

УДК 615.468

ИССЛЕДОВАНИЕ *in vitro* ДЕГРАДАЦИИ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ТКАНЕЙ ИЗ НАТУРАЛЬНОГО ШЕЛКА ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

© 2024 г. Е. И. Подболотова¹, А. Р. Пашутин¹, А. Е. Ефимов¹, О. И. Агапова¹, И. И. Агапов¹, *¹ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова” Минздрава России, Москва, 123182 Россия

*e-mail: igor_agapov@mail.ru

Поступила в редакцию 19.06.2024 г.

После доработки 26.06.2024 г.

Принята к публикации 01.07.2024 г.

Целью данного исследования было создание биодеградируемых скаффолдов на основе тканей из натурального шелка для регенеративной медицины. В качестве матриц использовали ткани с разной плотностью газ-шифон (15 г/м²) и двусторонний атлас (155 г/м²). Образцы предварительно обрабатывали водно-спиртовым раствором хлорида кальция разное время для получения образцов с различной степенью деструкции. Морфологические исследования с применением световой микроскопии подтвердили структурные изменения в тканях после этой обработки. Деградацию полученных скаффолдов изучали *in vitro* с использованием реактива Фентона с различной длительностью инкубации (15, 30 и 45 дней). Скорость деструкции скаффолдов зависела от типа ткани и времени предварительной обработки хлоридом кальция. Самая высокая скорость деградации была у газ-шифона, в то время как атлас демонстрировал более медленную деструкцию. Полученные результаты могут быть использованы при оптимизации свойств шелковых тканей для их использования в регенеративной медицине и разработки эффективных методов управления их биодеградацией.

Ключевые слова: шелк, ткань из натурального шелка, биодеградируемые скаффолды, скорость биодеградации

DOI: 10.56304/S0234275824030104

ВВЕДЕНИЕ

Биодеградируемые материалы являются объектом значительного интереса в регенеративной медицине благодаря их способности разлагаться *in vivo* после выполнения своей терапевтической функции, что устраняет необходимость в повторных хирургических вмешательствах для их удаления. Это особенно важно для временных структур, таких как тканевые скаффолды, которые служат для поддержки и направленного роста клеток до тех пор, пока вновь сформированная ткань не сможет самостоятельно выполнять свои функции. Среди биодеградируемых материалов широко применяются как синтетические полимеры (например, полигликолид, полимолочная кислота, поликапролактон) [1], так и природные полимеры (например, коллаген, хитозан, альгинаты) [2–4].

Шелк уже давно привлекает внимание исследователей в области биомедицины и регенеративной медицины благодаря своим уникальным свойствам, включающими биодеградируемость, биосовместимость и прочность. Применение скаффолдов на основе фиброина натурального шелка

охватывает широкий спектр областей, включая ортопедию, кардиологию, нейрохиргию и дерматологию. Такие матрицы, способные поддерживать рост различных типов клеток, включая фибробласты, остеобласты и стволовые клетки костного мозга, перспективны для применения для регенерации органов и тканей [5–7].

Кроме того, скаффолды на основе натурального шелка могут быть использованы для восстановления костной ткани после травмы или болезни, для регенерации сердечной мышцы после инфаркта миокарда, для создания биосовместимых внутренних и внешних швов, а также для создания кожных покровов для лечения ожогов и ран. Шелковые имплантаты биологически совместимы и не вызывают отторжения, что делает их эффективным средством для восстановления функции тканей и органов [8–10]. Одним из ключевых преимуществ таких скаффолдов является их способность подстраиваться под конкретные потребности тканей и клеток, благодаря возможности настройки их структуры, пористости и механических свойств.

Таблица 1. Время инкубации в водно-спиртовом растворе хлорида кальция, необходимое для получения образцов с разной степенью деструкции

Table 1. Incubation time in water-alcoholic calcium chloride solution required to obtain samples with different degrees of degradation

| Тип ткани/время, | Степень деструкции, % | | | | | |
|------------------|-----------------------|----|-----|-----|-----|-----|
| | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
| Атлас/ мин | 0 | 54 | 108 | 162 | 216 | 270 |
| Газ/ мин | 0 | 88 | 176 | 264 | 352 | 440 |

Фиброин шелка может быть получен как из коконов тутового шелкопряда, так и из готовых коммерческих изделий, таких как шовные и тканые материалы из натурального шелка. Применение таких готовых материалов значительно упрощает процесс подготовки фиброина к использованию. Использование коммерческих изделий на основе тканей из натурального шелка как перспективных скаффолдов для тканевой и регенеративной медицины уже было успешно продемонстрировано в наших прошлых исследованиях [11, 12]. Однако, несмотря на значительные достижения в этой области, еще существует ряд вопросов, требующих дальнейшего изучения и улучшения.

Одним из таких вопросов является биodeградируемость скаффолдов на основе тканей из натурального шелка. Скорость деградации должна соответствовать скорости заживления тканей: чрезмерно быстрая деструкция не обеспечит достаточную поддержку, тогда как слишком медленная может препятствовать процессу регенерации. Хотя шелк обладает природной способностью к биodeградации [13], скорость этого процесса может быть изменчивой и зависеть от различных факторов. Понимание и управление ими позволит разработать матрицы с оптимальной скоростью биodeградации, которая соответствует требуемому времени заживления и восстановления тканей.

Необходимо проведение дополнительных исследований деструкции скаффолдов на основе тканей из натурального шелка и определения оптимальных условий для их контролируемого распада в организме. Это позволит разработать более эффективные методы управления скоростью биodeградации и обеспечить оптимальное время существования матриалов в организме, соответствующее периоду восстановления тканей. Химическая обработка скаффолдов на основе тканей из натурального шелка представляет собой перспективный подход для управления их биоразрушением и другими свойствами.

Традиционно исследования биодеструкции проводятся в буферных растворах, таких как фосфатный буферный раствор (PBS), который поддерживает постоянные условия pH и ионный со-

став, аналогичные физиологическим. Однако такой подход имеет ограниченную способность имитировать сложные биологические процессы, происходящие в организме.

Более точно окислительный стресс в организме имитирует содержащий перекись водорода и ионы железа реактив Фентона, что делает его предпочтительным для оценки биodeградации материалов в лабораторных условиях. Окислительный стресс играет важную роль в процессах деградации биоматериалов, так как последние в реальных физиологических условиях подвергаются воздействию различных реактивных форм кислорода. Моделировать эти условия и обеспечить более точную оценку поведения материалов *in vivo* позволяет использование реактива Фентона. Он активизирует образование гидроксильных радикалов, которые являются одними из самых реакционно-способных и эффективных агентов для окисления органических материалов.

Целью данного исследования было получение образцов тканых скаффолдов с разной степенью предварительной деструкции и оценка скорости их деградации *in vitro* в условиях, моделирующих окислительный стресс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Получение образцов

Для создания деградируемых скаффолдов были использованы ткани из 100%-ного натурального шелка (декларация о соответствии EAC N RU Д-CN.PA09.B.91575/23, Tianjin Textile Industrial Supply And Sale Co., Ltd, Китай). В этом исследовании применяли два типа тканей с различной плотностью: газ-шифон (15 г/м²) и более плотный двусторонний атлас (155 г/м²). Образцы тканей получали согласно описанным ранее методам [11, 12]. Сначала тканевые лоскуты кипятили в растворе бикарбоната натрия на водяной бане в течение 40 мин, затем промывали в дистиллированной воде и повторно кипятили еще 30 мин. Эту процедуру повторяли трижды, после чего скаффолды сушили на воздухе при комнатной температуре.

Затем образцы ткани инкубировали в водно-спиртовом растворе хлорида кальция при молярном соотношении хлорида кальция, этилового спирта и воды 1 : 2 : 8 соответственно при температуре 46°C до нарушения целостности ткани. Время, необходимое для полной деструкции ткани, принимали за 100%. Оно составило 270 и 440 мин для образцов “газ-шифон” и “атлас”, соответственно. На основании этих данных рассчитали время обработки образцов атласа и газа для их деструкции на 0, 20, 40, 60 и 80% (табл. 1).

Образцы обозначали следующим образом: первая буква указывала на тип ткани — газ-шифон (Г) или атлас (А), а число — рассчитанная степень де-

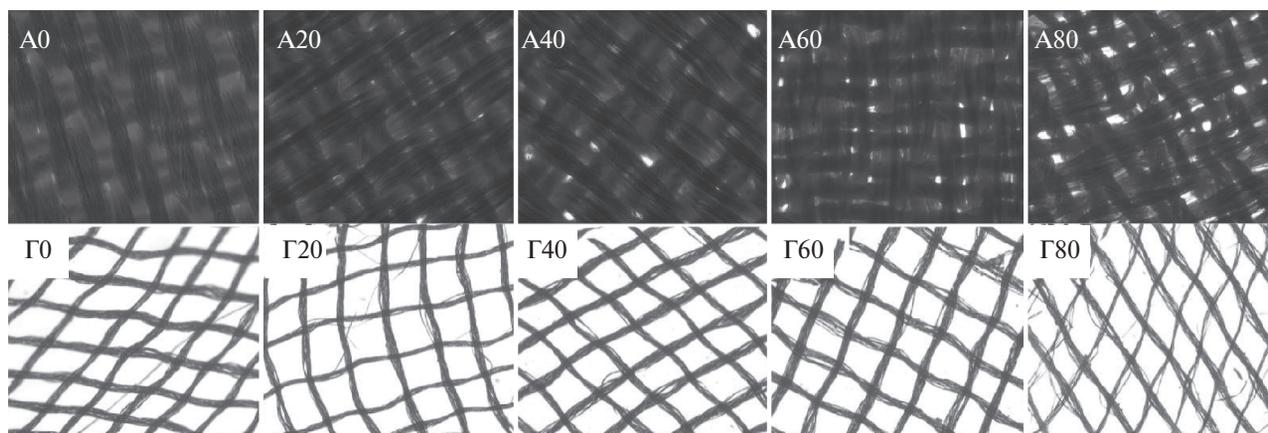


Рис. 1. Влияние времени предварительной обработки на структуру исследуемых образцов. Увеличение $\times 5$. А – атлас, Г – газ-шифон; цифрами обозначена степень деструкции материалов в %.

Fig. 1. Effect of pretreatment time on the structure of the investigated samples. Magnification $\times 5$. А – atlas, Г – gas-chiffon; numbers indicate the degree of material degradation in %.

струкции. После обработки образцы тщательно промывали дистиллированной водой и сушили на воздухе при комнатной температуре.

Световая микроскопия

Структурные изменения образцов оценивали световой микроскопией с использованием инвертированного микроскопа Carl Zeiss Axio Vert.A1 (Zeiss, Jena, Германия). С помощью данного микроскопа проводили наблюдение и фиксация морфологических изменений в структуре ткани после различных этапов обработки. Полученные изображения использовали для анализа микроструктурных характеристик тканей и оценки эффекта обработки хлоридом кальция на их морфологию.

Тест на деградацию образцов *in vitro*

Деградацию предварительно обработанных образцов исследовали согласно стандарту ГОСТ 10993-13–2009 “Оценка биологического действия медицинских изделий”. В качестве окислителя применяли реактив Фентона, содержащий 100 мкМ FeSO_4 и 1 мМ H_2O_2 . Образцы тканых скаффолдов размером $8 \times 2.5 \text{ см}^2$ инкубировали в 40 мл этого раствора. Раствор окислителя заменяли каждые 3 дня. По окончании выбранного времени инкубации образцы высушивали до постоянного веса и взвешивали на аналитических весах Sartorius R300S (Sartorius, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Образцы шелковых тканей, обработанные водно-спиртовым раствором хлорида кальция, по структуре и плотности волокон значительно отличались от исходных (контрольных) образцов. У

обоих типов ткани уменьшалась толщина и происходило изменение волокнистой структуры. Степень разрушения ткани под воздействием раствора хлорида кальция, зависела от времени инкубации (рис. 1).

Деградацию скаффолдов из этих двух типов ткани в условиях *in vitro* проводили с использованием реактива Фентона. Массы всех образцов в течение периода эксперимента значительно снизились. Скорость деструкции скаффолдов зависела от типа ткани и времени предварительной обработки. Самая высокая скорость деградации была у газ-шифона. Полное разрушение образцов произошло менее чем за 15 дней. Время предварительной обработки водно-спиртовым раствором хлорида кальция не оказало значительного влияния на скорость деградации этого типа ткани, все образцы разрушались с одинаковой скоростью.

По сравнению с газ-шифоном деградация атласа была более медленной. Его образцы А20, А40 и А60 продемонстрировали схожую скорость деградации (рис. 2). На 15 день эксперимента масса этих образцов изменилась примерно на 4.5% от исходной, на 30 день уменьшение составило около 43%, к 45 дню они потеряли до 78% своей исходной массы. Образцы с максимальным временем обработки (А80) по сравнению с другими обработанными образцами атласа продемонстрировали несколько более высокую скорость деградации на всех трех контрольных точках (15, 30 и 45 дней). Это указывает на более значительные изменения в микроструктуре ткани при максимально длительной обработке.

Таким образом, при исследовании влияния времени обработки хлоридом кальция на скорость деградации скаффолдов на основе тканей из натурального шелка в условиях окислительно-

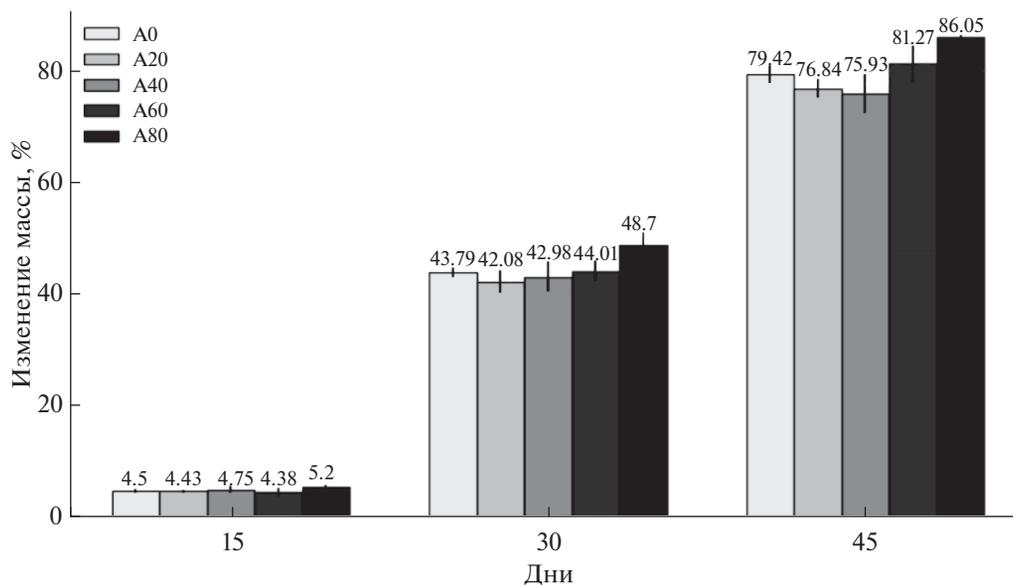


Рис. 2. Процентное изменение массы образцов атласа за время окислительной реакции с использованием реактива Фентона.

Fig. 2. Percent change in mass of atlas samples during oxidative reaction using Fenton's reagent.

го стресса *in vitro* установлено, что высокой скоростью деструкции обладают образцы из газ-шифона. Этот материал может быть особенно полезен в случаях, где требуется его быстрая деградация. Атлас, напротив, является более устойчивой тканью, подходящей для создания скаффолдов с регулируемой скоростью деградации. Полученные результаты могут быть использованы при оптимизации свойств шелковых тканей для их использования в регенеративной медицине и разработки эффективных методов управления их биodeградацией.

БЛАГОДАРНОСТИ:

Авторы выражают благодарность Немцу Евгению Абрамовичу за помощь в проведении экспериментов по *in vitro* деградации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

- Кулаков А.А., Григорьян А.С. Биodeградируемые полимерные материалы медицинского назначения (основные направления исследований и перспективы их развития). *Стоматология*, 2014, 93(2), 63–66.
- Файзуллин А.Л., Шехтер А.Б., Истранов Л.П., Истранова Е.В., Руденко Т.Г., Гуллер А.Е., Абоянц Р.К., Тимашев П.С., Бутнару Д.В. Биорезорбируемые коллагеновые материалы в хирургии: 50 лет успеха. *Сеченовский вестник*, 2020, 11(1), 59–70. <https://doi.org/10.47093/2218-7332.2020.11.1.59-70>
- Демина Т.С. Материалы биомедицинского назначения на основе механохимически модифицированного хитозана. Дисс. докт хим., Москва, 2021, 39с.
- Демина В.А., Седуш Н.Г., Гончаров Е.Н., Крашениников С.В., Крупнин А.Е., Гончаров Н.Г., Чвалун С.Н. Биоразлагаемые наноструктурированные композиты для хирургии и регенеративной медицины. *Российские нанотехнологии*, 2021, 16(1), 4–22.
- Altman G.H., Diaz F., Jakuba C., Calabro T., Horan R.L., Chen J., Lu H., Richmond J., Kaplan D.L. Silk-based biomaterials. *Biomaterials*, 2003, 24(3), 401–416. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00353-8](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00353-8)
- Fuchs S., Motta A., Migliaresi C., Kirkpatrick C.J. Outgrowth endothelial cells isolated and expanded from human peripheral blood progenitor cells as a potential source of autologous cells for endothelialization of silk fibroin biomaterials. *Biomaterials*, 2006, 27(31), 5399–408. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.06.015>
- Altman G.H., Horan R.L., Lu H.H., Moreau J., Martin I., Richmond J.C., Kaplan D.L. Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. *Biomaterials*, 2002, 23(20):4131–4141. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00156-4](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00156-4)
- Sangkert S., Meesane J., Kamonmattayakul S., Chai W.L. Modified silk fibroin scaffolds with collagen/decellularized pulp for bone tissue engineering in cleft palate: Morphological structures and biofunctionalities. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, 2016, 58, 1138–1149. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.09.031>
- Котлярова М.С., Жуйков В.А., Чудинова Ю.В., Хайдапова Д.Д., Мойсенович А.М., Коньков А.С., Сафонова Л.А., Боброва М.М., Архипова А.Ю., Гончаренко А.В., Шайтан К.В. Индукция остеогенной дифференцировки остеобластоподобных клеток MG-63 при культивировании в трёхмерных условиях на фиброинных микроносителях. *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. Биология*, 2016, 16(4), 34–40.

10. Melke J., Midha S., Ghosh S., Ito K., Hofmann S. Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering. *Acta Biomater.*, 2016, 31, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.09.005>
11. Сафонова Л.А., Боброва М.М., Ефимов А.Е., Агапова О.И., Агапов И.И. Биodeградируемые материалы на основе тканей из натурального шелка как перспективные скаффолды для тканевой инженерии и регенеративной медицины. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2020, 22(4), 105–114. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2020-4-105-114>
12. Агапов И.И., Агапова О.И., Ефимов А.Е., Соколов Д.Ю., Боброва М.М., Сафонова Л.А. Способ получения биodeградируемых скаффолдов на основе тканей из натурального шелка Патент RU 2653428 С1, опубл. 08.05.2018, бюл. № 13.
13. Агапова О.И. Биоинженерные конструкции на основе фиброина шелка и спидроина для регенеративной медицины и тканевой инженерии. *Современные технологии в медицине*. 2017; 9(2), 190–206. <https://doi.org/10.1769/stm2017.9.2.2.24>

***In vitro* Degradation Study of Tissue-Based Materials from Natural Silk for Regenerative Medicine**

E. I. Podbolotova^a, A. R. Pashutin^a, A. E. Efimov^a, O. I. Agapova^a, and I. I. Agapov^{a, #}

^a*Academician V.I. Schumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123182 Russia*

[#]*e-mail: igor_agapov@mail.ru*

Abstract—The aim of this study was to create biodegradable scaffolds based on natural silk fabrics for regenerative medicine. Fabrics with different densities of gas-chiffon (15 g/m²) and double-sided satin (155 g/m²) were used as matrices. The samples were pretreated with water-alcohol solution of calcium chloride for different times to obtain samples with different degrees of degradation. Morphologic studies using light microscopy confirmed structural changes in the tissues after this treatment. Degradation of the obtained scaffolds was studied *in vitro* using Fenton's reagent with different incubation durations (15, 30 and 45 days). The rate of degradation of the scaffolds depended on the tissue type and the time of pretreatment with calcium chloride. Gas-chiffon had the highest degradation rate, while atlas showed slower degradation. The results obtained can be used in optimizing the properties of silk fabrics for their use in regenerative medicine and developing effective methods to control their biodegradation.

Keywords: silk, natural silk fabric, biodegradable scaffolds, biodegradation rate