблица 2

Площади сечения нитей «Фиброплен-Газ» и «Фиброплен-Атлас» на разных сроках имплантации

Cross-sectional areas of Fibroplen-Gas and Fibroplen-Atlas filaments at different implantation dates

Описание	Площадь сечения, мкм ²			Статистическая значимость (p)
	4 суток	14 суток	56 суток	
«Фиброплен-Газ 0»	132,5 (111,8–157,6)	86,3 (68,4–102,9)	56,7 (42,1–71,0)	$p_{4-14} < 0,05^*$
				$p_{4-56} < 0,05^*$
				$p_{14-56} < 0,05^*$
«Фиброплен-Газ 80»	84,6 (60,6–102,9)	47,5 (25,5–66,8)	54,2 (41,0–71,5)	$p_{4-14} < 0,05^*$
				$p_{4-56} < 0,05^*$
				$p_{14-56} > 0,05$
«Фиброплен-Атлас 0»	121,8 (101,3–134,7)	111,3 (102,6–120,2)	97,5 (81,2–117,3)	$p_{4-14} > 0,05$
				$p_{4-56} < 0,05^*$
				$p_{14-56} > 0,05$
«Фиброплен-Атлас 80»	48,1 (40,8–62,0)	44,4 (31,5–52,8)	31,6 (22,7–41,7)	$p_{4-14} > 0,05$
				$p_{4-56} > 0,05^*$
				$p_{14-56} > 0,05^*$

* – различия выборок, статистически значимые при $p < 0,05$.

* – sample differences are statistically significant at $p < 0.05$.

В ходе проведенного морфологического исследования образцов «Фиброплен-Газ» и «Фиброплен-Атлас» с различной модификацией (срок наблюдения 56 суток) показано:

- а) продолжается макрофагальная реакция на имплантат с участием ГКИТ и частичная резорбция материала; по сравнению с предыдущим сроком наблюдения степень клеточной реакции заметно снижается;
- б) васкуляризация имплантата во всех образцах незначительна, однако более заметна в образцах «Фиброплен-Атлас 80» по сравнению с образцами «Фиброплен-Газ 80»;
- в) организованной ограничительной фиброзной капсулы по периметру имплантата нет.

Морфометрические исследования площади сечения нитей на разных сроках имплантации

Для изучения биодegradации шелковых нитей образцов «Фиброплен-Газ» и «Фиброплен-Атлас» с различной степенью модификации были рассчитаны площади сечения нитей, медианы (Q1–Q3) которых представлены в табл. 2.

Из полученных данных следует, что для контрольных образцов «Фиброплен-Газ 0» значения медиан сечения нитей достоверно ($p < 0,05$) уменьшаются на

всем протяжении исследования. Для нитей «Фиброплен-Газ 80» значимое уменьшение площади нитей происходит с 4-х по 14-е сутки имплантации, при этом с 14-х по 56-е сутки имплантации достоверно значимого изменения размера нитей не произошло.

Из таблицы видно, что в образцах «Фиброплен-Атлас 0» и «Фиброплен-Атлас 80» наблюдается достоверное уменьшение площади сечения нитей между 4-ми и 56-ми сутками.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали различную степень биодegradации представленного материала шелка «Фиброплен-Газ» и «Фиброплен-Атлас» как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*.

В исследованиях *in vitro* показано, что образцы шелка «Фиброплен-Газ» полностью деградировали за период менее 15 дней. Все исследованные образцы «Фиброплен-Атлас» на ранних стадиях эксперимента продемонстрировали медленную деградацию со значительным ускорением темпа потери массы к 30-м суткам инкубации в растворе Фэнтонна, сохраняя его до 45-х суток. Абсолютное значение потери массы составило 76–86%. Из полученных экспериментальных данных можно сделать вывод, что выбор способа предварительной обработки оказывает влияние на скорость деградации *in vitro*: скорость деградации увеличивается по сравнению с образцами «Фиброплен-Атлас 0».

В результате проведенного морфологического исследования показано, что для контрольных образцов «Фиброплен-Газ 0» (срок имплантации 4 суток) степень воспалительной реакции менее выражена и носит лимфоидно-макрофагальный характер по сравнению с модифицированными образцами, где на том же сроке эксперимента наблюдали признаки острой фазы воспалительной реакции. В контрольных образцах «Фиброплен-Атлас 0» еще сохраняются некоторые признаки незавершенной острой фазы воспалительного процесса, тогда как в модифицированных образцах «Фиброплен-Атлас 80» на данном сроке реакция на имплантат определена как лимфоидно-макрофагальная. В контрольных образцах («Фиброплен-Атлас 0») проявление биорезорбции выражено слабо и практически не визуализируется, тогда как на том же сроке наблюдения в эксперименте с модифицированными образцами признаки биорезорбции имплантата уже отмечаются. Кроме того, в образце «Фиброплен-Атлас 80» определяются первые признаки васкуляризации.

На сроке наблюдения 14 суток во все образцах «Фиброплен-Газ» в ходе морфологического изучения получены сходные результаты: воспалительная реакция носила преимущественно макрофагальный характер, соединительно-тканые тяжи выявляли в

толще имплантата, определяли признаки частичной биорезорбции и васкуляризации имплантата. На том же сроке наблюдения в эксперименте со всеми образцами «Фиброплен-Атлас» морфологическая картина имела общие черты: наблюдали признаки биорезорбции, васкуляризации имплантата, рост соединительно-тканых волокон на поверхности и в толщу имплантата. Однако степень проявления васкуляризации и фиброзирования модифицированных образцов относительно контрольных (немодифицированных) была более выражена. Кроме того, некоторые отличия были выявлены и в составе воспалительного инфильтрата, где отмечено несколько большее содержание лимфоцитов в образцах «Фиброплен-Атлас 80» и реакция носила лимфоидно-макрофагальный характер, тогда как в образце «Фиброплен-Атлас 0» воспалительная реакция была описана как макрофагальная.

На сроке наблюдения 56 суток гистологическая картина немодифицированных и модифицированных образцов имела следующие особенности: во всех образцах зафиксировано продолжение макрофагальной реакции на имплантат с участием ГКИТ и частичная биорезорбция материала. Наибольшая доля интактного материала сохранялась в образце «Фиброплен-Атлас 0». Следует отметить, что в сравнении со сроком 14 суток степень клеточной реакции заметно снижается, что наиболее проявляется в образце «Фиброплен-Атлас 0». Васкуляризация во всех исследуемых образцах незначительна, однако более заметна в образцах «Фиброплен-Атлас». Организованная ограничительная соединительно-тканная капсула по периметру имплантата обнаружена только в образцах «Фиброплен-Атлас 0» и «Фиброплен-Газ 0». При этом во всех представленных образцах наблюдаются эпизоды инкапсуляции отдельных нитей материала имплантата коллагеновыми волокнами.

При морфометрическом изучении гистологических образцов с помощью программы ImageJ получено, что площади сечений нитей «Фиброплен-Газ 0» значимо уменьшаются на всем протяжении исследования, для нитей «Фиброплен-Газ 80» достоверно уменьшаются с 4-х по 14-е сутки имплантации. Для нитей «Фиброплен-Атлас 0» и «Фиброплен-Атлас 80» площади достоверно уменьшаются с 4-х по 56-е сутки имплантации. Для нитей «Фиброплен-Атлас 80» также наблюдается достоверное уменьшение площади сечения нитей с 14-х по 56-е сутки.

ВЫВОДЫ

По результатам проведенных исследований можно сделать следующие выводы.

1. Предварительная обработка оказывает влияние на скорость деградации *in vitro*: скорость деградации для модифицированных образцов увеличивается по сравнению с немодифицированными (для

- образцов «Фиброплен-Атлас»). Образцы «Фиброплен-Газ» полностью деградировали за период менее чем 15 дней.
2. В результате проведенного морфологического исследования показано:
 - а) наибольшая доля интактного материала на сроке 56 суток сохраняется в образце «Фиброплен-Атлас 0»;
 - б) признаки незавершенности острой фазы воспаления выявлены только на сроке 4 суток в образцах «Фиброплен-Газ 80», а также в образце «Фиброплен-Атлас 0»; начиная с 14-х суток наблюдения воспалительная реакция приобретает характер лимфоидно-макрофагальной («Фиброплен-Атлас 80») или макрофагальной (все образцы «Фиброплен-Газ», «Фиброплен-Атлас 0»); на сроке 56 суток во всех исследованных образцах зафиксирован макрофагальный (в основном гигантоклеточный) тип реакции;
 - в) частичная биорезорбция материала на ранних сроках (4 суток) с участием ГКИТ и одиночных макрофагов обнаружена в модифицированных образцах «Фиброплен-Газ» и «Фиброплен-Атлас», тогда как в немодифицированных образцах практически не визуализируется; начиная с 14-х суток наблюдения биорезорбция отмечается во всех исследованных образцах;
 - г) признаки васкуляризации имплантата на сроке 4 суток зафиксированы только в образце «Фиброплен-Атлас 80», во всех остальных образцах васкуляризация проявляется начиная с 14-х суток;
 - д) морфологические признаки формирования ограничительной капсулы по периметру имплантата замечены на сроке 14 суток наблюдения в большинстве образцов, однако на 56-е сутки эксперимента только в контрольных образцах «Фиброплен-Атлас 0» и «Фиброплен-Газ 0» было зафиксировано наличие тонкой соединительно-тканной капсулы, при этом во всех исследованных образцах с разной степенью выраженности отмечены признаки фибрирования, выражающиеся в росте соединительно-тканых волокон вглубь имплантата и эпизодах инкапсуляции коллагеновыми волокнами отдельных нитей имплантата.
 3. При морфометрическом изучении гистологических образцов получено, что площади сечений нитей образцов «Фиброплен-Газ 0» значительно уменьшаются на всем протяжении исследования, для нитей «Фиброплен-Газ 80» достоверно уменьшаются с 4-х по 14-е сутки имплантации. Для нитей «Фиброплен-Атлас 0» и «Фиброплен-

Атлас 80» площади достоверно уменьшаются с 4-х по 56-е сутки имплантации. Для нитей «Фиброплен-Атлас 80» наблюдается достоверное уменьшение площади сечения нитей с 14-х по 56-е сутки.

Таким образом, проведенное исследование подтвердило, что модификация шелковых тканевых скаффолдов позволяет целенаправленно изменять их свойства, влияя на скорость биодegradации, воспалительный ответ и васкуляризацию. Регулирование этих параметров открывает возможности для адаптации материалов под конкретные медицинские задачи, включая заживление ран и создание биодegradуемых имплантатов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Dionigi B, Fauza DO.* Autologous approaches to tissue engineering. In: StemBook [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008. 2012 Dec 10. doi: 10.3824/stembook.1.90.1.
2. *Williams D.* Challenges with the development of biomaterials for sustainable tissue engineering. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019 May 31; 7: 127. doi: 10.3389/fbioe.2019.00127.
3. *Sevastianov VI, Basok YuB, Baranova NV, Belova AD, Grigoriev AM, Kholodenko IV et al.* Biomimetics of Extracellular Matrices for Cell and Tissue Engineered Medical Products / Eds. V. Sevastianov and Yu. Basok. Cambridge Scholars Publishing; 2023.
4. *Sahoo JK, Hasturk O, Falcucci T, Kaplan DL.* Silk chemistry and biomedical material designs. *Nat Rev Chem.* 2023 May; 7 (5): 302–318. doi: 10.1038/s41570-023-00486-x.
5. *Kamalathevan P, Ooi PS, Loo YL.* Silk-based biomaterials in cutaneous wound healing: A systematic review. *Adv Skin Wound Care.* 2018 Dec; 31 (12): 565–573. doi: 10.1097/01.ASW.0000546233.35130.a9.
6. *Kundu B, Rajkhowa R, Kundu SC, Wang X.* Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 Apr; 65 (4): 457–470. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.043.
7. *Cao Y, Wang B.* Biodegradation of silk biomaterials. *Int J Mol Sci.* 2009 Mar 31; 10 (4): 1514–1524. doi: 10.3390/ijms10041514. PMID: 19468322; PMCID: PMC2680630.
8. *Vidya M, Rajagopal S.* Silk fibroin: A promising tool for wound healing and skin regeneration. *Int J Polym Sci.* 2021 Oct; 2021 (6): 1–10. doi: 10.1155/2021/9069924.
9. *Sofia S, McCarthy MB, Gronowicz G, Kaplan DL.* Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *J Biomed Mater Res.* 2001 Jan; 54 (1): 139–148. doi: 10.1002/1097-4636(200101)54:1<139::AID-JBM17>3.0.CO;2-7.

10. Климентьев АА, Набока ВА. Биологические характеристики биodeградируемого материала на основе фиброина шелка для замещения костной ткани. *Медицина: теория и практика*. 2021; 3: 6–9. *Klimentyev AA, Naboka VA*. Biological characteristics of the biodegradable material for bone repair. *Medicine: theory and practice*. 2021; 3: 6–9. [In Russ, English abstract].
11. Котлярова МС, Архипова АЮ, Мойсенович АМ, Куликов ДА, Молочков АВ, Мойсенович ММ. Трехмерные пористые скаффолды на основе фиброина шелка для восстановления костной ткани. *Гены и клетки*. 2017; 12 (3): 131–132. *Kotliarova MS, Arkhipova AYu, Moysenovich AM, Kulikov DA, Molochkov AV, Moysenovich MM*. Trehmernye poristye skaffoldy na osnove fibroina shelka dlya vosstanovleniya kostnoy tkani. *Genes & Cells*. 2017; 12 (3): 131–132. [In Russ]. doi: 10.23868/gc120968.
12. Liu Q, Huang J, Shao H, Song L, Zhang Y. Dual-factor loaded functional silk fibroin scaffolds for peripheral nerve regeneration with the aid of neovascularization. *RSC Adv*. 2016; 6 7683–7691. doi: 10.1039/C5RA22054H.
13. Safonova L, Bobrova M, Efimov A, Davydova L, Tenchurin T, Bogush V et al. Silk Fibroin/Spidroin Electrospun Scaffolds for Full-Thickness Skin Wound Healing in Rats. *Pharmaceutics*. 2021 Oct 15; 13 (10): 1704. doi: 10.3390/pharmaceutics13101704.
14. Gavrilova NA, Borzenok SA, Revishchin AV, Tishchenko OE, Ostrovkiy DS, Bobrova MM et al. The effect of biodegradable silk fibroin-based scaffolds containing glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) on the corneal regeneration process. *Int J Biol Macromol*. 2021 Aug 31; 185: 264–276. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.040.
15. Aigner TB, DeSimone E, Scheibel T. Biomedical applications of recombinant silk-based materials. *Adv Mater*. 2018 May; 30 (19): e1704636. doi: 10.1002/adma.201704636.
16. Murphy AR, Kaplan DL. Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin. *J Mater Chem*. 2009 Jun 23; 19 (36): 6443–6450. doi: 10.1039/b905802h.
17. Колесников АЮ, Прокудина ЕС, Сенокосова ЕА, Арнт АА, Антонова ЛВ, Миронов АВ и др. Результаты долгосрочной проходимости и прижизненной визуализации сосудистых заплат из фиброина шелка. *Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика Б.В. Петровского*. 2023; 11 (3): 68–75. *Kolesnikov AYu, Prokudina ES, Senokosova EA, Arnt AA, Antonova LV, Mironov AV et al*. Results of long-term patency and lifetime visualization of vascular patches from silk fibroin. *Clinical and Experimental Surgery. Petrovsky Journal*. 2023; 11 (3): 68–75. [In Russ, English abstract]. <https://doi.org/10.33029/2308-1198-2023-11-3-68-75>.
18. Perrone GS, Leisk GG, Lo TJ, Moreau JE, Haas DS, Papenburg BJ et al. The use of silk-based devices for fracture fixation. *Nat Commun*. 2014 Mar 4; 5: 3385. doi: 10.1038/ncomms4385. PMID: 24594992.
19. Агапов ИИ, Агапова ОИ, Ефимов АЕ, Соколов ДЮ, Боброва ММ, Сафонова ЛА. Способ получения биodeградируемых скаффолдов на основе тканей из натурального шелка. Патент на изобретение RU2653428 С1, 08.05.2018. *Agapov II, Agapova OI, Efimov AE, Sokolov DYu, Bobrova MM, Safonova LA*. Sposob polucheniya biodegradiruemykh skaffoldov na osnove tkaney iz natural'nogo shelka. Patent na izobretenie RU2653428 S1, 08.05.2018.

*Статья поступила в редакцию 17.02.2025 г.
The article was submitted to the journal on 17.02.2025*