

DOI: 10.15825/1995-1191-2026-2-117-127

НАНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ФИБРОБЛАСТОВ МЫШИ 3ТЗ, КУЛЬТИВИРОВАННЫХ НА ТКАНЕВЫХ СКАФФОЛДАХ НА ОСНОВЕ НАТУРАЛЬНОГО ШЕЛКА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

А.Е. Ефимов¹, Е.И. Подболотова^{1, 2}, О. Доси², О.И. Агапова¹, 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, Московская область, Российская Федерация

Цель: провести наноструктурный анализ особенностей взаимодействия фибробластов мыши 3ТЗ с тканевыми скаффолдами на основе натурального шелка в условиях *in vitro* с использованием технологии сканирующей зондовой нанотомографии. **Материалы и методы.** Для исследования были получены образцы двух типов тканевых скаффолдов из натурального шелка: «Фиброплен-Атлас» и «Фиброплен-Газ», а также их модифицированные версии «Фиброплен-Атлас 80» и «Фиброплен-Газ 80». Фибробласты мыши 3ТЗ культивировались на тканевых скаффолдах в течение 7 суток. Препараты тканевых скаффолдов с культивированными фибробластами были фиксированы и залиты в эпоксидную смолу. Исследование поверхности полученных образцов после среза ультрамикротомом производилось методом сканирующей зондовой нанотомографии. Анализ полученных данных позволяет количественно определить важные морфологические параметры клеток, тканевых скаффолдов и интерфейсов между ними. **Результаты.** Анализ полученных изображений указывает на утончение и разобшение микроволокон в нитях модифицированных скаффолдов «Фиброплен-Атлас 80» и «Фиброплен-Газ 80». В отличие от немодифицированных версий скаффолдов в данном случае фибробласты в равной мере взаимодействуют как с внутренними, так и с внешними поверхностями микроволокон нитей шелковых скаффолдов, что приводит к значительному (до 40%) росту параметра, отражающего долю площади поверхности клеток, взаимодействующую с поверхностью скаффолда. **Заключение.** Наноструктурный анализ фибробластов мыши 3ТЗ, культивированных на тканевых скаффолдах на основе натурального шелка, позволил получить данные о топологических и морфологических особенностях взаимодействия клеток с модифицированными и немодифицированными тканевыми скаффолдами. Взаимодействие клеток с микроволокнами внутри нитей модифицированных скаффолдов может служить ускорению биодеградации данных скаффолдов. Совокупность полученных наноструктурных данных и результатов клеточных экспериментов *in vitro* позволяет сделать вывод о том, что разработанные скаффолды поддерживают адгезию клеток 3ТЗ и формирование клеточно-матриксных контактов.

Ключевые слова: фибробласты, фиброин шелка, сканирующая зондовая микроскопия, нанотомография.

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., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (499) 190-66-19. E-mail: igor_agapov@mail.ru

NANOSTRUCTURAL ANALYSIS OF 3T3 MOUSE FIBROBLASTS CULTURED ON NATURAL SILK-BASED TISSUE SCAFFOLDS *IN VITRO*

A.E. Efimov¹, E.I. Podbolotova^{1, 2}, O. Dosi², O.I. Agapova¹, I.I. Agapov¹

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

² Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russian Federation

Objective: to perform a nanostructural analysis of the interaction between mouse 3T3 fibroblasts and natural silk-based tissue scaffolds *in vitro* using scanning probe nanotomography (SPN). **Materials and methods.** Two types of natural silk tissue scaffolds were investigated: Fibroplen-Atlas and Fibroplen-Gaz, along with their modified variants, Fibroplen-Atlas 80 and Fibroplen-Gaz 80. Mouse 3T3 fibroblasts were cultured on the scaffolds for 7 days. Following incubation, scaffold–cell constructs were fixed and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections were prepared using an ultramicrotome, and the sample surfaces were analyzed by SPN. The acquired data enabled quantitative assessment of key morphological parameters of the cells, the scaffolds, and the interfaces between them. **Results.** Analysis of the acquired images revealed thinning and fragmentation of microfibers within the strands of the modified scaffolds (Fibroplen-Atlas 80 and Fibroplen-Gaz 80). In contrast to the unmodified scaffolds, fibroblasts in the modified matrices interacted with both the inner and outer surfaces of the microfibers. This enhanced interaction resulted in a marked increase (up to 40%) in the proportion of the cell surface area in contact with the scaffold surface. **Conclusion.** Nanostructural analysis of mouse 3T3 fibroblasts cultured on natural silk-based tissue scaffolds provided detailed insights into the topological and morphological features of cell–scaffold interactions in both modified and unmodified matrices. Enhanced interaction between cells and microfibers within the modified scaffold strands may promote accelerated scaffold biodegradation. The combined nanostructural findings and *in vitro* cell culture results indicate that the developed scaffolds effectively support 3T3 cell adhesion and the formation of stable cell–matrix contacts.

Keywords: fibroblasts, silk fibroin, scanning probe microscopy, nanotomography.

ВВЕДЕНИЕ

Биосовместимые материалы на основе фиброина шелка тутового шелкопряда *Bombyx mori* обладают высоким регенеративным потенциалом и могут быть использованы в различных областях медицины, таких как тканевая инженерия, разработка систем доставки лекарственных средств, заживление ран, лечение онкологических заболеваний и воспалений различной этиологии [1–4]. Фиброин может быть использован в различных формах медицинских изделий, таких как гели [5–7], пленки [8, 9], пористые [10–12] или волокнистые скаффолды [13–14]. Волокнистые скаффолды представляют особый интерес для разработок медицинских изделий, так как обеспечивают хорошую механическую поддержку, высокую пористость и возможность управления направлением клеточной миграции, что делает их актуальными для инженерии тканей, требующих строго организованной архитектуры [13].

Волокнистые структуры на основе фиброина могут быть получены с помощью электроспиннинга или путем использования готовых тканых и нетканых материалов, а также их ручной сборки [15–17]. Такие волокна и ткани применяются для создания ориентированных структур, имитирующих внеклеточный матрикс, и особенно перспективны для направленного роста нейронов, сосудов и сухожилий.

Одним из ключевых преимуществ натурального шелка в виде тканых материалов является развитая и масштабная система их промышленного производства [18]. Дополнительное преимущество – сравнительно низкая стоимость готовых тканых материалов по сравнению с более трудоемкими и маломасштабными методами получения биоматериалов, такими как электроспиннинг [19]. Шелковые ткани легко поддаются различным видам модификации – им можно задавать конкретные физические свойства, покрывать биополимерами, насыщать клетками или биоактивными веществами, что открывает широкие возможности для серийного производства медицинских изделий на их основе [17].

Особенно перспективно применение тканых шелковых материалов для создания скаффолдов для регенерации ран. Упорядоченная структура полотна облегчает анализ клеточной миграции и ориентации при культивировании, а также позволяет точно настраивать архитектуру будущего тканевого эквивалента.

Таким образом, натуральный шелк в форме тканых текстильных материалов представляет собой высокоэффективную основу для создания разнообразных биомедицинских конструкций. Сочетание биосовместимости, прочности, контролируемой деградации и технологичности делает его одним из наиболее универсальных кандидатов для разработки

скаффолдов для тканевой инженерии и регенеративной медицины.

В предыдущих работах [20–23] нами было описано получение биосовместимых тканевых скаффолдов «Фиброплен-Газ» и «Фиброплен-Атлас» на основе модифицированных тканей из натурального шелка (газ шифон и атлас соответственно), нацеленных на лечение раневых поверхностей и замещение дефектов ткани. Проведенные исследования подтвердили, что модификация шелковых тканевых скаффолдов позволяет целенаправленно изменять их свойства, влияя на скорость биодеградации, воспалительный ответ и васкуляризацию [22]. Варьирование параметров обработки позволяет получить биоматериалы с контролируемой степенью деструкции белковой матрицы, что непосредственно отражается на их прочностных характеристиках и предполагаемой кинетике биодеградации [23].

Однако важнейшим этапом разработки эффективных медицинских изделий на основе шелковых тканевых скаффолдов является качественный и количественный анализ микро- и наноструктурных особенностей взаимодействия клеток с волокнами скаффолдов *in vitro*. Данный анализ обычно выполняется при помощи сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), однако СЭМ-изображения тканевых и клеточных структур на скаффолдах представляют собой вид сверху и не позволяют напрямую исследовать области контакта клеток с волокнами. Для решения данной задачи мы используем в качестве аналитической технологии метод сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ) – комбинацию методов ультрамикротомии (сверхтонких срезов поверхности толщиной от 20 нм) и измерений поверхности блока исследуемого образца после среза методом сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) [12, 24]. Эта методика, основанная на аппаратной интеграции данных приборов в рамках одной экспериментальной установки, позволяет получить СЗМ-изображения поверхности клеток и волокон матрикса в поле среза, выполняемого в плоскости, перпендикулярной плоскости скаффолда [25–27].

Процессы репарации и регенерации тканей, особенно раневых поверхностей и повреждений кожного покрова, в значительной степени регулируются активностью фибробластов, которые обеспечивают синтез компонентов внеклеточного матрикса, ремоделирование поврежденных участков и сокращение раневого дефекта. Взаимодействие фибробластов с биоматериалами, используемыми в медицинских изделиях, во многом определяет эффективность ранозаживления [28]. Целью данного исследования являлось проведение наноструктурного анализа особенностей взаимодействия фибробластов мыши 3Т3 с тканевыми скаффолдами на основе натурального

шелка в условиях *in vitro* с использованием технологии сканирующей зондовой нанотомографии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение тканевых скаффолдов на основе натурального шелка

Тканевые скаффолды «Фиброплен-Газ», «Фиброплен-Газ 80», «Фиброплен-Атлас» и «Фиброплен-Атлас 80» на основе натурального шелка *Bombyx mori* были получены по описанной ранее методике [20–23]. Для получения 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, КНР). В исследовании применяли два типа шелковых тканей с различной плотностью: газ-шифон (плотность 15 г/м²) и атлас (плотность 155 г/м²). Сначала для удаления серицина ткани 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 высушивались на воздухе при комнатной температуре. Таким способом были получены образцы, обозначаемые как «Фиброплен-Газ» и «Фиброплен-Атлас» соответственно. Для получения модифицированных скаффолдов, обозначаемых «Фиброплен-Газ 80» и «Фиброплен-Атлас 80», образцы «Фиброплен-Газ» и «Фиброплен-Атлас» инкубировали в водно-спиртовом растворе хлорида кальция в молярном соотношении 1 : 2 : 8 при температуре 46 °С в течение времени, соответствующего 80% от времени полной деструкции ткани в данных условиях, что составляло 352 минуты для образцов «Фиброплен-Газ» и 216 минут для образцов «Фиброплен-Атлас». После обработки модифицированные образцы тщательно промывали дистиллированной водой и сушили на воздухе при комнатной температуре.

Культивирование клеток на тканевых скаффолдах

Клетки линии 3Т3 (ATCC® CRL-1658™) культивировали в DMEM с высоким содержанием глюкозы (Gibco, США), дополненной 10% FBS (Gibco, Бразилия), 50 мкг/мл гентамицина (HiMedia, США) и 2 мМ GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific). Культивирование проводили при 37 °С в увлажненной атмосфере 5% CO₂. Перед экспериментами клетки отделяли трипсином и ресуспендировали в среде. Подсчет клеток проводили с использованием гемоцитометра на инвертированном микроскопе Carl Zeiss Axio Vert.A1 (Zeiss, Jena, Германия).

Для экспериментов по культивированию клеток на скаффолдах *in vitro* стерильные тканевые скаффолды диаметром 17 мм увлажняли средой DMEM и помещали на дно лунок стандартного 24-луночного планшета. В каждую лунку вносили клеточную суспензию плотностью $3,5 \times 10^4$ клеток. Для каждого типа скаффолдов подготавливали по 7 лунок. Инкубация скаффолдов с клетками для исследований производилась в течение 7 суток. После инкубации скаффолды извлекали из лунок, дважды промывали фосфатно-солевым буфером для удаления несвязанных клеток и остатков среды и проводили оценку внешнего вида клеток с помощью световой микроскопии.

Сканирующая электронная микроскопия

Для выявления изменений поверхности и микроструктуры в образцах тканевых скаффолдов с культивированными клетками 3Т3 образцы изучали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Образцы обезвоживали путем последовательного переноса в растворы этанола с возрастающей концентрацией – 10, 20, 50, 70 и 95%, по 30 минут в каждом растворе. После этого образцы наносили на предметное стекло и сушили в вакууме в течение 1 часа с использованием камеры системы напыления с ротационным насосом Q150R ES (Quorum Technologies, Великобритания). Высушенные образцы покрывали слоем золота толщиной 5 нм в атмосфере аргона при ионном токе 20 мА и давлении 1 мбар с использованием той же системы Q150R ES (Quorum Technologies, Великобритания). Анализ проводили с помощью растрового электронного микроскопа Tescan Vega3 SBU (Tescan, Чехия) при напряжении 30 кВ. Съемка осуществлялась с использованием программного обеспечения VegaTC (Tescan, Чехия).

Сканирующая зондовая нанотомография

Анализ образцов методом сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ) выполнялся с использованием специализированного сканирующего зондового микроскопа (СЗМ), комбинированного с ультрамикротомом Leica EM UC6 (Leica Microsystems GmbH, Австрия) для сканирующей зондовой нанотомографии. Для пробоподготовки при помощи скальпеля вырезали фрагменты скаффолдов размером $1,5 \times 1,5$ мм. Затем фрагменты скаффолдов фиксировались в 2,5% растворе глутарового альдегида в натрий-фосфатном буфере (pH = 7,4) в течение 2 часов в темноте при +4 °С, и производилось три отмывки образцов в натрий-фосфатном буфере по 10 минут. После этого производили дегидратацию образцов проводкой по спиртам с увеличивающейся концентрацией. Далее производили три отмывки образцов в ацетоне по 10 минут, а затем инкубировали в смеси

ацетона и эпоксидной среды в соотношении 1 : 1 в течение 30 минут, после чего образцы переносили в смесь пропиленоксида и эпоксидной среды в соотношении 1 : 2 и инкубировали в течение 30 минут. Затем образцы заключали в эпоксидную смолу, инкубировали в термостате при 45 °С в течение 12 часов, после чего продолжали инкубацию в течение 72 часов при температуре 60 °С. Для заливки образцов использовалась эпоксидная среда (Epoxy Embedding Medium, Sigma-Aldrich, Cat. № 45345), смешиваемая с равным по массе количеством отвердителя заливочной среды (додецилэтантарный ангидрид DDSA) и 4% по массе 2,4,6-трис-(диметиламинометил)-фенола (DMP-30).

Срезы образцов скаффолдов толщиной 70 нм выполнялись с использованием алмазного ножа Diatome Ultra AFM 35 (Diatome AG, Швейцария) с шириной режущей кромки 2,0 мм. СЗМ-измерения проводились в полуконтактном режиме при скорости сканирования 1,56 Гц с использованием кремниевых зондов-кантилеверов HA_HR (Tipsnano OÜ, Эстония) с резонансной частотой 405 кГц и радиусом кривизны острия <10 нм. При сканировании были получены коррелятивные изображения в режимах отображения топографии и фазы размерами 1024×1024 пиксела. Обработка СЗМ-изображений и анализ морфологических параметров скаффолдов выполнялись в программе Nova ImageAnalysis 1.0.26.1443 (НТ-МДТ, Москва).

Обработка данных

Все количественные данные представлены в виде среднего значения ± стандартного отклонения ($M \pm SD$). Для оценки достоверности различий между группами использовался непараметрический критерий Манна–Уитни. Значения считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$. Обработка данных и построение графиков проводились с использованием программы OriginPro (OriginLab Corporation, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Метод сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ) основан на комбинации техник сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) и ультрамикротомии в рамках одного приборного комплекса, позволяющего выполнять СЗМ-измерения поверхности образцов *in situ* непосредственно после выполнения сверхтонкого среза ультрамикротомом [24]. Для выполнения исследований методом СЗНТ образцы биоматериалов и биологических объектов подвергаются специальной пробоподготовке, аналогичной процедуре подготовки образцов для трансмиссионной (просвечивающей) электронной микроскопии, а именно фиксации, дегидратации и заливке в эпоксидную среду (подробнее см. раздел «Материалы и методы»). Ультрамикротомирование образцов выполняется с использовани-

ем специализированного алмазного ножа UltraAFM (Diatome AG, Швейцария), позволяющего получать после среза поверхность блока с качеством, приемлемым для СЗМ-измерений. Срез области интереса образца производится в механически задаваемой оператором плоскости. Таким образом, изменяя ориентацию образца, мы можем получить доступ к областям, не доступным методам оптической или сканирующей электронной микроскопии, и получить уникальную информацию об их наноструктуре. После среза к поверхности срезанного блока подводится зонд СЗМ и выполняется сканирование интересующей области поверхности. В случае полимерных и биологических образцов предпочтительно применять полуконтактные методики СЗМ-измерений. При этом зонд СЗМ, находящийся на кремниевой балке (кантилере), совершает вынужденные колебания на ее резонансной частоте (обычно в диапазоне от 100 до 500 кГц, в зависимости от выбранной модели зонда) с физической амплитудой в несколько десятков нанометров. Взаимодействие зонда с поверхностью детектируется по падению величины регистрируемой амплитуды до заданного значения (*set point*). Таким образом, зонд физически взаимодействует с поверхностью (находится в зоне отталкивания сил Ван-дер-Ваальса) только в нижней точке своих колебаний. Этот метод минимизирует нарушения поверхности мягких материалов, вызываемые острым кремниевым зондом при сканировании, к тому же кроме топографии образца позволяет выполнять измерения фазы сдвига колебаний кантилера относительно несущего сигнала. Эта методика является важной для наших исследований, так как изменения фазы колебаний кантилера зависят от локальных вязкоупругих свойств поверхности, что часто позволяет получить дополнительный контраст и улучшенное разрешение при измерениях биологических и полимерных образцов [25]. Радиус кривизны острия кремниевого зонда СЗМ составляет менее 10 нм, что определяет физическое латеральное разрешение метода.

В нашем случае мы выполняли срезы в плоскостях, перпендикулярных плоскостям тканевых скаффолдов и перпендикулярных одному из направлений нитей в скаффолдах, получая таким образом дополнительную к методам электронной и оптической микроскопии наноструктурную информацию. Для исследований были выбраны образцы «Фиброплен-Газ», «Фиброплен-Газ 80», «Фиброплен-Атлас 80» и «Фиброплен-Атлас» с культивированными (срок культивирования 7 суток) фибробластами мыши 3Т3. Срок культивирования был выбран исходя из результатов предыдущих *in vitro* исследований материалов на основе фиброина шелка, которые показали, что на 7-е сутки культивирования на них наблюдается устойчивая пролиферация фибробластов мыши 3Т3 [8, 14]. Каждый образец был фиксирован и разделен



Рис. 1. СЭМ-изображения поверхности нитей тканевого скаффолда «Фиброплен-Газ 80» с культивированными фибробластами мыши 3Т3 (срок культивирования 7 суток): а – $\times 1000$; б – $\times 4310$. Стрелками указаны примеры фибробластов

Fig. 1. SEM images of the surface of Fibroplen-Gaz 80 tissue scaffold fibers following 7 days of culture with mouse 3T3 fibroblasts: а – magnification $\times 1000$; б – magnification $\times 4310$. Arrows indicate representative of fibroblasts

скальпелем на две части, одна из которых исследовалась при помощи СЭМ, а вторая подвергалась заливке в эпоксидную среду и анализу при помощи СЗНТ.

На рис. 1, а, приведен пример СЭМ-изображения образца скаффолда «Фиброплен-Газ 80» с культивированными фибробластами мыши 3Т3. Мы можем наблюдать нити тканевого скаффолда, плотно покрытые клетками. На рис. 1, б, приведено СЭМ-изображение одной нити данного скаффолда с повышенным увеличением. Однако очевидно, что применение только метода СЭМ в данном случае не позволяет нам получить информацию о внутренней структуре нитей тканевых скаффолдов и распределению клеток внутри них. Использование метода СЗНТ позволило нам выявить и проанализировать существенные различия в структуре скаффолдов «Фиброплен-Газ» и «Фиброплен-Газ 80», которые определяют отличия в адгезии клеток. На рис. 2 приведены СЭМ-изображения поверхности поперечного среза нити скаффолда «Фиброплен-Газ» после среза ультрамикротомом.

В среднем каждая нить скаффолда «Фиброплен-Газ» имеет диаметр порядка 50 мкм и состоит из

~14 шелковых микроволокон размером порядка 10 мкм. Сечение данных микроволокон может иметь нерегулярную форму, далекую от круговой, часто напоминающую вытянутый многоугольник со сглаженными углами либо сектор или сегмент круга. Важным обстоятельством является то, что большинство микроволокон в нитях скаффолда «Фиброплен-Газ», полученного на основе немодифицированной ткани, компактно собраны и склеены между собой.

На рис. 2, в, г, приведены увеличенные СЗМ-изображения фрагментов среза нити, полученные в режиме отображения фазы. Этот метод позволяет отображать наноструктуры скаффолдов и клеток на срезах с меньшим влиянием механических шумов и повышенными контрастом и разрешением. В частности, на данном изображении мы различаем клетки фибробластов мыши 3Т3, контактирующие с микроволоконками только с внешней стороны нити. Клетки

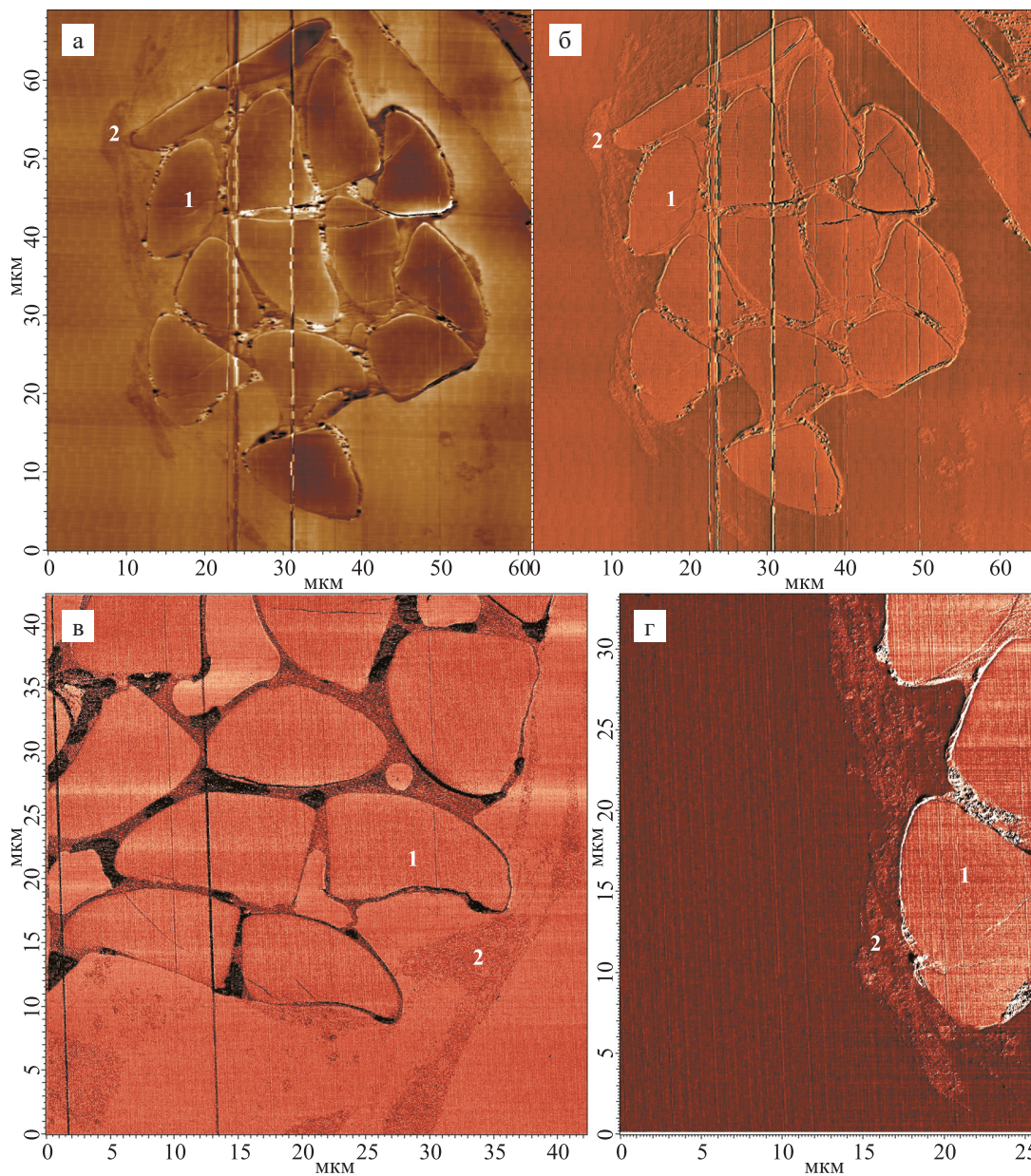


Рис. 2. СЗМ-изображения поверхности поперечного среза нитей тканевого скаффолда «Фиброплен-Газ» с культивированными фибробластами мыши 3Т3 (срок культивирования 7 суток): а – режим отображения топографии; б – режим отображения фазы, размер скана 63,0×68,0 мкм, вариация высоты 50 нм; в – режим отображения фазы, размер скана 54,0×54,0 мкм, вариация высоты 50 нм; г – режим отображения фазы, размер скана 25,0×33,0 мкм. Обозначения: 1 – фиброиновые волокна; 2 – фибробласты

Fig. 2. SEM images of the cross-sectional surface of Fibroplen-Gaz tissue scaffold fibers following 7 days of culture with mouse 3T3 fibroblasts: а – topography mode; б – phase imaging mode (scan size: 63.0×68.0 μm; height variation: 50 nm); в – phase imaging mode (scan size: 54.0×54.0 μm; height variation: 50 nm); г – phase imaging mode (scan size: 25.0×33.0 μm). Labels: 1 – fibrin fibers; 2 – fibroblasts

и их отростки не могут проникнуть внутрь нити, так как микроволокна плотно совмещены друг с другом.

Для ряда полученных СЗМ-изображений срезов нитей скаффолдов с культивированными клетками был выполнен статистический анализ морфологических параметров клеток и микроволокон. Для статистического анализа были выбраны такие морфологические параметры сечений микроволокон, как площадь (S_f) и периметр (P_f) сечения, степень их вытянутости (e), вычисляемая как отношение сторон максимально вытянутого прямоугольника, охватывающего сечение [29], а также среднее расстояние (r) между границами микроволокон, усредняемое для каждой пары соседних сечений.

Полученные данные также позволили нам провести статистический анализ морфологических характеристик сечений клеток ЗТЗ и интерфейсов между клетками и микроволокнами. Были проанализированы такие параметры, как толщина адгезированных клеток (t), площадь сечения клеток (S_c), средний периметр сечения клеток (P_c), а также усредненное отношение суммарной длины периметра контактов клетки с микроволокнами матрикса к общему периметру сечения клетки (k), являющееся важной характеристикой его способности к поддержке адгезии и пролиферации фибробластов [25]. Результаты анализа характеристик шелковых микроволокон и контактирующих с ними фибробластов мыши ЗТЗ для всех исследованных скаффолдов представлены ниже в таблице.

На рис. 3 приведены СЗМ-изображения поверхностей поперечных срезов нитей скаффолда «Фиброплен-Газ 80» с культивированными фибробластами мыши ЗТЗ (срок культивирования 7 суток).

В случае модифицированного скаффолда отдельные шелковые микроволокна в нитях совмещены не так плотно, как мы наблюдали в немодифицированном скаффолде, и клетки могут проникать и взаимодействовать с поверхностью микроволокон, в том числе внутри нити (см. увеличенные СЗМ-изображения фибробластов, взаимодействующих с микроволокнами, на рис. 3, в, г).

Выполненный количественный анализ параметров скаффолдов также указывает на утончение и разобщение микроволокон в модифицированных скаффолдах. Так, средняя площадь S_f сечения микроволокон в модифицированных скаффолдах «Фиброплен-Газ 80» уменьшилась на 18,6% по сравнению с немодифицированными, в то время как среднее расстояние между поверхностями микроволокон r резко выросло – от значения $1,34 \pm 0,29$ мкм для скаффолдов «Фиброплен-Газ» до $6,41 \pm 2,25$ мкм для скаффолдов «Фиброплен-Газ 80». Также можно отметить, что для модифицированных шелковых скаффолдов было получено более высокое среднее значение параметра k , отражающего долю периметра сечения клетки, взаимодействующую с поверхностью скаффолда: оно составило $0,17 \pm 0,08$ (по сравнению со значением $0,12 \pm 0,06$ для немодифицированных скаффолдов), что может быть связано с тем, что адгезия клеток происходит и на поверхностях микроволокон внутри нитей.

Аналогичные результаты наблюдаются при исследовании структуры скаффолдов на основе ткани атлас. На рис. 4 приведен пример СЭМ-изображений образца скаффолда «Фиброплен-Атлас 80» с культивированными фибробластами мыши ЗТЗ. В этом случае мы также наблюдаем пучки нитей скаффолда,

Таблица

Сравнительные морфологические характеристики тканевых скаффолдов и культивированных на них клеток ЗТЗ

Comparative morphological characteristics of tissue scaffolds and 3T3 cells cultured on them

Параметр	Фиброплен-Газ	Фиброплен-Газ 80	Фиброплен-Атлас	Фиброплен-Атлас 80
Средняя площадь сечения волокон S_f , мкм ²	102,86 ± 23,6	83,71 ± 35,8	88,62 ± 27,4	71,43 ± 22,8
Средний периметр сечения волокон P_f , мкм	41,54 ± 11,23	34,06 ± 15,64	34,64 ± 13,3	29,35 ± 12,4
Средний коэффициент вытянутости сечения волокон e	1,63 ± 0,35	1,76 ± 0,38	1,57 ± 0,27	1,68 ± 0,25
Среднее расстояние между границами волокон r , мкм	1,34 ± 0,29	6,41 ± 2,25	1,42 ± 0,32	10,85 ± 5,31
Средняя толщина клеток t , мкм	4,78 ± 1,41	5,22 ± 1,74	4,14 ± 1,42	3,72 ± 1,25
Средняя площадь сечения клеток S_c , мкм ²	77,06 ± 21,13	91,53 ± 27,78	76,44 ± 18,7	81,44 ± 22,84
Средний периметр сечения клеток P_c , мкм	48,74 ± 16,43	56,32 ± 18,97	43,16 ± 14,2	51,48 ± 15,74
Средняя доля границы клетки, взаимодействующая с микроволокном, k	0,12 ± 0,06	0,17 ± 0,08	0,13 ± 0,07	0,19 ± 0,08

покрытые клетками (ср. с рис. 1). Обзорное СЭМ-изображение поверхности поперечного среза нити скаффолда «Фиброплен-Атлас 80» после среза ультрамикротомом приведено на рис. 5.

Можно отметить, что отдельные микроволокна в нити скаффолда в данном случае еще в большей степени разобщены. При этом количество микроволокон

в нити примерно вдвое больше, чем в скаффолдах «Фиброплен-Газ», а сами нити, как видно из СЭМ-изображений, прилегают ближе друг к другу. В этом случае среднее расстояние между микроволоконками выросло до уровня $10,85 \pm 5,31$ мкм (см. таблицу), а клетки в равной мере адгезированы как на внутренние, так и на внешние микроволокна нитей, что

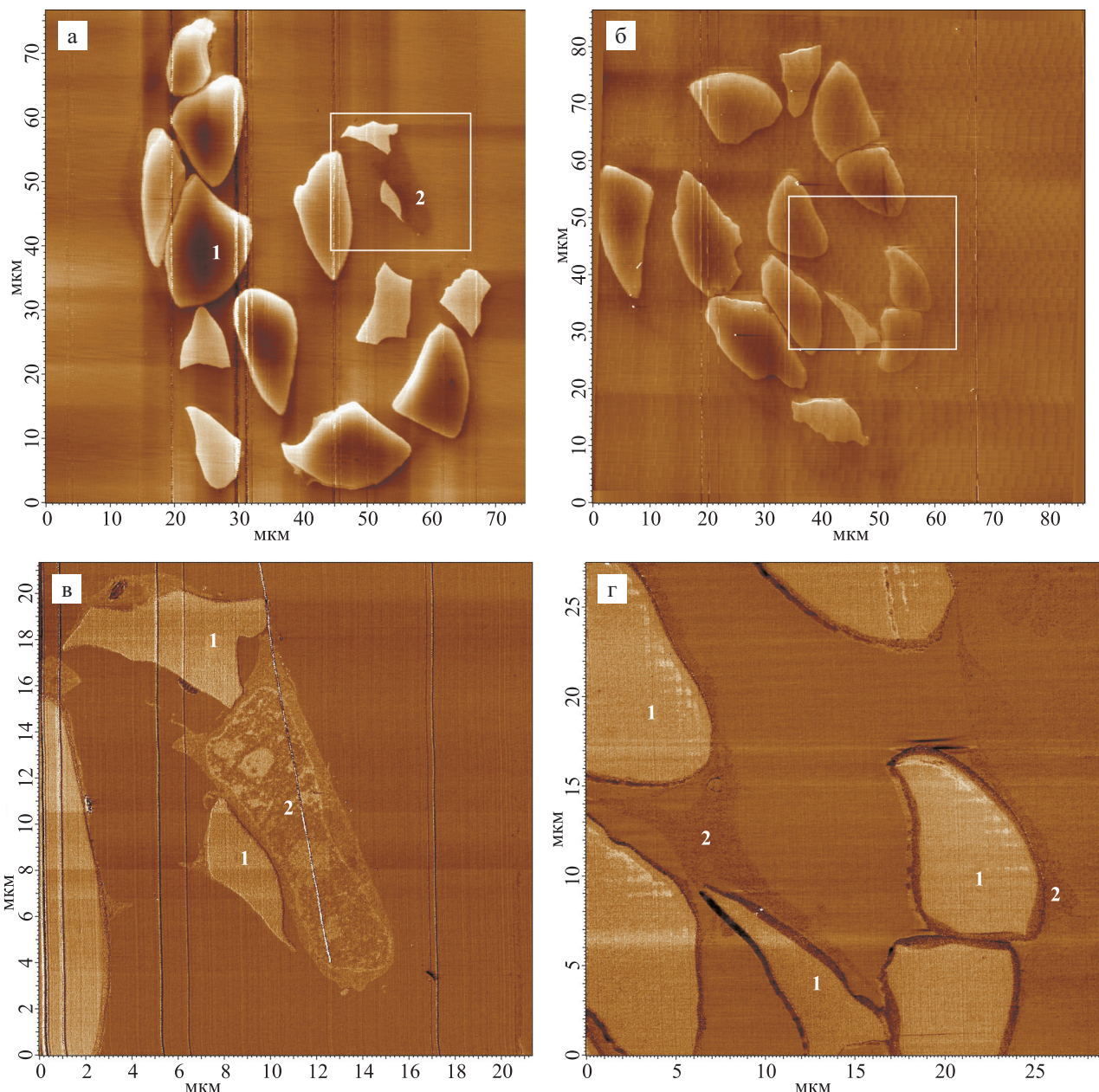


Рис. 3. СЭМ-изображения поверхности поперечного среза нити тканевого скаффолда «Фиброплен-Газ 80» с культивированными фибробластами мыши 3Т3 (срок культивирования 7 суток): а – режим топографии, размер скана 74,0×74,0 мкм, вариация высоты 50 нм; б – режим топографии, размер скана 86,0×86,0 мкм, вариация высоты 60 нм; в – режим отображения фазы, размер скана 21,0×21,0 мкм (выделенная прямоугольником область на а); г – режим отображения фазы, размер скана 29,0×27,0 мкм (выделенная прямоугольником область на б). Обозначения: 1 – фибриновые волокна; 2 – фибробласты

Fig. 3. SEM images of the cross-sectional surface of a Fibroplen-Gaz 80 tissue scaffold fiber following 7 days of culture with mouse 3T3 fibroblasts: а – topography mode (scan size: 74.0×74.0 μm; height variation: 50 nm); б – topography mode (scan size: 86.0×86.0 μm; height variation: 60 nm); в – phase imaging mode (scan size: 21.0×21.0 μm; region indicated by a rectangle in а); г – phase imaging mode (scan size: 29.0×27.0 μm; region indicated by a rectangle in б). Labels: 1 – fibrin fibers; 2 – fibroblasts

продемонстрировано на СЗМ-изображениях, приведенных на рис. 6.

При этом средняя площадь сечения микроволокон скаффолда «Фиброплен-Атлас 80» уменьшилась при модификации на 19,4%, а средняя доля периметра сечения клеток, взаимодействующая с поверхностью микроволокон, показывает тенденцию к увеличению от $k = 0,13 \pm 0,07$ до уровня $0,19 \pm 0,08$.

Наблюдаемое взаимодействие клеток с микроволоконками внутри нитей скаффолда может служить ускорению биодеградации скаффолдов, продемонстрированному нами в предыдущих работах [21, 22]. Учитывая высокую регенеративную активность фиброина шелка [1–4, 6–9], можно предположить, что модифицированные тканевые скаффолды «Фиброплен-Газ 80» и «Фиброплен-Атлас 80» могут лучше стимулировать регенерацию раневых поверхностей, чем немодифицированные скаффолды, так как в данном случае как внешние, так и внутренние поверхности микроволокон внутри нитей доступны для взаимодействия с клетками, и соответственно, оно может происходить более интенсивно. При этом выбор более или менее плотных скаффолдов («Фиброплен-Атлас 80» или «Фиброплен-Газ 80» соответственно) может определяться в том числе и конкретной терапевтической или хирургической задачей в зависимости от требуемых механических свойств используемых изделий [23]. Однако экспериментальное подтверждение выдвинутых предположений о регенеративном потенциале скаффолдов

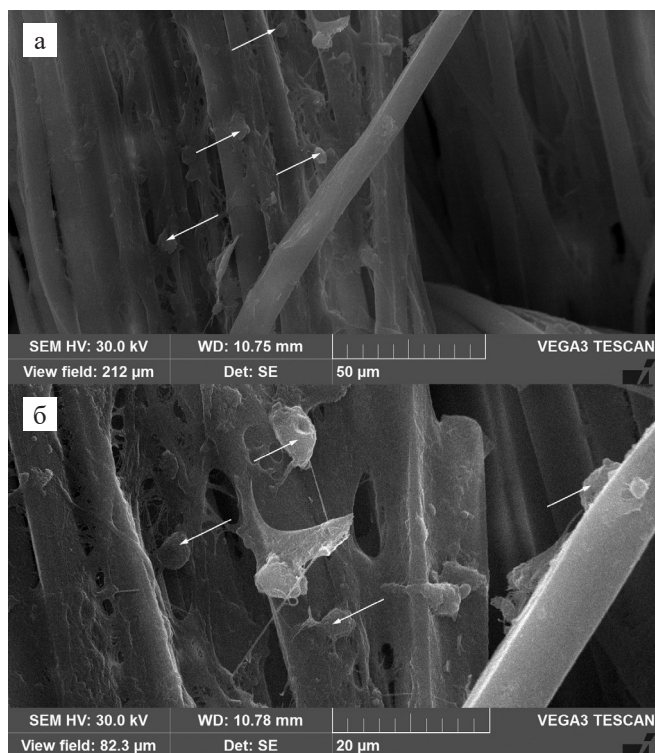


Рис. 4. СЗМ-изображение поверхности скаффолда «Фиброплен-Атлас 80» с культивированными фибробластами мыши 3Т3 (срок культивирования 7 суток): а – $\times 1800$; б – $\times 4630$. стрелками указаны примеры фибробластов

Fig. 4. SEM image of the surface of the Fibroplene-Atlas 80 scaffold following 7 days of culture with mouse 3T3 fibroblasts: a – magnification $\times 1800$; б – magnification $\times 4630$. Arrows indicate representative of fibroblasts

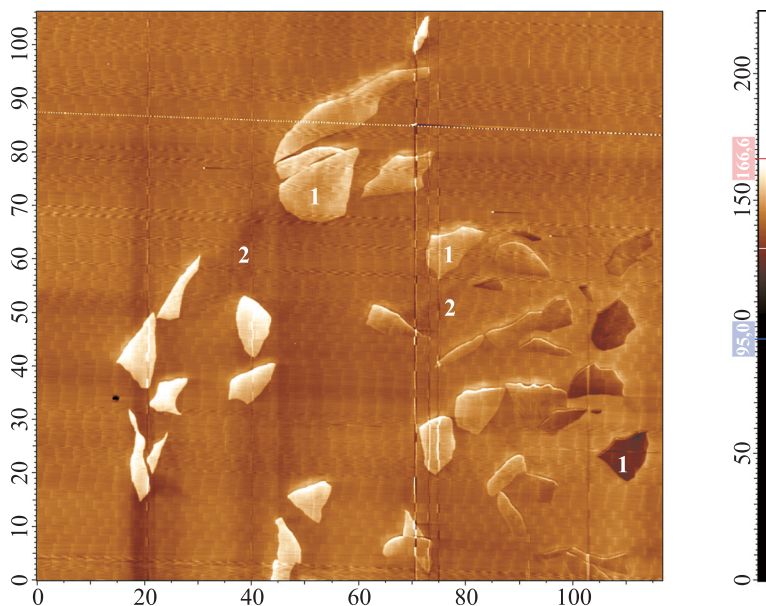


Рис. 5. СЗМ-изображение поверхности поперечного среза нити тканевого скаффолда «Фиброплен-Атлас 80» с культивированными фибробластами мыши 3Т3 (срок культивирования 7 суток), режим топографии, размер скана 116,0 \times 106,0 мкм, вариация высоты 70 нм. Обозначения: 1 – фиброиновые волокна; 2 – фибробласты

Fig. 5. SEM image of the cross-section of a Fibroplene-Atlas 80 tissue scaffold fiber following 7 days of culture with mouse 3T3 fibroblasts, acquired in topography mode (scan size: 116.0 \times 106.0 μm ; height variation: 70 nm). Labels: 1 – fibroin fibers; 2 – fibroblasts

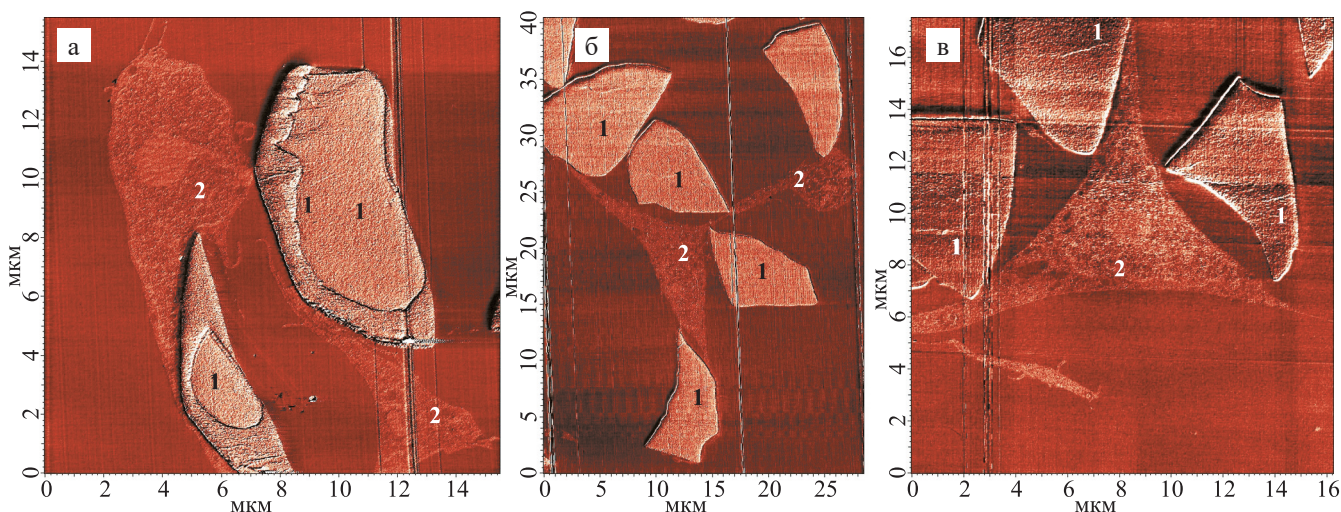


Рис. 6. СЗМ-изображения поверхности поперечного среза микроволокон тканевого скаффолда «Фиброплен-Атлас 80» с культивированными фибробластами мыши 3Т3 (срок культивирования 7 суток), режим отображения фазы: а – размер скана 15,0×15,0 мкм; б – размер скана 28,0×40,0 мкм; в – размер скана 18,0×19,0 мкм. Обозначения: 1 – фиброиновые волокна; 2 – фибробласты

Fig. 6. SEM images of the cross-sectional surface of microfibers from a Fibroplen-Atlas 80 tissue scaffold following 7 days of culture with mouse 3T3 fibroblasts, acquired in phase imaging mode: а – scan size: 15.0×15.0 μm; б – scan size: 28.0×40.0 μm; в – scan size: 18.0×19.0 μm. Labels: 1 – fibrin fibers; 2 – fibroblasts

требует проведения сравнительных экспериментов по регенерации тканей *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наноструктурный анализ фибробластов мыши 3Т3, культивированных на тканевых скаффолдах на основе натурального шелка «Фиброплен-Газ», «Фиброплен-Газ 80», «Фиброплен-Атлас» и «Фиброплен-Атлас 80», позволил получить данные о топологических и морфологических особенностях взаимодействия клеток с модифицированными и немодифицированными тканевыми скаффолдами. Взаимодействие клеток с микроволоконными нитями модифицированных скаффолдов может способствовать ускорению биодеградации данных скаффолдов. Совокупность полученных наноструктурных данных и результатов клеточных экспериментов *in vitro* позволяет сделать вывод о том, что исследуемые шелковые скаффолды поддерживают адгезию клеток 3Т3 и формирование клеточно-матриксных контактов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Yildiz A, Başaran Mutlu-Ağardan N, Acartürk F. Silk fibroin: features, production methods and medical applications. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2026; 118: 108066. doi: 10.1016/j.jddst.2026.108066.
2. Zhang Y, Roohani I. Recent Advances in Silk Fibroin Derived from *Bombyx mori* for Regenerative Medicine. *J Funct Biomater.* 2026; 17 (1): 12. doi: 10.3390/jfb17010012.
3. Liu B, Li Y, Chen H, Li S, Dan X, Xue P et al. From molecular mechanisms to clinical translation: Silk fibroin-based biomaterials for next-generation wound healing. *Int J Biol Macromol.* 2025; 313: 144266. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2025.144266.
4. Manoochehrabadi T, Solouki A, Majidi J, Khosravimelal S, Lotfi E, Lin K et al. Silk biomaterials for corneal tissue engineering: From research approaches to therapeutic potentials; A review. *Int J Biol Macromol.* 2025; 305 (Pt 1): 141039. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2025.141039.
5. Liu J, Sun H, Peng Y, Chen L, Xu W, Shao R. Preparation and Characterization of Natural Silk Fibroin Hydrogel for Protein Drug Delivery. *Molecules.* 2022; 27 (11): 3418. doi: 10.3390/molecules27113418.
6. Hemalatha T, Aarthy M, Sundarapandiyan A, Ayyadurai N. Bioengineered Silk Fibroin Hydrogel Reinforced with Collagen-Like Protein Chimeras for Improved Wound Healing. *Macromol Biosci.* 2025; 25 (2): e2400346. doi: 10.1002/mabi.202400346.
7. Pashutin A, Podbolotova E, Kirsanova L, Dosi O, Efimov AE, Agapova O, Agapov I. Silk Fibroin Microparticle/Carboxymethyl Cellulose Composite Gel for Wound Healing Applications. *Biomimetics (Basel).* 2025; 10 (7): 434. doi: 10.3390/biomimetics10070434.
8. Safonova L, Bobrova M, Efimov A, Lyundup A, Agapova O, Agapov I. A Comparative Analysis of the Structure and Biological Properties of Films and Microfibrous Scaffolds Based on Silk Fibroin. *Pharmaceutics.* 2021; 13 (10): 1561. doi: 10.3390/pharmaceutics13101561.
9. Arthe R, Arivuoli D, Ravi V. Preparation and characterization of bioactive silk fibroin/paramylon blend films for

- chronic wound healing. *Int J Biol Macromol.* 2020; 154: 1324–1331. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.010.
10. Li Y, Liu Z, Tang Y, Fan Q, Feng W, Luo C et al. Three-dimensional silk fibroin scaffolds enhance the bone formation and angiogenic differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells: a biocompatibility analysis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2020; 52 (6): 590–602. doi: 10.1093/abbs/gmaa042.
 11. Ye J, Xie B, Hu J, Xu X, Lu S, Wang J, Yang L. Recent advances in silk fibroin-based biomaterials for tissue engineering applications. *Int J Biol Macromol.* 2025; 322 (Pt 2): 146764. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2025.146764.
 12. Efimov AE, Moisenovich MM, Bogush VG, Agapov II. 3D nanostructural analysis of silk fibroin and recombinant spidroin 1 scaffolds by scanning probe nanotomography. *RSC Adv.* 2014; 4: 60943–60947. doi: 10.1039/c4ra08341e.
 13. Dos Santos FV, Siqueira RL, de Moraes Ramos L, Yoshioaka SA, Branciforti MC, Correa DS. Silk fibroin-derived electrospun materials for biomedical applications: A review. *Int J Biol Macromol.* 2024; 254 (Pt 2): 127641. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.127641.
 14. Safonova L, Bobrova M, Efimov A, Davydova L, Tenchurina T, Bogush V et al. Silk Fibroin/Spidroin Electrospun Scaffolds for Full-Thickness Skin Wound Healing in Rats. *Pharmaceutics.* 2021; 13 (10): 1704. doi: 10.3390/pharmaceutics13101704.
 15. Zhang X, Reagan MR, Kaplan DL. Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009; 61 (12): 988–1006. doi: 10.1016/j.addr.2009.07.005.
 16. De Giorgio G, Matera B, Vurro D, Manfredi E, Galstyan V, Tarabella G et al. Silk fibroin materials: biomedical applications and perspectives. *Bioengineering (Basel).* 2024; 11 (2): 167. doi: 10.3390/bioengineering11020167.
 17. Aibibu D, Hild M, Wöltje M, Cherif C. Textile cell-free scaffolds for *in situ* tissue engineering applications. *J Mater Sci Mater Med.* 2016; 27: 63. doi: 10.1007/s10856-015-5656-3.
 18. Pereira RFP, Silva MM, de Zea Bermudez V. Bombyx mori silk fibers: an outstanding family of materials. *Macromol Mater Eng.* 2015; 300: 1171–1198. doi: 10.1002/mame.201400276.
 19. Fang Y, Xu L, Wang M. High-throughput preparation of silk fibroin nanofibers by modified bubble-electrospinning. *Nanomaterials.* 2018; 8 (7): 471. doi: 10.3390/nano8070471.
 20. Агапов III, Агапова ОИ, Ефимов АЕ, Соколов ДЮ, Боброва ММ, Сафонова ЛА. Способ получения биodeградируемых скаффолдов на основе тканей из натурального шелка. Патент на изобретение RU2653428 C1, 08.05.2018. Agapov II, Agapova OI, Efimov AE, Sokolov DYu, Bobrova MM, Safonova LA. Способ polucheniya biodegradiruemykh skaffoldov na osnove tkaney iz natural'nogo shelka. Patent na izobretenie RU2653428 S1, 08.05.2018.
 21. Agapov II, Podbolotova EI, Kirsanova LA, Grudinina NV, Pashutin AR, Agapova OI et al. *In vitro* and *in vivo* Biodegradation of Silk Fabric Scaffolds. *Dokl Biol Sci.* 2025; 520 (1): 34–37. doi: 10.1134/S0012496624600519.
 22. Подболотова ЕИ, Кирсанова ЛА, Кузнецова ЕГ, Грудинин НВ, Папутин АР, Агапова ОИ и др. Разработка и исследование биodeградируемых тканевых скаффолдов из натурального шелка. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2025; 27 (2): 100–111. Podbolotova EI, Kirsanova LA, Kuznetsova EG, Grudinina NV, Pashutin AR, Agapova OI et al. Development and evaluation of biodegradable silk fibroin scaffolds. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs.* 2025; 27 (2): 100–111. doi: 10.15825/1995-1191-2025-2-100-111.
 23. Подболотова ЕИ, Папутин АР, Грудинин НВ, Волкова ЕА, Агапова ОИ, Ефимов АЕ, Агапов III. Исследование механических и структурных свойств шелковых скаффолдов для тканевой инженерии и реконструктивной хирургии. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2025; 27 (4): 125–132. Podbolotova EI, Pashutin AR, Grudinina NV, Volkova EA, Agapova OI, Efimov AE, Agapov II. Silk-based scaffolds for tissue engineering and reconstructive surgery: mechanical and structural properties. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs.* 2025; 27 (4): 125–132. (In Russ.) doi: 10.15825/1995-1191-2025-4-125-132.
 24. Alekseev A, Efimov A, Loos J, Matsko N, Syurik J. Three dimensional imaging of polymer materials by Scanning Probe Tomography. *Eur Polym J.* 2014; 52: 154–165. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2014.01.003.
 25. Efimov AE, Agapova OI, Safonova LA, Bobrova MM, Parfenov VA, Koudan EV et al. 3D scanning probe nanotomography of tissue spheroid fibroblasts interacting with electrospun polyurethane scaffold. *Express Polymer Letters.* 2019; 13 (7): 632–641. doi: 10.3144/expresspolymlett.2019.53.
 26. Balashov V, Efimov A, Agapova O, Pogorelov A, Agapov I, Agladze K. High resolution 3D microscopy study of cardiomyocytes on polymer scaffold nanofibers reveals formation of unusual sheathed structure. *Acta Biomaterialia.* 2018; 68: 214–222. doi: 10.1016/j.actbio.2017.12.031.
 27. Efimov AE, Agapova OI, Safonova LA, Bobrova MM, Parfenov VA, Koudan EV et al. Nanostructural features of contacts of fibroblasts with dual-scale biocompatible polyurethane scaffold. *Nanotechnologies in Russia.* 2016; 11: 830–834. doi: 10.1134/S1995078016060094.
 28. Tremel A, Cai A, Tirtaatmadja N, Hughes BD, Stevens GW, Landman KA et al. Cell migration and proliferation during monolayer formation and wound healing. *Chem Eng Sci.* 2009; 64: 247–253. doi: 10.1016/j.ces.2008.10.008.
 29. Dražič S, Ralević N, Žunić J. Shape elongation from optimal encasing rectangles. *Comput Math Appl.* 2010; 60 (7): 2035–2042. doi: 10.1016/j.camwa.2010.07.043.

Статья поступила в редакцию 9.02.2026 г.
The article was submitted to the journal on 9.02.2026