

DOI: 10.15825/1995-1191-2016-3-74-84

## ПЛЕНКИ НА ОСНОВЕ ФИБРОИНА ШЕЛКА ДЛЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ ПОЛНОСЛОЙНОЙ РАНЫ КОЖИ У КРЫС

Л.А. Сафонова<sup>1, 2</sup>, М.М. Боброва<sup>1, 2</sup>, О.И. Агапова<sup>1</sup>, А.Ю. Архипова<sup>2</sup>, А.В. Гончаренко<sup>2</sup>, И.И. Агапов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

**Цель.** Изучение влияния пленок на основе фиброина шелка, полученных методом полива, на процесс заживления полнослойной кожной раны у крыс породы Wistar. **Материалы и методы.** Было получено 4 вида пленок с общей концентрацией белка 20 мг/мл: пленки из водного раствора фиброина шелка, пленки из раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте, пленки из водного раствора фиброина шелка с добавлением 30% коллагена по массе и пленки из раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте с добавлением 30% коллагена по массе. Пленки были получены методом полива на поверхности полированного тефлона. Методом сканирующей электронной микроскопии была исследована поверхностная структура пленок. Проведен анализ цитотоксичности полученных изделий на модели мышинных фибробластов линии 3Т3 методом МТТ. Полученные пленки использованы в качестве раневых покрытий для заживления полнослойной кожной раны у крыс породы Wistar. **Результаты.** Было показано, что поверхность полученных изделий имеет микро- и нанорельеф в виде шероховатостей. В эксперименте по изучению цитотоксичности пленок пролиферативная активность мышинных фибробластов линии 3Т3 увеличивалась в течение 7 дней эксперимента. Полученные изделия ускоряют заживление полнослойной кожной раны крыс породы Wistar в среднем на 25%. Анализ гистологических срезов выявил структурное восстановление кожного покрова, очагов воспаления выявлено не было. **Заключение.** Полученные изделия не являются токсичными для эукариотических клеток и имеют структуру, оптимальную для адгезии и пролиферации фибробластов. Использование пленок для покрытия полнослойной кожной раны ускоряет ее заживление, что подтверждается гистологическими исследованиями.

*Ключевые слова:* фиброин шелка, коллаген, метод полива, заживление полнослойной кожной раны.

## FIBROIN SILK BASED FILMS FOR RAT'S FULL-THICKNESS SKIN WOUND REGENERATION

Л.А. Safonova<sup>1, 2</sup>, М.М. Bobrova<sup>1, 2</sup>, О.И. Agapova<sup>1</sup>, А.Ю. Arkhipova<sup>2</sup>, А.В. Goncharenko<sup>2</sup>, И.И. Agapov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Moscow State University, Biological Faculty, Moscow, Russian Federation

**Aim** of this study is to research an effect of silk fibroin films fabricated by casting method upon Wistar rat's full-thickness skin wound regeneration. **Materials and methods.** 4 different kinds of films with protein concentration equal to 20 mg/ml were fabricated: films from silk fibroin aqueous solution, films from silk fibroin formic acid solution, films from silk fibroin aqueous solution containing 30% collagen by weight, films from silk fibroin formic acid solution containing 30% collagen by weight. All kinds of films were fabricated by casting method on polished Teflon surface. Scanning electron microscopy was applied to research films' surface structure. Cytotoxicity test of the films was realized on mouse 3T3 fibroblasts model by MTT assay. Manufactured films were

**Для корреспонденции:** Агапов Игорь Иванович. Адрес: 123182, г. Москва, ул. Щукинская, д. 1.  
E-mail: igor\_agapov@mail.ru

**For correspondence:** Agapov Igor Ivanovich. Address: 1, Shchukinskaya St., Moscow, 123182, Russian Federation.  
E-mail: igor\_agapov@mail.ru

utilized to regenerate full-thickness skin wounds in Wistar rats. **Results.** It was shown that films' surface was characterized by micro- and nanorelief in the form of roughness. The proliferative activity of mouse 3T3 fibroblasts increased during 7 days of cytotoxicity test. Fabricated films enlarge the regeneration rate of full-thickness Wistar rat skin wounds an average of 25%. Histological analysis indicated structural skin restoration without any inflammatory tissue. **Conclusion.** All fabricated films are non-cytotoxic and characterized by appropriate structure for the adhesion and proliferation of fibroblasts. The application of films for full-thickness skin wound regeneration increases its restoration rate which is confirmed by histological examination.

*Key words: silk fibroin, collagen, casting method, full-thickness skin wound regeneration.*

## ВВЕДЕНИЕ

Кожа является самым большим по площади и при этом сложно устроенным органом позвоночных животных. В организме кожа выполняет важные функции: защищает внутренние ткани организма от повреждений, обеспечивает сенсорную функцию, а также регулирует постоянство внутренней среды организма. Повреждение кожного покрова может возникать вследствие ряда причин, при этом заживление кожных ран является комплексным процессом и требует взаимодействий между собой различных типов клеток и регулируется множеством тканевых цитокинов и факторов роста [1].

Индукция заживления кожных ран в первую очередь обеспечивается закрытием поверхности раны с помощью перевязочных материалов для превращения ее в хирургически чистую рану. Однако использование перевязочных материалов само по себе не способствует регенерации кожного покрова, так как такие материалы являются биологически инертными. В связи с этим в тканевой инженерии становится актуальной задача разработки биологического эквивалента кожи, который бы позволил ускорить процесс заживления раны не только за счет сохранения ее стерильности, но и за счет активизации в ней процессов восстановительной регенерации.

Основным методом устранения тяжелых повреждений кожного покрова является аутологичная трансплантация кожи. Однако применение этого метода сопряжено с рядом трудностей и прежде всего необходимостью подготовки раневого ложа для трансплантата и необходимостью использования хорошо васкуляризованных трансплантатов, к которым кожа не относится. В связи с указанными проблемами возникает острая необходимость разработки биоинженерного эквивалента кожи [1].

Активация регенерации кожного покрова требует подбора материала, который обеспечивал бы структурное и функциональное восстановление кожи. В связи с этим для восстановления кожного покрова часто применяют изделия на основе коллагена вследствие его высокого содержания в нативном внеклеточном матриксе кожи. Однако конструкции на основе коллагена тяжело подвергаются структурированию и не обладают достаточной механической прочностью. Поэтому помимо колла-

гена рассматривается возможность применения других натуральных материалов, в том числе фиброина шелка тутового шелкопряда *Bombyx mori* [2]. В настоящее время при регенерации поврежденных органов и тканей используются 2 подхода: создание тканеинженерных конструкций, в том числе со стволовыми клетками [3], а также использование биополимерных матриц в качестве самостоятельных изделий, не содержащих клеточного компонента. Уникальные свойства фиброина шелка позволяют считать перспективным его использование в рамках обоих рассматриваемых подходов, а также для создания композитов фиброина шелка с матриксными белками нативной кожи [4–6]. Помимо этого, для формирования изделий на основе фиброина шелка могут быть использованы различные растворители. Это позволяет получать нано- и микроструктурированные изделия, которые имеют различные физико-химические свойства, в том числе различную пористость, которые оказывают существенное влияние на биологические свойства изделия [7].

Фиброин шелка является фибриллярным белком, а его первичная структура характеризуется большим числом повторов [-Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala]<sub>n</sub>. Вторичная структура фиброина шелка представляет собой антипараллельные β-слои, связанные водородными связями. Аморфные участки белка образуют α-спирали, доля которых возрастает при гидратации белка. В третичной структуре фиброина выделяют 2 цепи: тяжелую цепь с молекулярной массой 390 кДа и легкую цепь – 26 кДа, присутствующие в отношении 1:1 и соединенные дисульфидными связями [8]. Изменяя долю β-слоев в структуре фиброина шелка, можно контролировать механические свойства изделия и скорость его биодegradации [9].

Цель данной работы – изучение влияния пленок на основе фиброина шелка, полученных методом полива, на процесс заживления полнослойной кожной раны у крыс породы Wistar.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Получение фиброина шелка

Фиброин шелка получали из коконов тутового шелкопряда *B. mori*. На первом этапе коконы подвергали очистке от серицина. Навеску шелка из ко-

конов 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.

**Получение водного раствора фиброина шелка**

Для получения водного раствора фиброина к 130 мг отмытого шелка добавляли раствор, содержащий 389 мг CaCl<sub>2</sub>, 388 мкл C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH и 544 мкл H<sub>2</sub>O на 1 мл раствора. Смесь нагревали в течение 5 часов на водяной бане до полного растворения шелка. Полученный раствор центрифугировали в течение 7 минут при 12 100 g. Супернатант диализовали против 500 мл бидистиллированной воды, всего проводили 5 смен диализа по 30 минут. Раствор фиброина центрифугировали 7 минут при 12 100 g, концентрацию фиброина определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм, молярный коэффициент экстинкции принимали равным 473 480 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, что соответствует теоретически рассчитанному коэффициенту экстинкции по аминокислотной последовательности тяжелой цепи фиброина шелка (номер в базе данных UniProt: P05790).

**Получение водного раствора коллагена**

Раствор коллагена из крысиных хвостов в уксусной кислоте [10] центрифугировали в течение 20 минут при 5000 g. Супернатант диализовали против 1 л бидистиллированной воды при комнатной температуре, смену диализата проводили 5 раз через каждый час. Концентрация полученного раствора составила 9 мг/мл. Полученный раствор содержит от 60 до 85% коллагена, 60% которого составляет коллаген I типа [11].

**Получение раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте**

Навеску отмытого шелка растворяли в муравьиной кислоте из расчета 20 мг/мл при нагревании до 40 °C на водяной бане в течение 30 минут. Полученный раствор центрифугировали 5 минут при 12 100 g.

**Изготовление пленок из фиброина шелка и смеси фиброина шелка с коллагеном**

Пленки получали методом полива. Для изготовления пленки диаметром 1 см наносили 100 мкл раствора с заданным составом (табл. 1) на поверхность полированного тефлона и высушивали в течение

двух дней при комнатной температуре. Общая концентрация белка в растворе для изготовления пленки составляла 20 мг/мл, содержание коллагена в смеси с фиброином шелка – 30% по массе. Пленки снимали с поверхности тефлона с помощью скальпеля, предварительно инкубируя их в спирте в течение 15 минут, и хранили в 96%-ном спирте при температуре 4 °C.

**Анализ структуры пленок методом сканирующей электронной микроскопии**

Образцы пленок фиксировали глутаровым альдегидом, дегидратировали возрастающими концентрациями этанола – 10, 30, 50, 70, 95% – и помещали в ацетон (Химмед, Россия). После этого образцы высушивали методом перехода критической точки с помощью прибора НСР-2 (Hitachi Ltd., Япония). Высушенные образцы покрывали слоем золота толщиной 20 нм в атмосфере аргона при ионном токе 6 мА и давлении 0,1 мм рт. ст. с использованием прибора IonCoaterIB-3 (Eiko Engineering, Япония), затем анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа Camscan S2 (Cambridge Instruments, Великобритания). Разрешение микроскопа 10 нм, рабочее напряжение 20 кВ. Изображения получали с использованием программного обеспечения «Micro Capture» (SMA, Россия).

**Анализ цитотоксичности пленок**

Оценку цитотоксичности проводили путем оценки пролиферативной активности фибробластов. Для этого пленки прикрепляли к поверхности

Таблица 1

**Группы животных в эксперименте по регенерации кожного покрова**  
**Groups of animals in the experiment of skin regeneration**

Номер группы	Метод и состав пленки, применяемой для регенерации
1	Контроль – заживление без пленки
2	Пленка, полученная высушиванием водного раствора фиброина шелка с концентрацией 20 мг/мл
3	Пленка, полученная высушиванием водного раствора фиброина шелка, содержащего 30% коллагена по массе, с общей концентрацией белка 20 мг/мл
4	Пленка, полученная высушиванием раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте с концентрацией 20 мг/мл
5	Пленка, полученная высушиванием раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте, содержащий 30% коллагена по массе, с общей концентрацией белка 20 мг/мл

лунок 96-луночного планшета с помощью 5% раствора желатина. В качестве контроля использовали культуральный пластик. Перед проведением теста планшет подвергали стерилизации: обрабатывали 70% спиртом 30 минут и облучали ультрафиолетом в течение 30 минут. В лунки планшета вносили стерильный раствор фосфатно-солевого буфера (рН = 7,4) на 15 минут, а затем на 30 минут стерильный 0,9% раствор NaCl. Далее в лунки планшета вносили по 300 мкл среды инкубации Dulbecco's Modified Eagle's Medium – low glucose (Sigma, США) и Ham's F12 (Flow laboratories, Великобритания) в соотношении 1:1, содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 40 мкг/мл гентамицина (Ферейн, Россия), 4 мМ глутамин (ПанЭко, Россия), и инкубировали 15 минут. Суспензию мышечных фибробластов 3Т3 в среде инкубации вносили в лунки планшета из расчета 9000 клеток на 1 см<sup>2</sup> поверхности. Клетки инкубировали в термостате при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> в течение 7 дней.

Оценку цитотоксичности проводили согласно ГОСТ Р ИСО 10993-2-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*» с помощью МТТ-теста [12] на 3, 6 и 9-й дни эксперимента. Для этого в каждую лунку планшета вносили по 50 мкл раствора 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромида (МТТ). Инкубировали в термостате при 37 °С при содержании 5% CO<sub>2</sub> в течение 3–4 часов до выпадения темно-синих кристаллов формазана. Затем планшет центрифугировали в течение 5 минут при 1500 об/мин. Супернатант удаляли, осадок формазана растворяли в ДМСО и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 540 нм с помощью анализатора иммуноферментных реакций Пикон (Пикон, Россия).

### Моделирование полнослойной кожной раны у крыс

Эксперимент *in vivo* проводили на модели заживления полнослойной кожной раны у крыс породы Wistar.

Все операции с животными осуществляли под ингаляционным эфирным наркозом, обеспечиваемым с помощью эксикатора, из расчета 50 мг/кг массы тела. При этом животные находились на спонтанном дыхании с частотой 75 ± 10 дыхательных циклов в минуту, что соответствует хирургической стадии наркоза.

Экспериментальных животных распределяли на 5 групп в зависимости от материала, используемого в процессе создания пленок для раневого покрытия. Количество животных в каждой группе было равным 5 (табл. 1).

Для формирования раны крысе удаляли шерсть на спине в области лопаток с помощью лезвия и депиляционного крема, после чего кожу обрабатывали 0,05% раствором хлоргексидина. Далее крысе наносили полнослойную рану диаметром 15 ± 1 мм с помощью хирургических ножниц и скальпеля. При этом глубина повреждения соответствовала толщине кожного покрова крысы, включающего эпидермис, дерму и гиподерму. Рану обрабатывали 0,05% раствором хлоргексидина.

После этого на поверхности раны размещали пленку, предварительно стерилизованную 70% спиртом в течение 12 часов, и пришивали к поверхности раны тремя швами с помощью хирургических полипропиленовых нитей. В процессе операции следили за тем, чтобы пленка была влажной, и при необходимости увлажняли ее 0,05% раствором хлоргексидина. Затем рану с пришитым раневым покрытием вновь обрабатывали 0,05% раствором хлоргексидина, после чего накладывали стерильную марлевую повязку, которую снимали на третий день проведения эксперимента.

В течение эксперимента крысы находились изолированно друг от друга в одиночных клетках со свободным доступом к воде и пище.

### Оценка заживления полнослойной кожной раны

Оценку заживления ран проводили на 3, 9, 14, 18, 23, 28, 35 и 40-й дни эксперимента. Качественную оценку заживления ран проводили визуально. Изображения получали с помощью цифровой фотокамеры Nikon D5100 18-105 VR kit и объектива Nikon модели AF-S DX 18-105 мм f/3,5-5,6 G ED VR. Для количественной оценки заживления кожной раны измеряли диаметр раны (d) и вычисляли процент уменьшения раны (A) в каждый из контрольных дней эксперимента по следующей формуле:

$$A = \frac{d_{(0)} - d_{(0, 3, 9, 14, 18, 23, 28)}}{d_{(0)}} \times 100\%$$

Проводили анализ полученных значений, отображающих изменение площади раны по исследуемым срокам.

### Гистологическое исследование

Образцы кожи крыс размером 20 ± 3 мм фиксировали с помощью смеси формалина, этанола и уксусной кислоты в объемном соотношении 4:1:0,3. Далее образцы кожи заливали в парафин, после чего получали срезы с помощью микротомы Leica CM 1900 UV (Leica Microsystems GmbH, Germany) толщиной 14 мкм. Окрашивание срезов производили гематоксилин-эозином. Полученные окрашенные срезы заключали в канадский бальзам и анализировали с помощью микроскопа Leica DM 4000B

(Leica Microsystems GmbH, Germany). Изображения фрагментов полученных срезов получали с помощью цифровой камеры Leica DFC310 Fx (Leica Microsystems GmbH, Germany). Обработку изображений проводили в программе Leica Application Suite V4 (Leica Microsystems GmbH, Germany).

### Обработка данных

Статистический анализ результатов проводили методом дисперсионного анализа. Статистическую значимость оценивали с помощью критерия Манна–Уитни, уровень статистической значимости  $p$  принимали равным 0,05.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Для выполнения данного исследования методом полива были получены пленки следующего состава: пленка из водного раствора фиброина шелка тутового шелкопряда *B. mori*, пленка из раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте, пленка из водного

раствора фиброина шелка с добавлением коллагена и пленка из раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте с добавлением коллагена (табл. 1). Общая концентрация белка во всех изделиях была равной 20 мг/мл. Содержание коллагена в изделиях, полученных из смесей полимеров, составляло 30% по массе. Все изделия были получены в одинаковых условиях.

Толщина полученных изделий была равной  $30 \pm 10$  мкм, все полученные изделия являлись бесцветными.

### Анализ поверхностной структуры пленок методом сканирующей электронной микроскопии

Поверхностная структура пленок, исследованная методом сканирующей электронной микроскопии, представляет собой микро- и нанорельеф в виде шероховатостей (рис. 1) и характеризуется волокнистой структурой.

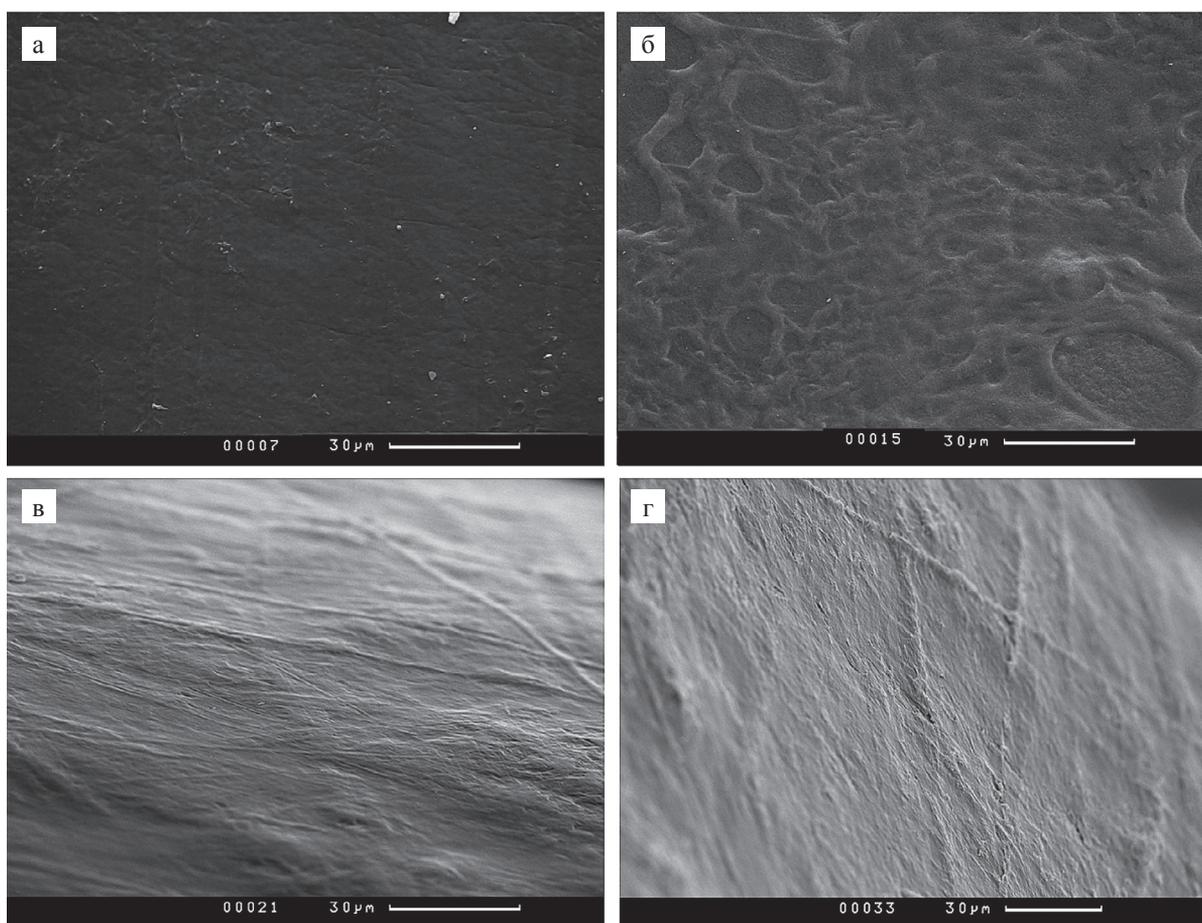


Рис. 1. Изображения поверхности пленок, полученных методом сканирующей электронной микроскопии: а – из водного раствора фиброина шелка; б – из водного раствора фиброина шелка с добавлением 30% коллагена по массе; в – из раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте; г – из раствора фиброина шелка в муравьиной кислоте с добавлением 30% коллагена по массе

Fig. 1. Scanning electron microscopy images of films surface: а – from silk fibroin aqueous solution; б – from silk fibroin aqueous solution contains 30% collagen by mass; в – from silk fibroin formic acid solution; г – from silk fibroin formic acid solution contains 30% collagen by mass

### Анализ цитотоксичности пленок

Полученные изделия исследовали на цитотоксичность на модели пролиферации мышинных фибробластов линии 3T3 в течение 7 дней. В качестве контроля использовали культуральный пластик. Проллиферативная активность клеток, культивируемых на полученных изделиях, возрастала в ходе эксперимента (рис. 2). Это означало, что все полученные изделия не оказывают негативного влияния на жизнеспособность эукариотических клеток, однако пролиферативная активность фибробластов на пленках, полученных из водных растворов полимеров, на 5-й и 7-й дни была достоверно выше, чем на других полученных изделиях.

### Моделирование полнослойной кожной раны у крыс породы Wistar и оценка заживления раны

У животных в 5 экспериментальных группах (табл. 1) в день проведения операции, а также на 3, 9, 14, 18, 23, 28, 35 и 40-й дни эксперимента были

получены изображения ран (рис. 3). На рисунке не приведены изображения на 35-й и 40-й дни эксперимента, так как они не являются показательными – к этому времени произошло зарастание раны во всех группах, за исключением контрольной.

По полученным измеренным значениям диаметра ран была составлена табл. 2, отражающая изменение процента уменьшения раны с течением времени.

Раневые покрытия на основе фиброина шелка ускоряют регенерацию кожного покрова. Пленки, полученные из растворов полимеров, ускоряют заживление кожной раны на 12 дней по сравнению с контролем. На 28-й день эксперимента наблюдалось полное заживление ран, покрытых пленками из фиброина шелка, рубцовой ткани на месте раны не было обнаружено. В контрольной группе № 1 полное заживление раны было достигнуто на 40-й день. Различия в динамике заживления кожной раны между группами были выявлены на 23-й день: в группах № 2, 3, 4, 5 скорость заживления раны увеличилась в среднем на 25% по сравнению

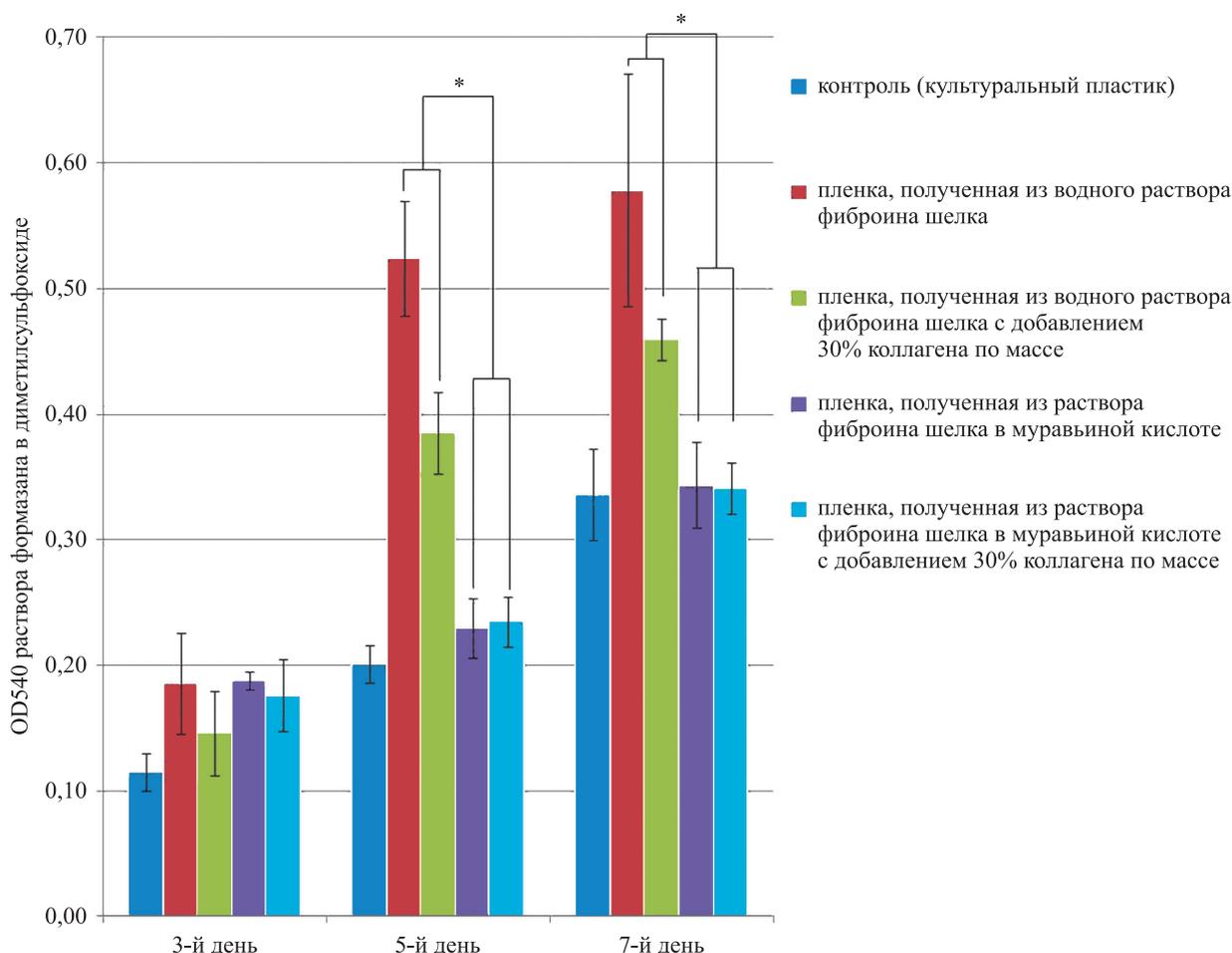


Рис. 2. Данные о цитотоксичности пленок различного состава на 3, 5 и 7-й дни эксперимента на модели пролиферации мышинных фибробластов линии 3T3. \* –  $p < 0,05$

Fig. 2. Cytotoxicity data of films with different composition on 3, 5 and 7 days of experiment on mice 3T3 fibroblasts model. \* –  $p < 0,05$

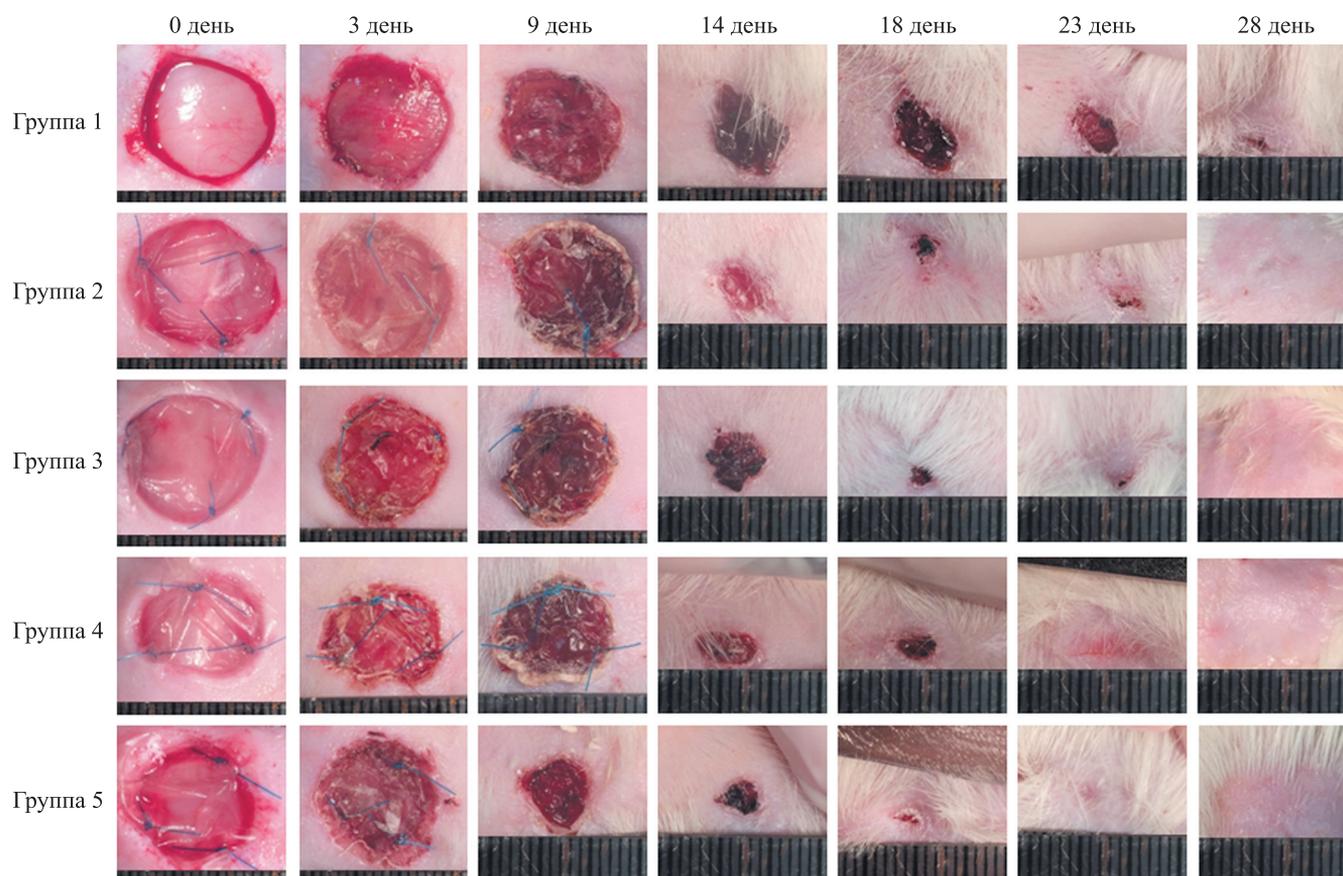


Рис. 3. Динамика макроскопического изменения площади ран, полученных у крыс породы Wistar в день проведения операции, на 3, 9, 14, 18, 23 и 28-й дни эксперимента в разных группах

Fig. 3. Macroscopic alteration dynamics of Wistar rats wound area at the day of experiment and 3, 9, 14, 18, 23, 28 days of experiment in different groups

Таблица 2

**Динамика заращения кожной раны у крыс породы Wistar. Указаны значения стандартного отклонения для 3 независимых измерений**

**Skin wound regeneration dynamics of Wistar rats. Standard deviation values for 3 several experiments are noted**

Группа	День эксперимента	Процент уменьшения раны, %						
		0	3	9	14	18	23	28
1	0	0	12,5 ± 4,0	50,0 ± 5,1	68,8 ± 4,0	75,0 ± 2,2	87,5 ± 3,7	
2	0	5,0 ± 3,8	21,2 ± 8,2	63,5 ± 8,2	75,0 ± 2,7	96,2 ± 5,4	100	
3	0	9,2 ± 7,2	25,0 ± 3,0	69,0 ± 3,4	72,9 ± 2,9	98,2 ± 2,5	100	
4	0	9,8 ± 3,0	42,3 ± 3,3	70,0 ± 6,6	80,0 ± 2,8	96,2 ± 5,4	100	
5	0	3,8 ± 0,6	35,4 ± 2,9	63,3 ± 4,7	85,7 ± 3,0	93,3 ± 9,4	100	

*Примечание.* Различия между группой 1 (контроль) и всеми остальными во все дни после операции являются достоверными ( $p < 0,05$ ).

с группой № 1. Визуально заживление характеризовалось восстановлением волосяного покрова животных и отсутствием рубца на коже.

**Гистологическое исследование**

Забор образцов проводили в день полного заращения раны ( $A = 100\%$ ). Были получены образцы кожи и проведено их микроскопическое исследова-

ние (рис. 4). На всех полученных срезах выявлено наличие трех слоев кожи: эпидермис, дерма и гиподерма. Присутствие этих слоев свидетельствует об успешном заживлении раны. Морфология срезов образцов кожи животных из экспериментальных групп не отличается от морфологии срезов нативной неповрежденной кожи крысы. Эпидермис кожи крысы состоит преимущественно из кератиноци-

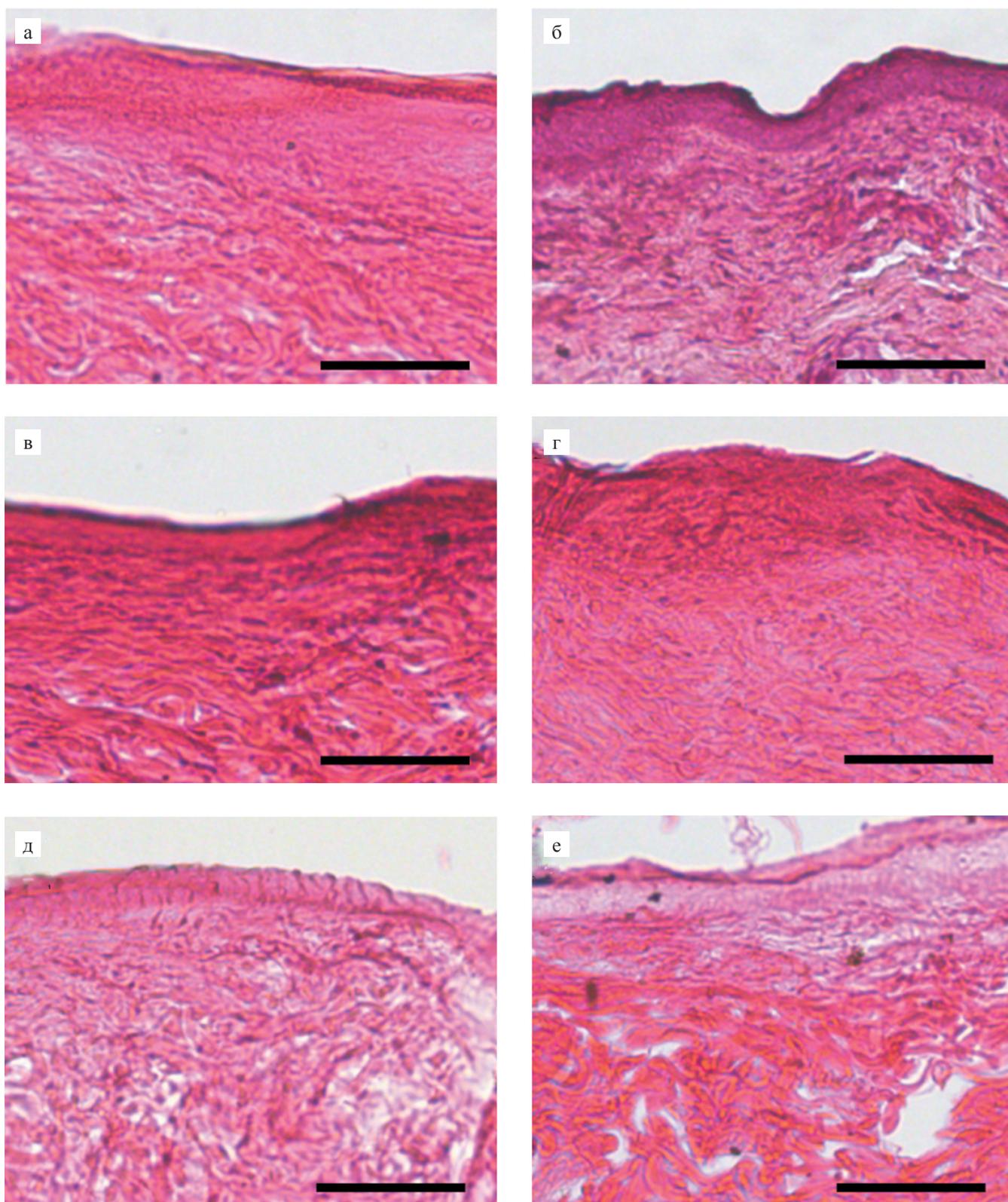


Рис. 4. Изображения гистологических срезов кожи крыс в зоне полного заживления раны (А = 100%), окрашенных гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 100$ , масштаб – 100 мкм: а – здоровая кожа крысы (норма); б – группа 1 на 40-й день эксперимента; в – группа 2 на 28-й день эксперимента; г – группа 3 на 28-й день эксперимента; д – группа 4 на 28-й день эксперимента; е – группа 5 на 28-й день эксперимента

Fig. 4. Histological sections images of rat's skin in complete regeneration area (A = 100%) provided by haematoxylin-eosin staining, magnification  $\times 100$ , scale – 100 mcm: a – native rat skin (normal skin); б – group 1 on 40 day of experiment; в – group 2 on 28 day of experiment; г – group 3 on 28 day of experiment; д – group 4 on 28 day of experiment; е – group 5 on 28 day of experiment

тов, образующих между собой плотные контакты. Образцы групп № 2, 3 и 4 характеризуются более интенсивной пролиферацией фибробластов в слое дермы, что свидетельствует о более полном восстановлении дермы по сравнению с образцами кожи группы 5 и контрольной группы 1, и следовательно, большей эффективностью применения данных изделий для заживления кожной раны. Очагов воспаления на полученных срезах выявлено не было, что также является важным показателем, характеризующим успешное заживление кожного покрова.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе рассматривается возможность использования пленок из фиброина шелка, полученных методом полива, для ускоренного заживления кожного покрова у крыс породы Wistar. В ходе работы были изготовлены 4 группы образцов пленок на основе фиброина шелка и его смеси с коллагеном, полученным методом экстракции из хвостов крыс породы Wistar, с использованием двух различных растворителей – воды и муравьиной кислоты. Известно, что метод полива позволяет получать непористые изделия, которые возможно использовать в качестве подложек для культивирования клеток [13]. Поверхность полученных пленок характеризуется микро- и нанорельефом. Согласно данным литературы, такая структура является оптимальной для культивирования эукариотических клеток [14]. Наличие микро- и нанорельефа положительно влияет на адгезию эукариотических клеток и дальнейшее их взаимодействие с поверхностью изделия – адгезия и пролиферация фибробластов происходит тем быстрее, чем выше шероховатость субстрата.

Данные эксперимента по изучению цитотоксичности изделий, а также ранее полученные данные [15] свидетельствуют о том, что изготовленные пленки не являются токсичными для клеток, характеризуются оптимальными механическими свойствами, подвергаются деградации и могут быть использованы в системе *in vivo*. Это согласуется с данными других исследований, которые предлагают применять изделия на основе фиброина шелка для восстановления различных органов и тканей, в том числе и кожи [16, 17].

В данной работе было проведено изучение динамики заживления кожных ран у крыс при покрытии ран различными видами пленок на основе фиброина шелка. Различия в свойствах изделий определяют процесс покрытия. Пленки, изготовленные из водных растворов, являются гигроскопичными и легко фиксируются на поверхности раны даже без наложения швов. Вследствие высокой проницаемости они способны удерживать в себе влагу и в процессе имплантации не требуют постоянного увлажнения.

Эти свойства значительно облегчают и ускоряют процесс имплантации изделия, а отсутствие необходимости пришивать изделие к поверхности раны позволяет сделать процедуру менее болезненной и не наносить дополнительные повреждения в процессе операции. Напротив, пленки, изготовленные из растворов полимеров в муравьиной кислоте, не фиксируются на поверхности раны, а их непроницаемость создает трудности, связанные с возможным высыханием пленки в процессе ее имплантации.

Изделия, полученные для данного исследования, ускоряют заживление кожного покрова по сравнению с контрольной группой крыс. Между различными группами образцов не было выявлено достоверных различий в динамике заживления кожного покрова. Результаты были подтверждены макроскопическими изображениями ран в динамике и гистологическим исследованием, которое показало, что успешное заживление кожного покрова происходило во всех экспериментальных группах.

Полученные результаты согласуются с данными литературы, в которых показано, что изделия на основе фиброина шелка, полученные различными методами, в том числе методом полива, могут быть использованы для регенерации кожного покрова *in vivo* [18]. Имплантация конструкций из фиброина ускоряла процесс заживления раны, вызывала восстановление эпителия и дермы, увеличение синтеза коллагена. Рубец, образовавшийся на месте повреждения, после имплантации конструкции из фиброина был практически незаметным.

Для более успешной регенерации кожного покрова могут применяться различные полимерные добавки. Известны примеры использования смесей фиброина шелка с различными полимерами для достижения более высокой скорости регенерации. Пленки, изготовленные из смеси фиброина с хитозаном, поддерживают адгезию и пролиферацию фибробластов, обеспечивают межклеточные взаимодействия. В адгезировавших клетках наблюдали экспрессию  $\beta$ -актина, а также секрецию коллагена I типа, присутствие которого в межклеточном матриксе характерно для дермы кожи [19]. Другой композитный материал представляет собой смесь фиброина с эластином. Пленки, изготовленные из такого материала, поддерживают адгезию фибробластов *in vitro*. Испытания кожного эквивалента на модели ожога показали, что изделия способствуют успешному восстановлению эпителия и заживлению раны [20].

В данной работе в качестве полимерной добавки был выбран коллаген из хвоста крысы. Состав коллагена, использованного для изготовления пленки, близок к составу коллагена кожи крыс, так как основной межклеточного матрикса кожи крыс является

коллаген I типа, на долю которого приходится 80% от сухой массы матрикса дермы, а также в его состав входит коллаген III и V типов [21]. Технология получения раствора коллагена, используемая в данной работе, позволяет выделить из сухожилий крыс коллаген I и III типов. Таким образом, мы полагаем, что коллаген в составе пленки будет стимулировать процесс заживления раны за счет деградации под действием ферментов-коллагеназ, расщепляющих коллаген типов I и III, выделяемых фибробластами. Однако по результатам экспериментов не было показано влияния добавки коллагена на скорость и динамику заживления кожной раны. Это может быть связано с особенностями взаимодействия полимеров в структуре использованного нами изделия, которое не позволяет ферментам расщеплять коллаген.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изученные свойства фиброиновых пленок позволяют считать их биосовместимыми изделиями, которые могут быть использованы для восстановления органов и тканей. В данной работе было проведено заживление полнослойной кожной раны у крыс породы Wistar. Полученные изделия ускоряют заживление кожной раны и способствуют образованию кожного покрова, морфология которого не отличается от нативной кожи. Это позволяет считать пленки на основе фиброина шелка перспективными изделиями для заживления кожного покрова.

Авторы выражают благодарность к. м. н., старшему научному сотруднику отдела клинической патологии ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава РФ Владимиру Анатольевичу Зайденову за помощь в регистрации данных гистологических исследований, а также заведующему лабораторией электронной микроскопии Центра коллективного пользования МГУ им. М.В. Ломоносова Г.Н. Давидовичу и сотрудникам лаборатории за помощь в проведении электронно-микроскопических исследований.

Работа осуществляется при поддержке Минобрнауки РФ по Соглашению о предоставлении субсидии от 27 ноября 2014 г. № 14.604.21.0148, уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60414X0148.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Bellas E, Seiberg M, Garlick J, Kaplan DL. In vitro 3D full-thickness skin-equivalent tissue model using silk and collagen biomaterials. *In Macromol. Biosci.* 2012; 12 (12): 1627–1636, doi: 10.1002/mabi.201200262.
2. Karahaliloghlu Z, Ercan B, Denkbaz EB, Webster TJ. Nanofeatured silk fibroin membranes for dermal wound healing applications. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2015; 103 (1): 135–144, doi: 10.1002/jbm.a.35116.
3. Surguchenko VA, Ponomareva AS, Kirsanova LA, Skaleckij NN, Sevastianov VI. The cell-engineered construct of cartilage on the basis of biopolymer hydrogel matrix and human adipose tissue mesenchymal stromal cells (*in vitro* study). *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2015; 103 (2): 463–470, doi: 10.1002/jbm.a.35197.
4. Bhardwaj N, Sow WT, Devi D, Ng KW, Mandal BB, Cho N-J. Silk fibroin-keratin based 3D scaffolds as a dermal substitute for skin tissue engineering. *Integr. Biol. (Camb).* 2015; 7 (1): 53–63, doi: 10.1039/c4ib90045f.
5. Мойсенович ММ, Архипова АЮ, Орлова АА, Друцкая МС, Волкова СВ, Захаров СЕ и др. Композитные матрицы на основе фиброина шелка, желатина и гидроксиапатита для регенеративной медицины, и культивирования клеток в трехмерной культуре. *Acta Naturae.* 2014; 6 (1): 103–109. Moisenovich MM, Arkhipova AY, Orlova AA, Drutskaya MS, Volkova SV, Zacharov SE et al. Composite Scaffolds Containing Silk Fibroin, Gelatin, and Hydroxyapatite for Bone Tissue Regeneration and 3D Cell Culturing. *Acta Naturae.* 2014; 6: 96–101.
6. Агапов ИИ, Мойсенович ММ, Дружинина ТВ, Каменчук ЯА, Трофимов КВ, Васильева ТВ и др. Биокompозитные матрицы из фиброина шелка и наногидроксиапатита для регенерации костной ткани. *Доклады Академии наук.* 2011; 440 (6): 1–4. Agapov II, Moisenovich MM, Druzhinina TV, Kamenchuk YA, Trofimov KV, Vasilyeva TV et al. Biocomposite scaffolds containing regenerated silk fibroin and nanohydroxyapatite for bone tissue regeneration. *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2011; 440: 228–230. doi: 10.1134/S1607672911050103.
7. Efimov AE, Moisenovich MM, Bogush VG, Agapov II. 3D nanostructural analysis of silk fibroin and recombinant spidroin 1 scaffolds by scanning probe nanotomography. *RSC Advances.* 2014; 4: 60943–60947, doi: 10.1039/C4RA08341E.
8. Kim UJ, Park J, Kim HJ, Wada M, Kaplan DL. Three dimensional aqueous-derived biomaterial scaffold from silk fibroin. *Biomaterials.* 2005; 26: 2775–2785, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.044>.
9. Hu Y, Zhang Q, You R, Wang L, Li M. The Relationship between Secondary Structure and Biodegradation Behavior of Silk Fibroin Scaffolds. *Advances in Materials Science and Engineering.* 2012; 2012: 1–5.
10. Chandrakasan G, Torchia DA, Piez KA. Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution. *J. Biol. Chem.* 1976; 251 (19): 6062–6067.
11. Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol. Rev.* 200.; 84 (2): 649–698.
12. 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.

13. Rajkhowa R, Levin B, Redmond SL, Li LH, Wang L, Kanwar JR et al. Structure and properties of biomedical films prepared from aqueous and acidic silk fibroin solutions. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2011; 97 (1): 37–45, doi: 10.1002/jbm.a.33021.
14. Moisenovich MM, Pustovalova OL, Shackelford J, Vasiljeva TV, Druzhinina TV, Kamenchuk YA et al. Tissue regeneration *in vivo* within recombinant spidroin I scaffolds. *Biomaterials*. 2012; 15 (33): 3887–3898. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.02.013.
15. Ni S, Sun L, Ercan B, Liu L, Ziemer K, Webster TJ. A mechanism for the enhanced attachment and proliferation of fibroblasts on anodized 316L stainless steel with nano-pit arrays. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 2014; 102 (6): 1297–1303, doi: 10.1002/jbm.b.33127.
16. 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, Agarova OI, Kotliarova MS, Arkhipova AYU, Moisenovich MM, Agapov II. Biological properties of regenerated silk fibroin films. *Modern Technologies in Medicine*. 2015; 7 (3): 6–13. [English abstract].
17. Kundu B, Rajkhowa R, Kundu CS, Wang X. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013; 65: 457–470, doi: 10.1016/j.addr.2012.09.043.
18. Gil ES, Panilaitis B, Bellas E, Kaplan DL. Functionalized Silk Biomaterials for Wound Healing. *Adv. Healthc. Mater.* 2013; 2: 206–217, doi: 10.1002/adhm.201200192.
19. Luangbudnark W, Viyoch J, Laupattarakasem W, Surakunprapha P, Laupattarakasem P. Properties and Biocompatibility of Chitosan and Silk Fibroin Blend Films for Application in Skin Tissue Engineering. *The Sci World J*. 2012; 2012: 1–10, doi: 10.1100/2012/697201.
20. Vasconcelos A, Gomes AC, Cavaco-Paulo A. Novel silk fibroin/elastin wound dressings. *Acta Biomater.* 2012; 8 (8): 3049–3060, doi: 10.1016/j.actbio.2012.04.035.
21. Cen L, Liu W, Cui L, Zhang W, Cao Y. Collagen Tissue Engineering: Development of Novel Biomaterials and Application. *Pediatr. Res.* 2008; 63 (5): 492–496, doi: 10.1203/PDR.0b013e31816c5bc3.

Статья поступила в редакцию 21.07.2016 г.  
The article was submitted to the journal on 21.07.2016