

УДК 615.468

БИОДЕГРАДАЦИЯ ТКАНЕВЫХ ШЕЛКОВЫХ СКАФФОЛДОВ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

© 2025 г. И. И. Агапов^{1, *}, Е. И. Подболотова^{1, 2}, Е. А. Немец¹, Л. А. Кирсанова¹,
Н. В. Грудинин¹, А. Р. Пашутин^{1, 2}, О. И. Агапова¹, А. Е. Ефимов¹, Ю. Б. Басок¹,
А. В. Люндуп³, академик РАН С. В. Готье^{1, 4}

Поступило 15.09.2024 г.

После доработки 20.10.2024 г.

Принято к публикации 21.10.2024 г.

В работе исследована биodeградация натуральных шелковых скаффолдов, изготовленных из тканей газ и атлас, в условиях *in vitro* и *in vivo*. Проведены эксперименты по деградации образцов в фосфатно-солевом буфере и с использованием реактива Фентона. Образцы продемонстрировали высокую стабильность в модели физиологических условий и различную скорость деградации под воздействием окислительного стресса. Исследования *in vivo* на крысах показали хорошую биосовместимость скаффолдов и постепенное снижение воспалительных реакций. Эти результаты подчеркивают потенциал использования шелковых скаффолдов для применения в различных областях регенеративной медицины.

Ключевые слова: шелковые скаффолды, биodeградируемые материалы, регенеративная медицина, биосовместимость, тканевая инженерия

DOI: 10.31857/S2686738925010089, **EDN:** tcqqzj

В последние десятилетия, с развитием биотехнологий, шелк привлек внимание ученых как перспективный биоматериал. Основным источником медицинского шелка — коконы тутового шелкопряда *Bombyx mori*. Шелк состоит в основном из двух белков: фиброина и серицина. Фиброин составляет около 75% от массы шелка и отвечает

за его прочность и устойчивость благодаря своей кристаллической структуре. Серицин, в свою очередь, обволакивает волокна фиброина и действует как клей, связывая и защищая их от повреждений.

Современные исследования активно изучают возможности применения шелка в различных областях регенеративной медицины. В ортопедии скаффолды из фиброина шелка используются для восстановления костной и хрящевой ткани [1]. В дерматологии такие скаффолды применяются для восстановления кожных покровов [2], в неврологии — исследуются для регенерации нервной ткани [3, 4], а в сосудистой хирургии шелковые трубки служат каркасом для восстановления сосудов [5].

Одним из ключевых преимуществ шелка перед синтетическими материалами является его высокая прочность и гибкость [6]. Высокая биосовместимость и низкая иммуногенность делают шелк идеальным для использования в медицинских имплантатах и скаффолдах [7]. Также важной характеристикой шелка является его способность к биodeградации в организме [8].

Разработка биodeградируемых скаффолдов является актуальной задачей в современной биотехнологии. Целью нашего исследования являлось создание биodeградируемых скаффолдов на основе натуральных шелковых тканей с контролируемой

¹“Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)”, Долгопрудный, Россия

³Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Российский университет дружбы народов”, Москва, Россия

⁴Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова” Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), Москва, Россия

*e-mail: igor.agapov@gmail.com

скоростью деградации, адаптированных для использования в тканевой инженерии и регенеративной медицине. Для достижения этой цели был выбран газ (Г) с плотностью 15 г/м² и атлас (А) с плотностью 155 г/м² (декларация о соответствии EAC N RU Д-CN.PA09.B.91575/23, Tianjin Textile Industrial Supply And Sale Co., Ltd, Китай). Подготовка образцов проводилась по описанному методу [9]. Для очищения тканей от примесей проводилась следующая процедура: тканевые лоскуты кипятили в растворе бикарбоната натрия (2.5 мг/мл) на водяной бане в течение 40 минут, затем промывали дистиллированной водой и повторно кипятили еще 30 минут. Подобную отмывку дистиллированной водой проводили 3 раза, после чего ткани сушили на воздухе при комнатной температуре.

Далее образцы ткани подвергались обработке водно-спиртовым раствором хлорида кальция. Образцы инкубировались в растворе с молярным соотношением хлорида кальция, этилового спирта и воды 1:2:8 при температуре 46°C. Время, необходимое для полной деструкции ткани, принималось за 100%. На основе этого времени создавались образцы со степенью обработки 80%, обозначаемые А80 и Г80 в дальнейшем. Время обработки для А80 составило 216 мин, для Г80 — 352 мин.

После обработки образцы тщательно промывали дистиллированной водой и сушили на воздухе при комнатной температуре. Для предотвращения инфекционных осложнений до имплантации все образцы стерилизовали автоклавированием при температуре 126°C в течение 30 мин.

На рис. 1 представлена структура изготовленных образцов. Предыдущие исследования подтвердили, что такие образцы не являются токсичными [8].

Для оценки деградации скаффолдов из натурального шелка проводилось исследование *in vitro*. В ходе этого исследования использовались два метода: деградация в фосфатно-солевом буфере (PBS) и с использованием реактива Фентона. Выбор этих методов обусловлен их способностью моделировать различные аспекты условий *in vivo*.

Фосфатно-солевой буфер представляет собой физиологический раствор, который широко

используется для имитации стабильных и биологически совместимых условий, аналогичных тем, которые присутствуют в организме. Образцы тканей размером 2.5×8 см² инкубировали в 40 мл раствора (рН = 7,4) при температуре 37°C. В ходе исследования было обнаружено, что ни Г80, ни А80 не подверглись заметной деградации за 60 дней инкубации в PBS: образцы потеряли не более 10% от изначальной массы.

Полученные результаты демонстрируют высокую устойчивость исследуемых материалов к деградации в условиях, близким к физиологическим, что указывает на их стабильность в процессе имплантации. Эти данные предполагают, что материалы способны сохранять свои функциональные свойства в течение необходимого времени для поддержки тканевой регенерации.

Реактив Фентона представляет собой смесь пероксида водорода и ионов железа, которая используется для моделирования окислительного стресса. Этот реактив вызывает быстрое образование гидроксильных радикалов. Реактив Фентона имитирует условия, которые могут возникать в живых тканях при воспалении или повреждении, где происходит интенсивное образование активных форм кислорода [10]. В этом исследовании реактив Фентона использовался для оценки способности шелковых скаффолдов к деградации в условиях окислительного стресса.

Было показано, что полная деградация образца Г80 в реактиве Фентона произошла за 15 дней, тогда как образец А80 полностью деградировал за 60 дней. Это различие в скорости деградации можно объяснить разной плотностью и структурой тканей Г80 и А80. Более плотная структура атласа (А80) делает его более устойчивым к окислительному воздействию по сравнению с менее плотным газом (Г80).

Результаты исследования подчеркивают высокую стабильность скаффолдов из натурального шелка в физиологических условиях, что указывает на их потенциальную долговечность при использовании в медицине. Разные скорости деградации в условиях окислительного стресса позволяют

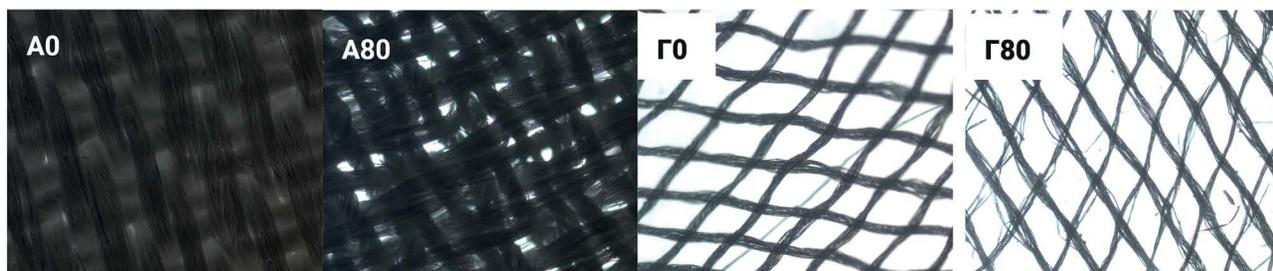


Рис. 1. Образцы, полученные в ходе исследования (5×): А – атлас, Г – газ; цифрами обозначена степень обработки материалов: 0 и 80% соответственно.

выбирать материалы в зависимости от требуемой скорости распада для конкретных медицинских целей. В дополнение, исследования показывают, что шелковые скаффолды могут быть адаптированы под специфические требования, такие как скорость деградации или механическая прочность, что делает их универсальными и применимыми в различных областях медицины.

Для проведения исследований *in vivo* с целью оценки биосовместимости и деградации скаффолдов из натурального шелка подготовленные образцы размером $1 \times 1 \text{ см}^2$ были имплантированы крысам подкожно. Этот метод позволяет оценить взаимодействие материалов с живыми тканями и наблюдать за динамикой реакции на имплантат на различных временных точках. Эксперимент проводился с целью изучения не только начальной реакции на имплантат, но и долгосрочных эффектов, связанных с его присутствием в организме.

Через 4, 14 и 56 дней после имплантации образцы вместе с прилежащими тканями извлекались для дальнейшего морфологического анализа.

Морфологическое исследование эксплантированных образцов включало анализ прилежащих к имплантату тканей с целью выявления местной реакции на инородное тело и особенностей процесса заживления. В частности, оценивалась степень воспалительного ответа, клеточный состав инфильтрата, наличие васкуляризации, формирование соединительнотканной капсулы, а также биорезорбция имплантата.

Морфометрический анализ образцов газа и атласа выявил аналогичные изменения размера волокон скаффолдов в течение 56 дней инкубации *in vivo*. На начальном этапе размер волокон составлял $15,0 \pm 0,5 \text{ мкм}$. На 4-й день он уменьшился до $12,5 \pm 1,5 \text{ мкм}$, что свидетельствует о начале биодegradации. К 14-му дню диаметр сократился до $8,3 \pm 1,3 \text{ мкм}$, а к 56-му дню – до $6,2 \pm 0,9 \text{ мкм}$, что подтверждает продолжающуюся резорбцию материала. Приведенные средние величины и погрешности были рассчитаны на основе стандартного отклонения, полученного в результате анализа 20 волокон для каждого образца в каждой из временных точек. Результаты гистологического исследования показали значительные различия в биосовместимости и динамике воспалительных реакций между имплантатами Г80 и А80. На ранних сроках, через 4 дня после имплантации, оба типа имплантатов вызывали выраженную воспалительную реакцию: в инфильтрате обнаруживались нейтрофилы, макрофаги, лимфоциты и многочисленные тучные клетки, а также гигантские многоядерные клетки инородных тел (ГКИТ). В образцах Г80 при этом наблюдалось также интенсивное формирование грануляционной ткани, что проявлялось наличием многочисленных полнокровных капилляров (показано стрелками) и фибробластов (рис. 2г). Это свидетельствует о начальной стадии заживления и активном включении имплантата в тканевую регенерацию. В образцах А80 формирование грануляционной ткани не наблюдалось, однако

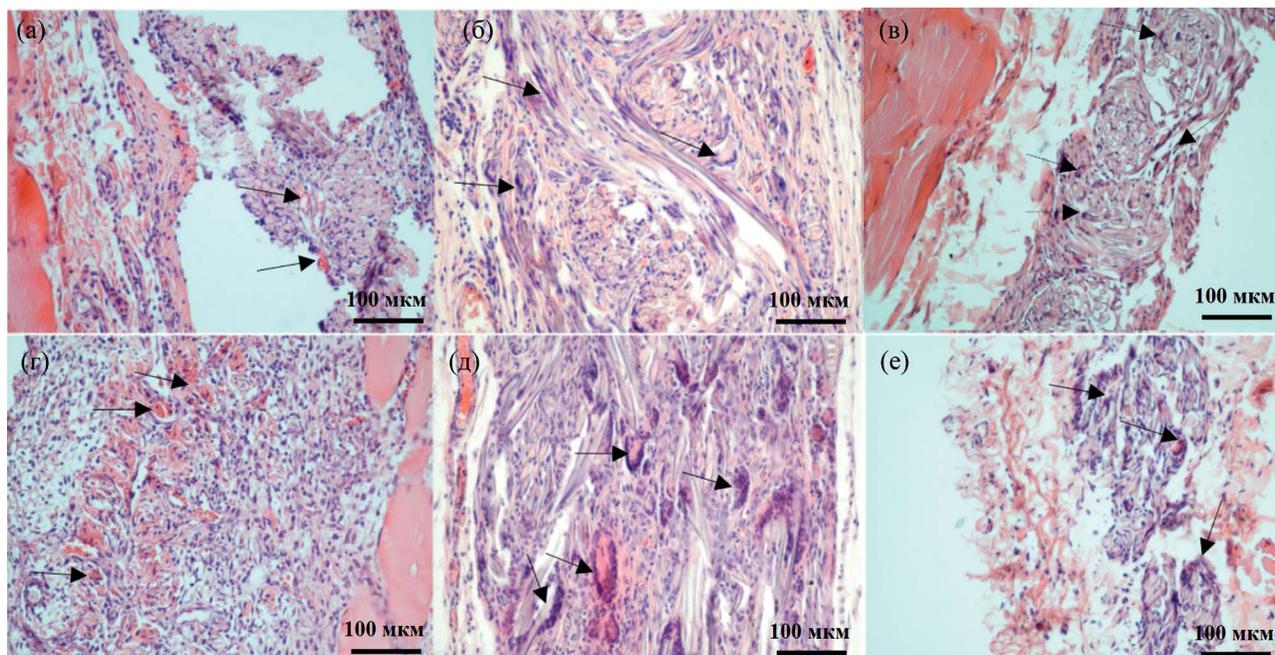


Рис. 2. Гистологическая картина образцов на 4, 14 и 56 дни имплантации (200×). Окраска гематоксилином и эозином. а – А80 на 4 день, б – А80 на 14 день, в – А80 на 56 день, г – Г80 на 4 день, д – Г80 на 14 день, е – Г80 на 56 день.

обнаруживалось появление тонкостенных сосудов (показано стрелками) непосредственно в толще имплантата (рис. 2а), что указывает на начальную васкуляризацию и успешное начало процесса интеграции в тканевую матрицу. Важно отметить, что структурные особенности А80 (более высокая плотность материала) могли способствовать более медленной, но более устойчивой реакции со стороны тканей.

На 14-й день после имплантации воспалительная реакция образца Г80 принимала преимущественно макрофагальный характер: в инфильтрате обнаруживались многочисленные ГКИТ (показано стрелками), макрофаги, немногочисленные лимфоциты и одиночные нейтрофилы (рис. 2д). Также наблюдалось интенсивное прорастание коллагеновых волокон вглубь имплантата. Это указывает на активное включение имплантата в ткани и начальную стадию инкапсуляции, что является положительным признаком успешного заживления. В образцах А80 наблюдалась реакция с участием лимфоцитов, макрофагов и ГКИТ (рис. 2б). По периметру имплантата визуализировались коллагеновые волокна, однако в толще имплантата они не обнаруживались. Присутствие полнокровных сосудов, лимфоцитов и макрофагов свидетельствует о продолжающемся активном иммунном ответе на имплантат, что подчеркивает высокую адаптивность материала к тканевой среде. Оба имплантата демонстрировали признаки васкуляризации и частичной резорбции.

На 56-й день после имплантации в обоих типах имплантатов был отмечен макрофагальный характер реакции с участием ГКИТ и признаки дальнейшей резорбции (рис. 2в и 2е). Формирование целостной соединительнотканной капсулы по периметру имплантатов не наблюдалось, однако обнаруживалась инкапсуляция коллагеновыми волокнами отдельных нитей имплантата, что подтверждает успешное включение материала в репаративные процессы. Замедленная инкапсуляция и продолжающийся процесс резорбции могут свидетельствовать о постепенной и контролируемой биодеградации имплантата. Этот аспект имеет важное значение для регенерации тканей, поскольку замедленная деградация может способствовать более устойчивой интеграции материала и долговременной функциональности.

Сравнительный анализ показал, что оба типа имплантатов — Г80 и А80 — обладают высокими биосовместимыми свойствами и различной динамикой воспалительных и заживляющих процессов. Г80 вызывал более выраженную раннюю воспалительную реакцию, которая постепенно уменьшалась к 14 дню. В то время как в образце А80 видимое снижение воспалительной реакции происходило на более поздних сроках, что

свидетельствовало о более длительном времени биодеградации. Отметим, что васкуляризация имплантата А80 при этом выглядела несколько более выраженной относительно образца Г80, что является важным параметром для лучшей интеграции имплантата в окружающую ткань.

Оба типа имплантатов показали хорошую биосовместимость, что подтверждается снижением воспалительной реакции и успешной интеграцией в тканях организма, а также схожую кинетику резорбции, с уменьшением размера волокон на 58% от исходного значения к концу наблюдаемого периода. Эти результаты подчеркивают потенциал использования модифицированных тканей из натурального шелка в различных медицинских приложениях, где требуется оптимальное сочетание биосовместимости, скорости деградации и интеграции в тканевую среду. Успешное применение таких материалов может существенно улучшить результаты лечения и расширить возможности медицинских технологий в области имплантатов и скаффолдов.

Ожидается, что дальнейшие исследования и разработки в этой области помогут еще более эффективно адаптировать и использовать шелковые материалы для решения разнообразных медицинских задач, способствуя улучшению качества лечения для пациентов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Богданову В.П. и Никольской А. О. за помощь в проведении *in vivo* исследований.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Нет.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Исследование выполнено в соответствии с принципами, установленными Хельсинкской декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации и одобрено Локальным Этическим Комитетом ФГБУ “НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова” Минздрава России (Заключение №231221-1/1д от 23 декабря 2021 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Котлярова М.С., Архипова А.Ю., Мойсенович А.М.,* и др. Биорезорбируемые скаффолды на основе фиброина для регенерации костной ткани // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2017. № 4. С. 228–228.
2. *Котлярова М.С., Солдатенко А.С., Архипова А.Ю.,* и др. Фотоотверждаемые пленки на основе фиброина и желатина для регенерации кожных покровов // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2020. С. 23–30.
3. *Bai S., Zhang W., Lu Q.,* et al. Silk nanofiber hydrogels with tunable modulus to regulate nerve stem cell fate // *J. Mater. Chem. B.* 2014. Vol. 2, No. 38. P. 6590–6600.
4. *Dinis T.M., Elia R., Vidal G.,* et al. 3D multi-channel bi-functionalized silk electrospun conduits for peripheral nerve regeneration // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2015. Vol. 41. P. 43–55. doi: 10.1016/j.jmbbm.2014.09.029. Epub 2014 Oct 13.
5. *Settembrini A., Buongiovanni G., Settembrini P.,* et al. In-vivo evaluation of silk fibroin small-diameter vascular grafts: State of art of preclinical studies and animal models // *Frontiers in Surgery.* 2023. Vol. 10.
6. *Vepari C., Kaplan D.L.* Silk as a biomaterial // *Prog. Polym. Sci.* 2007. Vol. 32, No. 8-9. P. 991–1007. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013.
7. *Cao Y., Wang B.* Biodegradation of silk biomaterials // *Int. J. Mol. Sci.* 2009. Vol. 10. P. 1514–1524.
8. *Сафонова Л.А., Боброва М.М., Ефимов А.Е.,* и др. Биodeградируемые материалы на основе тканей из натурального шелка как перспективные скаффолды для тканевой инженерии и регенеративной медицины // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2020. Т. 22, № 4. С. 105–114.
9. *Агапов И.И., Агапова О.И., Ефимов А.Е.,* и др. Способ получения биodeградируемых скаффолдов на основе тканей из натурального шелка // Патент на изобретение RU 2653428 С1. 08.05.2018.
10. *Muranov K.O.* Fenton reaction in vivo and in vitro. Possibilities and limitations // *Biochemistry (Mosc).* 2024. Vol. 89, Suppl 1. P. S112–S126. doi: 10.1134/S0006297924140074.

IN VITRO AND IN VIVO BIODEGRADATION OF SILK FABRIC SCAFFOLDS

**I. I. Agapov^{1,*}, E. I. Podbolotova^{1,2}, E. A. Nemets¹, L. A. Kirsanova¹, N. V. Grudinin¹,
A. R. Pashutin^{1,2}, O. I. Agapova¹, A. E. Efimov¹, Yu. B. Basok¹, A. V. Lyundup³,
Academician of the RAS S. V. Gautier^{1,4}**

¹*Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs,
Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation*

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

³*Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation*

⁴*Sechenov University, Moscow, Russian Federation*

**e-mail: igor.agapov@gmail.com*

This study investigates the biodegradation of natural silk scaffolds made from gauze and satin fabrics under *in vitro* and *in vivo* conditions. Experiments were conducted using phosphate-buffered saline and Fenton's reagent to model degradation. The samples demonstrated high stability under physiological conditions' model and exhibited varying degradation rates under oxidative stress. *In vivo* studies on rats revealed good biocompatibility of the scaffolds and a gradual reduction in inflammatory responses. These findings highlight the potential of silk scaffolds for use in various areas of regenerative medicine.

Keywords: silk scaffolds, biodegradable materials, regenerative medicine, biocompatibility, tissue engineering