

Биодеградируемые пористые матриксы для регенерации костной ткани

**О. И. Агапова, Т. В. Дружинина, К. В. Трофимов,
В. И. Севастьянов, И. И. Агапов**

Методом выщелачивания из рекомбинантного спидроина и фиброина шелка *Bombyx mori* изготовлены пористые матриксы. Экспериментально на крысах оценили регенеративные свойства матриксов при имплантации в костные раны. По данным рентгеновской томографии использование обоих видов биосовместимых материалов обеспечивало восстановление целостности кости. При анализе динамики регенерации было выявлено, что использование спидроина приводит к более быстрому восстановлению костной ткани в зоне дефекта по сравнению с фиброином шелка.

Ключевые слова: фиброин шелка, рекомбинантный спидроин, биодеградируемые матриксы, регенерация костной ткани.

Введение

Одной из важнейших задач регенеративной медицины является выбор материалов для изготовления искусственных органов, тканей и биоинженерных конструкций. Перечень необходимых требований, предъявляемых к такого рода материалам, достаточно велик. Наиболее важные из них следующие: материал должен формировать пористый каркас и быть нетоксичным для культивируемых клеток; должен характеризоваться достаточной механической прочностью и эластичностью, необходимыми для хирургических манипуляций; обладать биосовместимостью с организмом; быть биодеградируемым, что избавляет от дополнительных вмешательств извне для изъятия конструкции на конечном этапе регенерации; материал должен сохранять свои медико-химические свойства при стерилизации стандартными методами.

Поиск оптимальных полимеров, максимально соответствующих заданным критериям, непрост и сталкивается с рядом ограничений. Связано это с тем, что у каждого подобного материала существуют как положительные, так и отрицательные свойства, проявляющиеся в процессе изготовления конструкции, а затем в процессе лечения. Биоматериалы,

применяемые в медицине должны деградировать со скоростью, соизмеримой с образованием новой ткани для того, чтобы позволить клеткам синтезировать новый внеклеточный матрикс и восстановить функционально активную ткань. Наиболее перспективными материалами для изготовления носителей в тканевой инженерии являются полимеры биологического происхождения. Продукты деградации таких полимеров не оказывают токсического действия, а иногда могут служить высокоэффективными биостимуляторами [1 – 3]. Материалами, отвечающими всем вышеизложенным требованиям, являются фиброин шелка и спидроин.

Фиброин — основной белок шелка, который получают из коконов *Bombyx mori* или родственных видов. Представляет собой гетеродимер, состоящий из двух ковалентно связанных дисульфидными мостиками цепей: легкой цепи Fib-L с массой 26 кДа (262 аминокислоты) и тяжелой Fib-H цепи с массой 350 кДа (5263 аминокислоты), а также гликозилированного белка P25 с массой 30 кДа, объединенного с Fib-L и Fib-H гидрофобными связями [4 – 6]. Первичную последовательность фиброина составляют, в масс. %: глицин — 43 %, аланин — 30 %, серин — 12 % [7], тирозин — 5 %, валин — 2 %, аспарат, глутамат и цистеин, который выполняет главную

интегрирующую роль в объединении субъединиц в одну молекулу. Фиброин — амфифильный белок с существенным перевесом в сторону гидрофобности, не растворимый в воде и в разбавленных растворах многих кислот и щелочей. Благодаря тому, что фиброин способен формировать и α -спирали и β -складки, он существует в нескольких структурных формах: 1) рыхлой, глобулярной; 2) обогащенной α -спиралями аморфной форме (silk I); 3) прочной кристаллической β -форме (silk II). Именно насыщенная β -структурами форма белка задает и поддерживает форму создаваемой на его основе биоконструкции, обеспечивает его целостность и стабильность в близких физиологической среде организма водных растворах на протяжении долгого периода [8]. В связи с этим, конструкции из фиброина перед применением необходимо подвергать β -кристаллизации в целях сохранения их целостности и во избежании разрушения в среде культивирования или в условиях *in vivo*. Фиброин является термостабильным белком, температура его денатурации выше 127 °С, модуль упругости равен 15 – 17 ГПа, он обладает высокой прочностью на разрыв (610 – 690 МПа) [9].

Каркасный паутиный шёлк представляет собой шелк, синтезируемый пауками [10]. Нити каркасного шёлка паутины очень эластичны, характеризуются высокой прочностью на разрыв, сопоставимой с кевларом и превышающей прочность стали, что делает данный полимер уникальным среди других природных, а также большей части искусственных материалов [11]. Шёлк паутины устойчив к условиям внешней среды, обладает высокой биосовместимостью и способностью к биодеградации. Такие свойства объясняются его структурой. В состав каркасной нити входят два ковалентно связанных белка: спидроин 1, кодирующийся геном MASP1 (образует кристаллические β -складчатые струк-

туры), и спидроин 2, кодирующийся геном MASP2 (образует “аморфный матрикс”). Кристаллические части макромолекулы отвечают за высокую прочность на разрыв, а “аморфный матрикс” — за эластичность. Молекулярная масса выделенных спидроинов составляет 300 – 350 кДа, димерных форм — 550 – 650 кДа [12]. Каркасные нити паутины обладают высокой термостабильностью (до 230 °С). Существуют рекомбинантные аналоги природных спидроинов, характеризующиеся меньшей механической прочностью, которые получают синтезом в клетках дрожжей *Pichia pastoris* и *Saccharomyces cerevisiae*, путем использования в качестве продуцентов культур животных клеток, а также синтеза в трансгенных животных и растениях [13, 14].

Цель настоящей работы — исследование возможности регенерации костной ткани в экспериментальной модели механического повреждения кости при имплантации пористых биодеградируемых матриксов из фиброина шелка или рекомбинантного спидроина.

Материалы и методы

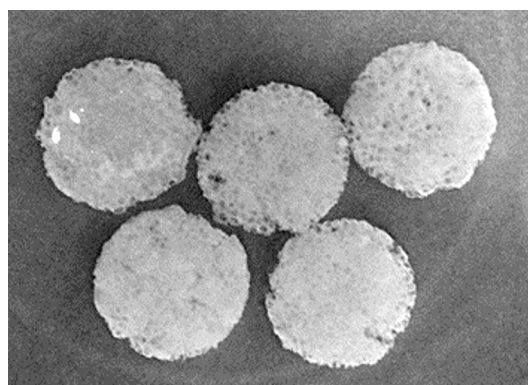
Изготовление пористых матриксов из регенерированного шелка и рекомбинантного спидроина

Лиофилизированный рекомбинантный спидроин 1f9 [15] был любезно предоставлен ведущим научным сотрудником лаборатории белковой инженерии ФГУП “Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов” В.Г. Богушем.

Фиброин выделяли из коконов шелкопряда *Bombyx mori*, предоставленных директором Государственного научного учреждения “Республикан-



а



б

Рис. 1. Макрофотографии пористых матриксов из рекомбинантного спидроина (а) и фиброина (б) шелка *Bombyx mori*. Матриксы — пористые диски диаметром 10 мм и высотой 2 мм.

ская научно-исследовательская станция шелководства Российской академии сельскохозяйственных наук” В.В. Богословским (г. Железноводск, Ставропольский край). Для отмывки от серицина коконы кипятили в 0,03 М NaHCO₃ в течение 1 ч и промывали дистиллированной водой.

Пористые матрицы были получены методом выщелачивания. Навеску каждого вида полимера массой 15 мг растворяли при 40 °С в течение 30 мин в 50 мкл раствора 10 % хлористого лития с 90 %-й муравьиной кислотой. Полученный раствор центрифугировали 10 мин при 11300 g, затем 50 мкл надосадочной жидкости смешивали со 110 мг хлорида натрия, размер частиц соли был от 200 до 400 мкм. После этого происходило формирование диска диаметром 10 мм и высотой 2 мм. При комнатной температуре (20–25 °С) диск высушивали, подвергали на протяжении 2 ч обработке 96 %-м этанолом, после чего отмывали от частиц хлорида натрия дистиллированной водой. Полученные матрицы дегазировали и хранили в 70 %-м этаноле (рис. 1). Размеры пор матрикса составили 100 – 600 мкм, пористость — 85 %.

Эксперименты in vivo

Все процедуры по уходу и работе с животными выполняли в соответствии с протоколами, утвержденными Комитетом по уходу и использованию животных, согласно руководству Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, приказ № 755 от 12.08.1977 и декларации Всемирной Медицинской Организации Хельсинки (2000 г.). В ходе проведения эксперимента было прооперировано 60 крыс породы “Wistar”, все животные были разделены на группы исследования, что представлено в табл. 1.

Таблица 1

Группы исследования крыс в зависимости от сроков наблюдения и различных типов биополимеров				
Группы наблюдения	Количество крыс в экспериментах при времени наблюдения, недели			
	1	2	4	8
Спидроин	5	5	5	5
Фиброин	5	5	5	5
Контроль	5	5	5	5

Дефект кости выполняли по следующей методике: в проекции диафиза бедренной кости в передне-заднем направлении выполняли сквозное отверстие диаметром 2 мм. Из полученных дисков-матрикса формировали цилиндры диаметром 2 мм, длиной

5 мм, которыми заполняли дефект. Перед имплантацией матрицы промывали в стерильном физиологическом растворе.

Во все сроки наблюдения (от 1 до 8 недель) у животных осуществляли забор крови из хвостовой вены, затем по 5 животных из каждой группы выводили из экспериментов ингаляционной передозировкой эфира. Путем экзартикуляции по суставам проводили извлечение бедренных костей с окружающими мягкими тканями, мягкие ткани удаляли и кость помещали в 10 %-й нейтральный раствор формалина.

Результаты применения матрикса двух видов оценивали с помощью биохимических исследований и рентгенографии области интереса в сроки 1, 2, 4, 8 недель после операции. Исследования проводили на 64-срезовом мультиспиральном компьютерном томографе (модель Light Speed VCT) компании General Electric (GE)). Параметры сканирования: 120 кВ, 80 мА, толщина реконструкции — 0,6 мм. Полученные серии изображений обрабатывали на рабочей станции экспертного класса с многопрофильным просмотром изображений AW VolumShare 4 по 3D (“three-dimensional”) и VR (“virtual reality”) протоколам. Количественную оценку проводили по индексу костной мозоли (ИКМ) по шкале Хаунсфилда. С этой целью осуществляли динамические измерения денситометрических показателей интермедиарной зоны регенерированной ткани и интактного кортикального слоя с помощью спиральной компьютерной томографии, ИКМ вычисляли по формуле:

$$\text{ИКМ} = \frac{\text{ИР}}{\text{КС}} \cdot 100\%,$$

где ИР — плотность интермедиарной зоны регенерированной ткани в единицах Хаунсфилда (НУ); КС — плотность интактного кортикального слоя прилежащего отдела кости, НУ.

Единицы Хаунсфилда оценивают степень абсорбции рентгеновского излучения анатомическими структурами организма по отношению к воде. Степень абсорбции рентгеновского излучения водой в шкале Хаунсфилда принимается равной 0. Воздух и жир имеют отрицательные значения, костная ткань — положительные значения

На полученных изображениях в интерактивном режиме выделяли область, в которой автоматически высчитывали площадь и плотность области интереса в НУ. В процессе измерений оценивали форму и соотношение костного дефекта и материала для замещения костной ткани, структуру кости, выявляли наличие дистрофических изменений костного и мягкотканого компонентов, характер изменений в

окружающих тканях. Оценку вышеуказанных параметров проводили в 2 этапа. На первом этапе полученные аксиальные изображения просматривали в костном и мягкотканом окнах, оценивали состояние костных и мягкотканых структур в области дефекта, измеряли площади и плотности костного регенерата. На втором этапе измерение проводили на серии мультипланарных реконструкций в костном и мягкотканом режиме. Качественную оценку остеорегенерации проводили по следующим критериям:

- снижение четкости границы костного дефекта,
- повышение оптической плотности костной мозоли за счет формирования островков минерализации.

Определение биохимических показателей и формулы крови

Уровни общего белка, аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаргатаминотрансферазы (АСТ), а также креатинина измеряли на автоматическом биохимическом анализаторе проточного типа “Verno” (производства Electa Lab., Италия). Щелочную фосфатазу определяли на биохимическом анализаторе “Sapphire 350” (Audit Diagnostics, Ирландия).

Формулу крови рассчитывали на лабораторном микроскопе “Nikon Eclipse 50i” (Nikon Instruments, США) после окрашивания мазков крови по стандартной методике гематоксилин-эозином. Кровь забирали у животных прижизненно из хвостовой вены.

Проведение статистического анализа

Оценку полученных результатов проводили с помощью методов вариационной статистики с

использованием пакетов стандартных статистических программ Microsoft Excel XP, а также с помощью программы Statistica for Windows Version 6,0 (StatSoft Inc., США). Определяли среднее значение (X), стандартное (среднеквадратичное) отклонение (SD), значение вероятности (p). Для анализа имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (критерий Колмогорова – Смирнова). Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, применяли непараметрический критерий Манна – Уитни (U-тест). Различия двух сравниваемых величин считали статистически значимым, если вероятность их тождества составляла менее 5 % ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

В послеоперационном периоде и у экспериментальных животных, и в группе контроля, в течение первых двух суток отмечали выраженную гиподинамическую реакцию, отек прооперированной зоны. Затем в период до 1 недели, указанные явления уменьшались, отмечалось сохранение умеренного отека мягких тканей бедра. Через 4 недели в послеоперационном периоде наступало полное восстановление.

При анализе динамики показателей лейкоцитарной формулы периферической крови у крыс были выявлены изменения, приведенные в табл. 2.

Увеличение уровня лейкоцитов, особенно смещение лейкоцитарной формулы в сторону увеличения содержания сегментоядерных нейтрофилов и моноцитов говорит о возникновении воспалительного процесса, который постепенно уменьшается в

Таблица 2

Среднестатистические значения гематологических показателей крови у крыс до и после операции через 1, 2, 4, 8 недель, $X \pm SD$

Группа	Время прошедшее после операции, недели	Показатели				
		Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	Лимфоциты, $10^9/\text{л}$	Сегментоядерные нейтрофилы, $10^9/\text{л}$	Эозинофилы, $10^9/\text{л}$	Моноциты, $10^9/\text{л}$
Спидроин	До операции	$4,4 \pm 0,3$	$6,43 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,3$	$0,2 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,02$
	1	$6,3 \pm 0,6$	$3,95 \pm 0,7$	$5,08 \pm 0,1$	$2,66 \pm 0,07$	$4,05 \pm 0,02$
	2	$4,8 \pm 0,7$	$4,56 \pm 0,9$	$4,2 \pm 0,2$	$1,59 \pm 0,02$	$2,08 \pm 0,01$
	4	$3,9 \pm 0,4$	$5,85 \pm 0,6$	$3,4 \pm 0,14$	$0,9 \pm 0,13$	$0,58 \pm 0,02$
	8	$4,0 \pm 0,5$	$6,35 \pm 0,7$	$1,95 \pm 0,15$	$0,1 \pm 0,08$	0
Фиброин	1	$6,9 \pm 0,9$	$3,15 \pm 0,7$	$5,64 \pm 0,3$	$3,16 \pm 0,07$	$4,25 \pm 0,02$
	2	$5,3 \pm 0,8$	$3,56 \pm 0,9$	$4,4 \pm 0,2$	$2,59 \pm 0,02$	$2,16 \pm 0,01$
	4	$4,9 \pm 0,6$	$4,95 \pm 0,6$	$3,6 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,1$	$0,73 \pm 0,02$
	8	$4,6 \pm 0,7$	$6,15 \pm 0,7$	$2,15 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,03$	0
Контроль	1	$6,6 \pm 1,0$	$4,56 \pm 0,5$	$4,53 \pm 0,21$	$1,2 \pm 0,05$	$0,15 \pm 0,01$
	2	$5,9 \pm 0,8$	$4,30 \pm 0,7$	$4,31 \pm 0,19$	$0,77 \pm 0,12$	$0,1 \pm 0,02$
	4	$4,7 \pm 0,6$	$5,36 \pm 0,5$	$3,56 \pm 0,12$	$0,46 \pm 0,01$	0
	8	$4,3 \pm 0,4$	$6,58 \pm 0,4$	$2,4 \pm 0,3$	$0,27 \pm 0,06$	0

Таблица 3

Среднестатистические значения биохимических показателей крови у крыс до и после операции через 1, 2, 4, 8 недель, $X \pm SD$

Группа	Время прошедшее после операции, недели	Показатели					
		Общий белок, г/л	Щелочная фосфатаза, ед./л	Билирубин общий, мкмоль/л	Креатинин, мкмоль/л	АЛТ, нмоль/л	АСТ, нмоль/л
Спидроин	До операции	86,7 ± 1,8	70,0 ± 1,2	3,6 ± 0,4	105,3 ± 6,5	72,7 ± 5,5	101,0 ± 8,4
	1	81,3 ± 1,6	94,9 ± 1,5	3,3 ± 0,1	103,7 ± 7,2	73,4 ± 6,8	99,6 ± 8,5
	2	84,1 ± 1,5	90,0 ± 1,3	3,2 ± 0,2	101,9 ± 8,1	75,1 ± 5,9	96,8 ± 7,9
	4	84,9 ± 1,6	84,8 ± 1,4	3,4 ± 0,14	102,7 ± 7,3	73,8 ± 6,2	98,9 ± 8,0
Фиброин	8	87,5 ± 1,5	75,3 ± 1,3	3,7 ± 0,15	105,8 ± 6,0	72,4 ± 5,6	102,8 ± 8,5
	1	79,9 ± 1,8	91,5 ± 1,7	3,4 ± 0,3	101,6 ± 7,7	75,6 ± 5,8	97,6 ± 7,5
	2	82,3 ± 1,9	89,6 ± 1,5	3,1 ± 0,2	104,8 ± 7,5	74,4 ± 6,1	99,8 ± 7,9
	4	84,9 ± 1,5	84,9 ± 1,6	3,6 ± 0,2	107,3 ± 7,1	74,9 ± 5,6	103,1 ± 8,5
Контроль	8	86,6 ± 1,8	71,5 ± 1,3	3,5 ± 0,16	106,5 ± 6,9	73,3 ± 5,2	104,5 ± 8,5
	1	82,3 ± 1,5	74,6 ± 1,4	3,5 ± 0,2	103,4 ± 8,3	74,2 ± 5,1	97,4 ± 7,6
	2	85,4 ± 1,6	74,3 ± 1,6	3,3 ± 0,15	104,9 ± 7,5	75,3 ± 6,3	99,4 ± 8,1
	4	84,7 ± 1,8	73,7 ± 1,5	3,5 ± 0,2	105,5 ± 7,0	76,1 ± 5,8	105,9 ± 9,2
	8	86,3 ± 1,7	71,8 ± 1,4	3,4 ± 0,3	107,3 ± 7,3	74,2 ± 5,5	102,4 ± 8,7

течение 2-х недель. Через 2 недели после введения материала содержание нейтрофилов не отличалось от физиологической нормы. Изменения в лейкоцитарной формуле, свидетельствующие о наличии аллергической реакции в течение раннего послеоперационного периода, более выражены в группе с имплантированными фиброиновыми матриксами, по сравнению с группой, в которой были использованы спидроиночные матрицы, и группой контроля. Такая реакция постепенно затухала в динамике наблюдения и полностью исчезала через 2 недели после операции.

Восстановительный послеоперационный период у животных протекал удовлетворительно, отмечалось достаточно быстрое снижение всех послеоперационных явлений, отсутствие локальных и системных осложнений, что подтверждается исследованием

уровней биохимических показателей в сыворотке крови животных. Уровни содержания общего белка, АЛТ, АСТ, а также креатинина на протяжении всего срока наблюдения оставались в пределах физиологической нормы во все сроки наблюдения и это дает нам основание утверждать о нормальном функциональном состоянии основных органов животных.

Динамическое наблюдение за изменением содержания в сыворотке крови щелочной фосфатазы показало незначительный ее рост к 14-му дню при применении во время операции как спидроина, так и фиброина. Так как явления воспаления ко 2-й неделе наблюдения затухают полностью, что доказано нами при анализе гематологических показателей, можно утверждать, что повышенный уровень щелочной фосфатазы по сравнению с контролем, вероятно,

Таблица 4

Данные рентгеновского исследования образцов бедренной кости с разными видами имплантированных материалов в разные сроки наблюдения, $X \pm SD$

Материал	Сроки наблюдения, недели	Плотность интермедиарной зоны регенерированной ткани, НУ	Плотность интактного кортикального слоя, НУ	Индекс регенерации
Спидроин	1	290,7 ± 21,0	953,1 ± 12,7	30,5 ± 0,6
	2	451,9 ± 9,2	1048,7 ± 19,4	43,1 ± 0,7
	4	560 ± 12,2	1129,1 ± 21,8	49,6 ± 0,9
	8	862,3 ± 10,3	1565,1 ± 22,5	55,1 ± 0,5
Фиброин	1	268,1 ± 0,8	921,4 ± 15,6	29,1 ± 0,4
	2	292,7 ± 10,2	863,4 ± 16,1	33,9 ± 0,6
	4	423,8 ± 0,9	990,3 ± 19,1	42,8 ± 0,5
	8	731,5 ± 10,0	1364 ± 20,2	47,5 ± 0,7
Контроль	1	431,2 ± 13,2	1540 ± 12,1	28,0 ± 0,8
	2	239,5 ± 10,3	753,0 ± 0,89	31,8 ± 0,7
	4	387,7 ± 0,95	964,5 ± 12,6	40,2 ± 0,4
	8	435,5 ± 11,5	983 ± 14,9	44,3 ± 0,6

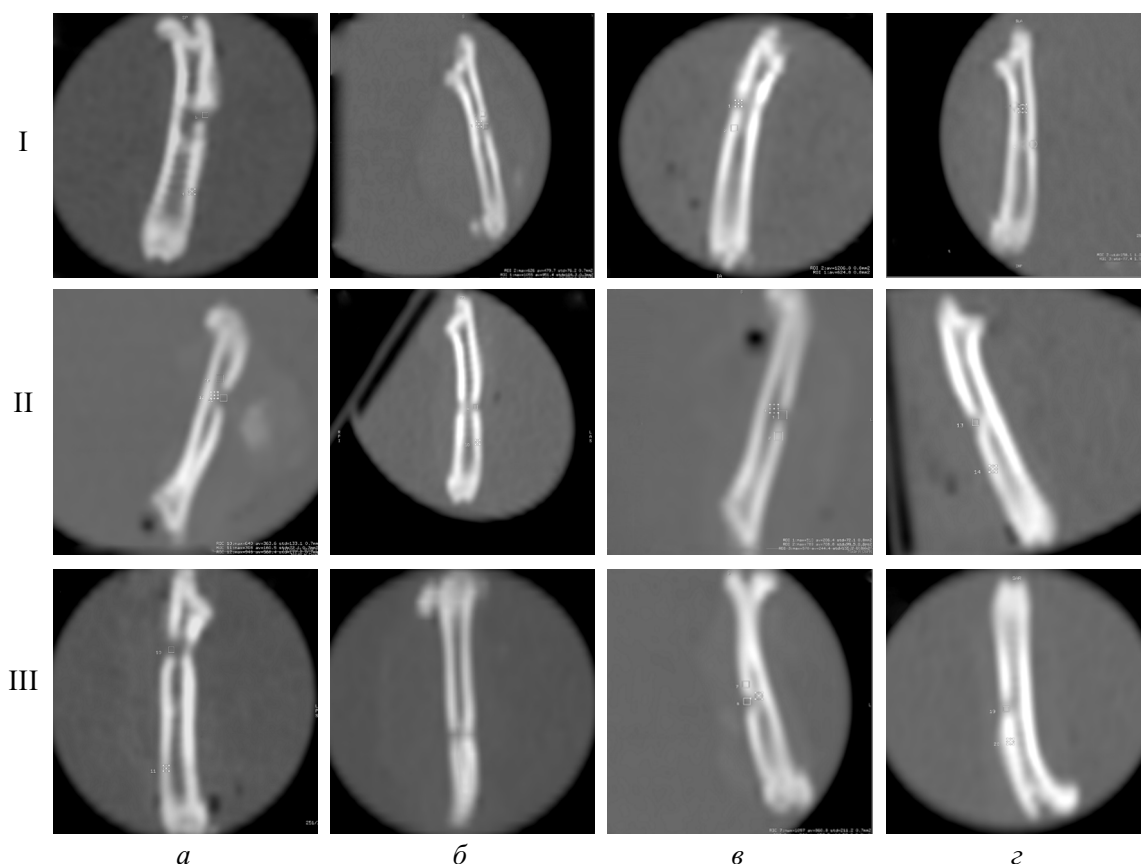


Рис. 2. Рентгенограммы костей прооперированных животных. Представлены рентгенограммы одной из 5 крыс из каждой группы. Сроки регенерации, недели: а – 1, б – 2, в – 3, г – 8. I – Спидроин, II – Фиброин, III – контроль (без введения матрикса).

отражает активацию остеобластов и, следовательно, процессов регенерации костной ткани. Данные биохимического исследования представлены в табл. 3.

Данные рентгеновского исследования также подтверждают более активные процессы репаративной регенерации костной ткани в случае применения спидроина, по сравнению с фиброином и группой контроля. В ходе эксперимента были исследованы оперированные кости в каждой группе из 5 животных в заданные сроки после операции. При денситометрическом анализе мультипланарных томограмм получены абсолютные значения плотности в области дефекта. Результаты исследования представлены на рис. 2 и в табл. 4.

Об образовании костной мозоли можно судить по увеличению плотности искусственно сформированного отверстия в кости, что связано с процессом кальцификации и регенерацией костной ткани. Данные процессы более выражены у животных опытных групп, особенно у группы с применением спидроина. Начиная со второй недели, более высокий индекс регенерации костной ткани у крыс наблюдали

при заполнении дефекта исследуемыми материалами по сравнению с группой контроля. Преимущество спидроина по сравнению с фиброином и контролем

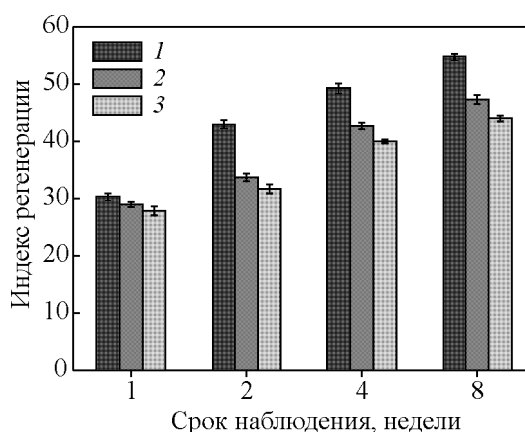


Рис. 3. Изменения индекса Хаунсфилда в динамике наблюдения при применении разных материалов для заполнения дефектов костной ткани: 1 – спидроин, 2 – фиброин, 3 – контроль. Обнаружены достоверные различия между группами на 2, 4 и 8 неделе после операции ($p < 0,05$).

выявлено во все сроки наблюдения после операции (рис. 3).

Введение фиброина шелка и рекомбинантного спидроина создает условия для регенерации костной ткани в области оперативного вмешательства. При применении двух видов материалов обеспечивается интеграция костной ткани с имплантатом с последующим восстановлением целостности кости.

При анализе динамики формирования костной ткани было выявлено, что, использование спидроина для её замещения приводит к более быстрому восстановлению костной ткани в зоне дефекта по сравнению с фиброином шелка. Возможно, на такой результат регенерации могут влиять различия в аминокислотной последовательности фиброина и спидроина, их молекулярной массе, а также особенности нано- и микроструктуры синтезированных матриц, что требует дальнейшего исследования.

Выводы

Фиброин шёлка и рекомбинантный спидроин являются перспективными материалами для изготовления пористых биоинженерных конструкций, способствующих восстановлению костной ткани.

Использование искусственных матриц из рекомбинантного спидроина для замещения костной ткани приводит к более быстрому восстановлению ткани в зоне дефекта по сравнению с фиброином шелка.

Мы благодарим А. Конькова за помощь в проведении ряда экспериментов.

Данная работа выполнена в рамках проекта ФЦПР 2014-2020 Минобрнауки России (Соглашение № 14.604.21.0001, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60414X0001).

Литература

1. Севастьянов В.И., Перова Н.В. Биополимерный гетерогенный гидрогель Сферо®ГЕЛЬ — инъекционный биодеградируемый имплантат для заместительной и регенеративной медицины. Практическая медицина, 2014, № 8, с. 110 – 116.
2. Кирсанова Л.А., Баранова Н.В., Бубенцова Г.Н., Скалецкая Г.Н., Перова Н.В., Севастьянов В.И., Скалецкий Н.Н., Влияние микроструктурированного коллагенсодержащего гидрогеля на культуры островковых клеток поджелудочной железы. Вестник трансплантологии и искусственных органов, 2014, № 1, с. 29 – 33.
3. Биосовместимые материалы (учебное пособие). Под ред. В.И. Севастьянова и М.П. Кирпичникова. М.: Изд-во “МИА”, 2011, 544 с.

4. Waddua P., Promdonkoy B., Maensiri S., Siri S. Different properties of electrospun fibrous scaffolds of separated heavy-chain and light-chain fibroins of Bombyx mori. International journal of biological macromolecules, 2010, v. 46, no. 5, p. 493 – 501.
5. Tanaka K., Inoue S., Mizuno S. Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by Bombyx mori. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1999, v. 29, no. 3. p. 269 – 276.
6. Ho W. Single-molecule chemistry. The Journal of Chemical Physics, 2002, v. 117, no. 24, p. 11033 – 11061.
7. Vepari C., Kaplan D.L. Silk as a Biomaterial. Progress in polymer science, 2007, v. 32, no. 8 – 9, p. 991 – 1007.
8. Scherer M.P., Frank G., Gummer A.W. Experimental determination of the mechanical impedance of atomic force microscopy cantilevers in fluids up to 70 kHz. Journal of Applied Physics, 2000, v. 88, no. 5, p. 2912 – 2920.
9. Smith R.K., Lewis P.A., Weiss P.S. Patterning self-assembled monolayers. Progress in Surface Science, 2004, v. 75, no. 1 – 2, p. 1 – 68.
10. Shen Z.Q., Hu J., Wang J.L., Zhou Y.X. Comparison of polycaprolactone and starch/polycaprolactone blends as carbon source for biological denitrification. International Journal of Environmental Science and Technology, 2014, v. 12, no. 4, p. 1235 – 1242.
11. Kluge J.A., Rabotyagova O., Leisk G.G., Kaplan D.L. Spider silks and their applications. Trends in Biotechnology, 2008, v. 26, no. 5, p. 244 – 251.
12. Spenner A., Schlott B., Vollrath F., Unger E., Grosse F., Weisshart K. Characterization of the protein components of nephila clavipes dragline silk. Biochemistry, 2005, v. 44, no. 12, p. 4727 – 4736.
13. Yang J., Barr L.A., Fahnestock S.R., Liu Z.B. High yield recombinant silk-like protein production in transgenic plants through protein targeting. Transgenic research, 2005, v. 14, no. 3, p. 313 – 324.
14. Wen H., Lan X., Zhang Y., Zhao T., Wang Y., Kajiura Z., et al. Transgenic silkworms (Bombyx mori) produce recombinant spider dragline silk in cocoons. Molecular biology reports, 2010, v. 37, no. 4, p. 1815 – 1821.
15. Bogush V.G., Sokolova O.S., Davydova L.I., Klinov D.V., Sidoruk K.V., Esipova N.G., et al. A novel model system for design of biomaterials based on recombinant analogs of spider silk proteins. Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology, 2009, v. 4, no. 1, p. 17 – 27.

References

1. Sevastyanov V.I., Perova N.V. Biopolimerny geterogenny gidrogel Sfero®GEL — inyectionsny biodegradiruyemy implantat dlya zamestitelnoy i regenerativnoy meditsiny [Biopolymer heterogeneous Sphero®GEL hydrogel — injection biodegradable implant for replacement and regenerative medicine]. *Prakticheskaya meditsina — Practical Medicine (in Rus)*, 2014, no. 8, pp. 110 – 116.
2. Kirsanova L.A., Baranova N.V., Bubentsova G.N., Skaletskaya G.N., Perova N.V., Sevastyanov V.I.,

- Skaletsky N.N., Vliyanie mikrostrukturirovannogo kollagensoderzhashchego gidrogelya na kultury ostrovkovykh kletok podzheludochnoy zhelezy [Effect of microstructured collagen hydrogel on culture of islet cells of pancreas]. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov — Russian journal of transplantology and artificial organs*, 2014, no. 1, pp. 29 – 33.
3. Sevastyanov V.I., Kirpichnikov M.P. *Biosovmestimye materialy* [Biocompatible materials]. Moscow, MIA Publ., 2011, 544 p.
 4. Wadbua P., Promdonkoy B., Maensiri S., Siri S. Different properties of electrospun fibrous scaffolds of separated heavy-chain and light-chain fibroins of *Bombyx mori*. *International journal of biological macromolecules*, 2010, vol. 46, no. 5, pp. 493 – 501.
 5. Tanaka K., Inoue S., Mizuno S. Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, vol. 29, no. 3, pp. 269 – 276.
 6. Ho W. Single-molecule chemistry. *The Journal of Chemical Physics*, 2002, vol. 117, no. 24, pp. 11033 – 11061.
 7. Vepari C., Kaplan D.L. Silk as a Biomaterial. *Progress in polymer science*, 2007, vol. 32, no. 8 – 9, pp. 991 – 1007.
 8. Scherer M.P., Frank G., Gummer A.W. Experimental determination of the mechanical impedance of atomic force microscopy cantilevers in fluids up to 70 kHz. *Journal of Applied Physics*, 2000, vol. 88, no. 5, pp. 2912 – 2920.
 9. Smith R.K., Lewis P.A., Weiss P.S. Patterning self-assembled monolayers. *Progress in Surface Science*, 2004, vol. 75, no. 1 – 2, pp. 1 – 68.
 10. Shen Z.Q., Hu J., Wang J.L., Zhou Y.X. Comparison of polycaprolactone and starch/polycaprolactone blends as carbon source for biological denitrification. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2014, vol. 12, no. 4, pp. 1235 – 1242.
 11. Kluge J.A., Rabotyagova O., Leisk G.G., Kaplan D.L. Spider silks and their applications. *Trends in Biotechnology*, 2008, vol. 26, no. 5, pp. 244 – 251.
 12. Sponner A, Schlott B, Vollrath F, Unger E, Grosse F, Weisshart K. Characterization of the protein components of *Nephila clavipes* Dragline silk. *Biochemistry*, 2005, vol. 44, no. 12, pp. 4727 – 4736.
 13. Yang J., Barr L.A., Fahnestock S.R., Liu Z.B. High yield recombinant silk-like protein production in transgenic plants through protein targeting. *Transgenic research*, 2005, vol. 14, no. 3, pp. 313 – 324.
 14. Wen H., Lan X., Zhang Y., Zhao T., Wang Y., Kajiura Z., et al. Transgenic silkworms (*Bombyx mori*) produce recombinant spider dragline silk in cocoons. *Molecular biology reports*, 2010, vol. 37, no. 4, pp. 1815 – 1821.
 15. Bogush V.G., Sokolova O.S., Davydova L.I., Klinov D.V., Sidoruk K.V., Esipova N.G., et al. A novel model system for design of biomaterials based on recombinant analogs of spider silk proteins. *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 2009, vol. 4, no. 1, pp. 17 – 27.

Статья поступила в редакцию 16.02.2015 г.

Агапова Ольга Игоревна — ФГБУ “ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И.Шумакова” Минздрава РФ (123182, г. Москва, Шукинская улица, д. 1), научный сотрудник, специалист в области биоматериаловедения.

Дружинина Татьяна Валентиновна — Медицинский центр № 2 Федерального государственного бюджетного учреждения здравоохранения “Сибирский федеральный Научно-Клинический Центр Федерального медико-биологического агентства” (636070 г. Северск Томской обл., ул. Мира 4), кандидат медицинских наук, заведующая клинико-диагностической лабораторией, специалист в области клинической лабораторной диагностики.

Трофимов Константин Викторович — Медицинский центр № 2 Федерального государственного бюджетного учреждения здравоохранения “Сибирский федеральный Научно-Клинический Центр Федерального медико-биологического агентства” (636070 г. Северск Томской обл., ул. Мира 4), заведующий отделением, специалист в области компьютерной томографии.

Севастьянов Виктор Иванович — ФГБУ “ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И.Шумакова” Минздрава РФ (123182, г. Москва, Шукинская улица, д. 1), доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом, специалист в области биоматериаловедения. E-mail: viksev@yandex.ru.

Агапов Игорь Иванович — ФГБУ “ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И.Шумакова” Минздрава РФ (123182, г. Москва, Шукшинская улица, д. 1), доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией, специалист в области биоматериаловедения. E-mail: igor_agapov@mail.ru.

Biodegradable porous scaffolds for bone tissue regeneration

O. I. Agapova, T. V. Druzhinina, K. V. Trofimov, V. I. Sevastianov, I. I. Agapov

Scaffolds made of recombinant spidroin and silk fibroin *Bombix mori* were produced by salt leaching technique. Regenerative properties of scaffold were evaluated in experiments with rats by implantation into bone wounds. According to data of X-ray tomography using both types of biocompatible materials provide restoration of integrity of the bone. By analyzing the dynamics of regeneration it was found that using of spidroin leads to more rapid regeneration of bone tissue compared with silk fibroin in the defect area.

Key words: silk fibroin, recombinant spidroin, biodegradable scaffolds, bone tissue regeneration

Agapova Olga — Academician V.I. Schumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow (1 Tshyukinskaya st., Moscow, 123182 Russia), research fellow of Laboratory of bionanotechnology, specialist in biomaterials.

Druzhinina Tatiana — Siberian Federal Research and Clinical Center of Federal Medical-Biological Agency, (4 Mira str., Seversk, Tomsk region, 636070, Russia), PhD (Med), head of diagnostic laboratory of Medical Center №2 of the Federal State budget institution of public health “Siberian Federal Scientific Clinical Center of the Federal Medical and Biological Agency”, specialist in clinical laboratory diagnostics.

Trofimov Konstantin — Siberian Federal Research and Clinical Center of Federal Medical-Biological Agency, (4 Mira str., Seversk, Tomsk region, 636070, Russia), head of Department of computed tomography department no. 2 Medical Center Federal State health agencies «Siberian Federal Scientific Clinical Center of the Federal Medical and Biological Agency», an expert in the field of computer tomography.

Sevastyanov Viktor — Academician V.I. Schumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow (1 Tshyukinskaya st., Moscow, 123182 Russia), Dr Sci (Biol), professor, head of department of biomedical technologies and tissue engineering, specialist in biomaterials. E-mail: viksev@yandex.ru.

Agapov Igor — Academician V.I. Schumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow (1 Tshyukinskaya st., Moscow, 123182 Russia), Dr Sci (Biol), professor, Head of laboratory of bionanotechnology, specialist in biomaterials. E-mail: igor_agapov@mail.ru.