

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. А.Н.
КОСЫГИНА (ТЕХНОЛОГИИ. ДИЗАЙН. ИСКУССТВО)»

На правах рукописи



САЖНЕВ НИКИТА АЛЕКСАНДРОВИЧ

**РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ МОДИФИКАЦИИ И ПЕРЕРАБОТКИ
ФИБРОИНА В ВОЛОКНИСТЫЕ
МАТЕРИАЛЫ И ГИДРОГЕЛИ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО
НАЗНАЧЕНИЯ**

Специальность 05.17.06 – Технология и переработка
полимеров и композитов

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, профессор
Кильдеева Наталия Рустемовна

Москва – 2022

СОДЕРЖАНИЕ	Стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	13
1.1 Особенности химического строения и структуры фиброина тутового шелкопряда (<i>Bombyx mori</i>)	13
1.2 Методы выделения фиброина из коконов шелкопряда и получения растворов фиброина	18
1.3 Изучение конформационных переходов в растворах фиброина и условий формирования β -складчатой структуры белка	23
1.4 Гелеобразование в растворах фиброина шелка и возможности применения гидрогелей фиброина в тканевой инженерии	27
1.5 Электроформование растворов фиброина и 3-D биопринтирование как методы получения пористых биоматериалов	31
1.6 Применение материалов на основе фиброина шелка и хитозана в тканевой инженерии	34
Выводы по главе 1	41
2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	43
2.1 Характеристика сырья и реактивов	43
2.2 Методы исследования	44
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	62
3.1 Изучение процесса получения и свойств растворов фиброина	62
3.1.1 Анализ и оптимизация условий получения водных растворов фиброина из коконов шелкопряда <i>Bombyx mori</i>	63
3.1.2 Изучение свойств водных растворов фиброина	65
3.2 Изучение процессов перевода фиброина в нерастворимое состояние	68

3.2.1	Изучение влияния этанола на $\alpha \rightarrow \beta$ -конформационный переход в фиброине	69
3.2.2	Изучение процесса сшивки фиброина бифункциональным реагентом	73
3.3	Получение не растворимых в воде материалов из растворов фиброина	80
3.3.1	Получение волокнистых материалов методом электроформования из растворов фиброина	80
3.3.2	Получение сшитых дженипином широкопористых криоструктуратов из растворов фиброина	87
3.4	Изучение полимерных систем на основе растворов фиброина и хитозана	89
3.4.1	Изучение кислотно-основных свойств смешанных растворов хитозана и фиброина	90
3.4.2	Спектральные и реологические исследования кинетики гелеобразования и сшивки в смешанных растворах хитозана и фиброина	93
3.5	Разработка биополимерных материалов на основе хитозана и фиброина	98
3.5.1	Получение биологически-активных пленок на основе фиброина и хитозана, модифицированных дженипином	98
3.5.2	Изучение процесса электроформования и модификации волокнистых материалов на основе фиброина и хитозана	113
3.5.3	Получение моноволокон из формовочных растворов на основе хитозана и фиброина	115
3.5.4	Получение криоструктуратов из растворов хитозана и его смесей с фиброином	119
3.6	Изучение биосовместимости и перспектив использования материалов на основе фиброина и хитозана	121

3.6.1	Изучение цитотоксичности и использование пористых гидрогелевых криоструктуратов в качестве 3D-подложки для культивирования животных клеток	122
3.6.2	Изучение цитотоксичности и использование волокнистых материалов на основе фиброина, полученных методом электроформования в качестве 3D-подложки для культивирования животных клеток	128
	ВЫВОДЫ	136
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	137

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСМ (AFM) – Атомно-силовой микроскоп

БАВ – Биологически активное вещество

ДМСО – Диметилсульфоксид

ФБ – Фиброин

ХТЗ – Хитозан

Ala – Аланин

FITC (ФИТЦ) – Флуоресцеина изоцианат

Gly – Глицин

Gr (Дж) – Дженипин

HFIP – 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропанол, гексафторизопропанол

hMSC – Человеческие мезенхимальные стволовые клетки

SEM (СЭМ) – Сканирующая электронная микроскопия

Ser – Серин

TGA (ТГА) – Термогравиметрический анализ

Tyr – Тирозин

Val – Валин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Биodeградируемые материалы на основе биополимеров широко используются при создании инновационных изделий медико-биологического назначения: рассасывающихся шовных нитей, имплантатов для пластической хирургии, матриц для клеточной и тканевой инженерии и регенеративной медицины. Создание материалов для инновационных медицинских технологий требует использования биополимеров и адекватных технологий их переработки, обеспечивающих эффективное функционирование в организме человека. Поэтому актуальным является разработка новых биополимерных материалов и поиск методов управления их структурой и свойствами. В настоящей работе в качестве таких технологий использованы криотехнологии, электроспиннинг, а также коагуляционное формование, а в качестве биodeградируемого полимерного сырья структурный белок – фиброин из коконов тутового шелкопряда *Bombyx mori* и аминополисахарид хитозан. Полученные из полисахаридов и белков гидрогелевые материалы, имитируют естественную среду организма и таким образом обеспечивают оптимальные условия для роста и регенерации тканей, а после выполнения биологической функции, деградируют под действием биологических сред.

Сформованные из регенерированного фиброина волокна и пленки растворимы в воде. Известный для хитозана метод предотвращения растворимости, улучшения водостойкости и механических свойств - химическое сшивание, - может быть недостаточно эффективным для фиброина, вследствие низкого содержания в этом белке первичных аминогрупп, однако добавление хитозана может способствовать эффективности модификации бифункциональными реагентами. Кроме того, учитывая, что для фиброина известны несколько возможных конформационных состояний: растворимые в воде α -спирали или конформации статистического клубка и не растворимые β -складчатые структуры, создание условий для $\alpha \rightarrow \beta$ конформационного перехода при

формовании волокон и гидрогелей из регенерированного фиброина позволит воздействовать на растворимость полимерного материала.

Работа посвящена изучению химической и структурной модификации фиброина при переработке биополимерных композиций и выполнялась в соответствии с приоритетными направлениями развития науки, технологий и техники в Российской Федерации в рамках грантов Российского фонда фундаментальных исследований: проекты № 19-38-90325 и № 18-29-17059.

Цель работы заключалась в разработке методов получения не растворимых в воде волокнистых и гидрогелевых материалов медико-биологического назначения путем переработки регенерированного фиброина.

В соответствии с поставленной целью в работе были решены следующие **задачи:**

- изучены условия перехода фиброина в β -конформацию в присутствии этанола и их влияние на процесс выделения фиброина из коконов шелкопряда *Bombyx mori*;

- изучена кинетика взаимодействия фиброина и природного сшивающего реагента дженипина;

- исследованы закономерности гелеобразования в растворах фиброина и его композиций с хитозаном в процессе сшивки дженипином;

- разработаны методы химической и структурной модификации биополимеров в процессе получения волокнистых и пленочных материалов и после формования биополимерных волокон и гидрогелей;

- разработаны не растворимые в воде биополимерные материалы на основе фиброина и его композиций с хитозаном: лекарственно-наполненные пленки, волокнистые материалы, и криоструктураты гидрогелей, исследованы их морфология и физико-химические свойства;

- изучены биосовместимость и перспективы использования разработанных материалов в качестве искусственных матриц для тканевой инженерии и систем с контролируемым высвобождением лекарственных соединений.

Методы исследования и технические средства решения задач.

С целью определения физико-химических свойств растворов биополимеров применялись методы вибрационной и ротационной вискозиметрии. Фазовое разделение фиброин-хитозановых систем и систем, химически модифицированных дженипином, проводили с использованием кондуктометрии и вискозиметрии. Получение композиционных матриц для тканевой инженерии осуществляли методом лиофильной сушки композиций и растворов фиброина и хитозана. Степень набухания биополимерных пленок и биodeградируемых матриц изучали гравиметрическим методом. С применением метода атомно-силовой, оптической, конфокальной лазерной и сканирующей электронной микроскопии были изучены морфология волокнистых матриц и пленок, а так же распределение клеток при их культивировании. Получение монолитов из хитозана и его смесей с фиброином осуществляли при помощи коагуляционного формования. Получение нановолокнистых материалов на основе растворов фиброина проводилось методом бескапиллярного электроформования. Цитотоксичность биополимерных матриц определяли с помощью метода тестирования экстрактов.

Исследования проводились на оборудовании кафедры химии и технологии полимерных материалов и нанокompозитов и Центра коллективного пользования Российского государственного университета им. А.Н. Косыгина, спектральные исследования осуществлялись н.с. Свидченко Е.А. в Центре коллективного пользования «Центр исследования полимеров» ИСПМ им. Н.С. Ениколопова РАН, криоструктураты получали под руководством д.х.н., проф. Лозинского В.И. в лаборатории криохимии биополимеров, ИНЭОС им. А.Н. Несмеянова РАН. Исследование цитотоксичности пористых гидрогелевых матриц проводилось н.с. ИБХ РАН Дроздовой М.А.

Научная новизна работы. Впервые:

1. Обоснованы способы перевода композиций хитозана и фиброина в не растворимое в воде состояние: конформационный переход в фиброине и химическая сшивка, и на этой основе предложены технологические решения в области формования волокон.

2. На примере пленок установлено, что обработка водно-этанольным раствором может служить эффективным средством перевода материалов на основе фиброина в не растворимую форму. Доказано, что в основе этого факта лежит конформационный переход фиброина в β -складчатую конформацию.

3. Установлены новые особенности механизма взаимодействия фиброина и хитозана с дженипином и гелеобразования в их растворах: продолжительный индукционный период роста вязкости и интенсивности поглощения при $\lambda=610$ нм, предшествующие образованию пространственной сетки сшитых биополимеров.

4. Обнаружено, что индукционный период реакции сшивки фиброина и хитозана (1:1) дженипином, детектируемый по стадии роста интенсивности синей окраски раствора, в 3 раза продолжительнее по сравнению с хитозаном, что создало возможность совместить процесс модификации и технологические операции формования не растворимого в воде волокна, пригодного для использования во влажной среде организма.

5. Установлена взаимосвязь состава формовочных композиций на основе растворов фиброина и хитозана, условий коагуляционного и электроформования мононитей и волокнистых материалов, условий перевода биополимеров в не растворимое состояние и растворимости, осмотических и физико-механических свойств пленок и волокон.

Теоретическая значимость. Установлена роль конформационных переходов фиброина и структурообразования в его смешанных растворах с хитозаном при формировании не растворимых в воде композиционных волокон и гидрогелей. Определены пути воздействия на продолжительность стадий модификации аминогрупп дженипином и образования сшитой

пространственной сетки при получении биополимерных материалов из фиброина и хитозана.

Практическая значимость. Разработаны методы получения волокнистых и гидрогелевых материалов на основе фиброина и его смеси с хитозаном, перспективных для применения в качестве пористых биополимерных матриц для тканевой инженерии и систем с контролируемым высвобождением лекарственных соединений. Разработан способ получения биodeградируемых криоструктуратов с высокой влагоудерживающей способностью, регулируемым размером пор и скоростью биodeградации, и показана эффективность их использования в качестве 3D-подложки в процессе культивирования животных клеток. Установлено, что введение фиброина приводит к подавлению воспалительной реакции тканей, усилению клеточной адгезии и пролиферации живых клеток на волокнистом материале из сшитого хитозана. Установлен пролонгирующий эффект иммобилизации биологически активных соединений в структуре сшитых биополимерных пленок из фиброина и хитозана, модифицированных дженипином.

На защиту выносятся:

Новые особенности механизма взаимодействия аминоксодержащих полимеров фиброина и хитозана с дженипином.

Технологические решения в области формования не растворимых в воде волокон, основанные на реализации перехода фиброина в β -конформацию и химической сшивке дженипином.

Новый подход к получению не растворимых в воде нитей, нетканых волокнистых и пленочных материалов на основе регенерированного фиброина и хитозана, позволяющий за счет использования в качестве сшивающего реагента дженипина реализовать процесс формования в условиях постоянной вязкости.

Апробация результатов. Результаты работы были изложены на 15 научных конференциях. Из них 13 международных: 9th international conference “Biomaterials and nanobiomaterials: Recent Advances Safetly-Toxicology and

ecology issues” Bionanotox-2018, Crete, Greece, 06-13 may 2018; Международный форум биотехнология: состояние и перспективы развития, Biotech-2018, 23 - 25 мая 2018, Москва, Россия; Международная научно-техническая конференция «Дизайн, технологии и инновации в текстильной и легкой промышленности» (ИННОВАЦИИ –2018), 14-15 ноября 2018 г., Москва, Россия; Четырнадцатая Международная конференция «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (РосХит-2018), 17-23 сентября 2018 г., Севастополь, Россия; VII Всероссийская научная конференция (с международным участием) «Физикохимия полимеров и процессов их переработки», 16-20 сентября 2019 г., Иваново, Россия; XXII Международный научно-практический форум «SMARTEX – 2019», «Физика волокнистых материалов: структура, свойства, наукоёмкие технологии и материалы», 25 – 27 сентября 2019 г., Иваново, Россия; 10th international conference “Biomaterials and nanobiomaterials: Recent Advances Safetly-Toxicology and ecology Issues” Bionanotox-2019, Crete, Greece, 05-12 may 2019; VIII международная конференция «Перспективные полимерные композиционные материалы. Альтернативные технологии. Переработка. Применение. Экология. («Композит-2019»)), 21-23 мая 2019 г., Энегльс, Россия; 11th international conference “Biomaterials and nanobiomaterials: Recent Advances Safetly-Toxicology and ecology Issues” Bionanotox-2020, Webinar, 07-18 September 2020; Международная научно-техническая конференция «Дизайн, технологии и инновации в текстильной и легкой промышленности» (ИННОВАЦИИ –2020), 12 ноября 2020 г., Москва, Россия; Всероссийская научная конференция молодых исследователей с международным участием «инновационное развитие техники и технологий в промышленности (ИНТЕКС-2021)», 12 – 15 апреля 2021 г., Москва, Россия. И 2 Всероссийские научные конференции: Восьмая Всероссийская Каргинская конференция «Полимеры в стратегии научно-технического развития РФ «Полимеры-2020», 9-13 ноября 2020 г., Москва, Россия; XXVI Всероссийская конференция «Структура и динамика молекулярных систем (Яльчик-2020)», 17 – 21 августа

2020 г., Казань, Россия; 12th international conference “Biomaterials and nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and ecology issues” Bionanotox-2021, Crete, Greece, 27 sep. - 04 oct. 2021; РосХит-2021: Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана, Архангельск, 15 – 19 сентября 2021.

Публикации. Основные положения научно-квалификационной работы (диссертации) опубликованы в 24 печатных работах, 7 из которых – в рецензируемых научных изданиях, входящих в базы Scopus и Web of Science и рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

Структура и объем работы. По своей структуре научно-квалификационная работа (диссертация) состоит из введения, трех глав, выводов по работе и списка литературы. Работа изложена на 152 страницах машинописного текста, содержит 64 рисунка, 16 таблиц. Список литературы включает 160 библиографических и электронных источника.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Особенности химического строения и структуры фиброина тутового шелкопряда (*Bombyx mori*)

Белки шелка присутствуют в железах некоторых членистоногих (таких как шелкопряды, пауки, скорпионы, клещи и пчелы) и превращаются в волокна во время их метаморфоза. Шелк тутового шелкопряда – это волокно, широко используемое в текстильной промышленности. Выход волокна из одного шелкового кокона составляет 600-1500 м [1]. Паутинный шелк неоднороден по своей природе, поэтому биоматериалы на основе шелка обычно получают из волокон тутового шелкопряда. В основном – это шелк, производимый гусеницей *Bombyx mori* (*B. mori*), членом семейства *Bombycidae*.

Шелк – это текстильное волокно, ежегодно производится и обрабатывается около 1000 тонн такого волокна. Очистку шелковых волокон обычно проводят с использованием простой процедуры удаления жиров и серицина щелочными или соляными растворами.

Шелк обладает большой молекулярной массой (200–350 кДа и более) с объемными повторяющимися модульными гидрофобными доменами, которые прерываются небольшими гидрофильными группами [2]. Фиброин шелка, как и креатин и коллаген, относится к фибриллярным белкам. Элементами структуры волокон шелка являются макрофибриллы шириной до 105 нм, которые, в свою очередь, состоят из спирально упакованных нанофибрилл диаметром 90-170 нм [3, 4]. Нанофибриллы могут играть важную роль в придании шелку повышенной прочности. Длина макроцепи фиброина 150 нм; диаметр макроцепи 0,45 нм [5, 6].

Шелковые волокна, производимые культивируемым тутовым шелкопрядом *Bombyx mori*, в основном состоят из двух белков, серицина и фиброина; они также содержат незначительное количество остатков других аминокислот и различных примесей: жиров, восков и минеральных солей. В

зависимости от штамма кокона содержание фиброина составляет 66,5-73,5, а содержание серицина - 26,5-33,5 мас. %.

Фиброин шелка *B. mori* состоит из тяжелой (H) и легкой (L) цепей (H- и L-фиброин соответственно), связанных между собой дисульфидной связью [7-9]. Кроме того, в составе шелка имеется гликопротеин с массой 25 кДа, названный P-25, также нековалентно связанный с этими цепями [10]. Гидрофобные домены тяжелых цепей содержат повторы аминокислот (Ala, Ser, Tyr, Val) и могут образовывать антипараллельные β -листы (β -складчатая структура). L-цепь (легкая) гидрофильна по своей природе и относительно эластична. Считается, что белок P-25 играет важную роль в поддержании целостности комплекса шелка [8, 11]. H-фиброин, L-фиброин и P-25 находятся в шелке в соотношении 6:6:1 [12]. Очищенный и переработанный шелк лишен легкой цепи и гликопротеина P-25 [11, 13]. Вместо этого он содержит гомодимеры тяжелой цепи с молекулярной массой ~ 330 кДа, которые образованы отдельными белками (~ 160 кДа) [14].

Гидрофобные домены полимерных цепей шелка, состоящие из повторяющейся аминокислотной последовательности, собраны в нанокристаллы (β -листы). Гидрофильные связи между этими гидрофобными доменами состоят из объемных и полярных боковых цепей и образуют аморфную часть вторичной структуры белка [15, 16].

Что касается химического состава, волокна *Bombyx mori* состоят из остатков как минимум 16 аминокислот, соотношение которых варьируется между различными участками надмолекулярной структуры фиброина (табл. 1). Суммарная мольная доля остатков глицина, аланина, серина и тирозина составляет 90%; их последовательность представлена общей формулой [17, 18].

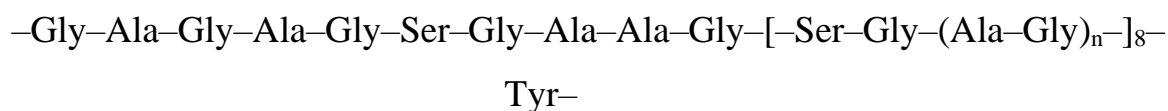


Таблица 1 – Аминокислотный состав фиброина *Bombyx mori* [19].

Аминокислота	Состав, мол. %		
	Всего	Н-фиброин	L-фиброин
Глицин	42,9	49,4	10,0
Аланин	30,0	29,8	16,9
Серин	12,2	11,3	7,9
Тирозин	4,8	4,6	3,4
Валин	2,5	2,0	7,4
Аспарагиновая кислота	1,9	0,65	15,4
Глутаминовая кислота	1,4	0,70	8,4
Треонин	0,92	0,45	2,8
Фенилаланин	0,67	0,39	2,7
Метионин	0,37	-	0,37
Изолейцин	0,64	0,14	7,3
Лейцин	0,55	0,09	7,2
Пролин	0,45	0,31	3,0
Аргинин	0,51	0,18	3,8
Гистидин	0,19	0,09	1,6
Лизин	0,38	0,06	1,5

Вторичная структура фиброина стабилизируется разного рода взаимодействиями. Водородные связи возникают между функциональными группами пептидных макроцепей и между боковыми фрагментами макромолекул [20].

Полярные карбокси- и аминогруппы в фиброине также могут участвовать в дипольных взаимодействиях, а в случае переноса протона также в электростатических взаимодействиях [21]. Поскольку содержание кислотных и основных групп в фиброине низкое, электростатический фактор не является решающим в формировании вторичной структуры; он, однако, может стать решающим в получении растворов фиброина. Поскольку фиброин

на 75% состоит из неполярных гидрофобных аминокислот, необходимо учитывать также гидрофобные (дисперсионные) взаимодействия, делающие фиброин устойчивым к большинству растворителей.

На данный момент выделяют три основных «типа» вторичных структур натурального фиброина шелка: в кристаллических областях, α -спиральных и β -складчатых структурах (шелк I и шелк II соответственно), и в аморфных областях, с неупорядоченной конформацией случайных глобул. Жидкий шелк, синтезируемый железой тутового шелкопряда, представляет собой водный раствор фиброина с концентрацией 26 об.%, в котором макромолекулы имеют форму глобулы или α -спирали. Фиброин *Bombyx mori* содержит $56\pm 5\%$ макромолекул в β -свернутой форме и $13\pm 5\%$ макромолекул в α -спиральной форме [22]. Таким образом, доля высокоупорядоченных (кристаллических) областей полимера достигает 60–70%.

Шелк II – это структура волокна после прядения тутовым шелкопрядом, она в основном представляет собой антипараллельный β -лист. Физические и механические свойства регенерированного фиброина шелка зависят от конформации молекулярной цепи и кристаллической структуры [23].

На рисунке 1 показаны проекции сегментов макромолекул, образующих α -спиральные и β -складчатые структуры. α -спиральная структура образована внутримолекулярными водородными связями, при этом гидрофобные фрагменты смещены к периферии [24]. В β -свернутой структуре макромолекулы располагаются параллельно или антипараллельно, образуя сложенный лист или слой (β -лист).

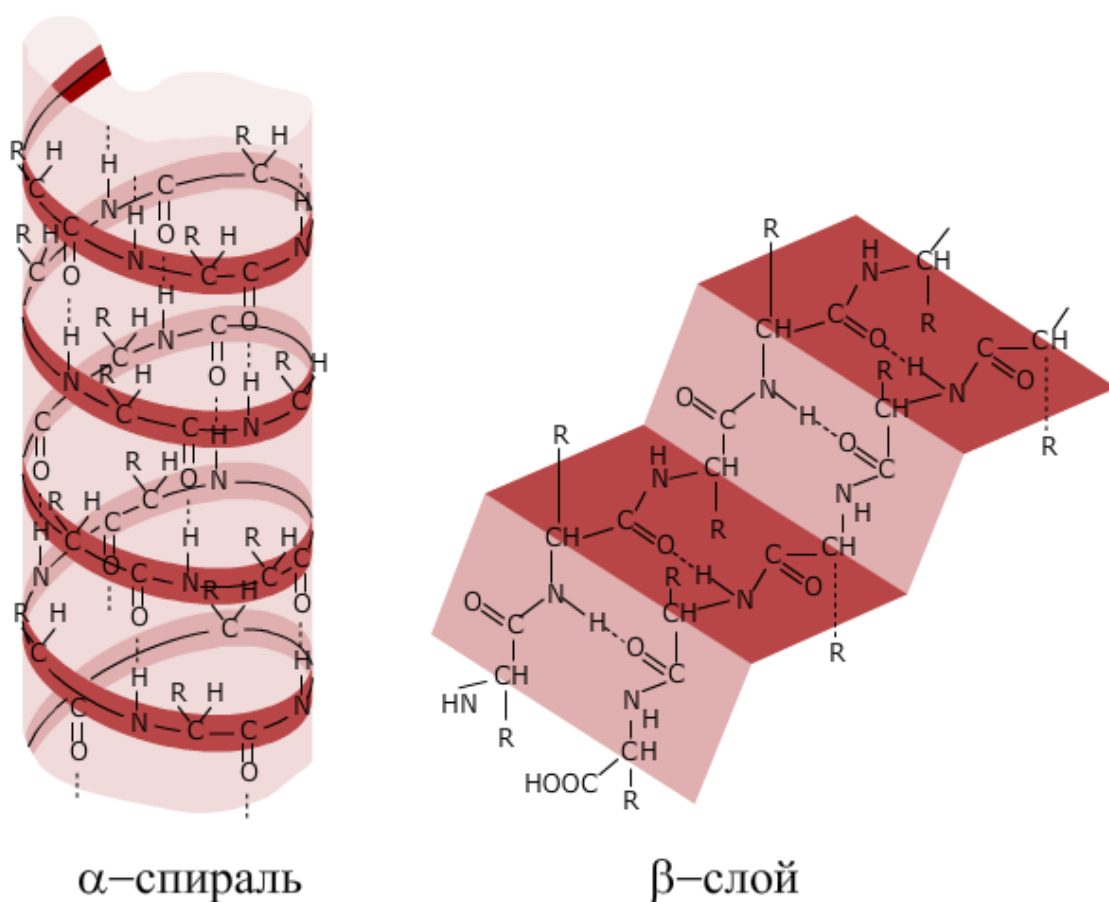


Рисунок 1 – Проекция сегментов макромолекул, образующих α -спиральные и β -складчатые структуры.

Антипараллельные β -листы фиброина шелка упакованы «лицом к лицу», «спина к спине»: двойной слой остатков глицина (межплоскостное расстояние 3,5 Å) двойной слой остатков аланина/серина (межплоскостное расстояние 5,7 Å) двойной слой остатков глицина и др. [25]. Для гидрофобных фрагментов макромолекул эта структура является наиболее энергетически выгодной [26, 27].

Конформация цепи в аморфных блоках представляет собой своеобразный «случайный клубок», который придает шелку эластичность [28, 29]. Критическими факторами, определяющими механические свойства любого вида шелка, являются точный контроль размера, количества, распределения, ориентации и пространственного расположения кристаллических и некристаллических доменов в нанометровом масштабе [30,

31]. Нанокристаллы способствуют выдающимся механическим свойствам шелка, несмотря на дефекты микроструктуры в виде микропустот [15, 32].

Помимо вторичной структуры, в шелковых волокнах также очевидна «иерархическая» надмолекулярная организация [16]. Шелк паука и тутового шелкопряда состоит из пучков – микрофиламентов (0,5–2 мкм), каждый из которых состоит из нанокристаллов и/или полукристаллических доменов [3, 33, 34].

Главное преимущество фиброина шелка по сравнению с другими биополимерами – его высокие механические свойства. Другие важные преимущества фиброина включают в себя хорошую биосовместимость, переработку через водные растворы, биоразлагаемость и наличие доступных для модификации функциональных групп.

1.2 Методы выделения фиброина из коконов шелкопряда и получения растворов фиброина

Из литературных источников известно несколько способов переработки фиброина, но каждому из них предшествует предварительная обработка. Перед тем, как переработать фиброин, необходимо обработать шелк-сырец для удаления серицина, который способен вызывать воспалительные процессы. Степень удаления серицина определяется количественно путем измерения диаметров волокон и наблюдения за микроструктурами кокона с помощью сканирующей электронной микроскопии (SEM).

Коэффициент дегуммирования (D_r) для получения эффективности вышеуказанных процессов был рассчитан, как описано в [35]. Вкратце, был измерен вес кусков кокона до и после обработки дегуммированием, и коэффициент дегуммирования был рассчитан с использованием следующего уравнения:

$$D_r = \frac{Wt_{\text{initial}} - Wt_{\text{degummed}}}{Wt_{\text{initial}}} \times 100 \quad (1),$$

где $W_{t_{degummed}}$ – масса обезжиренных волокон кокона и $W_{t_{initial}}$ – начальная масса коконов соответственно [36].

Описанный метод дегуммирования – использование раствора Na_2CO_3 , может повлиять на характеристики поверхности и механические свойства фиброина шелка, поэтому важно следить за температурой и временем обработки коконов.

Максимальное количество фиброина (около 20 г) легко растворяется в 100 мл водного раствора $CaCl_2$, когда концентрация составляет около 40-50% (рис. 2). Но длительное кипячение фиброина шелка в таком растворе разрывает молекулярные цепи.

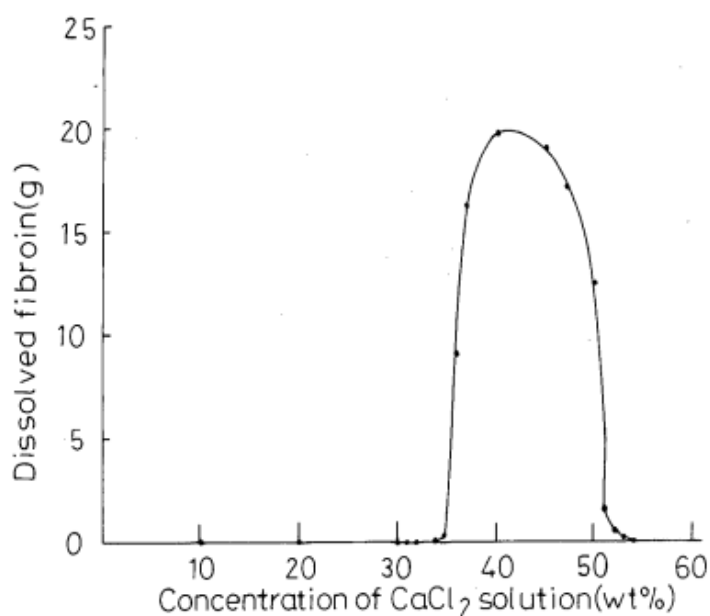


Рисунок 2 – Соотношение между растворенным фиброином и концентрацией 100 мл раствора хлорида кальция (мас.%).

На рисунке 3 показана взаимосвязь между временем схватывания геля и pH 3%-х растворов фиброина. Начальный pH раствора фиброина составлял 7,6-7,9. pH раствора регулировали лимонной кислотой, HCl и NaOH. Было обнаружено, что гелеобразование происходило в течение двух дней при pH от 3,0 до 4,0. Также было обнаружено, что при pH ниже 1,5 или выше 13,0 гелеобразования не происходило [37].

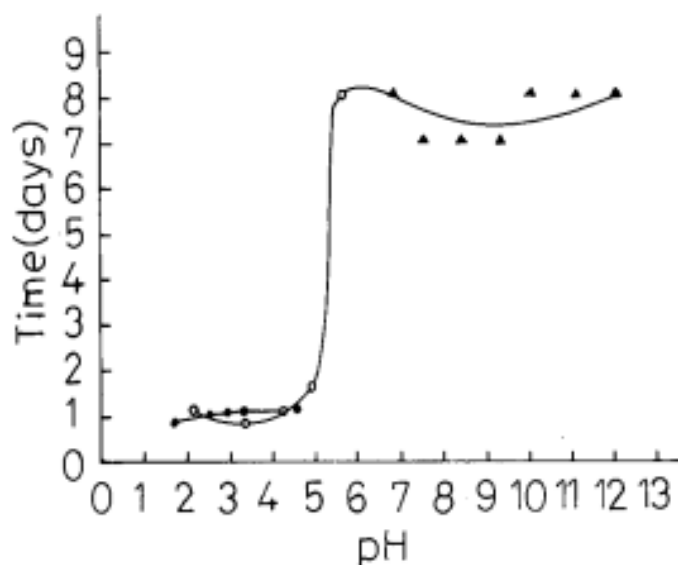


Рисунок 3 – Время схватывания геля при различных значениях pH 3% раствора фиброина: ○ лимонная кислота; ● HCl; ▲ NaOH.

Конечным результатом является водный раствор чистого фиброина шелка, который затем можно использовать в качестве формовочного. В качестве альтернативы его можно лиофилизировать для длительного хранения или использования для производства материалов в органическом растворителе (1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропанол, HFIP).

После того, как экстрагированный фиброин шелка перерабатывается в полимерный материал, заключительным этапом переработки является индукция кристалличности. Кристалличность можно вызвать двумя способами: либо погружением в спирт, например, метанол или этанол, либо «отжигом» в воде. Погружение в спирт – это просто и быстро, но, если необходимо избежать использования спирта, можно использовать другой способ. «Отжиг» в воде – это процесс, при котором шелковые материалы выдерживаются во влажной среде в течение нескольких часов. Подробнее описано в исследовании [38].

Методика очистки фиброина шелка от серицина состоит в кипячении коконов или волокон в щелочном растворе. Такой процесс называется дегуммирование. Дегуммированные шелковые волокна могут быть далее

переработаны в шелковые жгуты путем скручивания [4] или же нетканые шелковые матриксы [39].

Растворение фибрина само по себе является сложной задачей, и зависит от источников кокона. Системы растворителей, такие как CaCl_2 /этанол/вода [40], LiBr [41], LiSCN [42], NaOH [43] и $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ - MeOH - H_2O [44] использовали для растворения фиброиновых волокон. Такие растворы впоследствии подвергаются диализу перед обработкой в различные морфологии биоматериала.

Наиболее простой и дешевый способ растворения фибрина шелка – а в смеси CaCl_2 - $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ - H_2O (1:2:8 в молярном соотношении) [40]. Такой способ обеспечивает получение светло-желтых, прозрачных растворов, практически без осадка. Основным минусом может являться наличие в системе этанола и переработку при повышенной температуре (от 70°C). Кроме того – необходимо постоянно следить за концентрацией раствора и нагревом.

Получение и регенерация фибрина через 9М бромид лития происходит при комнатной температуре, с концентрацией раствора около 20 мас.% [41]. Минусом такой переработки может быть конечный выход белка – концентрация после диализа против воды колеблется в пределах 7-8 мас.%, теряется больше 50% сырья.

Переработка через тиоцианат лития: волокна фибрина шелка (10 г) помещали в 100 мл 10М водного раствора тиоцианата лития с 100 мл расплавленного $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, перемешивали до растворения при 40 и 100°C . Нерастворенные волокна фибрина шелка фильтровали по истечении заданного времени, а затем сушили при 140°C [42]. Такой способ достаточно сложен в реализации, схож с системой [40], требует конкретных значений температуры, фиброин растворяется ограничено, остается нерастворенная фаза.

Переработка через щелочной раствор (0,1N NaOH) требует соблюдения условий в виде низкой температуры (4°C) и времени – от 24-х часов [43]. Наиболее экономичный из всех способов переработки. Однако известно, что

белки неустойчивы к действию щелочей, и уже 3%-ый раствор гидроксида натрия вызывает щелочной гидролиз, т.е. происходит разрушение, которое усиливается при повышении температуры, концентрации NaOH, продолжительности переработки. Щелочи разрушают пептидные связи. Следовательно, все вышеперечисленные условия растворения фиброина в NaOH являются минусом такой переработки – необходим четкий контроль температуры, концентрации растворителя и своевременное прекращение процесса.

Было обнаружено, что фиброин шелка растворим в системе нитрат кальция–метанол (75% растворе $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2/\text{MeOH}$) при температуре 67°C [44]. Данные по вязкости указывают на то, что в солевом растворе наблюдается агрегация фиброиновых цепей. Агрегация может быть вызвана комплексообразованием ионов кальция с фиброиновыми цепями в их амидных связях.

Гексафторизопропанол (HFIP) [45], гидрат гексафторацетона [46] и муравьиная кислота [47] также использовались в качестве растворителей для регенерации фиброина шелка. Данные растворители достаточно сложно найти в розничной продаже, а концентрированные растворы муравьиной кислоты обладают токсичностью.

Растворенный в выбранной системе, диализированный, регенерированный и сформованный из водного раствора фиброин шелка [48] может быть использован для приготовления разных типов материалов для использования в тканевой инженерии (рис. 4 и 5).

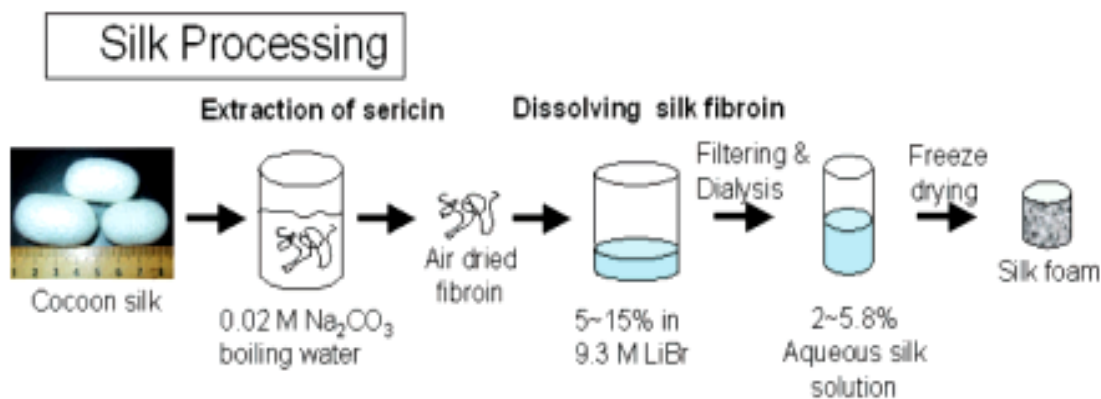


Рисунок 4 – Технология переработки шелка через раствор бромида ЛИТИЯ.

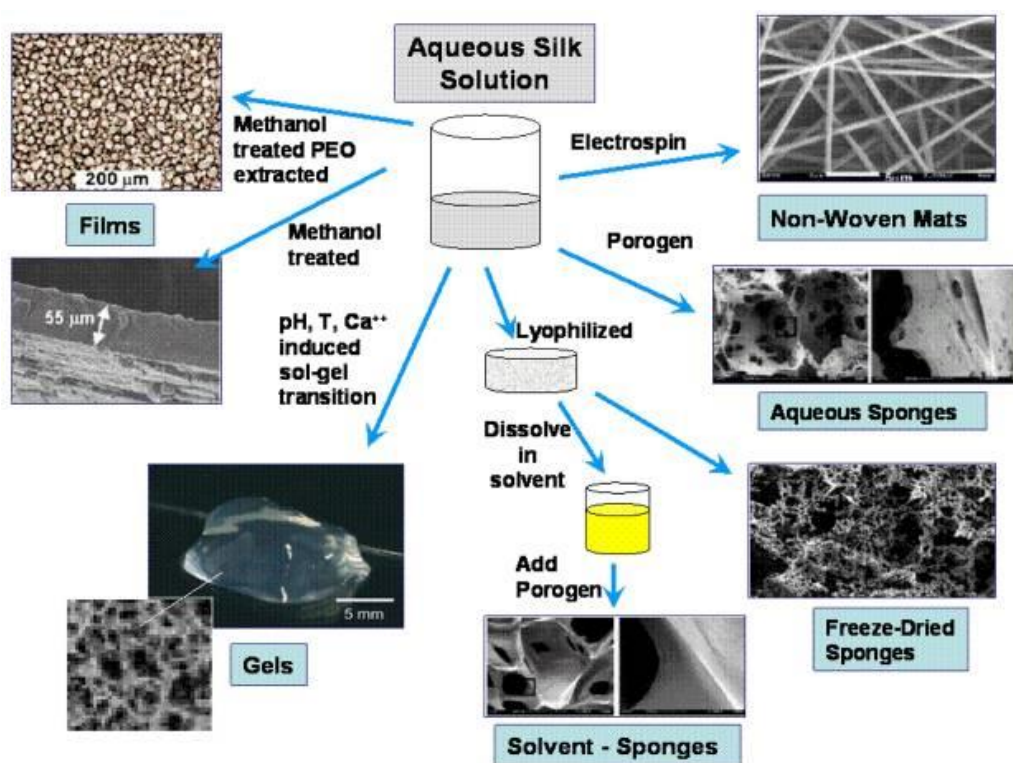


Рисунок 5 – Способы переработки регенерированного фиброина шелка.

1.3 Изучение конформационных переходов в растворах фиброина и условий формирования β-складчатой структуры белка

Конформационная стабильность фиброина шелка в водно-спиртовом растворе определяется взаимодействиями аминокислотных остатков друг с другом и растворителем. Агрегация гидрофобных боковых цепей нарушается

путем разрушения сетки водородных связей с участием воды спиртом и связывания спирта с гидрофобной группой. Формирование β -складчатой структуры представляет собой процесс перегруппировки водородных связей, сопровождающийся движением основной цепи, и образованием водородных связей между пептидными звеньями разных макромолекул. Водно-спиртовая смесь в низких концентрациях мало влияет на сольватацию пептидного звена. Установлено, что видимый конформационный переход в растворе начинается при использовании 40%-го раствора этанола.

Ранние работы показали, что ряд растворителей и механическая обработка индуцируют конформационный переход от менее стабильной случайной конформации клубка (α -спирали) или формы Шелк I к более стабильной форме Шелк II (β -лист) [49, 50]. Обширное изучение такого процесса очень важно для лучшего понимания относительной стабильности форм фиброина, а также разработки механизма индуцированного конформационного перехода.

В исследовании [44] рассмотрено получение волокна на основе шелка с уменьшенным содержанием β -конформации. С целью увеличения скорости биоразложения были получены водостойкие пленки из регенерированных растворов фиброина шелка с пониженным содержанием β -листов. Ключом к этому процессу является приготовление низкоконцентрированных (8 мас.%) водных растворов фиброина и последующая процедура «отжига» на водной основе. Эти новые материалы деградируют быстрее из-за снижения содержания β -листов, определяемого *in vitro* с помощью ферментативного гидролиза, но поддерживают экспансию взрослых стволовых клеток человека *in vitro*.

В работе [51] переход фиброина шелка был изучен в соответствии с различными параметрами обработки: концентрацией фиброина, pH и температурой. Изменения оптической плотности при 550 нм отслеживали параллельно с анализом вторичной структуры геля и использовали для измерения гелеобразования с течением времени. Гелеобразование

первоначально вызывается более слабыми взаимодействиями, не связанными со значительными вторичными структурными изменениями. За этими начальными изменениями следует быстрое, практически необратимое образование β -слоя. Изучение зависимости времени гелеобразования фиброина от pH привело к выявлению доминирующей роли кислотных групп в контроле скорости гелеобразования, что полностью соответствует процессу *in vivo*. Кроме того, из наблюдения за временем гелеобразования в различных средах (pH в диапазоне от нейтрального до основного pH), было сделано предположение о вкладе электростатических взаимодействий в кинетику гелеобразования (рис. 6).

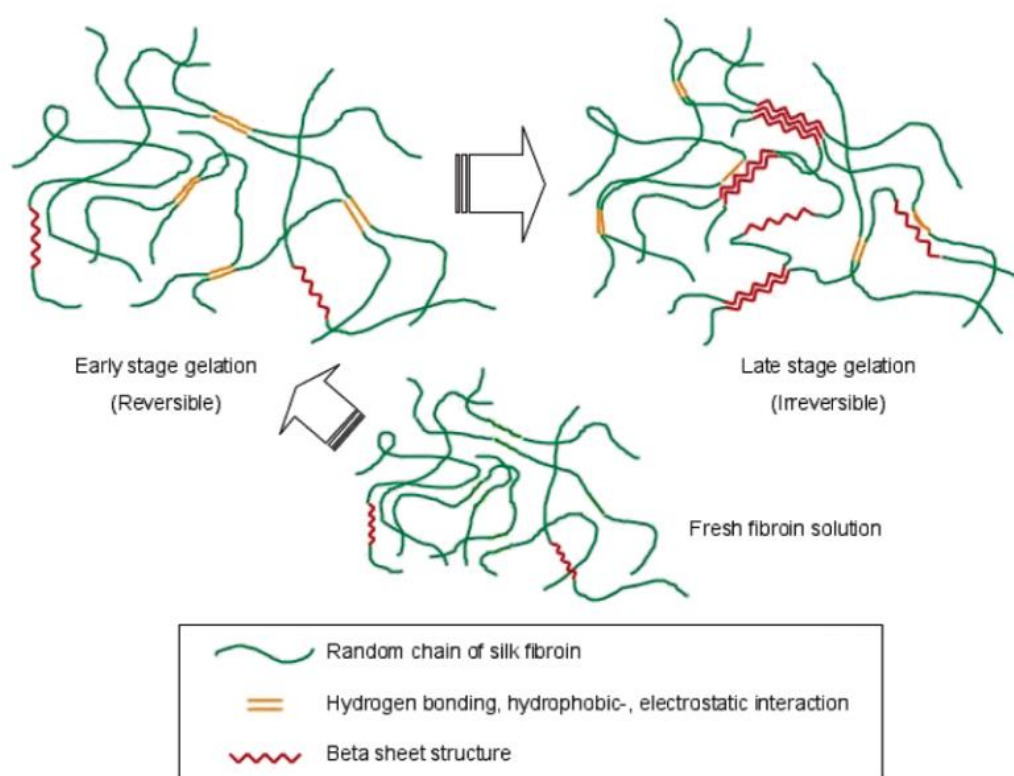


Рисунок 6 – Схематическое изображение прегелирования и ранних и поздних стадий гелеобразования фиброина, трехэтапная модель.

Свежий раствор (предварительное гелирование) имеет около 20% содержания α -спиралей с незначительными межмолекулярными связями; гелеобразование первоначально вызывается более слабыми межцепочечными взаимодействиями такие как (не образующие β -структуры) водородные связи,

гидрофобные взаимодействия и электростатические взаимодействия; и стабильные конструкции из β -листов, затвердевающие в третьей фазе, что приводит к стабильным и по существу необратимым межмолекулярным структурам.

В ряде работ указывается влияние спирта (этанол или метанол) на конформационный переход в фиброине шелка [52-54].

Показано, что при высоких концентрациях этанола и фиброина происходит образование межмолекулярных водородных связей, сопровождающих формирование β -листов.

Наиболее распространенный метод преобразования конформации α -спирали в β -лист заключается в обработке материала погружением в полярные растворители. Как было показано выше, перевод в нерастворимую форму β -листа может быть обеспечен обработкой сформованных волокон из фиброина шелка метанолом или этанолом. Такое же действие может оказывать водяной пар [55-57]. В работе [58] сообщается, что использование некоторых сшивающих реагентов (глутаровый альдегид или дженипин) также вызывает переход фиброина в β -складчатую структуру.

Для контроля конформационного перехода в растворах с различной концентрацией этанола и пленках, полученных из этих растворов, обычно используют ИК-спектроскопию.

Материалы на основе фиброина в β -конформации, сшитые производные фиброина, а, так же, материалы на основе смеси хитозана с полисахаридами перспективны для применения в качестве полимерных матриц, или систем, содержащих биологически активные вещества. За счет регулирования степени сшивки или содержания растворимой фракции фиброина, возможно регулировать скорость высвобождения таких соединений. В последующих главах будут рассмотрены наиболее распространенные полимерные системы, используемые в регенеративной медицине и тканевой инженерии, а также в качестве раневых покрытий, способные пролонгировано высвобождать лекарственные вещества.

Возможность переработки в не растворимые в воде пленки, нано- и микроволокна, матриксы и другие материалы может быть реализована в процессе гелеобразования при использовании сшивающих реагентов.

1.4 Гелеобразование в растворах фиброина шелка и возможности применения гидрогелей фиброина в тканевой инженерии

Гидрогели представляют собой набухшие в воде трехмерные полимерные сетки. Гелеобразование фиброина происходит в водных растворах посредством воздействия высоких температур, низкого рН, высокой ионной силы, встряхивания, обработки ультразвуком, замораживанием или электрогелированием [59–63]. Во время процесса гелеобразования происходят структурные изменения фиброина от неупорядоченного состояния до конформации β -слоя, который физически сшивает и стабилизирует гель [64].

Процесс электрогелирования является исключением, поскольку он приводит к случайным структурам с α -спиралями, а не к β -слоям, и является обратимым при температуре [65]. Также до некоторой степени можно обратить вспять гелеобразование, вызванное обработкой ультразвуком. Обработка ультразвуком передает локальное колебательное движение макромолекул ФБ, которое изменяет гидрофобное взаимодействие и способствует самосборке макромолекул фиброина с образованием β -складчатой структуры. После гелеобразования дальнейшая обработка ультразвуком может превратить гель обратно в раствор из-за разрыва дисульфидных связей, модуляции гидрофобных меж- и внутрицепочечных взаимодействий и конформаций β -листов [66]. Однако гель снова образуется вскоре после прекращения обработки ультразвуком. Гидрогели фиброина с интересными механическими свойствами могут быть сформированы с помощью методов замораживания, в которых используется замороженный регенерированный раствор фиброина, который погружается в подходящий растворитель при температуре ниже его температуры замерзания. Через несколько часов образуются гелеобразные матриксы [63]. Криогели фиброина

были получены из замороженных растворов при отрицательных температурах путем добавления диглицидилового эфира этиленгликоля, который вызывал кристаллизацию β -слоев, вызывая гелеобразование. Эти гели проявляли замечательные механические свойства, такие как эластичность, которая позволяла им противостоять полному сжатию без развития трещин (рис. 7 а), в то время как гидрогели, образовавшиеся при 50°C, разрушались уже при небольшой деформации (рис. 7 б). Матрицы криогеля, полученные из 12,6% раствора фиброина, показали очень высокий модуль сжатия (50 МПа), что делает их потенциальным скаффолдом для регенерации кости [67].

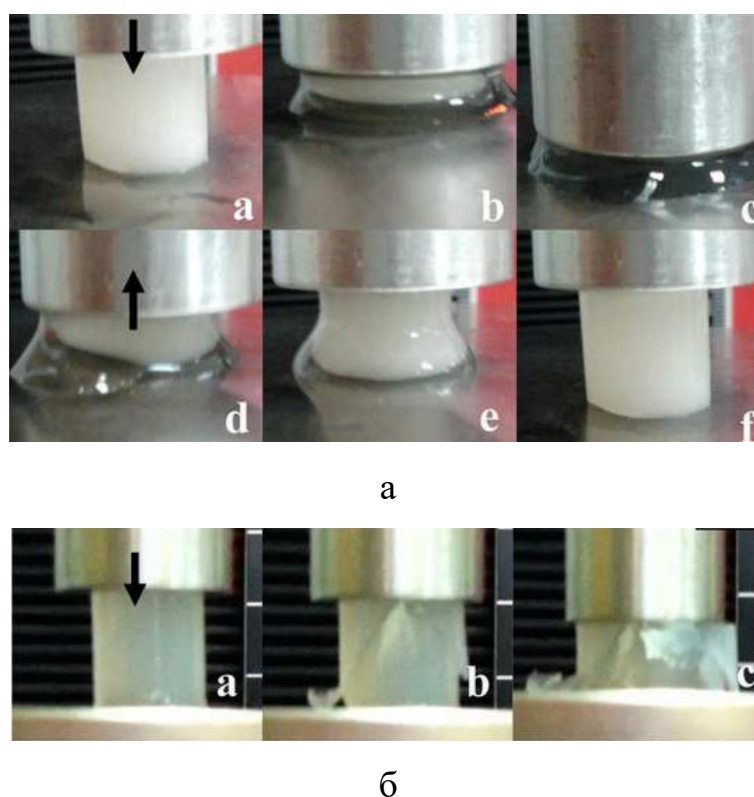


Рисунок 7 – Криогели (а) и гидрогели фиброина шелка (б), сформированные при 50 и -18 °С соответственно, подвергались воздействию испытание на сжатие.

Образование *in situ* гидрогелей фиброина шелка имеет потенциальные преимущества из-за минимальной инвазивности во время применения. Биоматериалы должны быстро образовывать гель в физиологических условиях после инъекции. В работе [68] предложен

способ ускорения гелеобразования ФБ с использованием анионного поверхностно-активного вещества додецилсульфата натрия. Был определен механизм быстрого гелеобразования, индуцированного данным ПАВом. При низких концентрациях поверхностно-активных веществ гидрофобные взаимодействия между цепями ФБ играли доминирующую роль в ассоциации, приводя к уменьшению времени гелеобразования. При более высоких концентрациях поверхностно-активного вещества электростатические силы отталкивания среди мицеллярных агрегатов постепенно становились доминирующими, и гелеобразование затруднялось. Образование геля предполагает соединение кластеров, образованных в результате накопления наночастиц. Этот процесс сопровождается быстрым образованием β -складчатых структур за счет гидрофобных и электростатических взаимодействий. Такой гидрогель шелка, с коротким временем гелеобразования, может быть использован в качестве инъекционного гидрогеля при доставке лекарств или в инженерии хрящевой ткани.

Было показано, что индуцированные ультразвуком гидрогели фиброина успешно инкапсулируют человеческие мезенхимальные стволовые клетки (hMSC), поддерживая их пролиферацию, рост и клеточные функции [61]. Водный раствор фиброина быстро обрабатывали ультразвуком, смешивали с hMSC и затем инкубировали при 37°C для полного гелеобразования. При аналогичном подходе hMSC инкапсулировали в смесь фиброина и ФБ-поли-L-лизина. Гидрогель индуцировал остеогенную дифференцировку hMSC, даже если в среду для культивирования клеток не добавляли остеогенные стимуляторы [69]. Кроме того, было продемонстрировано, что инъекции гидрогелей из фиброина ускоряют процессы ремоделирования в дистальных отделах бедренной кости кролика [70]. Эти остеогенные свойства были улучшены путем использования индуцированных ультразвуком гидрогелей из фиброина со встроенным фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) и костным морфогенным белком-2 (BMP-2). Исследования *in vivo* на кроликах

продемонстрировали, что VEGF и BMP-2 в этих гидрогелях способствуют ангиогенезу и образованию новой кости, соответственно, и что комбинация этих двух факторов оказывает аддитивный эффект на регенерацию кости [71]. Такие гели можно использовать для доставки различных факторов роста при минимально инвазивном подходе для регенерации неправильных или труднодоступных полостей в кости. Наконец, были получены инъекции фибриновых скаффолдов, содержащие активированные тромбоциты. Полученные гели показали улучшенные механические свойства, более медленную деградацию и более контролируемое высвобождение фактора роста VEGF, фактора роста тромбоцитов и трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF- β 1) по сравнению с контрольными группами без фиброина [72]. Известно, что обогащенная тромбоцитами плазма с костными трансплантатами значительно улучшает качество кости [73–75]. Следовательно, комбинация плазмы, богатой тромбоцитами, с фибрином может быть полезно при получении материалов для тканевой инженерии.

В этом исследовании количество активности щелочной фосфатазы и отложение кальция через 7 недель было сопоставимо с количеством клеток, культивируемых в децеллюляризованной губчатой кости [76]. Однако разные результаты были получены при использовании матриксов с костной пластинчатой структурой, вызванной лиофилизацией [77]. В этом исследовании обработка метанолом сравнивалась с «отжигом» в воде и стерилизацией паром для индукции β -складчатых структур.

В результате исследования возможных методов переработки фиброина, его конформационных переходов и получения из растворов гидрогелей, возникает возможность использования электроформования или других современных методов получения волокнистых структур из растворов белка с использованием приемов перевода материала в не растворимое в воде состояние.

1.5 Электроформование растворов фиброина и 3-D биопринтирование как методы получения пористых биоматериалов

Электроформование позволяет производить полимерные волокна с диаметром от микро- до нанометра. Это простой и недорогой процесс, с его помощью тонкие матриксы из В. *pori* с диаметром волокна менее 800 нм были сформированы путем электроформования с полиэтиленоксидом [78]. В результате формования из растворов в концентрированной муравьиной кислоте были получены волокна со средним диаметром 80 нм [79]. Эксперименты на клеточных культурах показали, что после 14 дней инкубации электроформованные матриксы из ФБ поддерживали обширную пролиферацию hMSC [80]. Чтобы имитировать необходимые условия для роста и пролиферации клеток, желательна трехмерная среда. Важность этого была показана при использовании матрикса, который увеличивал адгезию и пролиферацию преостеобластов и активность остеобластов [81]. Исследования *in vivo* на крысах продемонстрировали повышенную регенерацию костей в трехмерных пористых электроформованных матриксах из ФБ по сравнению с непористыми контрольными образцами и коммерчески доступными пористыми трехмерными каркасами из полимолочной кислоты (PLA) [82]. Предполагается, что трехмерная волокнистая структура обеспечивает более естественную поверхность для клеточной адгезии и обеспечивает более легкую циркуляцию питательных веществ и отходов по сравнению с губчатыми структурами, которые предлагают только двумерную поверхность в микроскопическом представлении и обычно имеют более низкую пористость.

Рассмотренные выше изделия и методы их изготовления не позволяют контролировать свойства материала и не имеют заранее определенной внутренней геометрии. Большинство матриксов, производимых в наши дни, имеют случайную пористость без определенной внутренней архитектуры, что препятствует прорастанию сосудов, что впоследствии приводит к плохой остеоинтеграции в конструкции. Поэтому эксперименты *in vivo* по изучению

влияния этой внутренней геометрии на поведение клеток также ограничены. Это главным образом связано с тем, что архитектура матрикса, создаваемая традиционными методами, такими как выщелачивание порогенов, вспенивание газом, сублимационная сушка и формование из расплава, часто определяется процессом, а не конструкцией. В настоящее время распространяется целый ряд новых подходов, таких как трехмерная биопечать (биопринтирование), которая создает настраиваемые каркасы произвольной формы с заранее определенной внутренней архитектурой с использованием подхода твердой произвольной формы, который может помочь преодолеть вышеупомянутые недостатки [83].

Биопринтинг или 3D-печать с использованием биополимеров или других биоматериалов считается будущей техникой объединения биоматериалов, клеток и в некоторой степени также поддерживающих компонентов в трехмерные биологические конструкции для реконструкции дефектов тканей или моделирования тканей и органов в здоровом и больном состоянии. Цель состоит в том, чтобы спланировать точное положение ячеек с помощью компьютерного дизайна, а затем распечатать их по отдельности или слой за слоем. Биопринтирование – относительно новый метод, в котором в основном используются биосовместимые гидрогели, поскольку они позволяют инкапсулировать клетки в желатинизированной, гидратированной и механически поддерживающей трехмерной среде [84]. К настоящему времени проведено лишь несколько исследований с использованием фиброина в качестве материала для процессов биопечати. Недавно был разработан процесс струйной печати, который использовался для изготовления «гнезд» фиброина для клеток [85], где узорчатые «гнезда» ФБ размером 70–100 мкм, модифицированные анионными и катионными боковыми цепями, действовали как закрепленные гнезда для инкубации и размножения клеток. Используя 3D-печать, можно эффективно изменять жесткость материала, изменяя содержание β -листов, что, следовательно, влияет на деградацию материала.

Недавно было показано, что матриксы из ФБ-желатина, полученные биопринтингом (рис. 8 А), и обработанные ультразвуком, обладают более высоким содержанием фибрина в конформации β -листов (25,4%) по сравнению с поперечно-сшитыми структурами, полученными с использованием фермента тирозиназы (14,2%) (рис. 8 В) [86]. Впоследствии биологическая активность материала была оценена путем культивирования мезенхимальных клеток-предшественников, которые продемонстрировали усиленную остеогенную дифференцировку только на обработанных ультразвуком каркасах, обладающих более высоким содержанием β -структур (рис. 8 С-Е), тогда как их сшитый тирозиназой аналог продемонстрировали хондрогенную дифференциацию в результате более низкого содержания β -листов и, как следствие, более низкой жесткости материала.

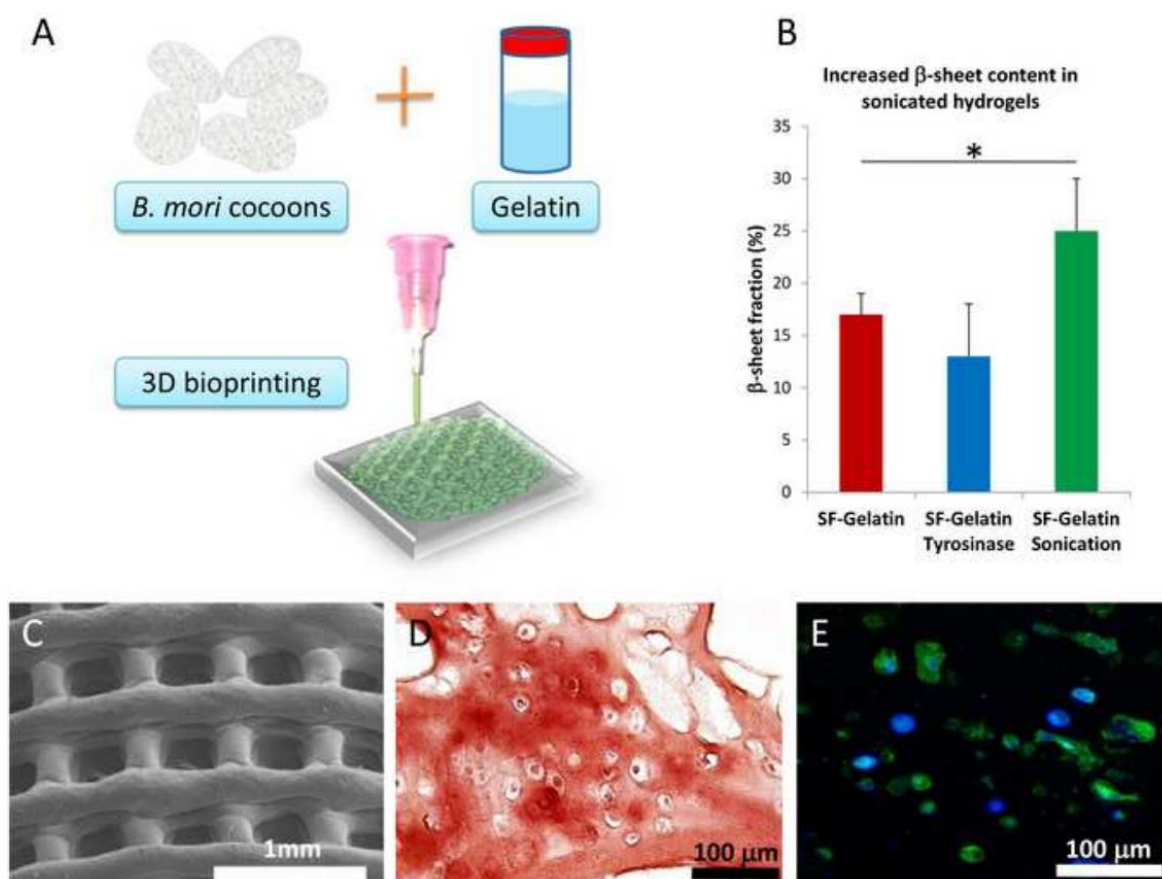


Рисунок 8 – Биопринтированные матриксы из фиброина и комплекса фиброин-желатин.

Таким образом показана возможность получения волокнистых материалов из фиброинсодержащих водных растворов. Однако в литературе недостаточно сведений об условиях модификации таких материалов и создания на их основе биологически активных материалов.

1.6 Применение материалов на основе фиброина шелка и хитозана в тканевой инженерии

Тканевая инженерия в настоящее время представляет собой принципиально новый подход в области клеточной и молекулярной биологии. Данный подход является перспективным для создания технологий, с помощью которых возможно восстановление поврежденных тканей и органов, а также лечение ряда заболеваний человека.

Основная цель тканевой инженерии состоит в росте и пролиферации вне организма человека живых клеток, тканей или органов для их последующей трансплантации пациенту с целью замены или стимуляции регенерации [25].

Регенерация функциональной ткани требует подходящего микроокружения, которое близко имитирует хозяина [25]. Такая среда прекрасно обеспечивается трехмерным каркасом (3-D матрикс или скаффолд), который действует как шаблон или матрица [13]. Помимо биосовместимости, которая является важной характеристикой для любого биоматериала, критически важными так же являются время деградации и время регенерации ткани. Кроме того, продукты разложения биоматериала должны безопасно метаболизироваться и выводиться из организма хозяина.

Пористые губчатые матриксы наиболее соответствуют задачам тканевой инженерии. Их трехмерная пористая структура обеспечивает прикрепление, пролиферацию и миграцию клеток, а также облегчает транспортировку питательных веществ и отходов путем диффузии в статической среде. Поры могут быть сформированы разного размера с использованием порогенов, вспенивания газа или сублимационной сушки [48, 87].

Такие материалы, как биополимеры, металлы и керамика, широко используются в качестве клеточных матриц для тканевой инженерии. Известны применения как синтетических, так и природных полимеров в качестве клеточных матриц, но у каждого из них есть свои ограничения [88-92]. В то время как первый тип скаффолдов легко подвергается обработке и модификации, второй предлагает лучшие цито- и биосовместимость [97]. Не существует универсального биоматериала, который бы отвечал всем необходимым требованиям к скаффолду для всех типов клеток, тканей или органов. Для различных живых клеток требуются биоматериалы со специфическими физическими и механическими свойствами и способностями к биодеградации. В связи со всем вышеперечисленным поиск наиболее универсального биоматериала для регенеративной медицины продолжается.

Структурные белки, такие как коллаген, эластин, альбумин и фиброин, используются в качестве шовных материалов, 3-D матриц, гемостатических агентов и т.д. [94]. Фиброин шелка тутового шелкопряда – это доступный природный биополимер, который достаточно давно применяется в качестве шовных материалов в медицинской практике. В настоящее время шелковые нити используются при хирургических операциях на различных органах: губах, глазах, при операциях на ротовой полости и при лечении кожных ран [30]. По мере изучения свойств фиброина шелка, его все чаще используют и в других областях биомедицины. В основном благодаря его механической прочности, эластичности, биосовместимости и контролируемой биоразлагаемости [30]. Как известно – эти свойства особенно полезны для тканевой инженерии. Опубликовано достаточно много работ по переработке фиброина, изучению структуры и применению биоматериалов на его основе [4, 13, 24, 90, 95, 96].

Параметры структуры матриц из фиброина можно варьировать, используя различные растворители для регенерации фиброина, включая органические растворители, такие как HFIP или воду. Матрицы HFIP-ФБ относительно устойчивы к деградации, и для разложения *in vivo* может

потребоваться до двух лет. В то время как матриксы, полученные из водных растворов, могут полностью разрушиться через 2-6 месяцев [87]. Существуют разные мнения о том, какой метод изготовления является наиболее подходящим для тканевой инженерии. Сообщалось, что матриксы фиброина, полученные из HFIP, предварительно засеянные стволовыми клетками, полученными из жировой ткани (ASC), продемонстрировали лучшее образование костной ткани с повышенными уровнями остеопонтина, коллагена I типа, костного сиалопротеина, увеличенным отложением кальция и минерализованным объемом внеклеточного матрикса.

Из водных растворов фиброина шелка получают пленки различной толщины с варьируемым набором параметров и характеристик. Так, например, наноразмерные пленки фиброина могут быть получены из его водных растворов, используя «послойную» технику. Данная методика позволяет получать биополимерные покрытия заданного размера и толщины. Наноразмерные пленки отлично поддерживали адгезию и пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток [97]. Показано, что рост и пролиферация фибробластов на пленках из фиброина такие же, как на пленках из коллагена [98]. Другие клетки млекопитающих и насекомых также показали хорошее приращение к фиброиновым покрытиям по сравнению с коллагеновыми пленками [99]. Химически модифицированные пленки из фиброина используются для улучшения приращения клеток и формирования костной ткани [100]. Для изучения пролиферативной активности клеток, следует учитывать морфофункциональное состояние поверхности изделия на основе фиброина шелка (в зависимости от материала – волокно, матрица или гидрогель). Зачастую в качестве методов микроскопии используют: сканирующую электронную [101], атомно-силовую [102] и интерференционную микроскопию [103]. Одним, из наиболее универсальных параметров для характеристики поверхности и клеточной адгезии, является значение поверхностной энергии материала [104].

Культура клеток hMSC через 42 дня культивирования в остеогенных условиях образовала с фибрином минерализованный матрикс [105]. Сообщалось также, что матриксы фиброина на водной основе проявляли более высокую остеокондуктивность по сравнению с ФБ, растворенным в HFIP. После 4 недель имплантации новая губчатая кость сформировалась внутри пор водных матриксов из фиброина, в то время как каркасы HFIP-ФБ в основном содержали некротические клетки и не содержали губчатой кости [106]. Утверждается, что эти результаты могут быть связаны с повышенной шероховатостью поверхности матриксов из фиброина, полученных из водных растворов [105, 107].

Важной особенностью фиброина шелка как биоматериала по сравнению с другими фибриллярными белками, является универсальность вариантов стерилизации [108]: автоклавированием, температурным воздействием до 120°C, возможность стерилизации этиленоксидом и γ -излучением или 70% раствором этилового спирта.

В качестве биосовместимого полимерного сырья для получения матриксов для тканевой инженерии используют различные природные полимеры, которые входят в состав внеклеточного матрикса – естественного окружение живых клеток - полисахариды и белки. Полученные из полисахаридов и белков волокнистые материалы, имитируют естественную среду организма и таким образом обеспечивают оптимальные условия для роста и регенерации тканей. Такие 3-D матриксы получают методом электроформования и сублимационной сушки [109-113].

В последние десятилетия значительное внимание привлекает хитозан. Хитозан, как единственный катионный полисахарид в природе, состоит из остатков N-ацетилглюкозамина и глюкозамина, которые обладают некоторыми полезными свойствами, такими как низкая токсичность, хорошая биосовместимость, биоразлагаемость, мукоадгезивность и т.д. [114-116]. Хитозан представляет собой кристаллический полисахарид и обычно нерастворим в растворах с показателем pH больше 7. Однако в разбавленных

кислотах ($\text{pH} < 6$) свободные аминогруппы в составе хитозана протонируются, в результате чего молекула становится растворимой. Высокая плотность заряда в разбавленных кислотных растворах позволяет хитозану образовывать комплексы за счет ионного взаимодействия с широким спектром водорастворимых полианионных соединений [116-118].

Хитозановые матриксы обычно получают с помощью технологии сублимационной сушки [119] или криотропного гелеобразования с использованием сшивающих реагентов [120, 121]. Многие свойства полученных хитозановых скаффолдов, такие как пористость, механическая прочность, можно регулировать, изменяя концентрацию хитозана, скорость замораживания, а также молекулярную массу и процент деацетилирования биополимера [118]. Кроме того, матриксы на основе хитозана и фиброина могут быть использованы для инкапсуляции и контролируемого высвобождения фармакологических агентов [122-124].

Исследования процесса биодegradации материалов на основе фиброина.

Дegradация играет важную роль в биоматериалах, используемых в тканевой инженерии. Биополимерный матрикс должен разрушаться с контролируемой скоростью, чтобы непрерывно поддерживать образование новой ткани. Поэтому информация о скорости биодegradации необходима для материаловедения фиброина. Было показано, что ФБ, являясь белком, подвержен протеолитической дegradации различными ферментами, такими как протеаза XIV, альфа-химотрипсин и коллагеназа IA [125, 126]. Высказывались опасения по поводу дegradации структуры β -слоя ФБ, поскольку амилоидные β -фибриллы связаны с болезнью Альцгеймера. Однако продукты дegradации фиброина не проявили значительной цитотоксичности по отношению к нейрональным клеткам в анализах *in vitro* [127]. По мере разложения фиброина, образующиеся аминокислоты могут абсорбироваться *in vitro* или *in vivo*, что благоприятно для биомедицинских применений. На дegradацию ФБ может влиять содержание структур нерастворимого в воде шелка II и водорастворимого шелка I, причем первые индуцируются,

например, во время обработки метанолом. Было показано, что с увеличением количества шелка II и, следовательно, с увеличением количества структур β -листов, время деградации также увеличивается [44]. Более быстрое разрушение пленок из фиброина было достигнуто путем приготовления водонерастворимой пленки с низким содержанием β -листов из концентрированного водного раствора либо путем последующего «отжига» на водной основе, либо путем очень медленного контролируемого процесса сушки [44, 128]. Пленки из фиброина, полученные путем медленной сушки, показали самое низкое содержание β -листов, что привело к самой быстрой деградации [128]. На поведение деградации также влияет источник фиброина. При сравнении фиброина из тутового и немелковичного шелкопряда наблюдается различная степень деградации: во втором случае шелк был менее подвержен деградации из-за компактной кристаллической структуры и высокого содержания β -слоев [129]. Было показано, что ингибиторы протеаз, интегрированные в системы на основе шелка, могут снижать скорость деградации [130]. Регулирование разложения также открывает новые возможности для применений фиброина в изделиях с контролируемым высвобождением лекарственных средств.

Благодаря непрерывному развитию науки в области биомедицины и пониманию важных механизмов в фармакокинетике биологически активных веществ, системы с контролируемой доставки лекарственных средств вышли на передний план по сравнению с их традиционными системами доставки.

Системы доставки лекарственных средств (СДЛС), состоящие из биосовместимых и биоразлагаемых материалов, учитывающих различные физиологические и физико-химические факторы организма, представляют особый интерес, поскольку они могут высвободить биологические агенты в нужном месте и/или со скоростью, скорректированной на регрессирование заболевания [131].

Биосовместимые и биоразлагаемые синтетические полимеры (такие как PLGA, PLA, PGA, поливиниловый спирт, поли (ϵ -капролактон) (PCL),

полиэтиленгликоль (PEG), поли (L-лизин) (PLL) и полифосфоэфир (PPEs)) и природные (а именно целлюлоза, ХТЗ, крахмал и желатин) открыли много путей для улучшения медицинских и фармацевтических применений, и при их изготовлении на наноуровне они модернизировали исследования контролируемой доставки лекарств [132, 133].

Гидрофильные гели, так называемые гидрогели, представляют собой сшитую сеть полимеров значительных абсорбирующих композиций, производимых как природными, так и синтетическими полимерами. Отличительной особенностью гидрогелей является их мягкая материальная среда за счет высокой степени гидрофильности, которая способствует поглощению воды [134, 135]. Это высокое содержание воды делает гидрогели очень перспективными для значительной загрузки гидрофильных препаратов, которые имитируют биологические ткани (рис. 9) [136].

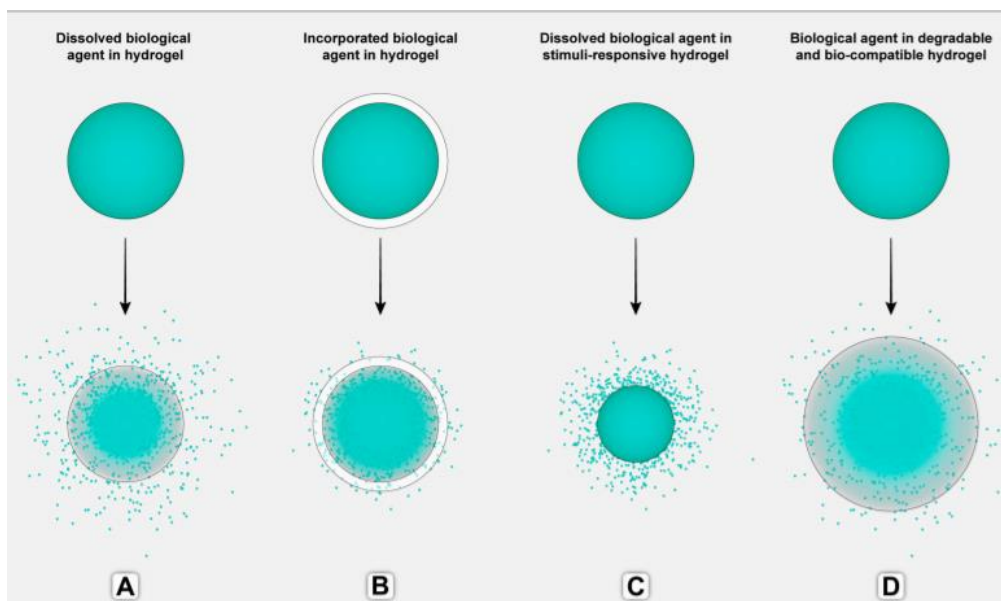


Рисунок 9 – Высвобождение препарата из гидрогелей: (А) препарат высвобождается путем растворения из гидрогеля, (В) препарат включается в гидрогель для поддержания его нативной структурной целостности, (С) реагирующие на стимулы гидрогели загружаются препаратом в качестве носителя препарата и (D) захват препарата в разлагаемом гидрогеле, позволяющий лекарству диффундировать из гидрогеля.

Кроме того, их пористая конфигурация позволяет лекарственным средствам загружаться в гелевую матрицу, что приводит к постепенному высвобождению лекарств в зависимости от коэффициента диффузии малой и/или макромолекулы в гелевой сети [137].

Для заживления ран, реагирующие на раздражители ХТЗ и ПВП смешивали с 74%-й нейтрализованной полиаскорбиновой кислотой (ПАА). Полученные гидрогели не только проявляли антимикробные свойства, но и демонстрировали длительное высвобождение при доставке сульфадиазина серебра с примерно в течение 80 мин [138]. В [139] показали межмолекулярные взаимодействия между ХТЗ и ПЭГ, и химическое сшивание ПЭГ ХТЗ в присутствии тиолина. Изучение морфологии композита показало, что эти новые сшитые губки обладают высокой стабильностью и пористой структурой, способствующей местной доставке лекарственных средств в физиологических условиях. В недавнем исследовании [140], ХТЗ и ПВП были объединены для эффективной доставки бетаметазон-17-валерата (BMV) для лечения рецидивирующего афтозного стоматита. Наличие ПВП с ХТЗ может повысить как термическую стабильность, так и степень набухания при высвобождении примерно 80%. Смешивание полимеров придало материалу высокую способность к набуханию, увеличило прочность на растяжение, что привело к эффективной системе доставки мукоадгезивных препаратов.

Выводы по главе 1

Анализ литературных источников показывает, что фиброин шелка может быть переработан в гидрогели, губки, волокна, наночастицы, микросферы, трубки и др. Перспективными материалами для нового направления – регенеративной медицины являются матриксы из электроформованных волокон. Свойства таких матриксов можно регулировать, изменяя состав полимерной системы исходя из результатов анализа взаимодействий клетка-клетка и клетка-биополимерный материал.

Получение материалов для инновационных медицинских технологий требует использования полимеров и адекватных технологий их переработки, обеспечивающих эффективное функционирование в организме человека. В качестве таких технологий могут быть использованы криотехнологии и электроформование, а в качестве биосовместимого полимерного сырья – природные полимеры, которые формируют внеклеточный матрикс – естественное окружение живых клеток – белки и полисахариды, такие как фиброин шелка и аминополисахарид хитозан. Полученные из полисахаридов и белков волокнистые материалы, имитируют естественную среду организма и таким образом обеспечивают оптимальные условия для роста и регенерации тканей.

Волокна и гидрогели хитозана и фиброина растворимы в разбавленных растворах кислот или даже в воде. Известный для хитозана метод предотвращения растворимости, улучшения водостойкости и механических свойств - химическое сшивание, - может быть недостаточно эффективным для фиброина, вследствие низкого содержания в этом белке первичных аминогрупп. Анализ литературы показал, что фиброин способен формировать такие структуры как: α -спирали или β -складчатые слои, которые не растворимы в воде, термодинамически устойчивы, обладают повышенной прочностью на разрыв, устойчивостью к механическим воздействиям. Проведенный анализ указывает на необходимость осуществления конформационного перехода (β -кристаллизации) при создании изделий из фиброина, если химическая сшивка не дает желаемого результата.

Таким образом, для получения полимерных матриц из фиброин-содержащих растворов, необходимо исследовать условия модификации фиброина, приводящей к потере им растворимости в воде, и разработать новые методы получения не растворимых волокон, пленок и гидрогелей, предназначенных для использования в медицине и тканевой инженерии.

2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Характеристика сырья и реактивов

Порошок хитозана, производство «Roerger» (Германия) с молекулярной массой 190 и 200 кДа, степенью деацетилирования хитина 87%.

Кокконы тутового шелкопряда (*Bombyx mori*), шовный материал (шелк), Китай.

Альбумин человека, лиофильно высушенный.

Кальций хлорид дигидрат в виде порошка, производство Honeywell.

Карбонат натрия и гидрокарбонат натрия в виде порошка (ГОСТ 32802-2014).

Бромид лития, порошок и 9М раствор, Китай.

Гидроксид натрия (ГОСТ 5100-85).

Этиловый спирт, 96,6% и его растворы различной концентрации.

Уксусная кислота марки «ХЧ»; ГОСТ 61 – 75 («Реахим», Ереванский завод химреактивов).

Дистиллированная вода; ГОСТ 6709 – 72.

Сшивающий реагент дженипин (Gp) «Sigma-Aldrich».

Мирамистин производства «Инфамед К» в виде порошка, антисептик из класса поверхностно-активных веществ, $t_{пл} = 177\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Сефадекс (Sephadex G-25) – микропористый материал, декстран, флуоресцеин FITC, в виде порошка, фосфатный буфер (таблетки, pH 7,4) «Химмед».

Кокконы тутового шелкопряда и шовные материалы перед использованием предварительно обрабатывались в растворах карбоната натрия.

Реагенты. В работе с культурами клеток использовали флуоресцентный краситель флуорескамин, культуральную среду клеток L929 (DMEM, ПанЭко, Россия), глютамин (ПанЭко, Россия), стрептомицин-пенициллин (ПанЭко, Россия), пируват натрия (Panreac, Испания), 2-меркаптоэтанол (Loba Feinchemie AG, Австрия), диметилсульфоксид (ДМСО, Геликон, Россия).

2.2 Методы исследования

Приготовление растворов хитозана и фиброина

Растворы хитозана с заданной концентрацией готовили в водных растворах уксусной кислоты (2-2,5 мас.%) по точным навескам сухого полимера ($\pm 0,0002$ г). Растворение проводилось на магнитной мешалке в колбах необходимого объема.

Для получения растворов фиброина, шелк-сырец обрабатывали в 0,02М карбонате натрия или гидрокарбонате натрия в течение 1 часа для очищения волокон от загрязнений, удаления серицина и остаточных жиров. Далее шелк трехкратно промывали в дистиллированной воде, затем выдерживали в бидистиллированной воде при температуре 90-100°C до 2-х часов, и оставляли сушиться при комнатной температуре на сутки. Очищенный шелк растворяли в 9М бромиде лития или хлориде кальция при температуре 70°C в течение 1 часа (выбор растворителя обуславливался скоростью процесса: бромид лития активнее хлорида кальция и других галогенпроизводных лития и кальция). Полученный раствор центрифугировали и отфильтровывали, чтобы избавиться от нерастворившихся конгломератов, затем диализовали против воды три дня со сменой среды каждые 3-4 часа для удаления солей, лиофильно высушивали и получали водорастворимый порошок фиброина. Растворы фиброина готовили в дистиллированной воде, по точным навескам полимера ($\pm 0,0002$ г).

Для приготовления смесей, содержащих фиброин и хитозан с соотношением 1:1 и концентрацией 2 мас.%, диспергировали в дистиллированной воде точную навеску хитозана, добавляли равную по массе навеску фиброина, продолжали перемешивать в воде в течение 30 минут, затем добавляли расчетное количество ледяной уксусной кислоты.

Приготовление растворов сшивающего реагента дженипина (Gr)

Водные растворы Gr заданной концентрации готовили в бюксах подходящего объема по точной навеске ($\pm 0,0002$ г).

Определение электропроводности растворов

Определение электропроводности осуществляли на кондуктометре «Эксперт-002» фирмы Эконикс (Россия) (рис. 10) с использованием погружного электрода. Отбирали 5 мл исследуемого раствора и заливали в измерительную ячейку, в которую погружали электрод, и проводили измерение электропроводности раствора 3-4 раза, до определения сходящихся результатов.



Рисунок 10 – Кондуктометр «Эксперт-002».

ИК-спектроскопия

ИК-спектры измерены при комнатной температуре на Фурье спектрометре методом нарушенного полного внутреннего отражения от границы раздела между элементом с высоким показателем преломления и исследуемым объектом (прибор «Nicolet 6700» Thermo Scientific (США) в диапазоне $4000\text{--}500\text{ см}^{-1}$). Исследовали чистые и модифицированные спиртом образцы фиброина для фиксации перехода белка из α -спирали в β -складчатую конформацию. Высушенные растворы фиброина и фиброина, обработанного спиртом, прессовали и загружали в прибор. Предварительно производили обнуление по воздуху, чтобы исключить регистрирование содержащихся в нем примесей. Изображения спектров получали при помощи программного обеспечения «OMNIC™ Series Software».

Спектроскопические исследования шивки фиброина дженипином

Спектры поглощения регистрировались на спектрофотометре Shimadzu UV 2501 PC в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см. Периодически отбирали 0,4 мл раствора фиброина и разбавляли в 4,6 мл воды (разбавление в 12,5 раз, обозначен как разбавленный раствор). Запись велась в кювете толщиной 2 мм. Температура среды – 24°C. При температуре среды выше 27°C раствор фиброина и растворы после сшивки гелировались. Эксперимент проводился сериями (0-7 ч, 8-16 ч, 17-23 ч, 24-30 ч).

Для анализа были выбраны полосы поглощения: 240 нм (полоса поглощения дженипина), 287 нм (из разностного спектра поглощения следует, что при сшивке появляется новая полоса поглощения), 360 нм (появляется на начальном этапе сшивки) и 610 нм (соответствует вторичной реакции сшивки).

Синтез меченых флуоресцеином белков

Был приготовлен раствор используемого белка (фиброин/альбумин) или смеси с концентрацией 30 мг/мл в свежем 0,1 М карбонатном буфере (рН 9,0). Для этого 0,1687 г NaHCO_3 было растворено в 19 мл очищенной воды, затем рН данного раствора было доведено до 9,0 путем добавления 1 мл 0,1 Н NaOH. Навеска альбумина была растворена в приготовленном буфере. FITC был растворен в ДМСО с концентрацией $C=4$ мг/мл (3,6 мг в 0,9 мл ДМСО). По каплям в раствор белка был добавлен раствор FITC в ДМСО при перемешивании - 0,9 мл (3,6 мг). Далее раствор перемешивался час при комнатной температуре, а затем был оставлен на ночь при 5°C в темном месте. Для остановки реакции на следующий день было добавлено 56,1 мг хлорида аммония, после чего раствор был оставлен инкубироваться еще на час при комнатной температуре. Свободный FITC был отделен гель-проникающей фильтрацией с использованием Sephadex G-25, в качестве элюента был использован 0,15М фосфатный буфер (рН 7,4), который добавлялся по каплям.

Разделение компонентов смеси с помощью гель-хроматографии основано на различии молекулярных размеров компонентов. Маленькие

молекулы имеют тенденцию диффундировать внутрь пористых частиц, так что их поток ограничен, в то время как большие молекулы не могут проникнуть в поры и имеют тенденцию беспрепятственно течь. Таким образом, сначала из слоя покидают компоненты с наивысшей молекулярной массой, а затем молекулы меньшего размера (рис. 11).



Рисунок 11 – Колонка для гель-проникающей фильтрации.

В колонку для гель-хроматографии заливали раствор белка, смешанный с раствором FITC в ДМСО. Колонку заполняли разведенным в дистиллированной воде Sephadex G-25, который представляет собой набухший в воде гель сшитого декстрана, на котором происходит разделение смеси. Sephadex G-25 в колонке промывали дистиллированной водой. По каплям в колонку добавляли полученный раствор, содержащий продукт реакции – меченый FITC белок и исходный FITC, в качестве элюэнта использовали 0,15 М фосфатный буфер pH 7,4. В процессе разделения смеси отбирали фракции (аликвоты раствора). Каждая фракция собирается в отдельную емкость. Фракция, которая в последующем лиофильно высушивалась, а также для которой снимались спектры поглощения,

отбиралась тогда, когда белок начинал двигаться по колонке вниз вместе с FITC. Данная фракция собиралась до того момента, пока меченый белок не выходил полностью (определялось появлением характерной белой (пустой участок декстрана) полосы в колонке), после чего собиралась другая фракция.

Определение времени гелеобразования

Гелеобразование в системах раствор хитозана/фиброина – дженипин изучали при разном мольном соотношении сшивающего реагента на аминогруппу хитозана. За точку гелеобразования в системе принимали время, при котором смесь хитозана с фиброином переставал течь под действием собственного веса. Полученные результаты представляли в виде зависимости времени гелеобразования от соотношения сшивающий реагент G_p/NH_2 .

Изучение реологических свойств растворов хитозана в процессе сшивки

Изучение реологических свойств растворов хитозана при их взаимодействии с G_p проводили при простом сдвиге с использованием ротационного вискозиметра «Rheotest 2» (Германия). Испытания проводили в термостатируемой ячейке типа «цилиндр в цилиндре». Для изучения динамической вязкости в полимерных композициях хитозан+фиброин учитывали скорость сдвиговой деформации ($\dot{\gamma}=3 \text{ c}^{-1}$). Значение динамической вязкости η рассчитывали, как отношение напряжения сдвига τ к скорости сдвига $\dot{\gamma}$:

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}, [\text{Па}\cdot\text{c}] \quad (2)$$

Точность измерения $\pm 5\%$.

Так же динамическую вязкость определяли при помощи вибровискозиметра SV-10 (AND, Япония), данный прибор после калибровки показывает значения с точностью до 0,1%.

Получение гидрогелей

Для получения гидрогелей использовали 2%-ные растворы хитозана с фиброином в соотношении [1:1] г/г в 2%-ном растворе уксусной кислоты

соответственно. рН исходных растворов хитозана – 4,15, смеси хитозана и фиброина – 4,2. Для получения растворов с рН 5,6, к исходному раствору в течение нескольких часов при перемешивании по каплям прибавляли насыщенный раствор NaOH при постоянном потенциометрическом контроле. К 3,4 г раствора хитозана прибавляли 0,85 г водного раствора, содержащего расчетное количество Gr и выдерживали в течение времени, необходимого для гелеобразования.

Получение матриц

Биополимерные матрицы получали замораживанием гидрогелей фиброина с концентрациями 20 и 30 мас.% при -5°C с последующей лиофильной сушкой из замороженного состояния в вакууме с использованием лиофилизатора ALPHA 1-2LD plus 2кг/24ч темп. -60°C, Martin Christ (Германия) и сшивкой в спиртовом растворе дженипина.

Изучение структуры гидрогелей

Образцы гидрогелей окрашивали с помощью флуоресцентного красителя флуорескамина. К образцам добавляли раствор флуорескамина (0,3 мг/мл в ацетоне) и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, затем промывали физиологическим раствором и помещали на предметное стекло. Для анализа образцов использовали инвертированный микроскоп Nikon TE-2000 с конфокальным лазером EZ-C1 (Япония) с помощью лазера 408 нм и детектора на 515 нм. Снимки были получены с помощью программного обеспечения (ПО) Nikon EZ-C1.

Формование плёнок

Формование плёнок толщиной от 50 мкм осуществляли методом полива на чашки Петри растворов из смеси хитозана и фиброина. Пленки выдерживали при комнатной температуре для испарения растворителя до постоянной массы. Массу формовочного раствора рассчитывали по формуле 2.

$$m = \frac{S \cdot h \cdot \rho \cdot 100}{C} \quad (3)$$

где S - площадь подложки, см^2 ; h - толщина пленки, см ; ρ - плотность раствора полимера/смеси полимеров, $\text{г}/\text{см}^3$; C - концентрация раствора, $\text{мас.}\%$.

Получение ковалентно-сшитых пленок

Формование плёнок осуществляли методом полива на чашки Петри растворов хитозана и фиброина, содержащих Gr. Пленки выдерживали при комнатной температуре для испарения растворителя до постоянной массы. Массу формовочного раствора рассчитывали по приведенной выше формуле 3.

Получение лекарственно-наполненных пленок

Для получения лекарственно-наполненных пленок в растворы из смеси хитозана и фиброина, дополнительно вводили мирамистин (0,5% от массы полимеров).

Определение прочности пленок

Исследование релаксационных физико-механических свойств по режиму релаксации проводили на динамометре Поляни, в результате чего получали кривые «напряжение – деформация» при различных скоростях растяжения, а также для определения разрывного усилия полимерных образцов.

Определение растворимости пленок

Определение растворимости пленок проводили путем погружения образца размером $1 \times 1 \text{ см}$ в бюкс с дистиллированной водой и выдерживания в течение трех суток. Пленки считали растворимыми, если они полностью растворялись в течение 1 часа; частично растворимыми, если образцы не растворялись полностью в течение 24 часов.

Термогравиметрический анализ

Метод термогравиметрического анализа основан на непрерывном фиксировании изменения массы образца в зависимости от температуры в условиях её программированного изменения.

В работе анализ материалов проводили динамическим методом (ТГА) (при изменении температуры печи во времени при постоянной скорости

нагрева) на анализаторе TA Instruments TGA Q50 в интервале температур от 0 до 600°C при скорости нагревания 10°C/мин в среде азота.

Степень набухания и влагопоглощение

Степень набухания пленок из хитозана с фиброином в воде изучали гравиметрическим методом. Образцы перед взвешиванием промокали фильтровальной бумагой. Степень набухания α , % рассчитывали по формуле:

$$\alpha = \frac{m - m_0}{m_0} \cdot 100 \quad (4)$$

где m – навеска полимера после набухания, г; m_0 – навеска полимера до набухания, г.

По полученным данным строили график зависимости степени набухания от времени $\alpha = f(\tau)$.

Определение кинетики высвобождения лекарственных веществ в физиологический раствор

Изучение кинетики высвобождения мирамистина из пленок в физиологический раствор NaCl (0,9%) (гидромодуль 100 мл/г) проводили путем регистрации изменения оптической плотности растворов при длинах волн 211 нм (для мирамистина) с использованием спектрофотометра Thermo Spectronic Genesis 10UV.

Коагуляционное формование волокон

Формовочный раствор из хитозана и смеси хитозана с фиброином в соотношении [1:1] г/г подвергали фильтрации для удаления механических примесей и нерастворимых частиц полимера. После фильтрации раствор обезвоздушивали при обычном атмосферном давлении, поскольку пузырьки воздуха могут вызвать обрыв нити. Моноволокна были получены по «мокрому» методу формования и растворов хитозана (ММ 200 кДа, рН 4,2) и композиции хитозан+фиброин (рН 4,17). Вязкость растворов составляла 240-260 мПа*с. Сшивающий реагент дженипин добавлялся в раствор так, чтобы соотношение аминогрупп и количество сшивающего реагента составляло 0,01 и 0,04 моль/моль. Дженипин добавлялся непосредственно перед формованием,

после чего формовочная композиция выдерживалась в течении времени, необходимого для достижения ею вязкости в пределах 260 мПа*с.

Фильтра МУП-3 представляет собой колпачок с отверстиями, через которые продавливается прядильный раствор. С помощью фильеры общий поток прядильного раствора разделяется на струйки, которые затем, затвердевая, превращаются в волокна. Общее число отверстий в фильерах на аппаратах типа МУП-3 колеблется от одной до нескольких десятков.

При мокром (коагуляционном) способе струйки формовочного раствора попадают в осадительную ванну, где под влиянием осадителя (спирто-щелочная смесь, содержащая 10%-й водный раствор NaOH и C₂H₅OH в соотношении 1:1) происходило их отверждение (коагуляция).

Заключительная отделка свежесформованного волокна заключается в его вытягивании и промывке (для синтетических и волокон из биополимеров). В результате вытягивания разрывная прочность химических волокон повышается в 2–3 раза и одновременно улучшается комплекс других практически ценных свойств. На аппаратах типа МУП-3 есть необходимый участок, называемый пластификационной ванной, где можно производить вытяжку сформованных волокон (рис. 12). Промывка необходима для удаления с поверхности волокон компонентов осадительной ванны.

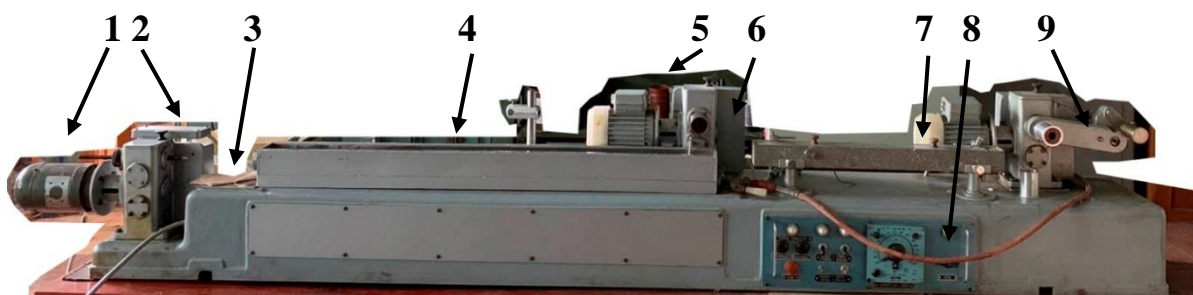


Рисунок 12 – Установка типа МУП-3. 1 - мотор для подачи, 2 – шестерни для регулировки скорости, 3 - место для прядильного узла с фильерой, 4 - осадительная ванна, 5 - шестерни для регулировки скорости приема, 6 - катушка для приема и вытяжки волокна, 7 - пластификационная ванна, 8 - панель управления, 9 - катушка для приема и вытягивания волокна.

Для расчета основных показателей, необходимых для успешного формирования волокон на аппаратах типа МУП-3, используют следующие формулы:

$$v_{\text{ист}} = V/F \quad (5)$$

Определение скорости истечения раствора. Где V – объем раствора, поданный из фильеры за 1 минуту ($\text{см}^3/\text{мин}$), F – площадь сечения отверстия фильеры (см^2).

$$F = (\pi d^2)/4 \quad (6),$$

Где d – диаметр фильеры, см.

Определение вытяжки волокна определяют по формулам 7 и 8. По 7 – знак вытяжки, по 8 – точный процент.

$$\Phi_1 = v_{\text{пр}}/v_{\text{ист}} \quad (7),$$

Где $v_{\text{пр}}$ – скорость приёма (регулируется диаметром шестерней на МУП-3, позиция 5 на рис. 1, м/мин). Если $\Phi_1 < 1$, вытяжка отрицательная, $\Phi_1 = 1$, вытяжка равна 0, Если $\Phi_1 > 1$, вытяжка положительная.

$$\Phi_2 = [v_{\text{пр}} - (4V/\pi d^2 * 1)] / [(4V/\pi d^2 * 1)] * 100\% \quad (8).$$

Определение скорости сдвига растворов.

$$\gamma = 4q/\pi r^3 \quad (9),$$

Где q – подача раствора (г/с), ρ – плотность раствора (г/см^3), r – радиус отверстия формовочного шприца (см). Скорость сдвига – с^{-1} .

В табл. 2 приведены параметры коагуляционного формирования волокон.

Таблица 2 – Параметры процесса коагуляционного формирования волокон.

Параметр	Значение
Диаметр фильеры	0,6 мм
Скорость подачи раствора	3 мл/мин
Время пребывания волокна в осадительной ванне	20 секунд
Скорость приема волокна	4 м/мин
Фильерная вытяжка	-25,5%

Электроформование нановолокон из фиброина и смеси фиброин+хитозан

Нановолкнистый материал получали методом электроформования на приборе Nanospider NS-Lab (Elmarco, Чехия). Состав формовочных растворов и параметры формования представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Электроформование волокон из водных растворов фиброина и его смесей с хитозаном.

Концентрация в растворе		Соотношение ФБ:ХТЗ, г/г	Степень сшивки, моль/моль	U, кВ	Характеристика
ФБ	ХТЗ				
10	0	1:0	0	22,2-25,8	Стабильное
10	2	5:1		24,8-28,9	Стабильное
20	0	1:0		23,0-26,4	Стабильное
20	2	10:1		23,3-27,3	Прерывистое
30	0	1:0		19,1-25,0	Прерывистое
10	0	1:0	0,04	21,0-25,0	Стабильное
10	2	5:1		25,0-30,0	Стабильное
20	0	1:0		23,0-27,0	Стабильное
20	2	10:1		23,2-27,9	Прерывистое
30	0	1:0		19,0-25,0	Прерывистое

Топография поверхности и диаметр волокон, полученных методом электроформования

Изображения поверхности волокон и значения их диаметров получали при помощи атомно-силового микроскопа (АСМ) на основе микроконсольной системы «NtegraPrima» (NT-MDT, Россия, рис. 13) в полуконтактном режиме работы кантилевера. Полученные данные подвергались обработке и сравнительному анализу в программе управления СЗМ «Nova» на базе платформы ИНТЕГРА и Solver.



Рисунок 13 – АСМ «NtegraPrima» (NT-MDT, Россия).

Определение паропроницаемости волокнистых материалов

Определение показателя паропроницаемости образцов нановолокнистых материалов проводилось по ГОСТу 22900-78. Для испытания из электроформованного материала вырезали образцы диаметром 35 мм. Образцы помещали в стаканчики с дистиллированной водой. Затем стаканчики с образцами и дистиллированной водой взвешивали и помещали в эксикатор, содержащий 100% H_2SO_4 на ~18 часов.

По истечении 18 часов стаканчики с образцами вынимали из эксикатора и взвешивали. Затем производилась повторная установка стаканчиков с образцами в эксикатор на 6 часов. После 6 часов стаканчики с образцами вновь извлекали из эксикатора и взвешивали. Полученные данные о потере массы использовали для расчета значения паропроницаемости по формуле:

$$\Pi = \frac{m_1 - m_2}{S \times \tau} \quad (10),$$

Где Π – паропроницаемость, $mg/cm^2 \cdot час$, m_1 и m_2 – масса стаканчика до и после помещения в эксикатор на 18 часов, mg , S – рабочая площадь образца, cm^2 , τ – время проведения испытания, ч.

Определение гигроскопичности и влагоотдачи волокнистых материалов

Определение показателей гигроскопичности и влагоотдачи образцов волокнистых материалов проводили по ГОСТ 8971-78. Обе методики носят весовой характер, где величины определяются исходя из изменения массы испытуемых образцов и выражаются в процентах. Для определения гигроскопичности и влагоотдачи электроформованного материала из него вырезали образцы размером 5x5 см и взвешивали их на аналитических весах. Затем образцы помещали в эксикатор с дистиллированной водой на 16 часов. Эксикатор устанавливали в термостат для контроля температуры в процессе испытания. После 16 часов образцы извлекали из эксикатора и взвешивали. Полученные данные использовали для расчета гигроскопичности образцов по следующей формуле:

$$\Gamma = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\% \quad (11),$$

Где Γ – гигроскопичность, %, m_1 и m_2 – масса образца до и после помещения в эксикатор.

После взвешивания образцы оставляли в помещении при 20°C и относительной влажности 65% на 8 часов. После истечения данного срока образцы вновь взвешивали и определяли влагоотдачу по формуле:

$$B = \frac{m_2 - m_3}{m_3} \times 100\% \quad (12),$$

Где B – влагоотдача, %, m_2 и m_3 – масса образца до и после высушивания при комнатной температуре.

Определение сорбционных свойств полимерных материалов

Определение сорбционных свойств нетканых материалов по отношению к парам воды проводили весовым методом. Образцы выдерживали в эксикаторах с определенным значением относительной влажности воздуха. 100%-ная влажность создавалась насыщенными парами воды при 20-22°C.

Для изучения процесса сорбции паров воды во времени образцы помещали в закрытые и взвешенные заранее бюксы, затем взвешивали через промежутки времени с помощью электронных весов с точностью до 0,001 г. Сорбционную емкость рассчитывали по формуле:

$$S = \frac{m_1 - m}{m} \times 100\% \quad (13),$$

Где m – масса исходного образца, термостатированного в эксикаторе с концентрированной H_2SO_4 (или в термошкафу в течение 1 часа при $T=120^\circ C$) до постоянной массы, г; m_1 – масса образца, увлажненного в эксикаторе с определенной относительной влажностью до постоянной массы, г.

Физико-механические свойства электроформованных волокон из фиброина и его смесей с хитозаном

Для определения физико-механических свойств нано- и микроволокон использовали атомно-силовой микроскоп от NT-MDT в «контактном» режиме работы кантилевера. При помощи регулирования таких параметров, как: Set Point (сила прижима зонда к образцу), Amplitude (напряжение генератора), Gain (коэффициент усиления синхронного детектора) и Preamplifier (предусилителя) получали топографию поверхности волокон и получали значения силы (F), приложенной к образцу для его разрыва. В таблице 4 указаны характеристики кантилевера.

Таблица 4 – Характеристики кантилевера.

Длина кантилевера, $L \pm 5 \text{ мкм}$	Ширина кантилевера, $W \pm 5 \text{ мкм}$	Толщина кантилевера, мкм	Резонансная частота, $\pm 10\%$, кГц	Силовая постоянная (константа жесткости кантилевера), $\pm 20\%$, Н/м
224	34	1,6-2,0	46	1,0
184	34	1,6-2,0	66	1,5

Разность в константе обусловлена свойствами кантилевера, т.к. современные зонды поставляются с двумя иглами различной длины.

Если известны константа жесткости используемого кантилевера и его геометрические размеры, то полученные изображения распределения сигнала изгиба кантилевера (DFL) можно преобразовать в изображение распределения локальной силы, действующей со стороны волокна на кантилевер. Волокна

предварительно формовали на кремний-алюминиевые подложки размером 2x2 см. Выбор материала подложки обусловлен невысокой адгезией волокон с поверхностью, что обеспечивает наиболее точные показания физико-механики для волокон. Для подвода к образцу и выбора отдельных волокон использовали оптический микроскоп с возможностью двенадцатикратного увеличения.

При снятии изображения, на панели отображения 1D-данных построчно отображается измеряемый сигнал изображения (рис. 14).



Рисунок 14 – Сигнал изображения.

В контактном методе работы АСМ, при удалении кантилевера от образца, ощутимо воздействие на зонд силы адгезии последнего. Эти силы обуславливают изгиб зонда непосредственно во время «отрыва» от поверхности. При переводе в рабочий сигнал, получаемый во время работы АСМ – это значение DFL, которое сначала уменьшается до меньшего показателя, чем сама величина DFL, затем возвращается обратно, образуя специфический скачок на графике (рис. 16).

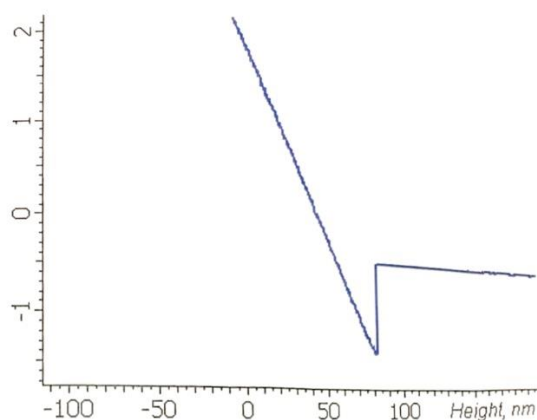


Рисунок 15 – Изменения сигнала DFL, в момент отрыва кантилевера от образца.

Дальнейшее значение силы адгезии можно вычислить, если принять как линейное значение зависимости силы от смещения кантилевера относительно поверхности образца по оси OZ. Тогда, по закону Гука:

$$F=k*\Delta\text{Height} \text{ (14),}$$

Где k – жесткость кантилевера, Н/м; ΔHeight – показания DFL, нм

Для вычисления силы адгезии, при помощи программы АСМ (Pair Markers), на полученном графике измеряют значение ΔHeight на наклонном участке кривой. Измеренные таким образом значения ΔX и ΔY являются, соответственно, показателями ΔHeight и ΔDFL . Учитывая размеры волокон (диаметры), можно вычислить механическое напряжение на волокне (кПа).

Все описанные далее эксперименты по культивированию клеток проводили в Институте биоорганической химии РАН под руководством д.б.н. Марквичевой Е.А.

Изучение цитотоксичности гидрогелей и волокнистых матриц.

Экстракт-тест

Цитотоксичность гидрогелей изучали методом тестирования экстрактов. Суспензию клеток L929 (100 мкл, 1×10^5 клеток/мл) засеивали в 96-луночный планшет и культивировали в течение 24 ч. Через 24 ч среду заменяли на 100 мкл экстрактов.

Экстракты были получены следующим образом: образцы гидрогелей помещали в 48-луночный планшет и стерилизовали этиловым спиртом (1 ч), потом спирт удаляли, а образцы промывали физ. раствором 3 раза по 2 мл и один раз средой с сывороткой по 1 мл. Затем к образцам вносили культуральную среду DMEM с содержанием сыворотки 10% (из расчета 1 мл среды на 100 мг гидрогелей), инкубировали при 37°C. Через 24 ч экстракты отбирали, готовили разведения (1:10, 1:2 и без разведения) и добавляли к монослою клеток (по 100 мкл). В качестве контроля использовали клетки, культивируемые в среде без экстрактов.

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста через 24 ч культивирования клеток в присутствии экстрактов. Для этого среду с экстрактами заменяли на 100 мкл раствора МТТ в DMEM без сыворотки (концентрация МТТ составила 0,5 мг/мл). Далее инкубировали в течение 2 ч при 37°C. По истечении этого времени смесь среды с МТТ тщательно удаляли, в лунки добавляли по 100 мкл ДМСО для растворения кристаллов формазана и инкубировали 15-20 минут. Далее измеряли оптическую плотность (ОП) на длинах волн 540/690 нм с использованием планшет-ридера Multiscan (Flow Laboratories, США). Относительную жизнеспособность клеток рассчитывали по формуле:

$$\text{Доля жизнеспособных клеток} = \frac{\text{ОП в тестовых лунках}}{\text{ОП в контрольных лунках}} \times 100\% \quad (15)$$

Культивирование клеток

В исследовании были использованы клетки линии мышинных фибробластов (L929) и иммортализованные мезенхимальные стволовые клетки человека (МСК имм.). Клетки линий L929 культивировали в DMEM, МСК имм. – в α -MEM. Использовали среды с добавлением 10% FBS, 2 мМ глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина — 100 мкг/мл стрептомицина, 1 мМ пирувата натрия и 50 мкМ 2-меркаптоэтанола в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂ при 37°C (CO₂-инкубатор HERAEUS B5060 EK/CO₂).

Подготовка образцов

Образцы гидрогелей 5x5 мм помещали в лунки 24-лун. планшета и стерилизовали инкубацией в 98% этиловом спирте 1 час (в УФ шкафу). Далее образцы промывали 3 раза по 2 мл физиологическим раствором и инкубировали в 1 мл DMEM+10%FBS 1 час.

Изучение влияния матрикса на результат МТТ-теста

Влияние матриксов на результат МТТ-теста изучали следующим образом: гидрогели нарезали на образцы диаметром 5 мм. Образцы помещали в 96-лун. планшет, стерилизовали инкубацией в этиловом спирте (1 ч), после

чего промывали физиологическим раствором 3 раза по 200 мкл. Далее к образцам добавляли DMEM+10%FBS.

Суспензии клеток (L929) (50, 100, 150 и 200 мкл, 10^6 клеток/мл) засеивали в 96-луночный планшет (в 2-х повторах) и инкубировали в CO₂-инкубаторе для прикрепления клеток ко дну лунок. Через 1 ч среду с сывороткой заменяли на среду без сыворотки (75 мкл), вносили образцы и добавляли реактив МТТ (25 мкл) (чтобы рабочая концентрация составила 0,5 мг/мл), инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Кристаллы формазана, образованные в живых клетках, растворяли в 200мкл ДМСО, отбирали аликвоту 100мкл и измеряли оптическую плотность (ОП) при 540 нм с использованием планшет-ридера Multiscan (Thermo, США). Далее строили графики зависимости ОП результата МТТ-теста монослоя клеток без образцов матриксов от ОП результата МТТ-теста монослоя клеток в присутствии образцов матриксов. Уравнение линии тренда – далее используется для пересчета результата МТТ теста после культивирования клеток на матриксах.

Морфология клеток после 7 дней культивирования в гидрогелях

Образцы гидрогелей с растущими на них клетками инкубировали в 100 мкл культуральной среды (без сыворотки), содержащей Calcein AM (0,5 мкг/мл) и DAPI (10 мкг/мл) в течение 20 минут при 37°C. Далее образцы изучали на инвертированном микроскопе Nikon TE-2000 (Japan) с максимумами поглощения и излучения 408/515 и 488/590 нм.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исходя из описанных данных в литературном обзоре, можно сделать вывод о том, что биополимеры фиброин и хитозан являются одними из наиболее перспективных полимеров для применения в тканевой инженерии и разработки материалов медико-биологического назначения. Их получают из водных растворов органических кислот или воды, можно химически сшивать, переводя тем самым в нерастворимое состояние. Однако единого мнения касательно способа формования медико-биологических материалов из смесей этих полимеров нет. Представляется важным изучение влияния природы различных растворителей и состава формовочных растворов фиброина с хитозаном на их физико-химические свойства и возможность их дальнейшего волокнообразования в электрическом поле.

Для использования хитозан-фиброиновых смесей в технологии получения материалов медико-биологического назначения с необходимым уровнем функциональных свойств необходимо исследовать закономерности процессов конформационных переходов, химической модификации фиброина сшивающим реагентом дженипином и последующего формования различных композиций на его основе в виде пленочных материалов, моно- и нановолокон, матриц для роста и пролиферации клеток.

3.1 Изучение процесса получения и свойств растворов фиброина

Способ осуществления перехода от раствора к нерастворимому материалу в технологическом процессе формования волокна или пленки из биополимеров оказывает определяющее влияние на конформацию макромолекул, фазовое состояние биополимера, гидрофильность, скорость биодegradации полимерного материала, его физико-механические свойства, кинетику высвобождения иммобилизованных соединений и саму возможность использования волокнистого материала в биомедицинских целях. В случае фиброина потеря растворимости в воде может происходить не только в результате химической сшивки, но и структурных перестроек при переходе в

β -складчатую конформацию. Конформационные переходы от глобулы к α -конформации и β -структуре сопровождается процесс биосинтеза природного фиброина шелка [141], и может происходить на разных стадиях получения материалов на основе фиброина – начиная с процесса получения формовочных растворов, включающего дегуммирование (растворение в водных растворах солей с высокой ионной силой), диализ, лиофильную сушку, получение концентрированных водных растворов, и заканчивая обработкой готовых материалов с целью сохранения их морфологии и механических свойств при эксплуатации.

Проведенный в предыдущей главе анализ указывает на необходимость осуществления конформационного перехода (β -кристаллизации) при создании не растворимых в воде изделий из фиброина. Однако такой переход может влиять на процессы получения формовочных растворов фиброина, пригодных для формования волокнистых, пленочных или иных гидрогелевых биоматериалов на основе фиброина. Поэтому прежде всего был проведен анализ условий выделения фиброина из коконов тутового шелкопряда *Bombyx mori* и исследованы свойства растворов фиброина.

3.1.1 Анализ и оптимизация условий получения водных растворов фиброина из коконов шелкопряда *Bombyx mori*

Основные технологические операции, направленные на получение очищенного (свободного от серицина) фиброина, т.н. процессы дегуммирования и получения регенерированного фиброина, включают растворение коконов шелкопряда, в растворителях, разрушающих дисульфидные связи между фиброином и серицином и водородные связи, удаление примесей и олигопептидов диализом и лиофильную сушку разбавленного водного раствора фиброина. Для растворения и регенерации фиброина используют ограниченное число растворителей: (1,1,1,3,3,3)-гексафторизопропанол, муравьиная кислота, трифторуксусная кислота, водно-спиртовые растворы солей лития или кальция [142, 143]. Однако большинство из них являются агрессивными и могут разрушать α -спираль фиброина, из-за

чего становится невозможным электроформование волокон. В таблице 5 приведен анализ условий дегуммирования фиброина, выполненный на основании литературных данных и результатов собственных исследований.

Таблица 5 – Условия получения регенерированного фиброина из коконов шелкопряда *Bombyx mori*.

№ п/п	Растворитель	Концентрация раствора	Температура/время дегуммирования	Особенности процесса
1	Раствор CaCl ₂ в водно-спиртовом растворе (H ₂ O/C ₂ H ₅ OH 8:2)	10%	70 °C/2-10 час	Необходимость постоянного контроля концентрации и добавление растворителя в процессе переработки, из-за присутствия спирта в системе существуют сложности при диализе против воды – наблюдается помутнение раствора
2	Муравьиная кислота H ₂ COOH	Концентрированная	25 °C/2-3 час	Растворение при комнатной температуре, используются концентрированные растворы кислоты, сложности при диализе в мешках
3	Гексафторизопропанол HFIP	100%	70 °C/2-6 час	Дорогой растворитель, токсичен, требует регенерации
4	Водный раствор LiBr,	9M	20-100°C/1-2час	Высокая концентрация, высокая скорость растворения, прозрачные растворы

На основании литературных данных с целью оптимизации условия выделения фиброина из натурального шелка были выбраны два способа

получения растворов фиброина: в водном растворе LiBr и водно-спиртовом растворе хлористого кальция $\text{CaCl}_2:\text{H}_2\text{O}:\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1:8:2). Предварительное удаление серицина из коконов (дегуммирование) проводили трехкратной обработкой 0,5%-ным раствором Na_2CO_3 , в течение 30-40 минут (при 100°C), промывали дистиллированной водой и растворяли в выбранной системе при 70°C . Готовый раствор диализовали против воды и лиофильно высушивали. При использовании в качестве растворителя фиброина 10% раствора CaCl_2 в водном растворе, содержащим этанол, и времени обработки при 70°C в 6 часов были получены прозрачные растворы, однако при последующем диализе обнаружено изменение фазового состояния раствора, связанное, по-видимому, с конформационными переходами в фиброине под действием этанола. Были определены оптимальные условия выделения фиброина из натурального шелка, обеспечивающие получение однофазных растворов, пригодных для формования пленок и волокон: понижение концентрации фиброина до 8-10 % и содержания этанола в растворе не более 30%, или использование в качестве электролита 9М водного раствора бромида лития (п.4, таблица 5).

3.1.2 Изучение свойств водных растворов фиброина

Изучение вязкости растворов фиброина. Характер межмолекулярных взаимодействий в растворах дженипина определяет не только тип конформации белка, но и реологические свойства и фазовое состояние фиброина в водном растворе. Изучение регенерированного шелка для выяснения роли факторов, определяющих реологию фиброина, имеет решающее значение для более полного понимания молекулярных механизмов, участвующих в нативном процессе синтеза фиброина, а также способов имитации этой процесса при получения искусственных волокон на основе фиброина. В процессе биосинтеза фиброина и получения шелка раствор белка претерпевает ряд изменений: переходы гель - золь, золь - жидкий кристалл, жидкий кристалл - волокно, которые строго контролируются изменениями окружающей среды, такими как pH, концентрация раствора, ММ белка, напряжение сдвига [4, 88, 95]. В нативном растворе, экстрагированном из

желез шелкопряда влияние этих факторов исследовано достаточно подробно [24, 144]. Использование принципов биомиметики для получения природоподобных материалов из фиброина предполагает моделирование полимерных систем на основе растворов регенерированного фиброина. С этой целью в широком диапазоне концентраций были исследованы гидродинамические и реологические свойства водных растворов фиброина, выделенного из коконов шелкопряда *Bombyx mori* по разработанной методике.

На рис. 16 приведена концентрационная зависимость приведенной вязкости водного раствора фиброина.

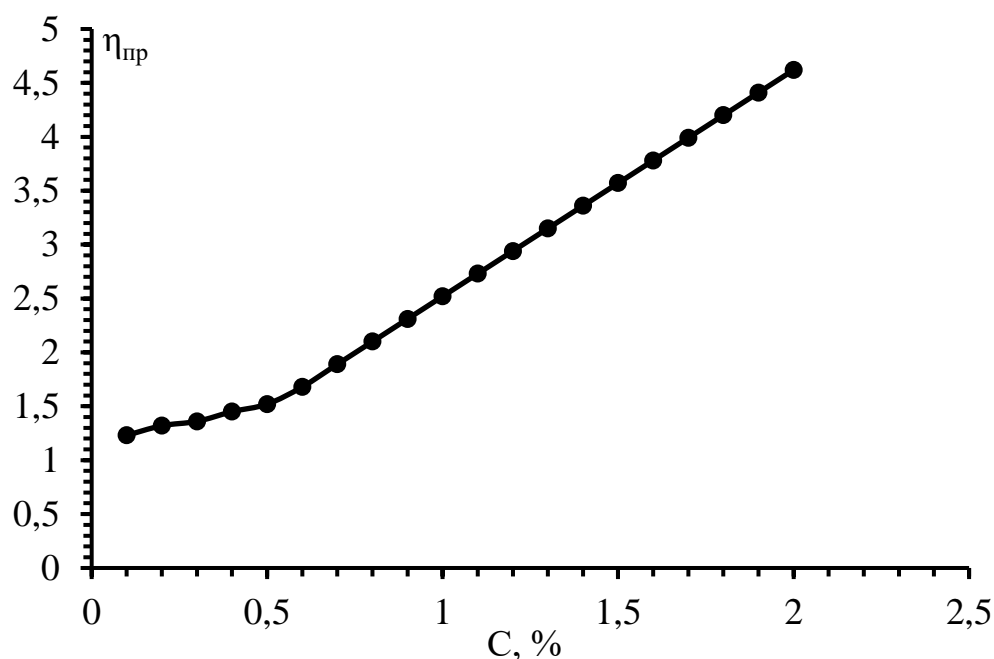


Рисунок 16 – Зависимость приведенной вязкости от концентрации раствора фиброина.

Нелинейный характер зависимости может быть связан с полиэлектролитной природой белка, содержащего ионизирующиеся функциональные группы.

В более широком диапазоне концентраций исследована динамическая вязкость растворов фиброина (рис. 17). Исследование проведено на синусоидальном вибрационном вискозиметре SV-10 при вибрации с частотой 30 Гц, что эквивалентно собственной частоте системы обнаружения вязкости и градиенте скорости сдвига от 30 до 90 [1/с].

Сложный характер концентрационной зависимости динамической вязкости, характеризующийся наличием участков с экспоненциальным ростом и слабой зависимостью вязкости от концентрации не может быть обусловлен увеличением числа ионизирующихся групп, так как электропроводность раствора изменяется монотонно, а pH не более, чем на 0,1 ед. при изменении концентрации на 10% (таблица 6). Резкое замедление роста вязкости после 30%-ной концентрации (рис. 17) может быть связано с началом конформационных перестроек: переходом фиброина от глобулярной конформации, характерной для разбавленных растворов, к анизотропной конформации α -спирали и появлением β -складчатых структур. Это предположение подтверждается результатами нефелометрических исследований (рис. 18) – резким ростом оптической плотности раствора в данной концентрационной области.

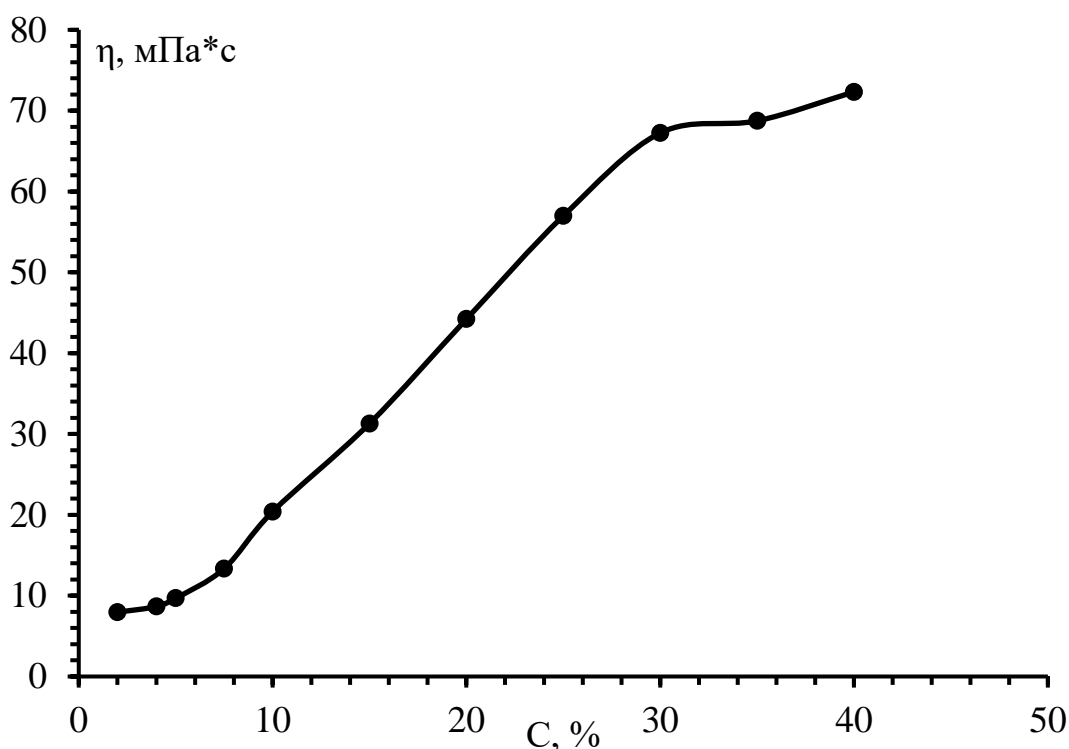


Рисунок 17 – Зависимость динамической вязкости от концентрации раствора фиброина.

Таблица 6 – Свойства растворов фиброина.

Концентрация раствора фиброина	pH	κ , мСм/см	η , мПа*с
10	6,8	3,58	22,18
20	6,9	6,4	44,13
30	6,93	9,8	66,24

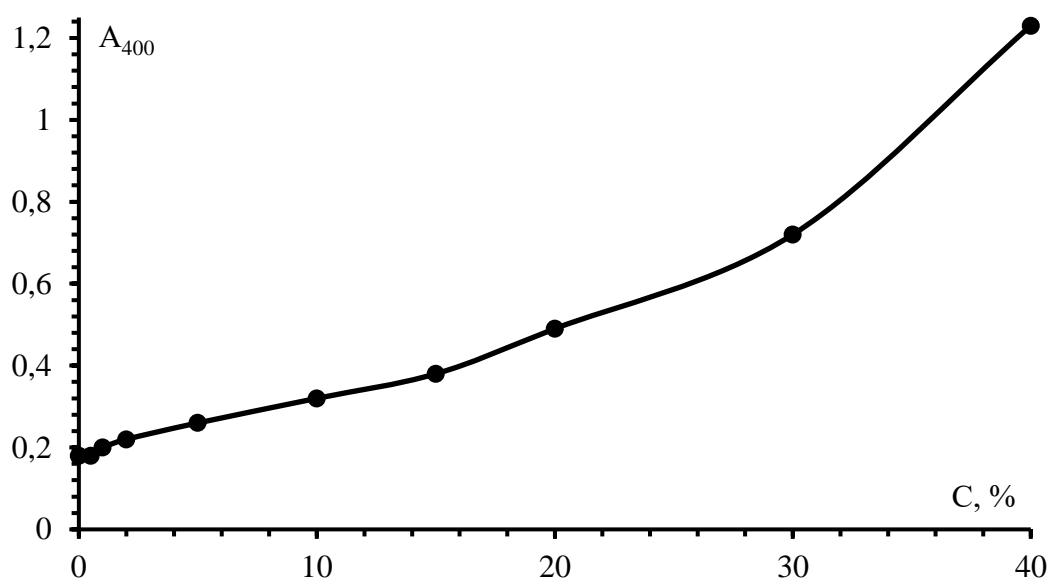


Рисунок 18 – Зависимость оптической плотности от концентрации раствора фиброина, λ 400 нм.

Учитывая, что концентрация раствора 25-30% соответствует концентрации фиброина последнего перед формированием шелковой нити отдела железы тутового шелкопряда, полученные результаты могут служить основанием для моделирования состава формовочных растворов.

3.2 Изучение процессов перевода фиброина в нерастворимое состояние

Для разработки биополимерных материалов на основе фиброина в нерастворимое в воде состояние необходимо выбрать способ перевода растворимой формы фиброина в не растворимый в воде материал. С этой

целью были изучены 2 принципиально разных процесса: конформационный переход под действием спиртов и химическая сшивка фиброина.

3.2.1 Изучение влияния этанола на $\alpha \rightarrow \beta$ -конформационный переход в фиброине

Для переработки в волокно, пленку или иной гидрогелевый фиброин-содержащий материал из раствора, нужна глобулярная (растворимая) форма или конформация α -спирали, а после переработки необходимо осуществить или перевод фиброина в β -форму или межмолекулярную сшивку. Изменение структуры белка происходит в результате перераспределения водородных связей в пользу межмолекулярных, которые поддерживают β -складчатую конформацию и придают материалу устойчивость к растворителям – нерастворимость в воде и хорошие механические свойства. Вызывать такое перераспределение может совокупность целого ряда факторов: присутствие спиртов и других соединений, изменение рН, присутствие солей, изменение концентрации раствора [51].

Конформационная стабильность фиброина шелка в водно-спиртовом растворе определяется взаимодействиями аминокислотных остатков друг с другом и с растворителем. Агрегация гидрофобных боковых цепей нарушается путем разрушения сетки водородных связей воды спиртом и связывания спирта с гидрофобной группой. Формирование β -складчатой структуры представляет собой процесс перегруппировки водородных связей, сопровождающий движение основной цепи, с образованием водородных связей между пептидными звеньями разных макромолекул.

Как было показано в литературном обзоре, перевод в нерастворимую форму β -листа может быть обеспечен обработкой сформованных волокон из фиброина шелка метанолом или этанолом. Метанол является токсичным растворителем, поэтому для контроля конформационного перехода в пленках из фиброина использовали этанол.

Исследование конформационных переходов было изучено в 5%-ном растворе фиброина в присутствии этанола (10, 20, 40 и 80 мас.%) и контролировалось нефелометрически по изменению мутности растворов при $\lambda=400$ нм в результате появления нерастворимой фазы (рис. 19). Введение спирта в 5%-ный раствор биополимеров вызывало помутнение раствора. Установлено, что видимый конформационный переход в растворе начинается при использовании 40%-го раствора этанола.

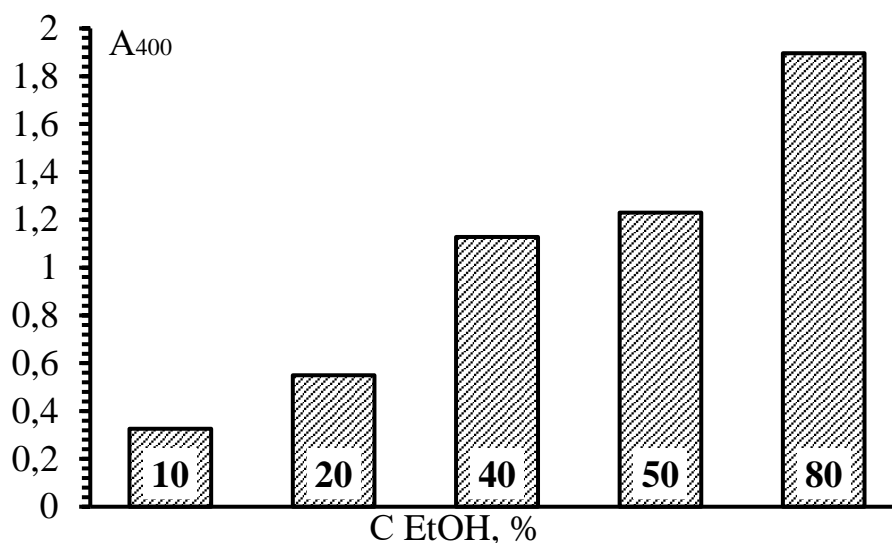


Рисунок 19 – Влияние этанола на оптическую плотность ($\lambda=400$ нм) 5%-ных растворов фиброина.

По-видимому, при увеличении концентраций этанола и фиброина, создаются условия для перераспределения межмолекулярных водородных связей, сопровождающие формирование β -листов. Эти наблюдения позволяют сформулировать оптимальные условия для начала стадии зарождения β -конформации: увеличение концентрации фиброина и содержания этанола для ускорения нуклеации при получении не растворимых в воде волокон фиброина.

Была проведена идентификация конформационного перехода в пленках из фиброина. Водорастворимые фиброиновые пленки толщиной 50 мкм, полученные в чашках Петри методом полива с последующим испарением

растворителя, обрабатывали растворами этанола в воде с концентрацией от 0 до 80 мас.%. Установленная оптимальная концентрация этанола 60 мас.%, при которой пленки сохраняли свою структуру, оказалась на 20% выше литературных данных [57], что может быть связано с отличием в исходном сырье (шелке) или способе переработке коконов.

Были получены и исследованы Фурье ИК-спектры порошка регенерированного фиброина (водорастворимая фракция) и не растворимой пленки из фиброина, обработанной 60 %-ным раствором этанола в течение 1 часа (рис. 20).

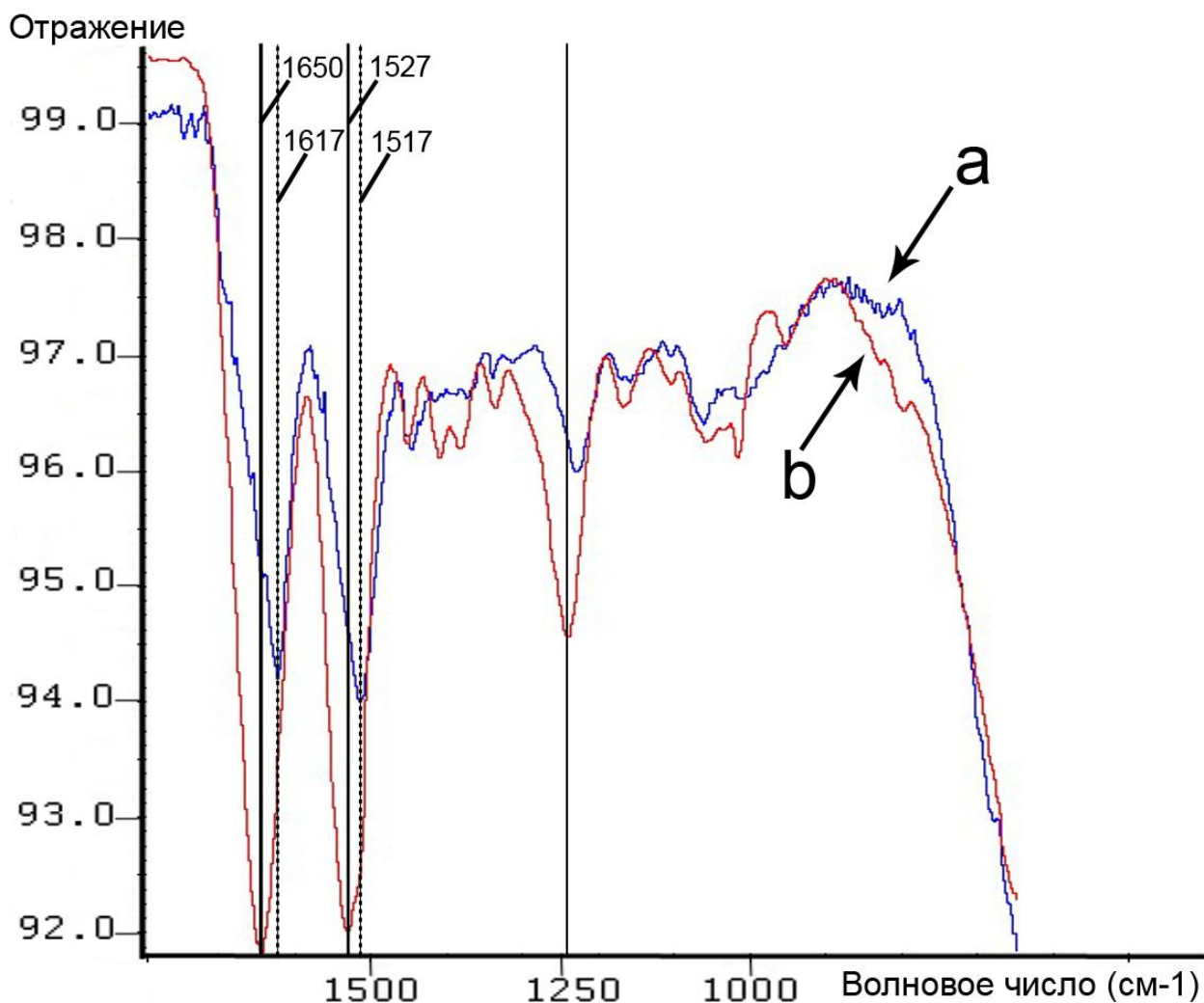


Рисунок 20 – ИК-Фурье спектры порошка регенерированного фиброина и пленки, обработанной этанолом: а – пленка после обработки 80%-ным раствором этанола; б – исходный регенерированный фиброин.

Сравнение ИК-спектров фиброина, пересаженного в этанол, со спектрами исходного фиброина, выделенного из коконов шелкопряда *Bombyx mori*, показало наличие изменений, описанных в [82]. Известно, что амидные полосы ИК-спектров чувствительны к молекулярной конформации фиброина шелка. Области амид I, амид II и амид III наиболее часто используются для исследования вторичной структуры белка. Амид I описывает валентные колебания C=O связи, амид II – деформационные колебания связи CN и NH, амид III – C-N растяжение и NH-поворот. В спектральном диапазоне амид-III (1350-1200 см⁻¹) полосы являются в основном результатом синфазной комбинации изгиба в плоскости связи N-H и деформационного колебания растяжения связи C-N, и они крайне чувствительны к вторичной структуре. Сигналы в этом диапазоне в 5-10 раз слабее, чем в диапазоне полосы амид I, они легко расшифровываются, что делает этот спектральный диапазон пригодным для количественного анализа вторичной структуры белка. Соотнесение спектральных полос в области амид III следующее: полоса 1330-1295 см⁻¹ соответствует α -спирали; полоса 1295-1270 см⁻¹ – β -поворотам; полоса 1270-1250 см⁻¹ – неупорядоченной структуре, а полоса 1250-1220 см⁻¹ – β -слоям.

Структурные изменения в порошках фиброина, вызванные прямой обработкой в метаноле/этаноле, подтверждены методом ИК-Фурье. Как указывалось ранее, фиброин может существовать в виде случайных клубков/глобул (низкие концентрации раствора белка, α -структура (шелк I, β -изгиб типа II - тип нерегулярной вторичной структуры в белках, вызывающий изменение направления полипептидной цепи) и β -форма (шелк II, антипараллельный β -складчатый лист, образованный физическим сдвигом или воздействием растворителей, таких как метанол). Порошок фиброина изначально имеет в основном аморфную структуру с наличием структуры шелка I. Не обработанный образец (кривая b) показывает сильные полосы при 1527 см⁻¹ (амид II), 1235 см⁻¹ (амид III), и 1650 см⁻¹ (амид I), характерные для конформации α -спирали [55]. Порошок, обработанный 80% этанолом (кривая

а), показывает сдвиги и появление полос при 1617, 1517, 1220 см^{-1} , характерных для конформации β -листа [54]. Эти изменения указывают на основное преобразование от случайных спиралей в упорядоченный лист при обработке водным раствором этанола. Таким образом, данные ИК-Фурье спектроскопии подтверждают влияние этанола на конформационную трансформацию регенерированного фиброина шелка. Характерным является наличие оптимальной концентрации этанола, вызывающей это преобразование. Фактически, вода может действовать как агент набухания по отношению к компактному и плотному фиброину шелка, тем самым способствуя разрыхлению матрицы полимера, проникновению этанола и перестройкам меж- и внутримолекулярных водородных связей. Полученные данные соответствуют данным, описанным в литературных источниках ранее [52, 54, 145].

Таким образом, установлено, что обработка водно-этанольным раствором может служить эффективным средством перевода материалов на основе фиброина в не растворимую форму. Доказано, что в основе этого факта лежит конформационный переход фиброина в β -складчатую конформацию.

3.2.2 Изучение процесса сшивки фиброина бифункциональным реагентом

Перспективным способом получения не растворимых в воде материалов на основе аминоксодержащих биополимеров является химическая сшивка. Химическая сшивка позволяет осуществить необратимый переход от раствора водорастворимого биополимера к его гидрогелю, и этот прием используется при получении и регулировании свойств различных типов биоматериалов.

Ранее нами был изучен процесс химической сшивки хитозана сшивающим реагентом природного происхождения дженипином, вызывающим гелеобразование в его растворах и разработаны условия получения волокнистых, пленочных материалов и пористых гидрогелей на их основе [146-148]. Взаимодействие с дженипином вызывало не только рост вязкости и гелеобразование в растворе хитозана, но и появление поглощения

в различных областях спектра, в том числе в видимой области и окрашивание материала в синий цвет.

Сшивка белка с использованием традиционных сшивающих реагентов: глутарового альдегида или дженипина происходит прежде всего с участием аминокрупп основных аминокислот и прежде всего, лизина, содержание которого в фиброине составляет всего 0,3-0,5 % мольн. Для сравнения – в хитозане первичная аминокруппа содержится практически в каждом элементарном звене. Концевые аминокруппы белка не всегда доступны для модификации, поэтому закономерным явился факт, что в условиях, приводящих к гелеобразованию хитозана в течение 40 минут добавление дженипина к эквиконцентрированному раствору фиброина не приводит к гелеобразованию, хотя и вызывает появление голубой окраски.

Была исследована кинетика гелеобразования в растворах фиброина в условиях полного депротонирования аминокрупп – при рН выше 7,0, т.е. в условиях, при которых получить раствор хитозана не представляется возможным. Зависимость времени гелеобразования в 2%-ном растворе фиброина, при рН 7,3 в процессе сшивки дженипином, от содержания сшивающего реагента представлена на рисунке 21 в сравнении с 2%-м раствором хитозана с рН 5,6.

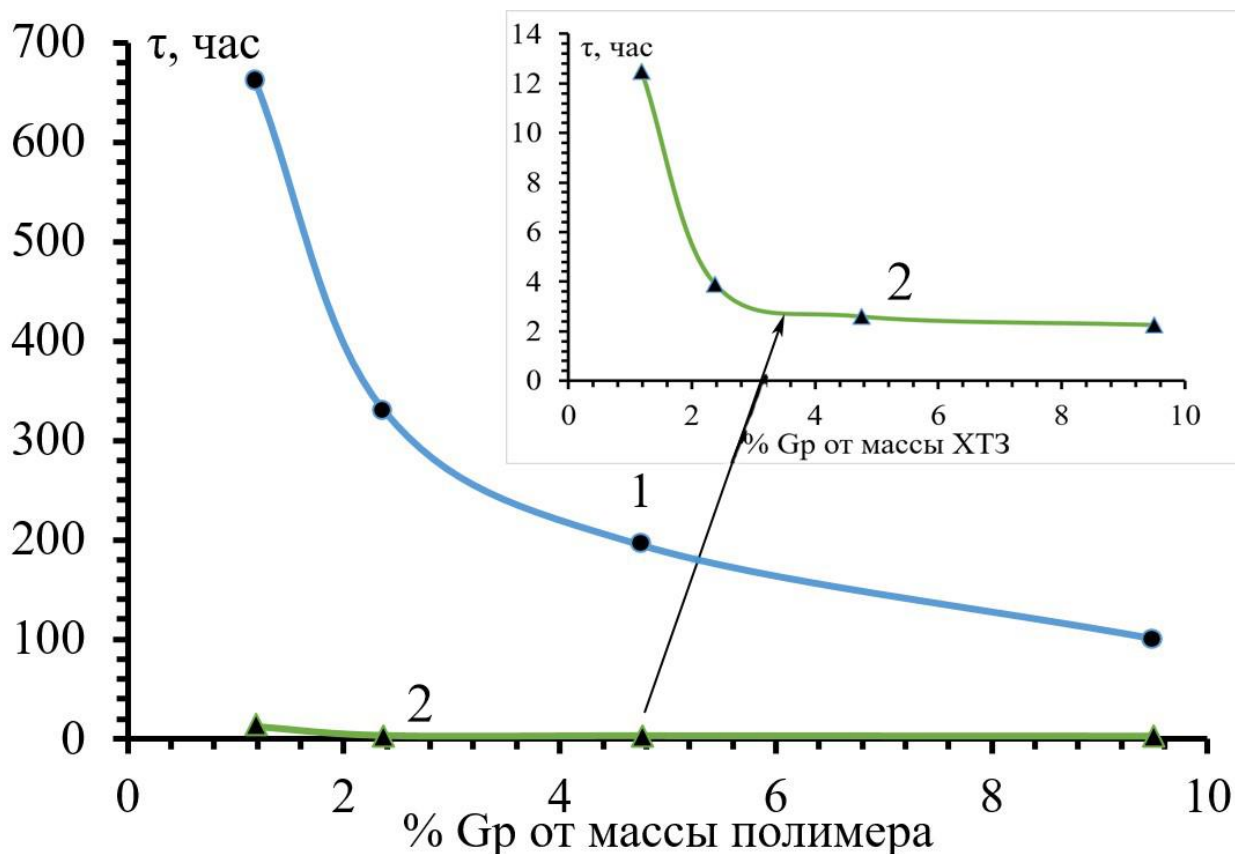


Рисунок 21 – Зависимость времени гелеобразования в 2%-ном растворе фиброина рН 7,3 (1) и хитозана рН 5,6 (2) в процессе сшивки дженипином от содержания сшивающего реагента.

Как видно из полученных данных, время гелеобразования в 2%-ном растворе фиброина даже при высоком содержании дженипина и рН 7,2 на порядки выше, чем в эквипонцентрированном растворе хитозана и составляет несколько суток. Это связано с низким содержанием первичных аминогрупп в молекуле фиброина.

Спектроскопическое исследование реакции сшивки фиброина дженипином.

Добавление раствора дженипина к раствору фиброина приводит к появлению новых полос поглощения в нескольких диапазонах видимой и ультрафиолетовой областей спектра. Это позволяет исследовать влияние условий сшивки на разные стадии реакции взаимодействия фиброина с Gr

Были получены электронные спектры поглощения раствора фиброина в

процессе сшивки дженипином. Спектры поглощения, записанные в интервале 0-7 ч представлены на рис. 22.

Во всех спектрах обнаружены полосы поглощения в нескольких диапазонах видимой и ультрафиолетовой областей спектра, соответствующие:

- 1) поглощению гетероцикла дженипина (240 нм);
- 2) 287 и 360 нм – длинноволновому $n-\pi^*$ переходам хромофора, образующегося при внедрении азота первичной аминогруппы в гетероцикл дженипина;
- 3) содержащим сопряженные связи олигомерным формам дженипина, присоединенного к биополимеру (610 нм).

Выраженный синий цвет растворов фиброина, сшитого Gr, и соответствующая ему область поглощения в районе 610 нм, является результатом индуцированной кислородом воздуха реакцией олигомеризации дженипина, протекающей после образования связи между первичной аминогруппой и Gr.

Похожая форма спектров ранее наблюдалась при исследовании реакции с дженипином в растворах хитозана [146], что свидетельствует о тождественном наборе хромофорных групп в рассматриваемых образцах и указывает на одинаковую природу химических реакций, протекающих при сшивке хитозана и дженипина.

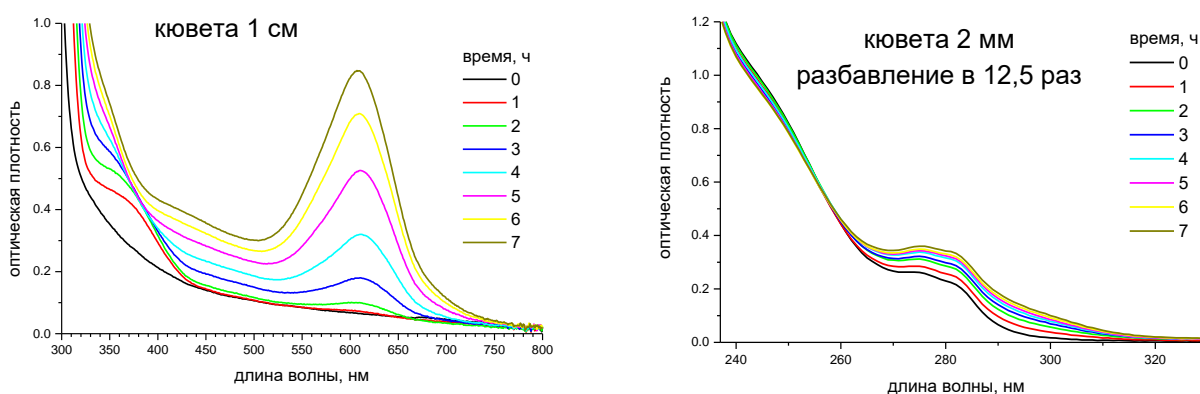


Рисунок 22 – Кинетика изменения спектров поглощения в растворе фиброина в процессе реакции с дженипином.

Для дальнейшего анализа были выбраны полосы поглощения: 240 нм (полоса поглощения гетероцикла дженипина), интенсивность которой уменьшается по мере расходования реагента, 287 нм (рост пика при 280-290 нм свидетельствует об увеличении степени связывания Gr с фиброином), 360 нм (появляется на начальном этапе сшивки и относится к первичной реакции дженипина с фиброином) и 610 нм (соответствует вторичной реакции сшивки, приводящей к росту длины сшивок и завершению реакции) (рис. 23).

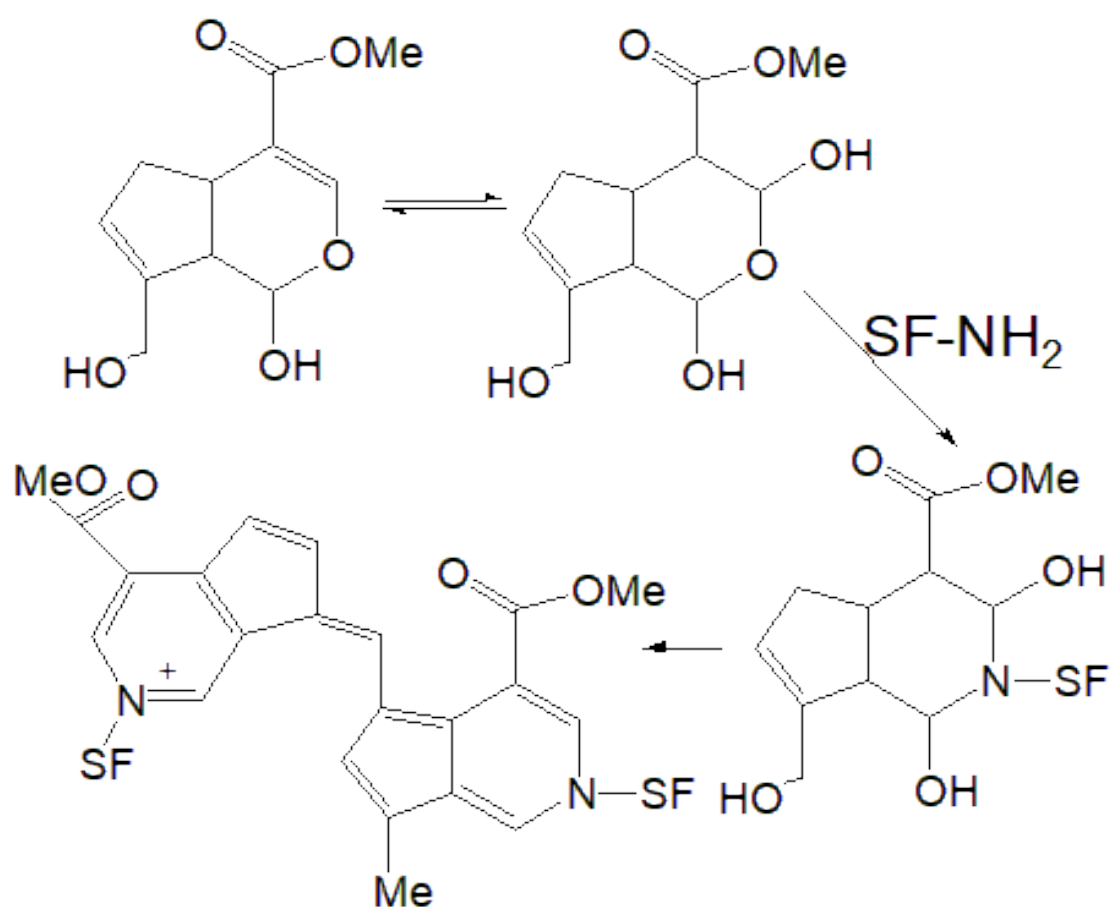


Рисунок 23 – Механизм сшивки фиброина сшивающим реагентом дженипином.

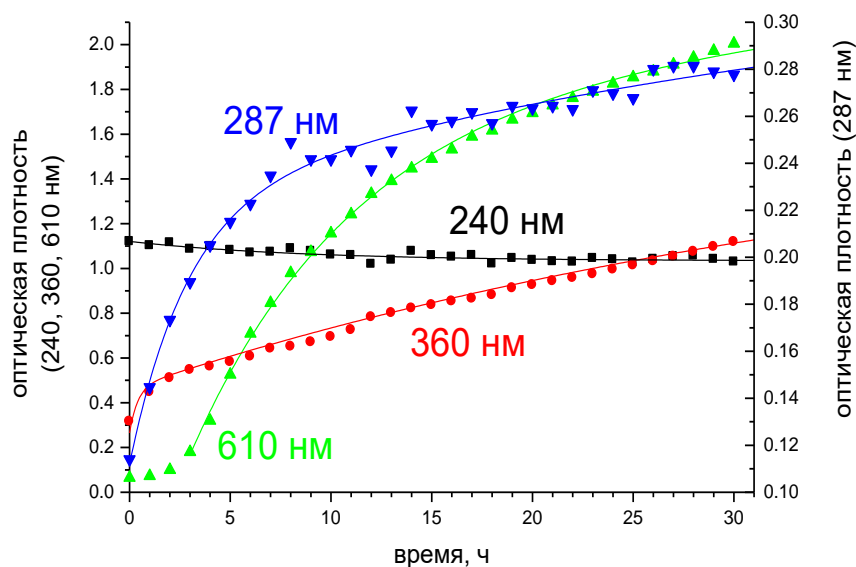


Рисунок 24 – Кинетические зависимости интенсивности характеристических полос поглощения в растворе фиброина в процессе реакции с дженипином.

Представленные данные по динамике роста полос (рис. 24) показывают следующее.

Происходящие изменения аналогичны наблюдаемым ранее на хитозане.

Процесс сшивки может быть условно разделен на 3 этапа:

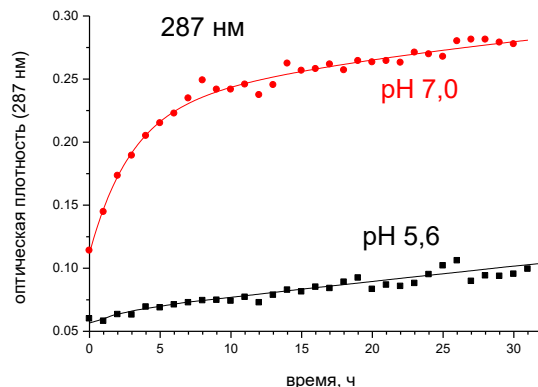
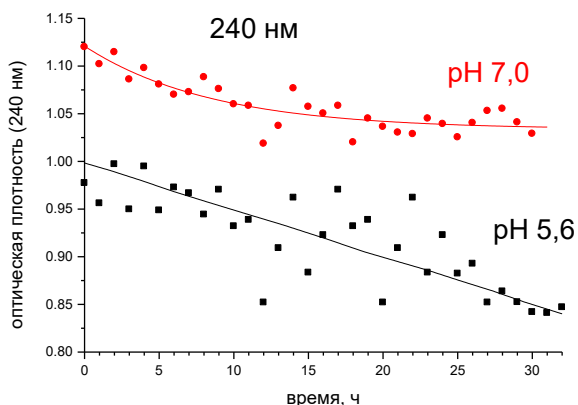
1 этап (0-4 ч). Снижение интенсивности полосы поглощения 240 нм, активный рост полос поглощения 287 нм и 360 нм, полоса 610 нм начинает медленно расти только после индукционного периода. На этом этапе полоса 360 нм в спектре четко прослеживается.

2 этап (4-10 ч). Интенсивность полосы 240 нм продолжает снижаться с уменьшающейся скоростью, полоса 287 нм также растет с понижающейся скоростью, полоса 360 нм становится все менее четко выражена, наблюдается активный рост полосы поглощения 610 нм.

3 этап (10-30 ч). Интенсивность полосы поглощения 240 нм практически не изменяется, полосы поглощения 287 нм и 360 нм непрерывно растут с медленной скоростью, полоса 610 нм растет с понижающейся скоростью.

Если предположить, что механизм взаимодействия фиброина с дженипином аналогичен механизму реакции с хитозаном, то полосы поглощения можно отнести следующим образом. Образующиеся полосы с максимумами 287 нм и 360 нм относятся к первичной реакции дженипина с фиброином, а полоса с максимумом при 610 нм – ко вторичной. Первичная реакция активно протекает в течение 10-ти часов, затем замедляется. Она сопровождается расходом дженипина. Вторичная реакция, которая завершает процесс, начинается после образования достаточного количества продуктов первичной реакции (примерно через 4 ч) и протекает с высокой скоростью до 10 ч, после чего продолжается с меньшей скоростью в течение всего времени наблюдения. Вероятнее всего, хромофоры, образующиеся при вторичной реакции, также имеют широкие слабые полосы поглощения и в коротковолновой области, которые перекрываются с полосами 287 нм и 360 нм и отвечают медленному росту последних на этапе вторичной реакции.

Снижение pH до 5,6 (максимальное значение, при котором растворы хитозана еще прозрачны и при котором была исследована реакция его сшивки дженипином [146]) приводит к резкому снижению скорости изменения интенсивности полос поглощения, соответствующих как продуктам первичной и вторичной реакций фиброина и дженипина, так и скорости расходования дженипина (при 240 нм).



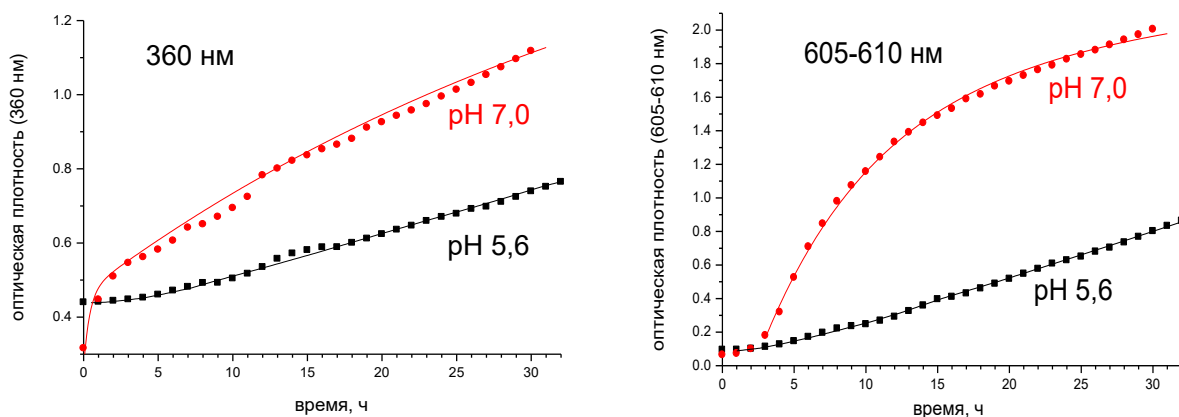


Рисунок 25 – Влияние pH раствора фиброина на кинетику изменения интенсивности характеристических полос поглощения процессе реакции с дженипином.

Таким образом, установлено образование продуктов взаимодействия Gr с первичными аминогруппами фиброина, поглощающими электромагнитное излучение в тех же областях, что и продукты реакции Gr с хитозаном, описанные нами ранее [146], однако скорость гелеобразования в растворах фиброина значительно ниже, чем в растворах хитозана. Этот факт накладывает определенные ограничения на возможность и условия получения не растворимых в воде материалов на основе фиброина.

3.3 Получение не растворимых в воде материалов из растворов фиброина

Полученные в предыдущей главе результаты исследования концентрационной зависимости вязкости растворов фиброина (рисунок 17) позволили выбрать для изучения возможности получения волокнистых материалов методом электроформования и широкопористых криоструктуратов концентрации водных растворов фиброина 10, 20, и 30%.

3.3.1 Получение волокнистых материалов методом электроформования из растворов фиброина

На рис. 26 приведены кинетические кривые изменения вязкости растворов фиброина в процессе сшивки дженипином при одинаковом

содержании сшивающего реагента 10,9% от массы фиброина в широком диапазоне концентраций фиброина, полученные на вибрационном вискозиметре.

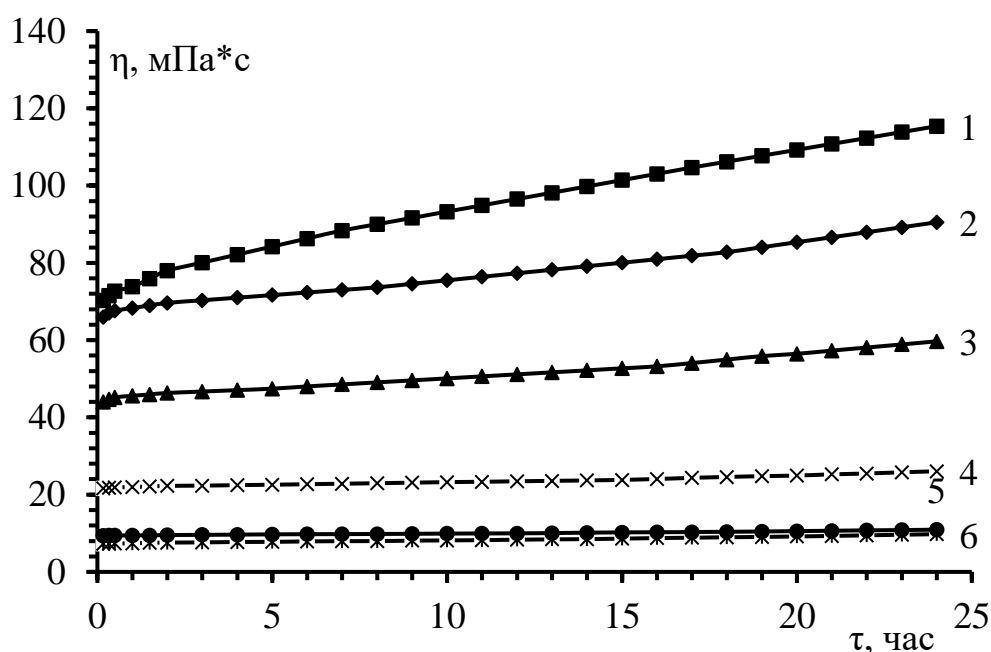
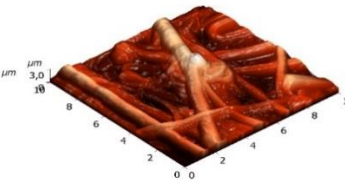

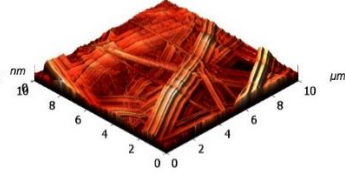
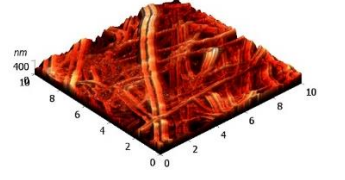


Рисунок 26 – Кинетика изменения вязкости в растворах фиброина в процессе сшивки дженипином. Концентрация раствора: 1 – 40 %; 2 – 30 %; 3 – 20 %; 4 – 10.%; 5 – 5 %; 6 – 2 %.

В течение 24 часов заметное изменение вязкости происходило только, начиная с концентрации 10%. Однако изменение цвета до зеленого или голубого (в зависимости от концентрации раствора) происходило, что свидетельствует о начале протекания вторичной реакции с образованием продукта, поглощающего в диапазоне $\lambda=600$ нм. Обнаруженное появление окраски в формовочном растворе может служить индикатором возможности проведения процесса формования в условиях, когда еще не происходит резкого роста вязкости, но первичная реакция уже произошла.

Растворы с концентрацией 10-30% были использованы для получения волокнистых материалов методом электроформования. Условия получения волокон приведены в таблице 7.

Таблица 7 – Условия электроформования волокон из водных растворов фиброина*.

№ п/п	Концентрация раствора фиброина, %	Содержание дженипина, % о	Напряжение электроформования, кВ	Характеристика процесса формования	АСМ-изображение
1	10	0	22,2-25,8	Стабильное	
2	20	0	23,0-26,4	Стабильное	
3	30	0	19,1-25,0	Прерывистое	-
4	10	5,45	Стабильное		
5	20	5,45	23,0-27,0	Стабильное	
6	30	5,45	19,0-25,0	Прерывистое	-

*После формования волокнистые материалы, не содержащие сшивающий реагент, обрабатывали раствором 80%-ным раствором этанола.

Условия получения волокон, модифицированных сшивкой дженипином, практически не отличались от полученных из растворов, не содержащих сшивающего реагента, кроме обработки этанолом готового волокна.

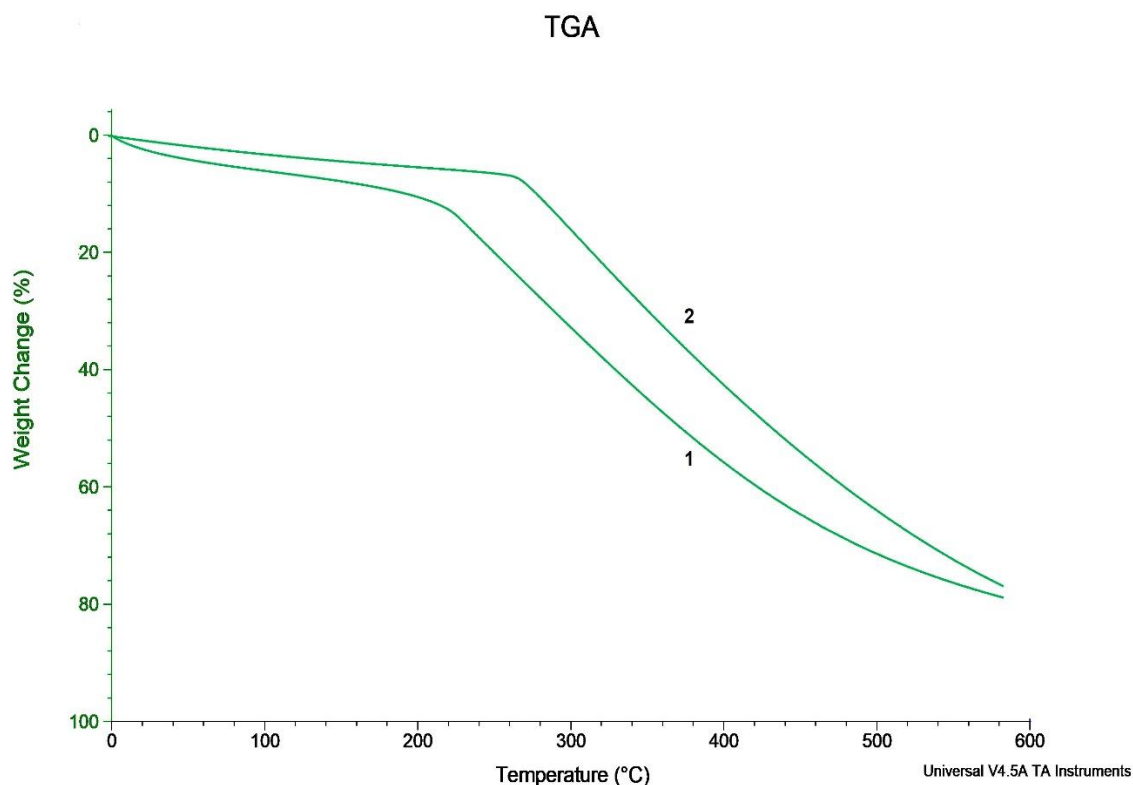


Рисунок 27 – Термограмма волокнистого материала из фиброина: 1 – без модификации; 2 – модифицированного спиртом.

На рисунке 27 представлена термограмма фиброина и фиброина, обработанного этанолом. Обработанные этанолом волокна теряют массу медленнее, и деструкция начинается при более высокой температуре. Это объясняется повышенным содержанием β -складчатых структур в волокнистой матрице модифицированного образца, индуцированных обработкой в спирте.

Для определения физико-механических характеристик полученных материалов был разработан метод оценки адгезионной прочности элементарного волокна методом АСМ.

Разработка метода определения физико-механических свойств элементарных волокон фиброина и хитозана методом АСМ

Для изучения многих физико-механических показателей сформованных нановолокон возможно использовать контактный метод получения изображений на АСМ. Используя данный метод, возможно измерить напряжение и деформации на отдельных волокнах, предел максимального

растяжения, упругость (предел упругости), жесткость и многие другие показатели.

В ряде исследований используют многочастотную атомно-силовую микроскопию (АСМ) в качестве инструмента для извлечения количественной вязкоупругой информации о полимерных системах [149, 150]. Используя этот подход, исследователи приводят доказательства того, что нано- и макро-размерные полимерные материалы обладают как эластичными, так и вязкими свойствами.

Так же АСМ используют для характеристики механических свойств некоторых нановолокон. Например, в исследовании [151] использовали комбинированный метод атомно-силовой микроскопии и оптической микроскопии для определения ключевых механических свойств отдельных нановолокон поли-ε-капролактона диаметром от 440 до 1040 нм.

До настоящего времени отсутствуют сведения об использовании метода АСМ для исследования свойств, полученных электроформованием волокнистых материалов и ультратонких волокон биополимеров. С целью разработки метода определения физико-механических свойств элементарных волокон фиброина и хитозана методом АСМ был использован кантилевер с повышенным коэффициентом жесткости, позволяющий визуализировать топографию отдельно взятого волокна и проводить физико-механические исследования одновременно.

Были получены значения ΔHeight для волокон различного состава. На рис. 28-31 представлена компьютерная обработка отдельно взятого волокна. По формуле (14) рассчитаны силы адгезии кантилевера от поверхности волокна и волокна от подложки. Результаты представлены в табл. 8.

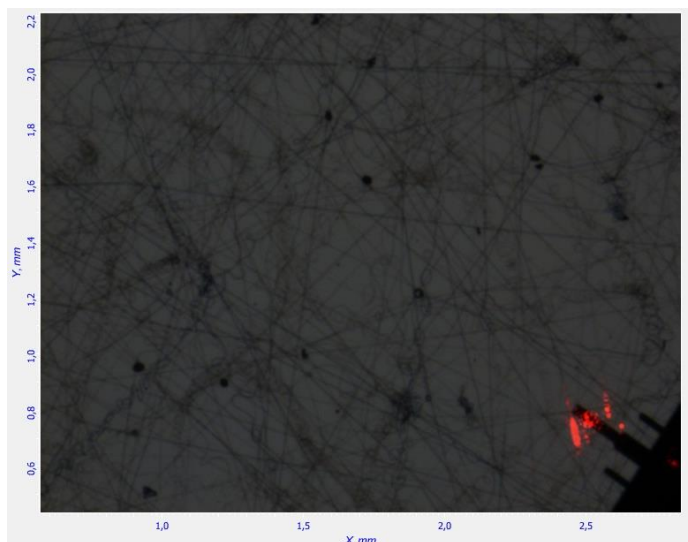


Рисунок 28 – Подвод кантилевера к образцу. Оптический микроскоп, увеличение 12х.

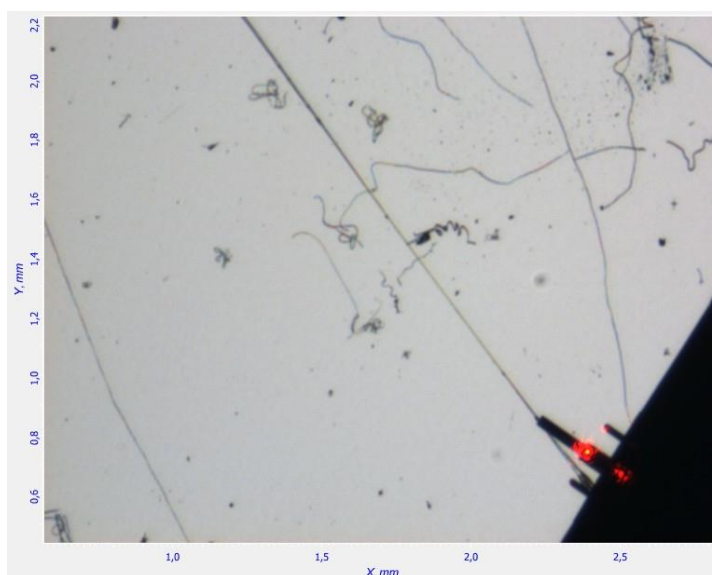


Рисунок 29 – Подводка кантилевера к отдельному волокну для определения сил адгезии.

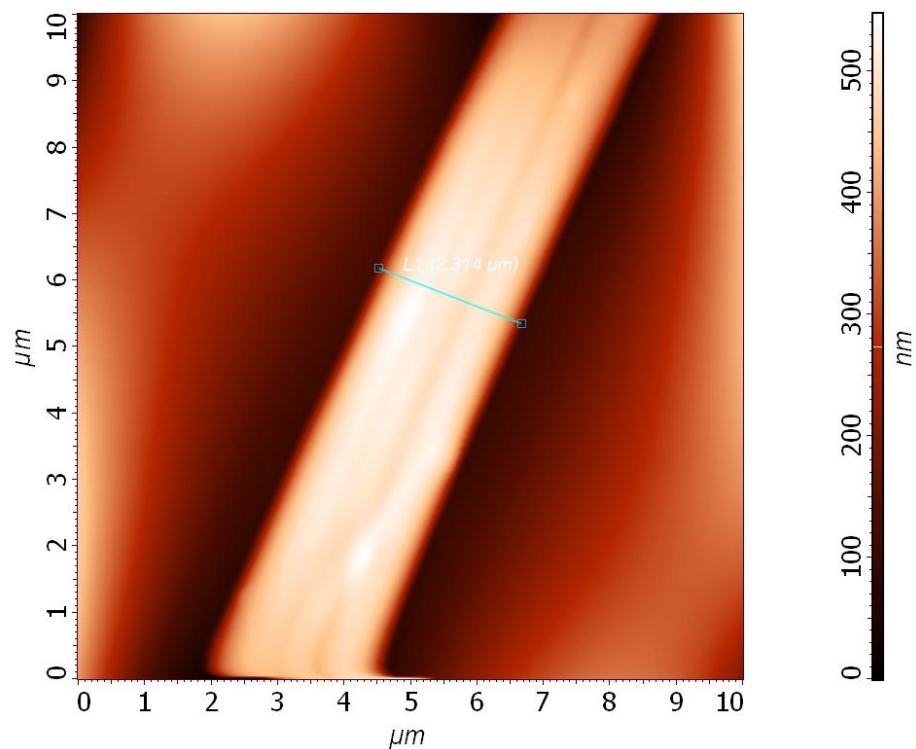


Рисунок 30 – АСМ-изображение в контактном методе работы кантилевера. Определение толщины волокна. Волокно фиброин:хитозан, 5:1, без химической модификации.



Рисунок 31 – Изменения сигнала DFL, в момент отрыва кантилевера от образца.

Полученные результаты позволяют проследить влияние состава формовочной смеси и количества сшивающего реагента на физико-

механические свойства волокон из фиброина и его смесей с хитозаном (табл. 13). В первую очередь, прослеживается зависимость от степени сшивки. Сшитые материалы обладают худшими механическими свойствами, по сравнению с немодифицированными реагентом дженипином. Данный факт подтверждается литературными данными о хрупкости и малой механической стойкости сшитых дженипином материалов [146, 152-155]. Состав волокон и концентрации формовочных композиций так же напрямую влияют на физико-механические свойства. С повышением концентрации фиброина и добавлением в состав композиции хитозана, волокна теряют упругость, что может свидетельствовать об образовании комплексов между хитозаном и фиброином и включении их в структуру электроформованного материала.

Таблица 8 – Свойства волокнистых материалов из фиброина, полученных электроформованием.

№ п/п	Концентрация раствора фиброина, %	Содержание дженипина, %	Характеристики волокна			Характеристики материала	
			D волокон, мкм	Разрывное усилие, у.е.	Разрывное напряжение, кПа	Паропроницаемость, мг/(см ² *ч)	Гигроскопичность, %
1	10	0	1,05±0,10	159,3	1,84	2,8	6,4
3	20	0	2,80±0,20	255,2	0,41	2,9	6,2
5	30	0	4,20±0,21	316,5	0,23	4,1	6,0
6	10	5,45	1,60±1,50	165,5	0,78	3,2	6,0
8	20	5,45	3,00±0,20	284,7	0,42	3,9	6,0
10	30	5,45	4,18±0,21	335,3	0,24	4,1	6,1

Увеличение концентрации раствора привело к получению более толстых и менее прочных волокон (табл. 8), обладающих паропроницаемостью и гигроскопичностью около 6%, чего явно недостаточно для использования материалов в качестве раневых покрытий.

3.3.2 Получение сшитых дженипином широкопористых криоструктуратов из растворов фиброина.

Для получения пористых материалов на основе фиброина был использован способ, при котором сшивку дженипином проводили уже сформированных лиофильной сушкой водных растворов фиброина пористых материалов. Согласно этому способу получали растворы фиброина с концентрацией 10 и 20%, которые разливали в чашки Петри и выдерживали при температуре -10°C в течение тридцати минут. Далее, образцы в чашках Петри отправляли на лиофильную сушку на 18 часов. Высушенные таким образом образцы представляют собой легкие пластинки (рис. 32). После лиофильной сушки, образцы погружали в 10%-ый раствор дженипина в этаноле на 24 часа, таким образом, получали сшитые дженипином криоструктураты.

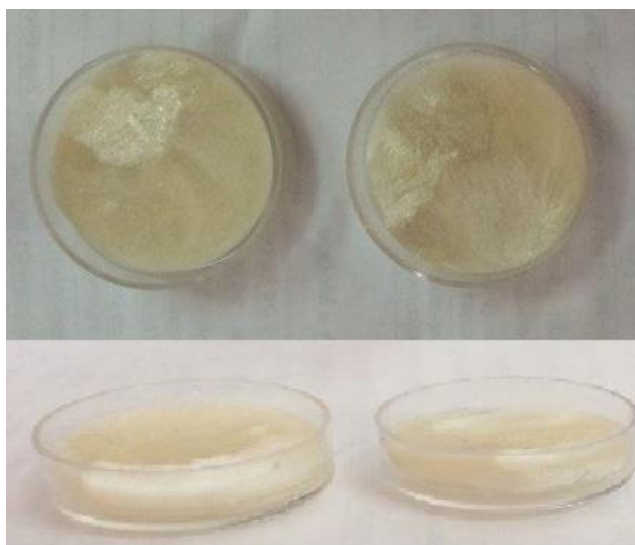

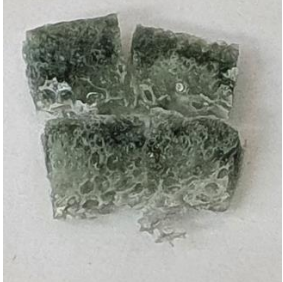


Рисунок 32 – Образцы фиброина после лиофильной сушки 20 и 30%-ных растворов.

Поверхность и внутренняя структура полученных матриксов была исследована методами оптической и конфокальной лазерной микроскопии.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что полученные материалы обладают системой взаимопроникающих пор, размер которых можно изменять, меняя концентрацию раствора хитозана (таблица 9).

Таблица 9 – Морфология поверхности криоструктуратов фиброина, сшитых дженипином.

Концентрация раствора фиброина	Внешний вид образца	Оптическая микроскопия поверхности	Конфокальная микроскопия
20			
30			

Полученные криоструктураты не растворялись в воде. Отсутствие растворимости обеспечивалось как переводом фиброина в β -конформацию, так и химической сшивкой дженипином, которая протекала в спиртовой среде.

3.4 Изучение полимерных систем на основе смешанных растворов фиброина и хитозана.

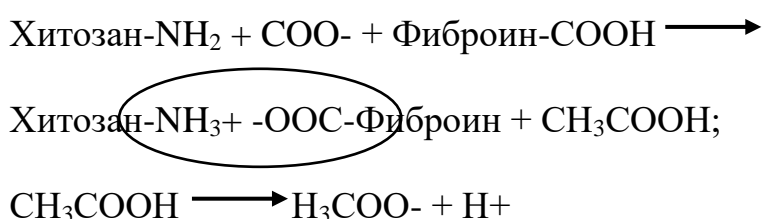
Для ускорения реакции сшивки, приводящей к образованию нерастворимых в воде материалов биомедицинского назначения, а также с целью разработки волокнистых материалов, имитирующих внеклеточный матрикс - естественную среду организма, состоящий из полисахаридов и белков, было предложено использовать фиброин-содержащие системы на основе растворов хитозана.

Полученные из полисахаридов и белков волокнистые материалы, имитируют естественную среду организма и таким образом обеспечивают оптимальные условия для роста и регенерации тканей.

Для получения полимерных материалов на основе хитозана и фиброина путем растворения фиброина в растворах хитозана в 2%-ной уксусной кислоте были приготовлены смешанные растворы биополимеров в общем растворителе.

3.4.1 Изучение кислотно-основных свойств смешанных растворов хитозана и фиброина

В водном растворе уксусной кислоты хитозан находится в виде уксуснокислой соли, а в самом растворе содержится некоторое количество свободной уксусной кислоты, которая, диссоциируя на ионы, вносит вклад в показатель pH раствора хитозана. Комплексообразование хитозана и фиброина можно представить следующей схемой:



С целью изучения влияния фиброина на кислотно-основные свойства хитозана было изучено влияние состава формовочного раствора на положение точки эквивалентности при потенциометрическом титровании. С повышением концентрации биополимеров в растворе закономерно увеличивается объем щелочи, пошедший на титрование (рис. 33). При добавлении фиброина (кривые 1 и 2) уменьшается количество щелочи, пошедшей на титрование смешанного раствора хитозана и pH, соответствующее титрованию сопряженной кислоты (протонированных аминогрупп). Это указывает на образование полиэлектролитного комплекса, в результате которого число протонированных аминогрупп уменьшается.

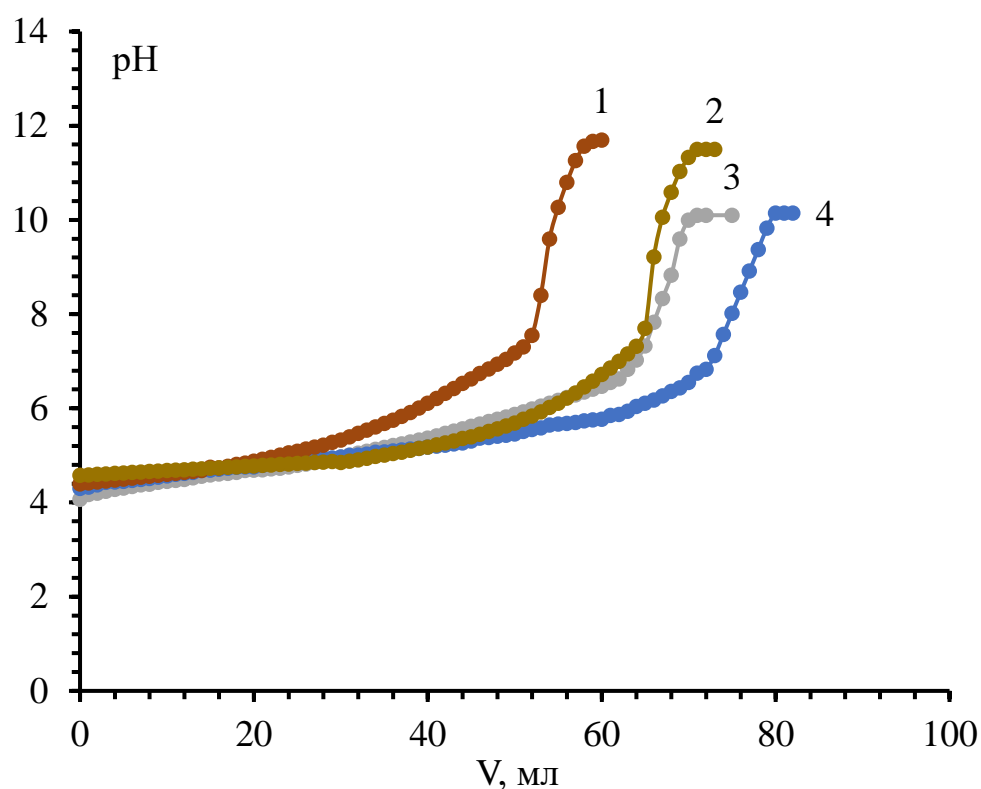


Рисунок 33 – Кривые титрования смешанных растворов хитозана и фиброина (1:1) с концентрацией хитозана 1 - 1% и 2 – 2% и раствора хитозана с концентрацией 3 - 1%, 4 – 2%.

Хитозан растворим в воде только в кислой среде, когда его первичные аминогруппы протонируются и макромолекула приобретает положительный заряд, поэтому получение пленок и других биополимерных матриц на основе хитозана возможно только из его раствора в водном растворе органической кислоты. В отличие от хитозана, дегуммированный фиброин растворим в всем диапазоне pH. Для получения нерастворимых в воде сшитых биополимерных пленок из фиброина и хитозана были использованы смешанные растворы хитозана и фиброина в разбавленной уксусной кислоте.

Изучение влияния на свойства формовочных растворов состава смешанного раствора хитозана и фиброина было изучено при одинаковой концентрации раствора биополимеров 2% (рис. 34).

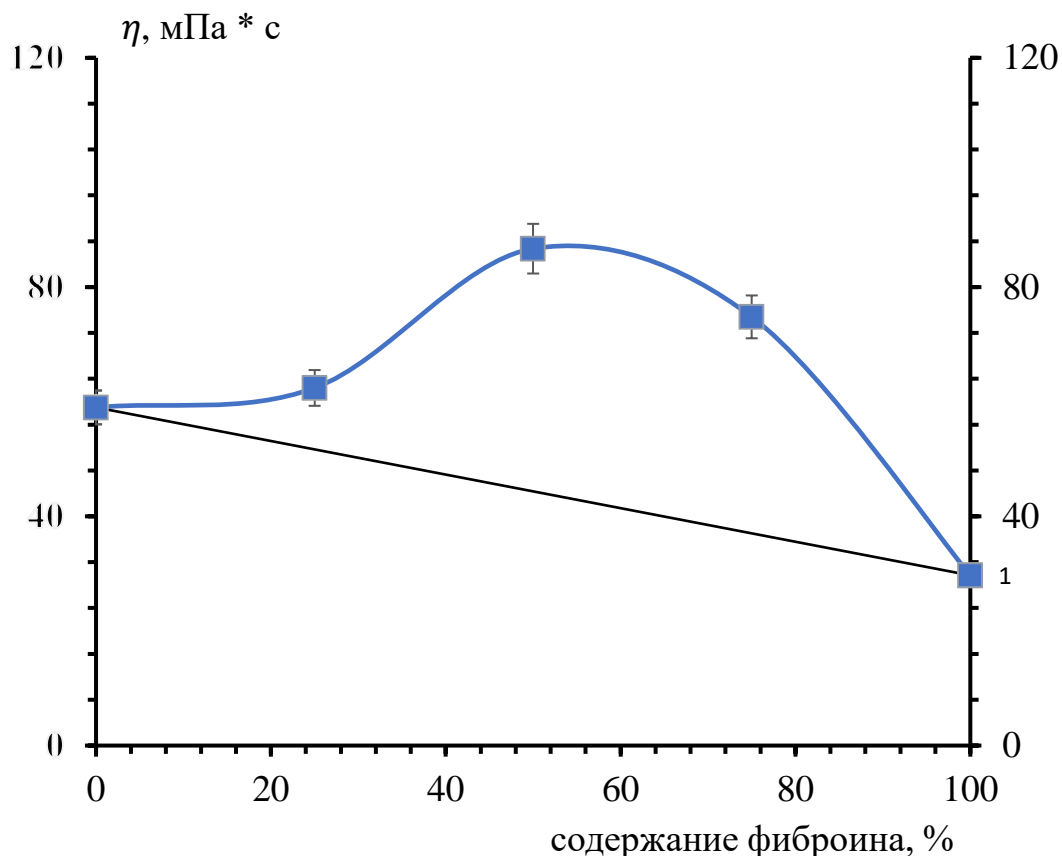


Рисунок 34 – Влияние содержания фиброина в смеси с хитозаном на вязкость 2%-го формовочного раствора.

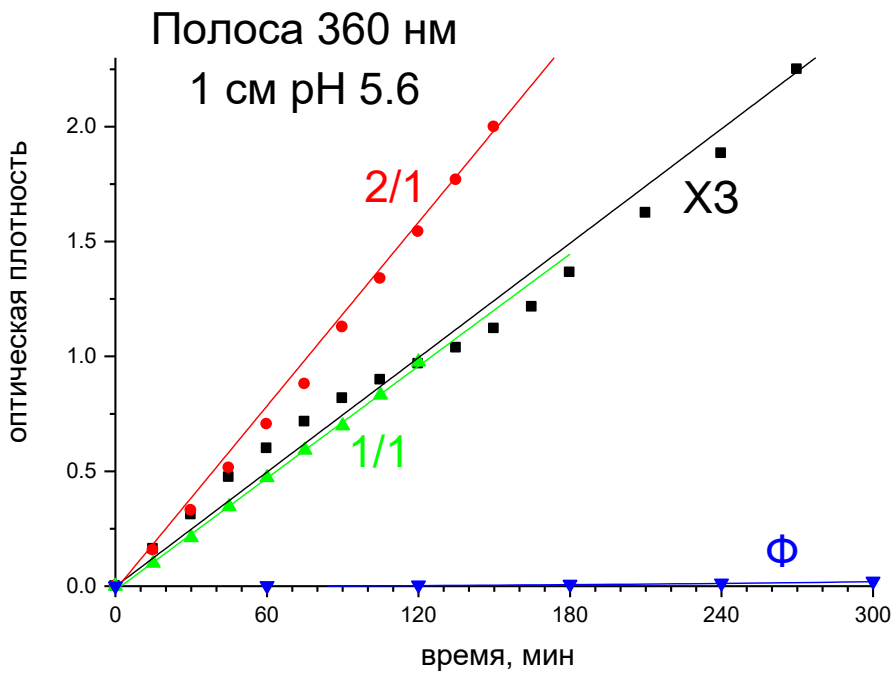
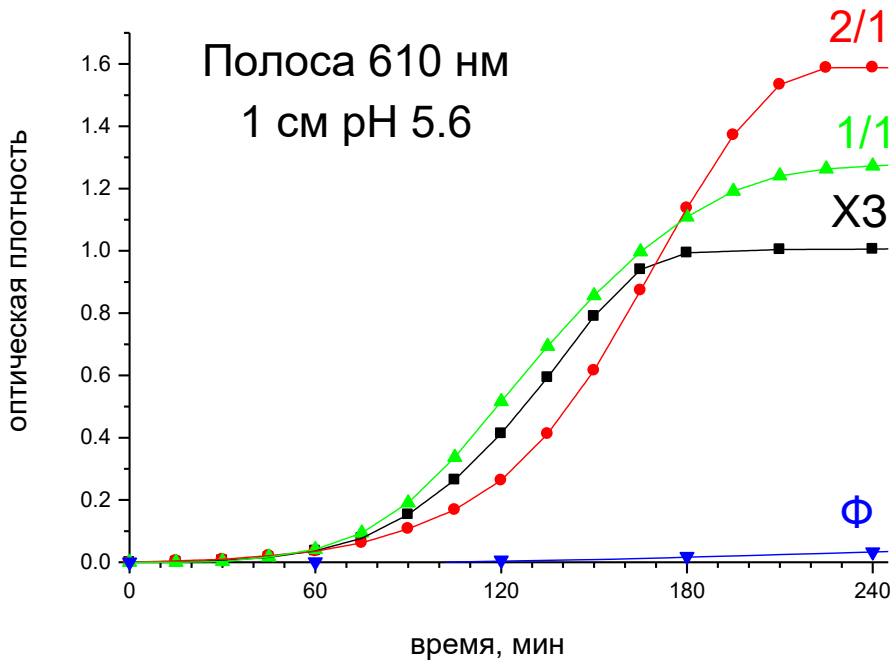
Результаты вискозиметрии указывают на вероятное комплексообразование хитозана и фиброина. При отсутствии взаимодействия между хитозаном и фиброином вязкость изменялась бы пропорционально содержанию более низковязкого компонента (фиброина). Из графика видно, что введение фиброина увеличивает вязкость раствора хитозана, причем вязкость растворов, содержащих фиброин, оказывается выше аддитивных значений. Это говорит о том, что в растворе происходит взаимодействие между хитозаном и фиброином, приводящее к увеличению объема конъюгата, по сравнению с глобулами индивидуальных полимеров. Это приводит к положительным отклонениям от аддитивности (рис. 34).

Светорассеяние растворов хитозана, содержащих фиброин даже при соотношении 1:1 и не содержащих белка, практически не отличалось, что обусловлено небольшим содержанием карбоксильных групп в фиброине по сравнению с числом аминогрупп в хитозане и, как следствие образованием комплексов нестехиометрического состава. Этот факт делает возможным проведение спектрофотометрических исследований процесса сшивки хитозана дженипином.

3.4.2 Спектральные и реологические исследования кинетики гелеобразования и сшивки в смешанных растворах хитозана и фиброина

С целью установления особенностей реакции сшивки хитозана и фиброина в их совместных растворах по сравнению с растворами индивидуальных аминоксодержащих полимеров была исследована кинетика изменения электронных спектров поглощения и вязкости реакционных смесей с разным содержанием фиброина в присутствии дженипина (соотношение хитозан-фиброин ХТЗ/ФБ 2:1 и 1:1) (рис. 35). Кинетика изменения вязкости в процессе сшивки дженипином была исследована при помощи вибрационного вискозиметра «SV-10A» производства «AND» (Япония) в открытой ячейке при постоянной температуре (рис. 36), кроме того были изучены зависимости времени гелеобразования в смешанных растворах биополимеров от содержания сшивающего реагента (рис. 37).

На рисунке 35 приведены кинетические зависимости оптической плотности для основных полос поглощения (287, 360, 610 нм) сшивки при pH 5,6.



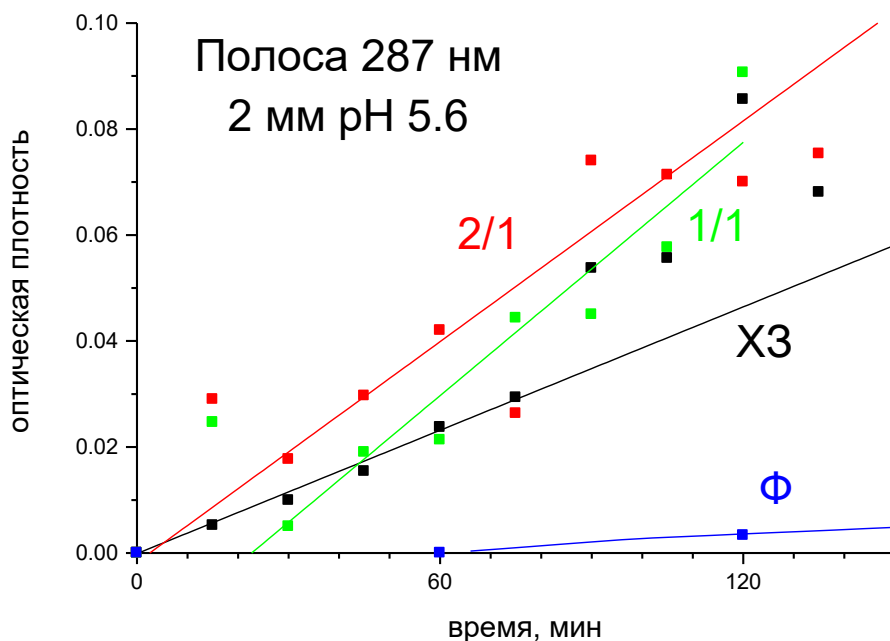


Рисунок 35 – Кинетика изменения интенсивности основных полос поглощения в процессе сшивки дженипином хитозана и фиброина при разных соотношениях при pH 5,6.

Как и для индивидуального раствора хитозана увеличение интенсивности полосы 610 нм в растворах хитозана, содержащих фиброин, имеет несколько участков: отсутствия роста оптической плотности (индукционный период, совпадающий по продолжительности с периодом постоянной вязкости), малой скорости (за счет накопление первичных продуктов присоединения дженипина) и почти линейного роста оптической плотности (рис. 35) (образование продуктов второй стадии реакции - олигомеризации дженипина в конечном продукте реакции сшивки) и (при симбатном росте вязкости (рис. 36), который прекращается в момент формирования вязко-упругого геля при разном содержании продукта реакции.

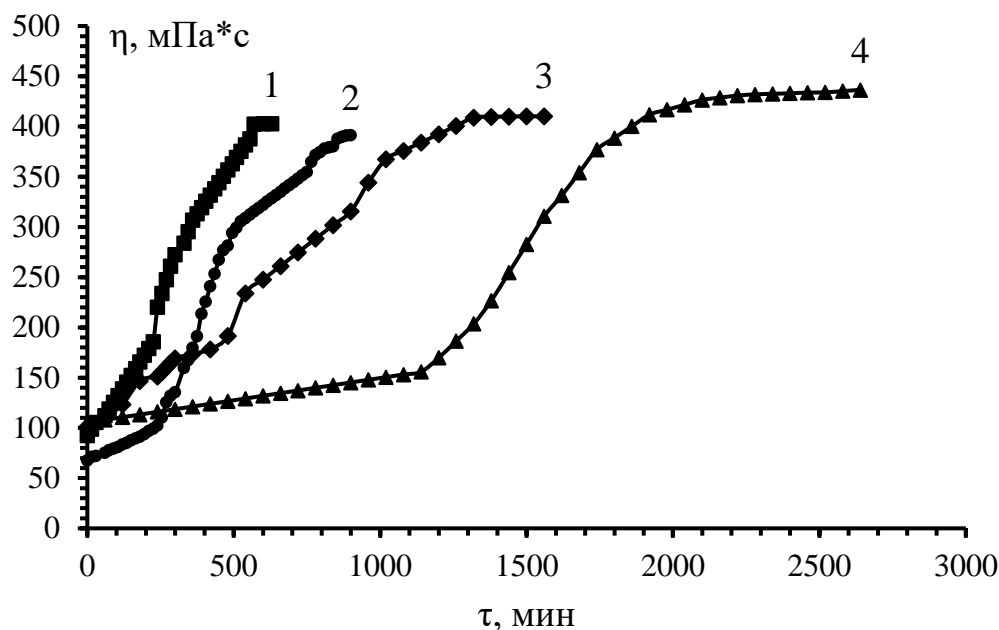


Рисунок 36 – Кинетика гелеобразования в 2% растворах хитозана и хитозана с фиброином (1:1), 1 – хитозан, соотношение Дж/NH₂ 0,08 моль/моль; 2 – хитозан/фибруин (1:1), Дж/NH₂ 0,08 моль/моль; 3 – хитозан, 0,02 моль/моль; 4 – хитозан/фибруин (1:1), 0,02 моль/моль.

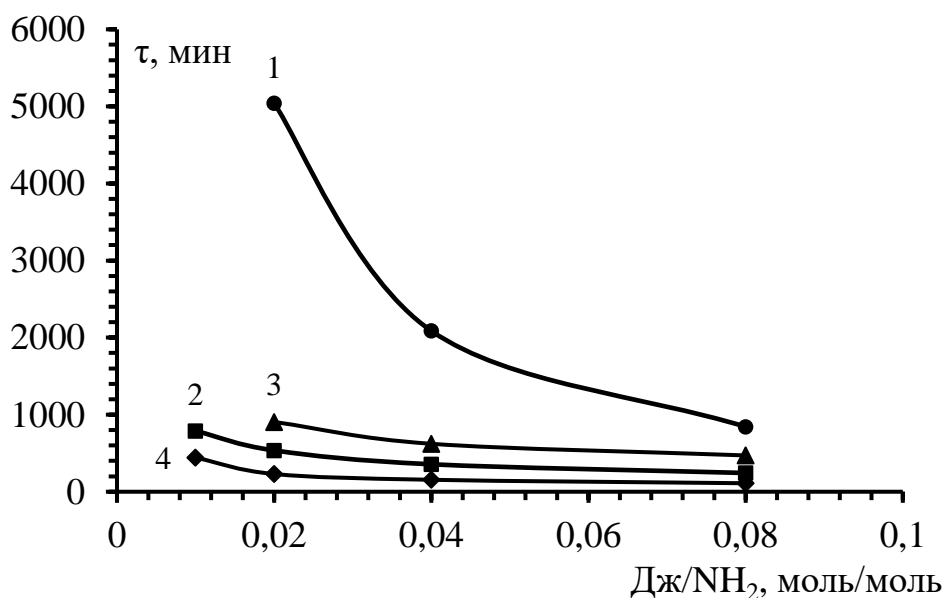


Рисунок 37 – Зависимость времени гелеобразования в 2%-ных растворах хитозана и хитозана с фиброином (1:1) от соотношения Дж/NH₂, 1 – хитозан/фибруин (1:1), рН 4,17; 2 – хитозан/фибруин (1:1), рН 5,6; 3 – хитозан, рН 4,2; 4 – хитозан, рН 5,6.

Было показано, что добавление фиброина к хитозану вопреки ожиданиям увеличивает время гелеобразования (рис. 37). В предыдущей главе было установлено, что индукционный период реакции сшивки фиброина и хитозана, детектируемый по стадии роста интенсивности синей окраски, различается в 3 раза, однако добавление фиброина к хитозану вопреки ожиданиям лишь немного увеличивает время длительность инкубационного периода и неоднозначно влияет на интенсивность поглощения продукта реакции после ее окончания (рис. 35), что связано с влиянием на скорость процесса двух противоположных факторов – некоторого увеличения числа аминогрупп (фиброин содержит не более 1 % аминокислотных остатков, содержащих первичные аминогруппы) и появления стерических затруднений протеканию вторичной реакции, приводящей к сшивке хитозана.

Увеличение времени гелеобразования при добавлении фиброина можно также объяснить образованием ПЭК. За счет комплексообразования снижается количество аминогрупп, доступных для сшивки. При небольшом содержании дженипина разница между временем гелеобразования раствора хитозана и хитозана с фиброином становится значительнее (рис. 36, кривые 3, 4). При значении $pH=4,2$ присутствие фиброина в исследуемом растворе оказывает более сильное влияние на время сшивки (рис. 37, кривые 1 и 2), чем при $pH=5,6$, так как в реакцию комплексообразования с фиброином вступают протонированные группы хитозана, число которых выше при $pH 4,2$. При $pH 4,2$ заметен резкий скачок в росте вязкости (рис. 36). Установлено, что индукционный период реакции сшивки фиброина и его смесей с хитозаном, детектируемый по стадии роста интенсивности синего цвета и роста вязкости, в ходе реакции сшивки составляет около 5 часов, что в 3 раза превышает продолжительность первой стадии реакции с хитозаном (в аналогичных условиях проведения).

Установленная возможность управлять индукционным периодом путем изменения композиционного состава позволит регулировать время

структурирования и гелеобразования в формовочных растворах при получении волокон и пленок, содержащих аминокислотосодержащие полимеры.

Проведенные исследования определяют перспективы модификации волокнообразующих полимеров в формовочном растворе, которые обеспечивают продолжительный период постоянной вязкости, что позволит сохранить их способность к пленко- или волокнообразованию в электрическом или силовом поле, но формируют после завершения реакции сшивки устойчивость полимерного материала к водной среде.

3.5 Разработка биополимерных материалов на основе хитозана и фиброина

Получение биополимерных пленок, волокон или гидрогелей из смесей фиброина с хитозаном позволяет сочетать известные структурные характеристики фиброина шелка (прочность, эластичность) и биосовместимость хитозана. В настоящей главе полимерные системы на основе растворов фиброина и хитозана были использованы для получения биологически активных пленок, пористых криоструктуратов, полученных электроформованием нетканых волокнистых материалов и моноволокон, сформованных по «мокрому способу» путем коагуляции в осадительной ванне. Для регулирования влагопоглощения и предотвращения растворимости в воде использовали сшивку природным сшивающим реагентом дженипином и обработку этанолом в условиях, установленных в исследованиях, описанных в главах 3.1 и 3.4.

3.5.1 Получение биологически-активных пленок на основе фиброина и хитозана, модифицированных дженипином

Контролируемая система доставки лекарств на основе полимерных материалов, постепенно высвобождающих лекарственные вещества, призвана доставить лекарство в определенное место с заданным кинетическим профилем. Постоянный уровень препарата в крови, низкая токсичность и длительное высвобождение препарата, позволяющее избежать многократных доз являются основными задачами при разработке систем контролируемой

доставки [156]. Для регулирования растворимости, гидрофобизации хитозановых пленок, содержащих фиброин, и пролонгирования скорости высвобождения биологически активного вещества использована сшивка дженипином и изучено влияние состава формовочного раствора на растворимость, степень набухания и фармакодинамические свойства пленок.

Нативный фиброин содержит, в основном, только концевые аминокислотные группы и взаимодействие с дженипином не приводит к гелеобразованию в его растворах. Однако, учитывая показанную нами возможность образования водорастворимых комплексов с хитозаном, можно предположить, что сближение функциональных групп при комплексообразовании в их смешанных растворах приведет к увеличению вероятности столкновения реакционноспособных групп фиброина с молекулами сшивающего реагента и включению макромолекул белка в пространственную сетку геля.

Для изучения влияния растворимости и степени набухания пленок из хитозана, содержащих фиброин, была получена серия образцов пленок из хитозана и смеси хитозана и фиброина, содержащая различные количества сшивающего реагента (табл. 10). Пленки получали методом полива на чашки Петри смеси 2% раствора хитозана в 2%-ной уксусной кислоте, а также 2% раствора хитозана, содержащего фиброин в соотношении 1:1. Пленку отделяли от подложки после того, как растворитель полностью испарился (сушили до постоянной массы).

Таблица 10 – Состав пленок на основе хитозана, сшитого дженипином, содержащих фиброин.

Номер образца	Пленкообразующие полимеры	соотношения Gp/NH ₂ , моль/моль
1	хитозан:фиброин 1:1	0
2	хитозан:фиброин 1:1	0,003
3	хитозан:фиброин 1:1	0,005
4	хитозан:фиброин 1:1	0,01
5	хитозан:фиброин 1:1	0,02
6	хитозан:фиброин 1:1	0,04

Пленка, которая содержит в своем составе фиброин высыхала на 5 часов дольше пленки только из хитозана. При этом пленка с фиброином имела более темную окраску, по сравнению с пленкой из чистого хитозана (рис. 38). Синяя окраска пленок, сшитых дженипином обусловлена возникновением сопряженных двойных связей в процессе взаимодействия дженипина с аминогруппами. Вероятно, увеличение интенсивности синей окраски связано с увеличением концентрации сопряжений, что косвенно указывает на вовлечение фиброина в процесс химической сшивки при получении пленки.



Рисунок 38 – Пленки, полученные из 2 %-го смешанного раствора хитозана и фиброина (1:1), содержащего дженипин при разных соотношениях Gp/NH_2 , моль/моль: 1 - 0,04; 2 - 0,02; 3 - 0,01; 4 - 0,003.

Исследование растворимости и степень набухания модифицированных пленок из фиброина и хитозана.

Фиброин, по сравнению с хитозаном, в своем строении имеет небольшое количество свободных аминогрупп, поэтому неочевидно, что при сшивке фиброин способен включаться в трехмерную сетку геля. Кинетику растворимости пленок изучали в течении 3 суток. Набухание является первой стадией растворения, исследование процесса набухания в воде хитозановых пленок, содержащих фиброин в эквимассовом соотношении, проводили в зависимости от соотношения дженипин/ NH_2 хитозана.

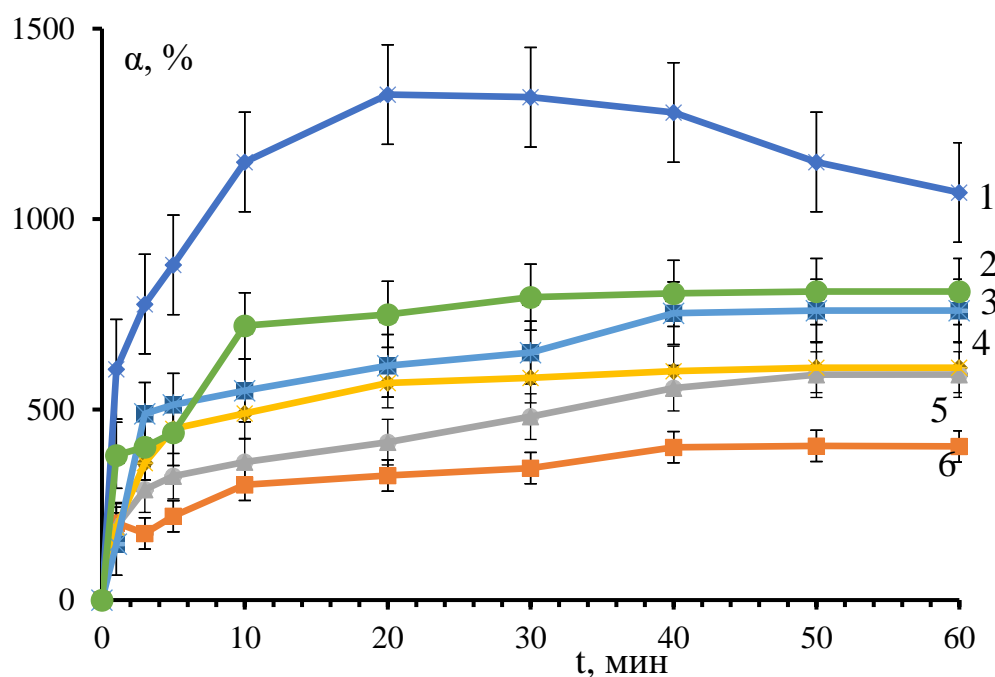


Рисунок 39 – Зависимость степени набухания от времени сшитых пленок из хитозана и фиброина 1:1 с соотношением сшивающего реагента/ NH_2 : 1 – 0; 2 – 0,003; 3 – 0,005; 4 – 0,01; 5 – 0,02; 6 – 0,04 моль/моль.

Из графика, представленного на рисунке 39, видно, что скорость набухания, а также максимальная степень набухания, увеличивается при уменьшении количества сшивающего реагента. Несшитая пленка (кривая 1, рис. 39) сначала набухает, а затем начинает терять массу (растворяться). Это связано с тем, что хитозан в пленках, полученных по сухому способу, находится в протонированной форме и хорошо растворим в воде.

Сшитые пленки (Рисунок 39, кривые 2-5) набухают значительно меньше, чем несшитая. В течение времени исследования 1 час данные пленки не растворяются и набухают до постоянной массы, увеличиваясь в размерах (рис. 40). Степень набухания уменьшается при увеличении соотношения G_p/NH_2

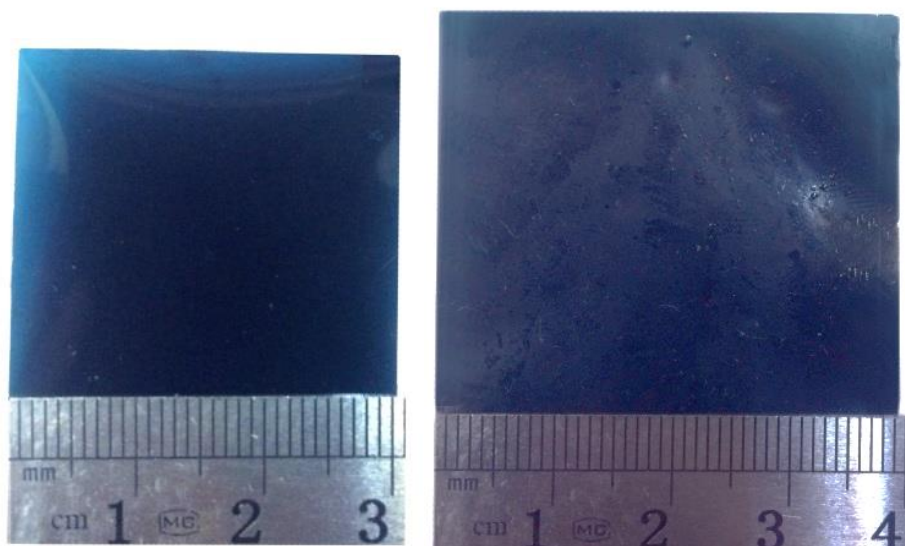


Рисунок 40 – Сшитая дженипином пленка до и после набухания в течение часа.

На рисунке 41 представлены кинетические кривые растворимости в воде хитозановых пленок, содержащих 50% фиброина.

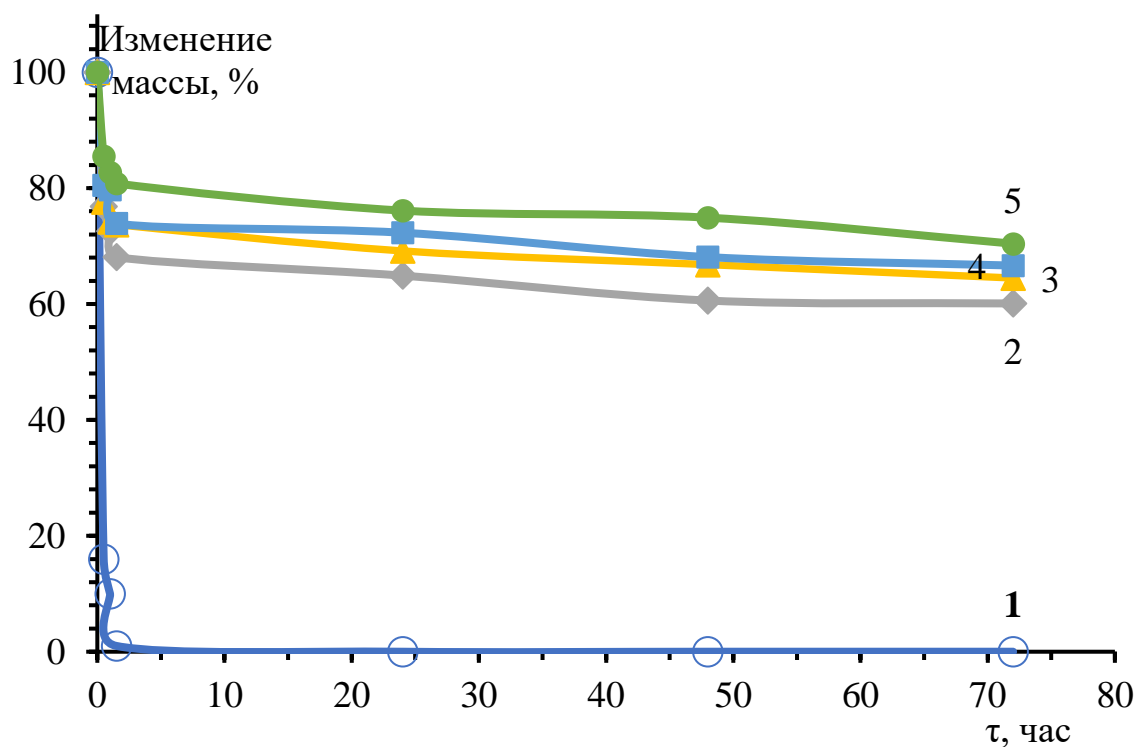


Рисунок 41 – Зависимость потери массы в воде от времени пленок из хитозана и фиброина с соотношением (1:1) и соотношением сшивающего реагента/ NH_2 : 1 – 0; 2 – 0,003; 3 – 0,005; 4 – 0,01; 5 – 0,04 моль/моль.

Из графика видно, что не сшитая пленка (кривая 1) растворяется полностью и теряет массу гораздо быстрее, чем пленки, содержащие сшивающий реагент. Свободные аминогруппы в растворе протонируются и со временем пленка полностью растворяется в воде.

Сшитые пленки (1-5) за трое суток полностью не растворились. Чем выше содержание сшивающего реагента, тем меньше у пленки растворимость. При степени сшивки 0,04 пленка, содержащая 50% фиброина теряет не более 25% массы.

Интересным является факт, что включение в состав пленок фиброина в количестве 50% от массы пленки слабо влияет на характер кинетических кривых потери массы в водных растворах. Пленки, содержащие фиброин с соотношением 1:1, теряют массу лишь немного быстрее, чем пленки из раствора хитозана (рис. 42). Все это подтверждает предположение о том, что образование водорастворимых ПЭК с хитозаном позволяет фиброину включиться в трехмерную структуру сшитого хитозана за счет образования ковалентных связей с дженипином.

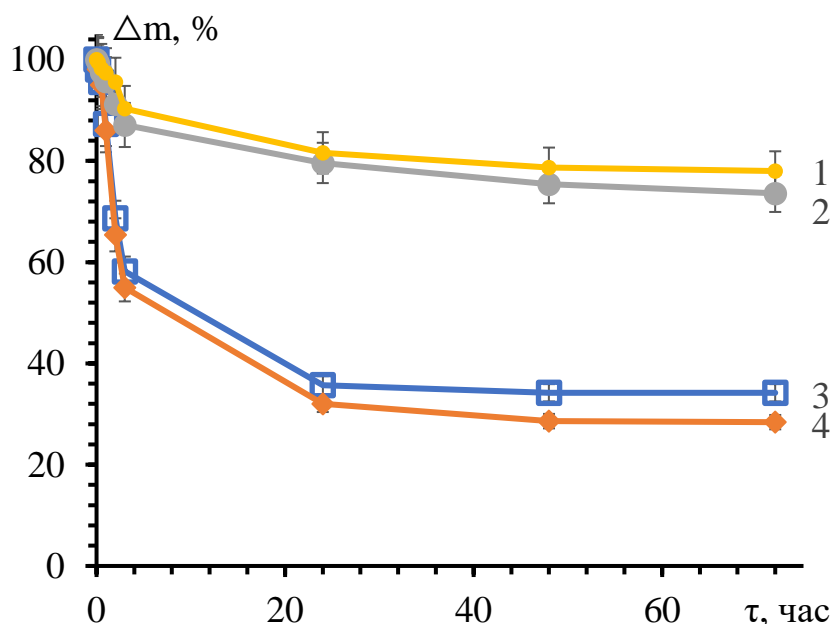


Рисунок 42 – Кинетика растворения пленок из хитозана (1, 3), а также пленок из хитозана и фиброина (2, 4) с соотношением 1:1 и с соотношением сшивающего реагента/ NH_2 : 1,2 – 0,04; 3,4 – 0,003. pH = 7,0.

Исследование физико-механических свойств проводили на динамометре Поляни в режиме напряжение–деформация и определения разрывного усилия полимерных образцов.

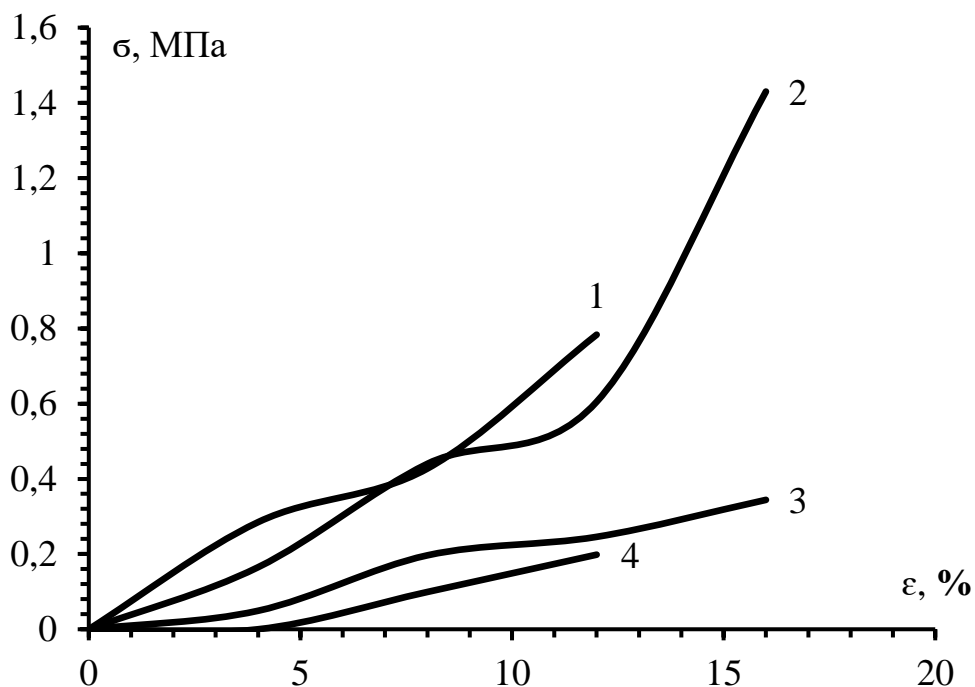


Рисунок 43 – Диаграмма напряжений пленок на основе хитозана с разной степенью сшивки, $-NH_2/Gr$: 1 – 0, 2 – 0,0025, 3 – 0,005, 4 – 0,01.

Таблица 11 – Физико-механические параметры пленок из хитозан-фиброиновой смеси с различным соотношением сшивающего реагента.

Содержание сшивающего реагента, %	Толщина пленки, мкм	Разрывная нагрузка, Н	Разрывное напряжение, Мпа	Разрывное удлинение, %
0	50	1,415	1,43	16
0,34	50	0,599	0,783	12
0,684	50	0,381	0,344	16
1,3625	50	0,218	0,198	12

Из данных диаграммы и таблицы 8 видно, что с увеличением содержания сшивающего реагента напряжение, необходимое для разрыва пленки, уменьшается. Определяющим для прочности сшитых пленок является возможность равновесной укладки макромолекул при формировании структуры пленки в процессе испарения растворителя. При высоком содержании сшивающего реагента скорость реакции сшивки превышает скорость испарения растворителя, в результате фиксируется неравновесная укладка полимерных цепей. Однако для использования в качестве раневых покрытий не прочность является основным показателем, определяющим эксплуатационные свойства, а способность к влагопоглощению и скорость высвобождения иммобилизованных лекарственных соединений.

Получение антимикробных пленок на основе фиброина и хитозана.

Хитозан, благодаря антимикробным, противоопухолевым, адьювантным, кровоостанавливающим и ранозаживляющим свойствам, а также хорошей пленкообразующей способности является перспективным биополимером для получения лекарственно-наполненных полимерных систем, главным образом, при изготовлении биологически активных пленок. Дополнительное введение антимикробных соединений способно усилить эффективность действия хитозановых пленок при использовании в качестве раневых покрытий. В настоящей главе с целью пролонгирования антимикробного действия раневых покрытий на основе хитозана и фиброина изучено влияние условий сшивки дженипином на особенности кинетики высвобождения антимикробного вещества мирамистина из биологически активных пленок.

Для получения лекарственно-наполненных пленок в формовочные растворы, содержащие хитозан и фиброин в соотношении 1:1, а также расчетное количество дженипина, дополнительно вводили мирамистин (0,5% от массы хитозана). Формование плёнок толщиной 70 мкм осуществляли методом полива на чашки, содержащих Дж. Добавление лекарственного соединения не влияло на рН формовочных растворов.

Изучение кинетики высвобождения мирамистина из пленок в физиологический раствор (NaCl, гидромодуль 100 мл/г) проводили путем измерения оптической плотности растворов при длине волны $\lambda = 211$ нм. Концентрацию лекарственного вещества рассчитывали по формуле:

$$C = A_{211}/\varepsilon \quad (16),$$

Где A_{211} – оптическая плотность при $\lambda = 211$ нм, ε – коэффициент экстинкции ЛВ в физиологическом растворе при $\lambda = 211$ нм.

Кинетика высвобождения мирамистина из пленок представлена на рисунке 44.

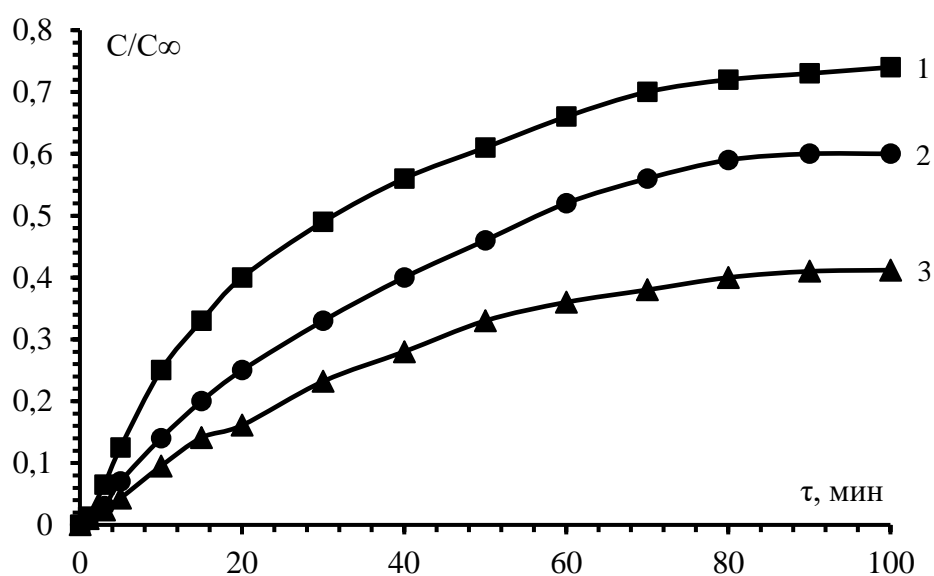


Рисунок 44 – Кинетика высвобождения мирамистина из хитозан-фибриновых пленок с соотношением 1:1, [г/г], модифицированных дженипином, рН 4,2, содержание сшивающего реагента Gp/NH₂: 1 – 0 моль/моль, 2 – 0,0025 моль/моль, 3 – 0,04 моль/моль.

Количество мирамистина, высвободившегося для всех образцов оказалось различным, что указывает на пролонгирование высвобождения. увеличение степени сшивки позволяет увеличивать время высвобождения ЛВ до двух раз.

Кинетику выхода мирамистина из сшитых пленок изучали в течение 100 минут, в этот период кривые стремились выйти на плато. Анализ кинетических

кривых, представленных в координатах уравнения Фика, показывает линейную зависимость $M_t/M_\infty = f(t^{0,5})$ (рис. 45), что свидетельствует о диффузионном механизме процесса выделения мирамистина в физиологический раствор.

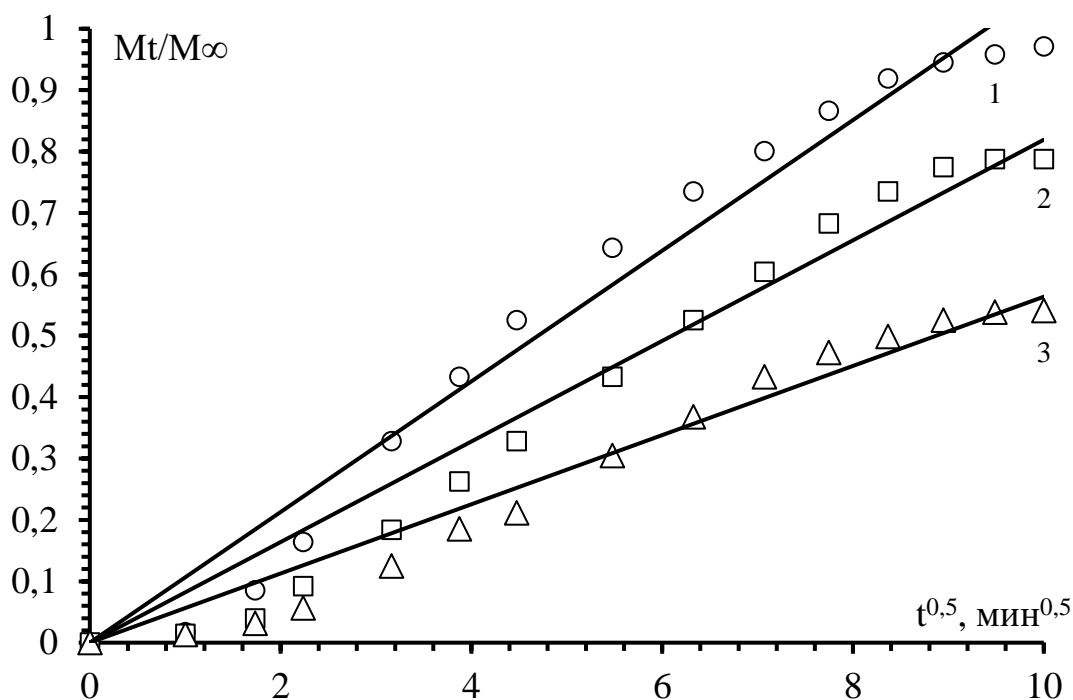


Рисунок 45 – Линейный вид кривых высвобождения мирамистина из пленок хитозана с фибрином, соотношение 1:1, г/г. Условия получения пленок - Gr/NH₂, pH 4,2: 1 – 0 моль/моль, 2 – 0,0025 моль/моль, 3 – 0,04 моль/моль.

Тангенсы наклона ($tg\alpha$) кинетических кривых позволяют рассчитать коэффициенты диффузии по уравнению:

$$D = \pi l^2 (tg\alpha)^2 / 16 \quad (17),$$

Где l – толщина пленки, см.

Рассчитанные коэффициенты диффузии приведены в таблице 12.

Таблица 12 – Свойства биологически активных пленок на основе хитозана и фиброина 1:1, [г/г], сшитых дженипином.

Содержание дженипина, %	Свойства биологически активных пленок		
	Максимальная степень набухания α , %	% высвобождения мирамистина (за 100 мин)	Коэффициент диффузии мирамистина $D \cdot 10^9$ (см ² /с)
0	2126	74	46,2
0,41	856	60	30,6
5,45	421	41	14,3

Видно, что с увеличением количества введенного дженипина наклон полученных прямых и значения рассчитанных коэффициентов диффузии уменьшаются (табл. 11). Этот факт связан с увеличением степени сшивки и образованием плотной сетки межмолекулярных связей, затрудняющей молекулярную подвижность. Измерение оптической плотности физиологического раствора через 100 мин показало, что максимальное количество мирамистина (74%) десорбируется из пленки, полученной без сшивающего реагента. Учитывая, что мирамистин в форме гидрохлорида хорошо растворим в воде его высвобождение может быть связано только с диффузионным процессом.

Таким образом, модификация хитозан-фиброиновых пленок дженипином позволяет получить биополимерные пленки с регулируемой кинетикой высвобождения биологически активного низкомолекулярного вещества.

Получение белок-содержащих пленок из хитозана и изучение кинетики высвобождения белка с использованием флуоресцентной метки.

Для адаптации полимерных материалов к технологиям регенеративной медицины все чаще обращаются к клеточным технологиям с использованием стволовых клетки. Они снижают степень воспаления, ускоряют регенерацию при хирургических травмах [157]. Принципиальным шагом в направлении регенеративной медицины является использование комбинации белков,

полученных из стволовых клеток. Было показано, что комплекс противовоспалительных и антибактериальных пептидов и белков, секретируемых мезенхимальными стволовыми клетками, разработанный в Институте биологии клетки РАН, обладает противовоспалительным, антиапоптозным и иммуномодулирующим эффектом, снижает степень воспаления и ускоряют регенерацию при хирургических травмах [158, 159].

Для решения проблемы отдельного определения аминокислотных соединений при их включении в состав хитозановых пленок и исследования кинетики высвобождения белка из полимерных материалов при его низком содержании в настоящей работе была отработана методика получения конъюгатов белков (противовоспалительных и антибактериальных белков, секретируемых мезенхимальными стволовыми клетками) и изоцианата флуоресцина (FITC), и исследовано влияние степени сшивки хитозана дженипином на кинетику высвобождения белков из пленок.

Конъюгирование FITC с белками и пептидами проводили по отработанной на альбумине методике [160]. В процессе гель-фильтрации слои непрореагировавшего флуоресцеина (рис. 47) и биологически активного конъюгата хорошо визуализовались: снизу ярко-желтый FITC, сверху оранжевый продукт реакции белкового препарата с FITC. Полученный меченный белково-пептидный препарат был лиофильно высушен.



Рисунок 47 – Гель-хроматография меченого FITC белково-пептидного препарата. (разделение фракций свободного FITC и меченого FITC препарата).

Для идентификации белково-пептидного препарата, помеченного FITC на спектрофлуориметре был снят спектр флуоресценции полученного соединения (рис. 48). На спектре выявлен характерный для флуоресценции FITC пик, имеющий высокие значения интенсивности, что свидетельствует о значительном содержании флуоресцентной метки в белково-пептидном препарате.

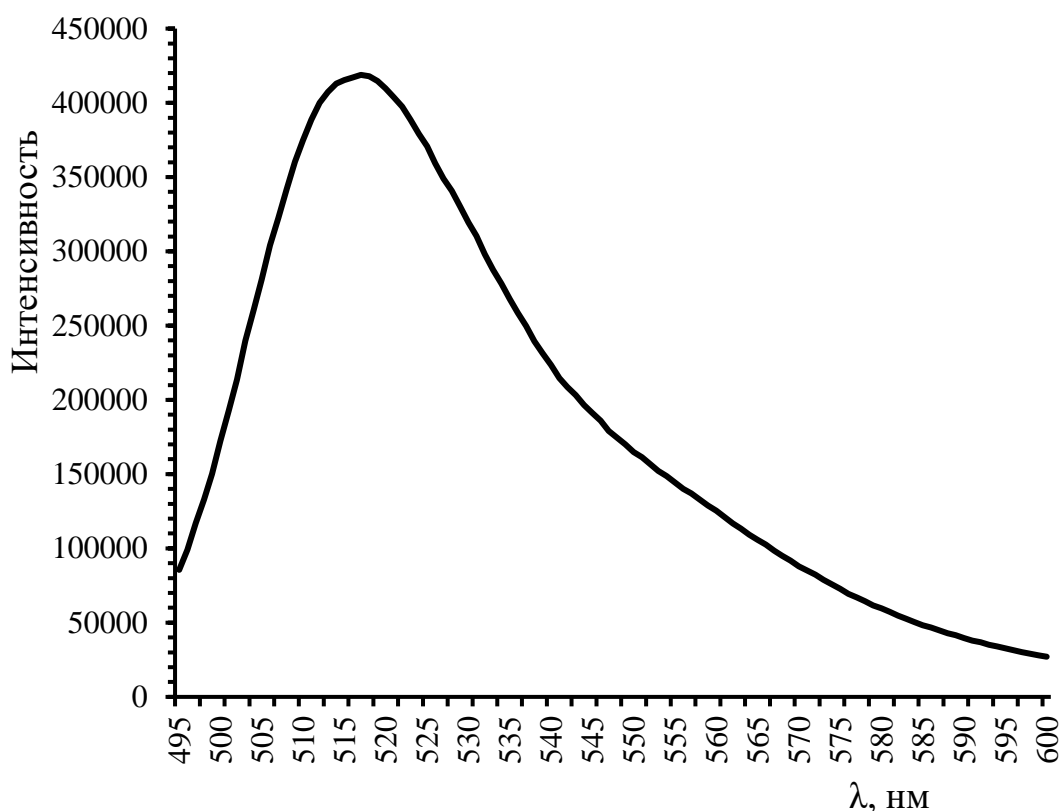


Рисунок 48 – Зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны падающего света для меченого белково-пептидного препарата.

Концентрация раствора 0,18 мг/мл.

Полученные результаты позволяют заключить, что в результате взаимодействия флуоресцеина FITC с биологически-активным белково-пептидным препаратом из мезенхимальных клеток был получен конъюгат, обладающий способностью к высокоэффективной флуоресценции.

Для определения концентрации меченого белково-пептидного препарата на спектрофлуориметре были измерены интенсивности поглощения растворов содержащего FITC препарата разной концентрации и получена калибровочная кривая, с использованием которой далее изучалась кинетика высвобождения флуоресцентного белка из пленки.

Кинетику высвобождения меченого белково-пептидного препарата из пленок со степенью сшивки 0,0025 моль/моль определяли в дистиллированной воде (модуль ванны 500 мл/г). Через определенные промежутки времени

отбирали пробы раствора и при соответствующем разбавлении определяли оптическую плотность на спектрофлуориметре RF-6000. На основании полученных данных (Рис. 49) был построен график зависимости C/C_{∞} от времени.

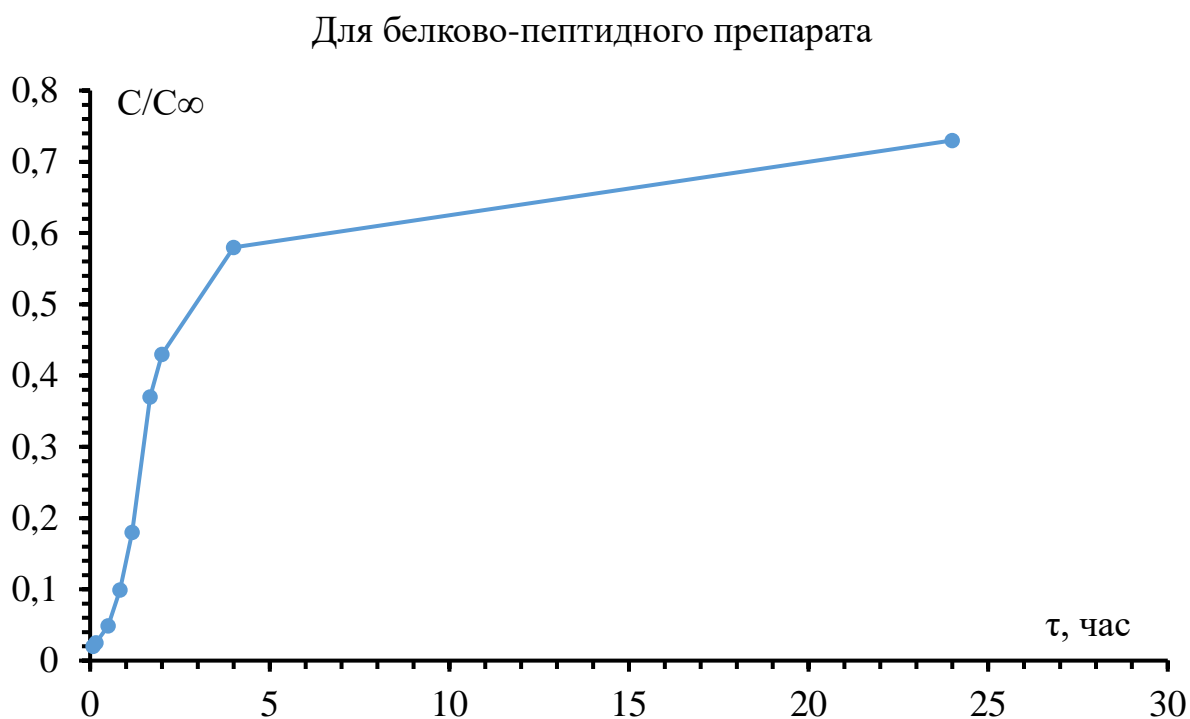


Рисунок 49 – Кинетика высвобождения меченого белково-пептидного препарата из пленки со степенью сшивки хитозана 0,0025 моль/моль, (по данным измерения интенсивности флуоресценции).

По данному графику можно судить о пролонгированном высвобождении белково-пептидного препарата, содержащего флуоресцентную метку, из пленки, сшитой дженипином при соотношении Gp/NH_2 0,0025 моль/моль. На кинетической кривой высвобождения белка присутствует излом, что указывает на наличие двух механизмов высвобождения альбумина: за счет диффузии и за счет гидролиза связи в продукте взаимодействия белка с дженипином, посредством которой белковый препарат включается в трехмерную сетку сшитого хитозана.

В следующих главах будет исследовано влияние пленочных материалов, содержащих белки, секретируемых мезенхимальными стволовыми клетками, на динамику и механизм развития местной воспалительной реакции у лабораторных животных.

3.5.2 Изучение процесса электроформования и модификации волокнистых материалов на основе фиброина и хитозана

Формирование нетканого нановолокнистого материала с поверхности формовочного раствора путем электроформования происходит в течение нескольких часов. Процесс формования по мокрому способу состоит из нескольких стадий, и формовочная композиция перед формованием выдерживается в течение часа и нестабильность такого важного технологического параметра, как вязкость, которая может изменяться в результате сшивки хитозана в процессе электроформования или подготовительных операций, приведет к изменению толщины волокон, дефектности структуры материала и обрывности нити.

Полученные в главе 3.4 результаты изучения кинетики изменения вязкости в присутствии дженипина позволяют выбрать количество сшивающего реагента, обеспечивающего сшивку фиброина и хитозана, но не приводящее в течение длительного времени к изменению вязкости формовочного раствора и использовать его как технологический параметр при выборе условий формования волокна.

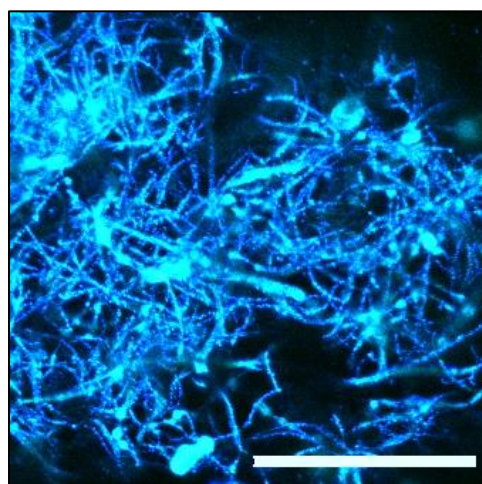
На основании изучения электропроводности и вязкости растворов были определены условия получения фиброин-содержащих волокон методом электроформования на установке Nanospider.

Основные параметры процесса приведены в таблице 13.

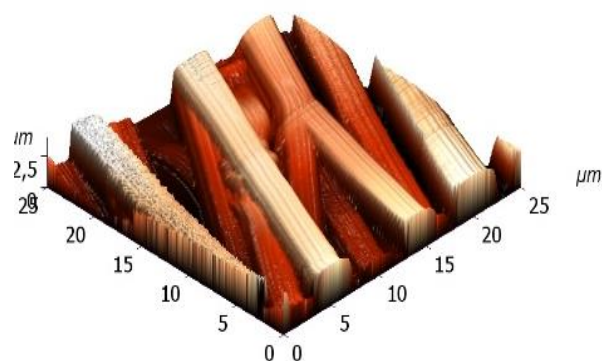
Таблица 13 – Электропроводность и вязкость формовочных растворов из фиброина и его смесей с хитозаном.

Концентрация в растворе, %		Соотношение ФБ:ХТЗ, г/г	рН	Удельная электропроводность κ , мСм/см	Динамическая вязкость η , мПа*с
Фиброин	Хитозан				
10	-	1:0	6,8	3,58	22,18
10	2	5:1	4,84	27,3	62,21
20	-	1:0	6,9	6,4	44,13
20	2	10:1	5,24	29,46	52,36
30	-	1:0	6,93	9,8	66,24
30	2	15:1	5,72	31,93	93,21

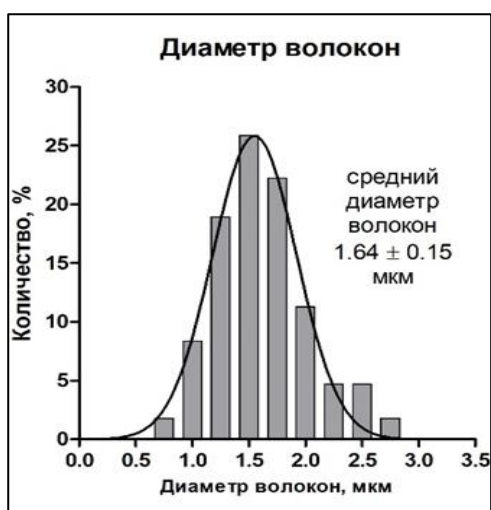
Электроформование удалось осуществить при концентрации фиброина в растворе 10 и 20%. Для определения среднего диаметра волокон и размера межволоконного пространства были использованы фотографии, полученные с помощью конфокальной микроскопии (рис. 50). Структура материала представляла собой волокна со средним диаметром $1,64 \pm 0,15$ мкм и межволоконным расстоянием $6,2 \pm 1,7$ мкм. Стабилизация структуры волокон достигалась за счет обработки этанолом или введением в состав формовочной композиции дженипина.



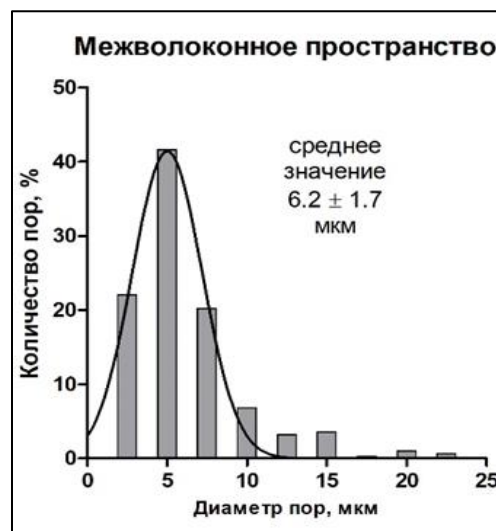
а



б



В



Г

Рисунок 50 – Конфокальная микрофотография (шкала 100 мкм) (а), АСМ 3-Д изображение и распределение по диаметру волокон (б) и по межволоконному пространству (в) образца субмикроволокна, полученного из 10%-го раствора фиброина, содержащего хитозан при соотношении 10:1.

Добавление сшивающего реагента в формовочный раствор в количестве 5,45% от содержания полимера, приводит к незначительному увеличению диаметра волокон.

3.5.3 Получение моноволокон из формовочных растворов на основе хитозана и фиброина

При изучении кинетики гелеобразования обнаружен продолжительный индукционный период, предшествующий росту вязкости в растворах хитозана и фиброин. Определены пути воздействия на продолжительность стадий модификации аминогрупп и образования сшитой пространственной сетки полимеров. Полученные результаты изучения кинетики изменения вязкости в присутствии дженипина позволили выбрать количество сшивающего реагента, обеспечивающего сшивку хитозана, но приводящее к изменению вязкости формовочного раствора и использовать его как технологический параметр при формировании волокна.

При формировании нити по «мокрому» способу, то есть методом коагуляции в осадительной ванне, образование твердой нити происходит в результате массообменных процессов. В выходящие из фильеры струйки проникают компоненты осадительной ванны, происходит массообмен и вымывание растворителя. В данной работе формирование проводили на установке МУЛ-1 через фильеру с одним отверстием диаметром 0,6 мм, таким образом, получалось моноволокно, состоящее из одной цельной нити.

С целью выбора компонентов осадительной ванны были определены числа осаждения для формовочного раствора, который представлял собой 2%-ный раствор хитозана, содержащего фиброин (1:1) в 2%-ном водном растворе уксусной кислоты. В качестве осадителей были выбраны смешивающиеся с водой органические растворители и 10% раствор NaOH. К раствору хитозана постепенно добавляли определенный осадитель до появления помутнения и расслоения на две фазы. Количество добавленного осадителя, вызывающего помутнение 5 мл формовочного раствора и принималось за число осаждения.

Таблица 14 – Числа осаждения формовочных растворов хитозана.

Осадитель	Число осаждения, мл	pH смеси в точке осаждения
ацетон	15	6,8
этанол	25	7,18
изопропанол	18	6,3
10% раствор NaOH + этанол (1:1)	0,3	14,1
5% NaOH + ацетон(1:1)	4,3	13,1
5% NaOH + изопропанол (1:1)	0,8	13,9

В составе осадителя главную роль играет NaOH, его роль заключается в нейтрализации уксусной кислоты и депротонировании аминогрупп хитозана. Этанол дегидратирует хитозан и вызывает конформационные переходы фиброина, приводящие к снижению его растворимости.

Наименьшее число осаждения имеет осадительная смесь 10% NaOH и этанола, она и была выбрана в качестве осадительной ванны для формирования волокон хитозана, сшитого дженипином или хитозана, содержащего дженипин.

Моноволокна из чистого хитозана и смеси хитозана и фиброина в соотношении 1:1 г/г были получены на формовочной установке МУЛ-1 через фильеру с одним отверстием диаметром 0,6 мм.

На рисунке 51 представлены фотографии волокон, полученные с помощью светового микроскопа. Моноволокна, полученные в присутствии сшивающего реагента, имели выраженную темно-синюю окраску, характерную для продукта взаимодействия хитозана с дженипином, их свойства в табл. 15.

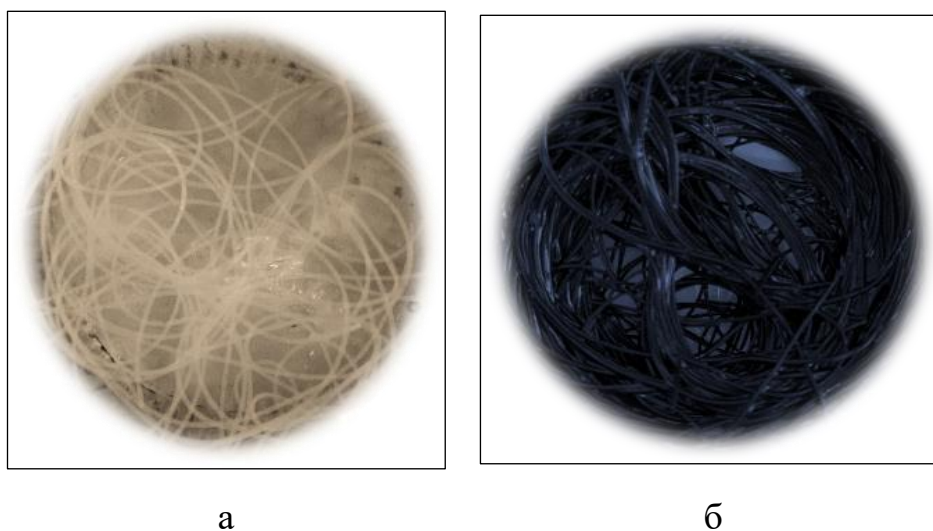


Рисунок 51 – Волокна из хитозана (ММ 200 кДа) с фиброином: а – без химической модификации, б – химически сшитые дженипином.

Таблица 15 – Характеристика волокон, полученных методом коагуляции.

№, п/п	Состав волокна		Степень сшивки	Средняя толщина волокна, мм	Линейная плотность, tex	Степень набухания, %
	Хитозан	Фиброин				
1	2 мас. %	0	0	0,25	0,158	-
2			0,01		0,162	-
3			0,04		0,212	84
4	2 мас. %	2 мас. %	0	0,34	0,148	-
5			0,01		0,156	-
6			0,04		0,189	70

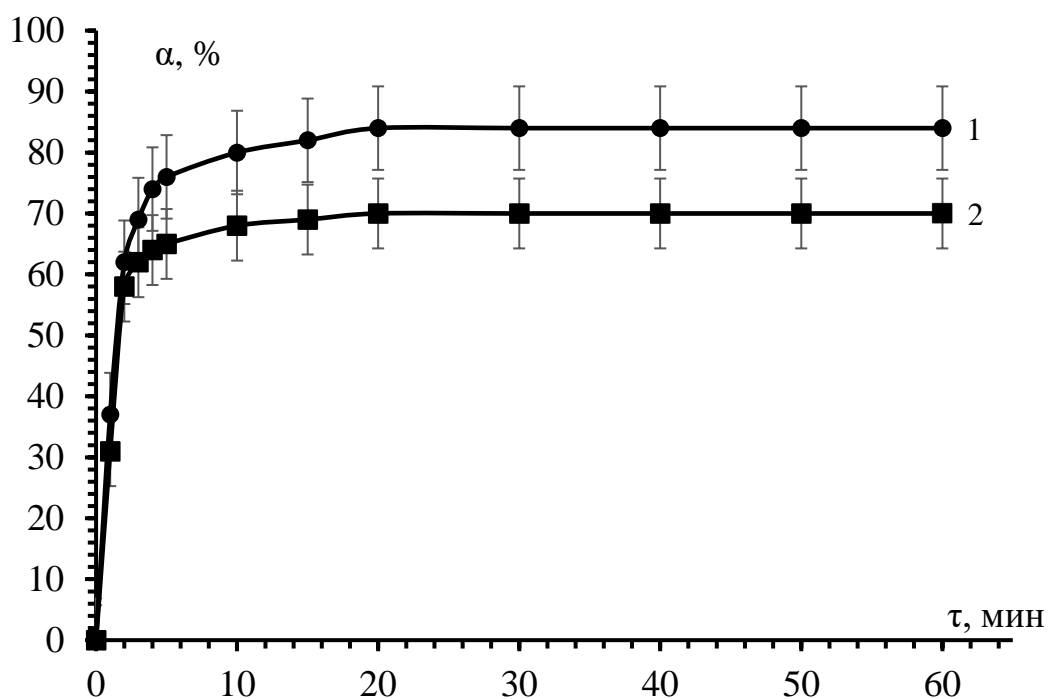


Рисунок 52 – Кинетика набухания в 0,9% растворе NaCl моноволокон из хитозана (1) и его смеси с фиброином (1:1) (2), сшитых дженипином при соотношении Gr/NH₂ 0,04 моль/моль.

Кинетика набухания моноволокон из хитозана и его смесей с фиброином, модифицированных сшивкой дженипином при соотношении функциональных групп 0,04 моль/моль исследовалась в физиологическом

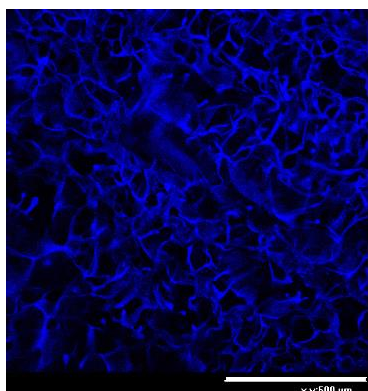
растворе (рис. 52). Максимальная степень набухания моноволокна из чистого хитозана составила 84%, из смеси – 70%. Уменьшение степени набухания может происходить из-за уплотнения структуры волокна, так как этанол, содержащийся в осадительной ванне, способствует конформационным перестройкам в фиброине и переходу в β -складчатую структуру. Фиксации такой структуры способствует дополнительная сшивка дженипином, которая может происходить с участием аминогрупп лизина или концевых аминогрупп белка.

3.5.4 Получение криоструктуратов из растворов хитозана и его смесей с фиброином.

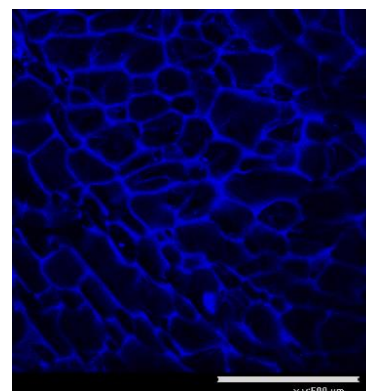
Для формирования хитозановых криогелей 2%-ные водные растворы ацетата хитозана или его смеси с фиброином, содержащие различные количества дженипина, замораживали при -20 или -30°C и выдерживали при этих температурах в течение различного времени. Сшивку хитозана дженипином проводили в гетерогенных условиях в среде этанола после приготовления криоструктуратов. На рис. 53 приведены микрофотографии этих гелей, а также 3D реконструкция их пористой структуры и распределение пор по размерам.

Содержание Gr,
моль/ NH_2
Конфокальная
микроскопия.
Шкала 500 мкм.

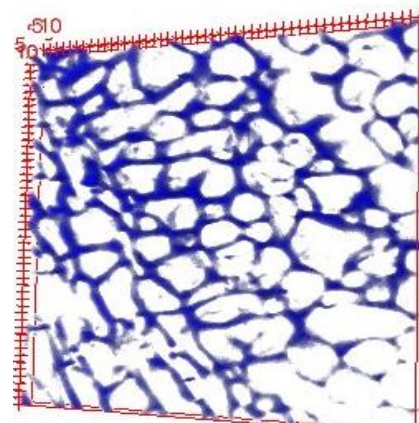
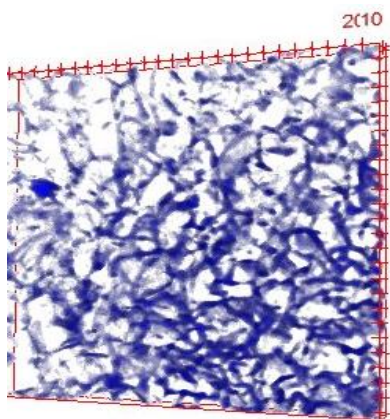
0,033



0,025



3D
реконструкция
структуры
гидрогелей.



Распределение
пор по размерам

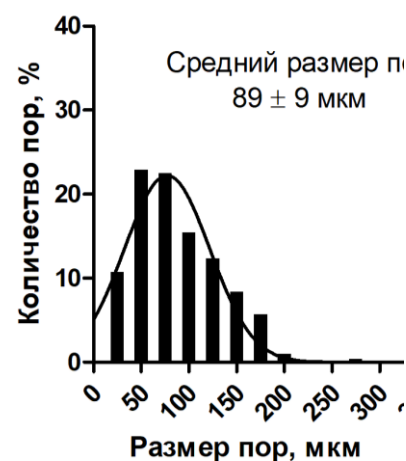
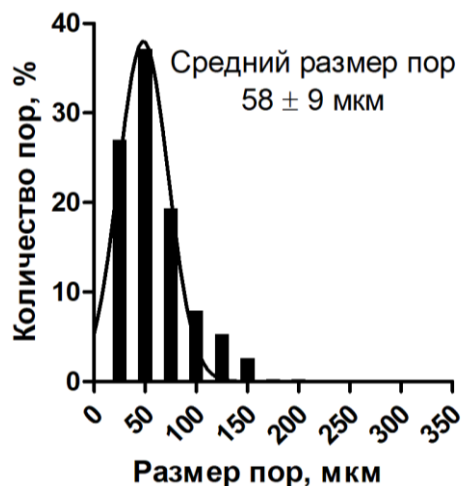


Рисунок 53 – Морфология хитозановых криоструктуратов, сшитых дженипином при различном соотношении функциональных групп полимера и дженипина (моль Gr, /NH₂).

Изменение влагоудерживающей способности криоструктуратов, сшитых разным количеством Gr (рис. 54), связано не только осмотическими свойствами гелевых стенок, а также с изменением их пористой морфологии.

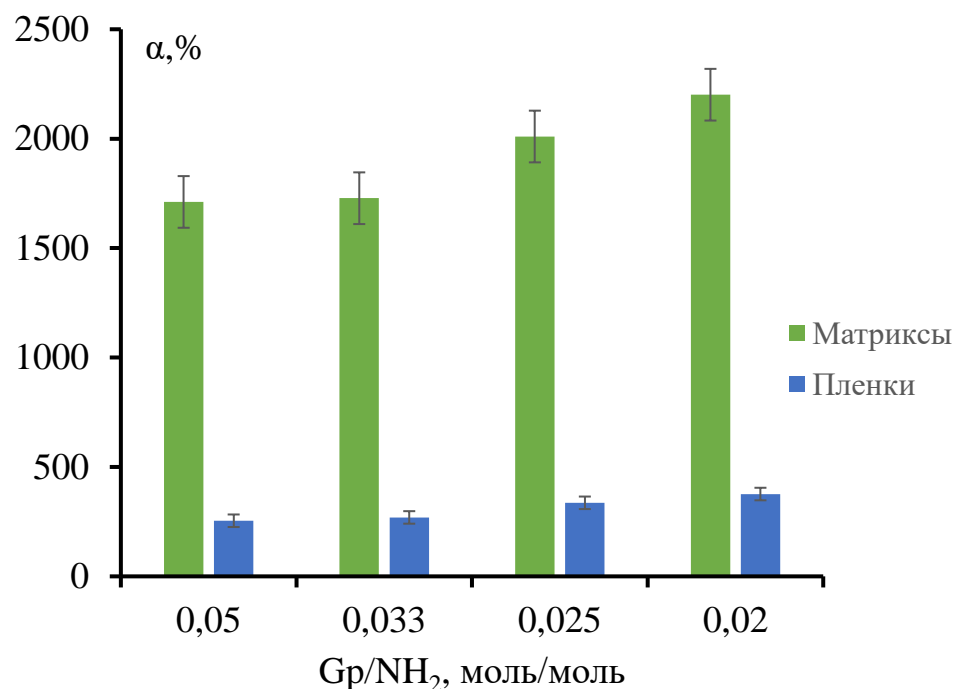


Рисунок 54 – Степень набухания (α) биополимерных матриц и пленок, полученных на основе гидрогелей ацетата хитозана, модифицированного сшивкой дженипином.

На основе системы раствор ацетата хитозана – Дж при разном соотношении Gr/NH₂ получены биodeградируемые криоструктуры с высокой влагоудерживающей способностью, регулируемым размером пор и скоростью биodeградации, которые были опробованы в тестах на цитотоксичность и в качестве 3D-подложки в процессе культивирования животных клеток.

3.6 Изучение биосовместимости и перспектив использования материалов на основе фиброина и хитозана

Полученные хитозановые криоструктуры и волокнистые материалы обладают развитой системой взаимосвязанных пор, что, наряду с их биodeградируемостью и высокой влагоудерживающей способностью, обеспечивают биомеханическую совместимость и атравматичность. Эти свойства можно было рассматривать как предпосылки для успешного

использования криоструктуратов в качестве 3D-подложек для культивирования животных клеток.

3.6.1 Изучение цитотоксичности и использование пористых гидрогелевых криоструктуратов в качестве 3D-подложки для культивирования животных клеток

В качестве исследуемых материалов были изучены лиофильно высушенные и сшитые в водно-спиртовой среде дженипином макропористые гидрогели - криоструктураты на основе ацетата хитозана, с ММ 320 кДа, смеси хитозана и фиброина, чистого фиброина из концентрированных растворов белка (20 и 30 мас.%).

Изучение криоструктуратов хитозана, сшитого дженипином.

Была исследована цитотоксичность гидрогелей методом тестирования экстрактов. Этот метод позволяет оценить влияние экстрагируемых из матрикса веществ на жизнеспособность клеток. В качестве модельной использовали линию мышинных фибробластов L929. В случае всех изучаемых образцов, снижения жизнеспособности клеток не наблюдалось. Можно сделать вывод о том, что исследуемые гели не цитотоксичны.

Способность губчатых 3D-подложек на основе хитозана поддерживать рост и пролиферацию клеток при их длительном культивировании изучали с помощью конфокальной микроскопии. Для этого клетки линии мышинных фибробластов помещали в предварительно стерилизованные хитозановые губки и культивировали в течение 7 сут.

На рис. 55 видно, что хороший рост отдельных клеток наблюдали во всех трех хитозановых криоструктуратах, сшитых дженипином.

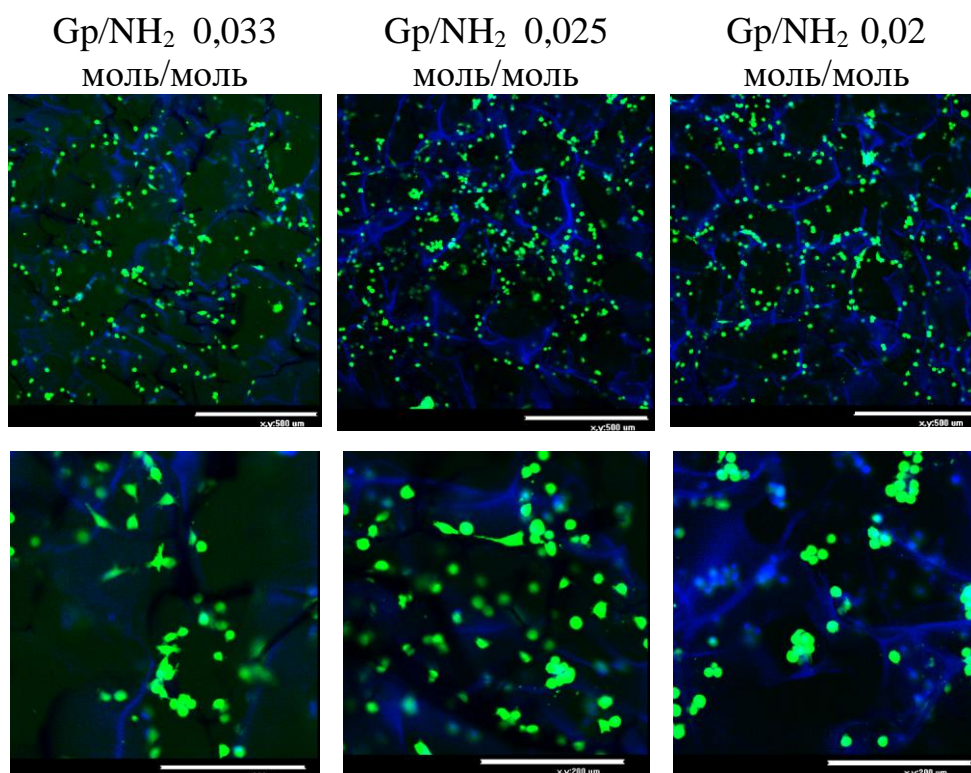


Рисунок 55 – Микрофотографии распределения фибробластов L929 после 7 дней культивирования в криоструктурах хитозана, сшитого Gp. Жизнеспособные клетки окрашены красителем Calcein AM (зеленый цвет), а гели визуализированы с помощью красителя DAPI (синий цвет).
Конфокальная микроскопия. Шкала 100 и 200 мкм.

Изучение криоструктуратов фиброина, сшитого дженитином.

Полученные криоструктураты на основе 20 и 30%-ных растворов фиброина были испытаны на цитотоксичность, а, так же, как матриксы – опорные носители для роста и пролиферации клеток.

Образцы криоструктуратов обладают системой проходных пор, диаметр которых зависит от концентрации фиброина. Средний размер пор образцов гидрогелей был 149 ± 7 мкм и 355 ± 14 мкм для образцов гидрогелей Фб-20 и Фб-30, соответственно (рис. 56).

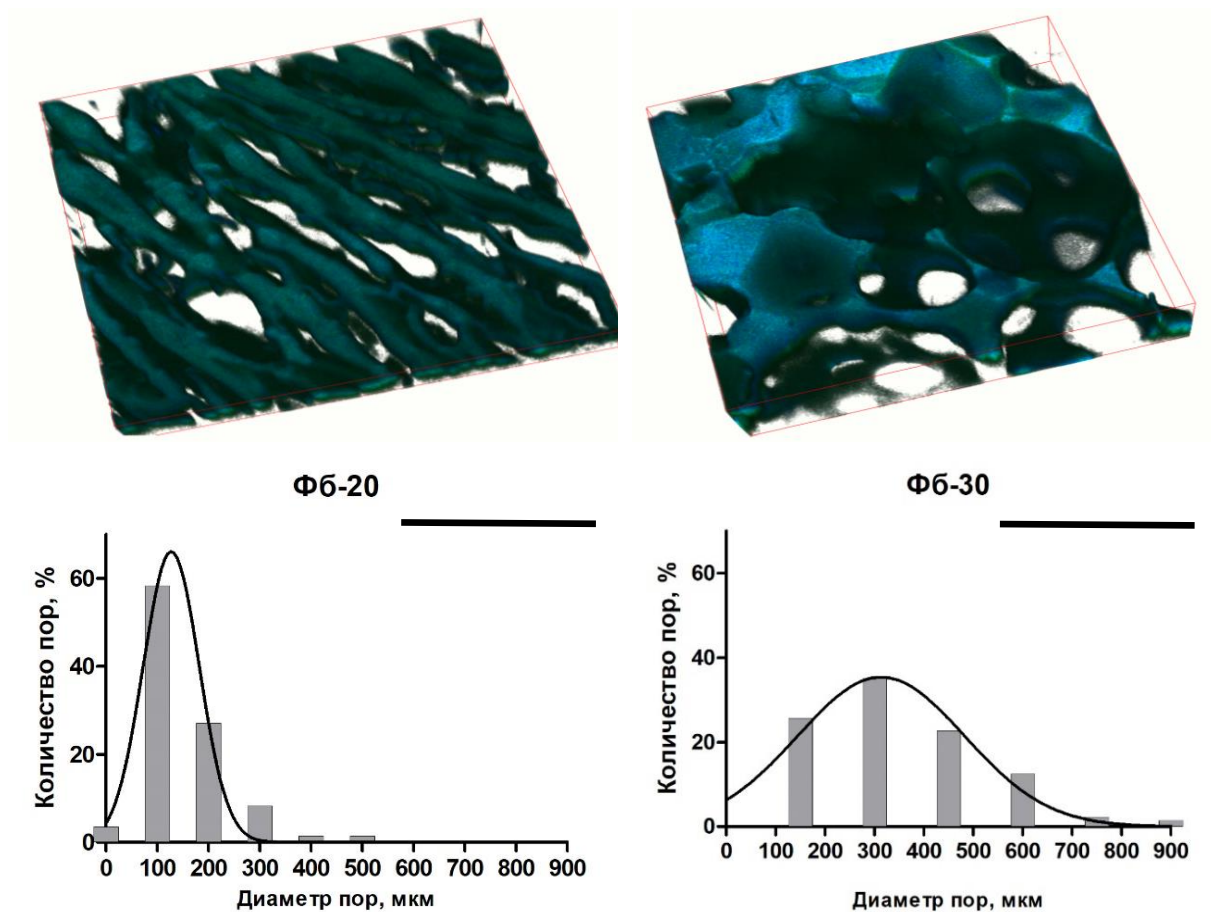


Рисунок 56 – Конфокальная микрофотография и 3D реконструкция структуры криоструктуратов (шкала 500 мкм), полученных из растворов с концентрацией фибрина 20 и 30%, и распределение пор по диаметру.

На рисунке 57 представлены результаты по набуханию образцов гидрогелевых криоструктуратов через 24 часа инкубации в питательной среде. Равновесное набухание гидрогелей было довольно низким ($2,8 \pm 0,25$ и $2,9 \pm 0,8$ мл/мг для образцов гидрогелей Фб-20 и Фб-30, соответственно) и практически не различалась. Набухание образцов гидрогелей после удаления несвязанной воды также не зависело от концентрации фибрина: $0,86 \pm 0,19$ и $0,8 \pm 0,27$ мкл/мг для образцов гидрогелей Фб-20 и Фб-30, соответственно.

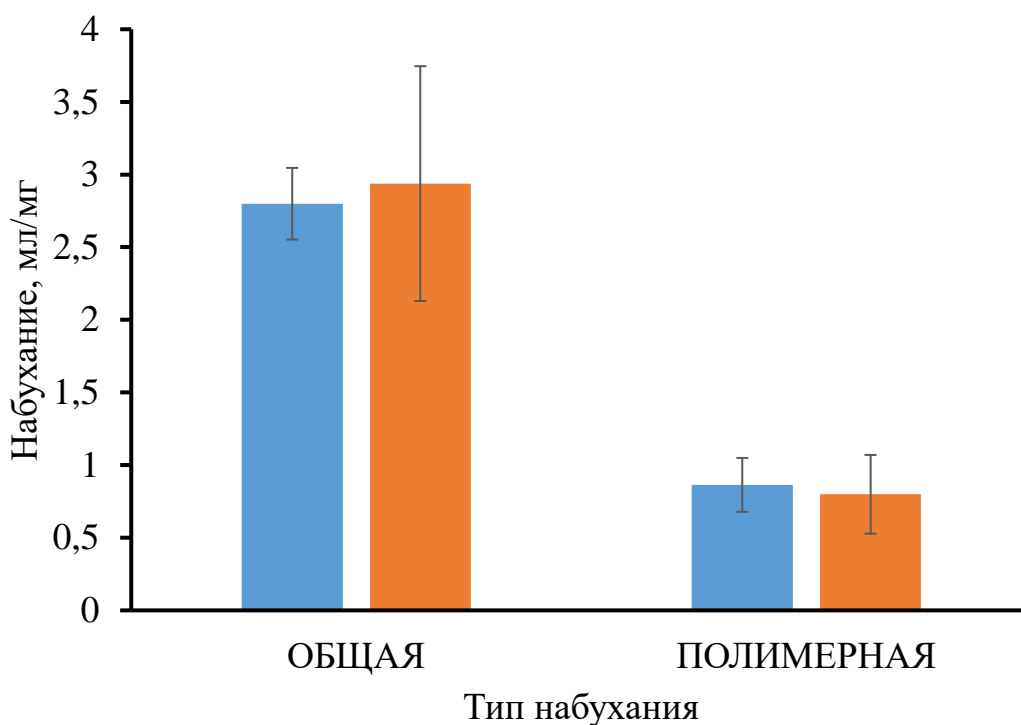


Рисунок 57 – Показателя набухания в воде криоструктуратов фиброина в культуральной среде DMEM после инкубации в течение 24 часов.

На первом этапе *in vitro* исследований криоструктуратов фиброина изучали их цитотоксичность методом тестирования экстрактов. В качестве модельной использовали линию мышинных фибробластов L929. Количество жизнеспособных клеток определяли с помощью МТТ-теста.

На рисунке 58 приведены зависимости жизнеспособности клеток после их инкубации в экстрактах из гидрогелей в течение 24 ч. Наблюдается некоторое снижение жизнеспособности клеток при их инкубации в неразбавленных экстрактах из гидрогелей. Однако, никаких изменений в морфологии клеток после инкубации с экстрактами не наблюдали. При разбавлении экстрактов жизнеспособность клеток увеличивается.

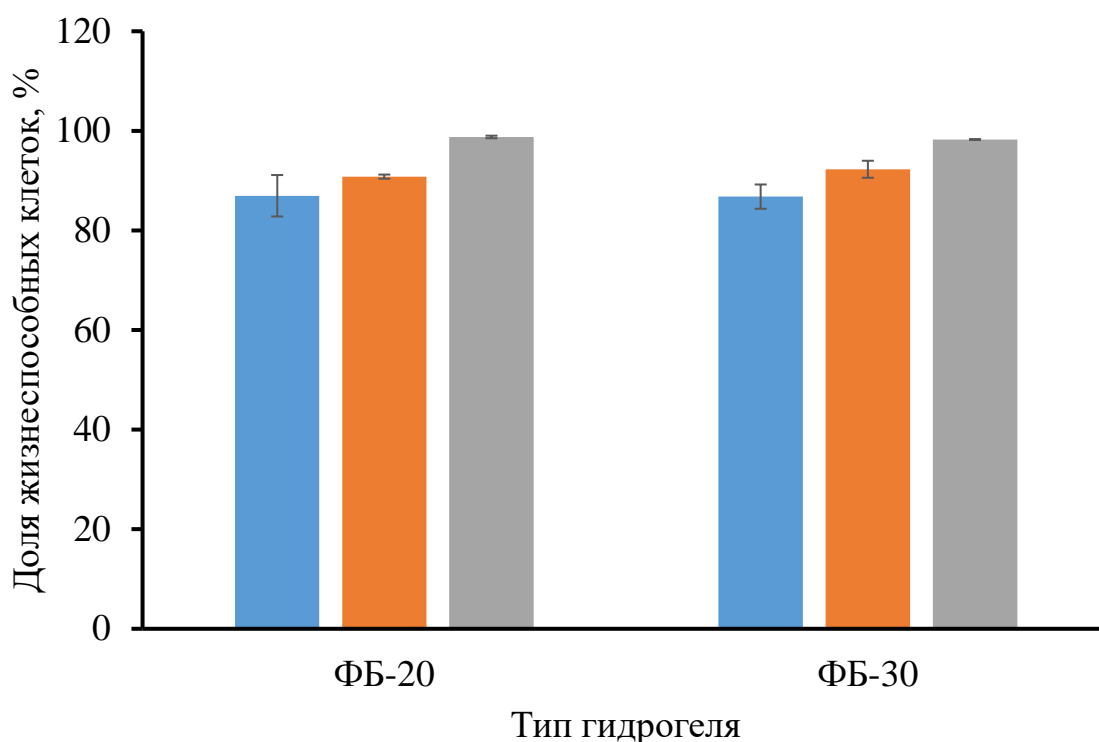


Рисунок 58 – Жизнеспособность клеток L929 после 24 ч инкубации с экстрактами из криоструктуратов.

Для оценки поведения клеток в матриксе, клетки линии мышинных фибробластов L929 и иммортализованных мезенхимальных стволовых клеток (МСК имм.) сажали в гидрогели и культивировали в течение 7 дней. Рост и пролиферацию животных клеток в гидрогелях оценивали с помощью конфокальной микроскопии через 7 дней культивирования (рис. 59).

Через 7 дней культивирования МСК имм. образовали плотный клеточный монослой на гидрогелях обоих типов, фибробласты L929 сформировали клеточный монослой.

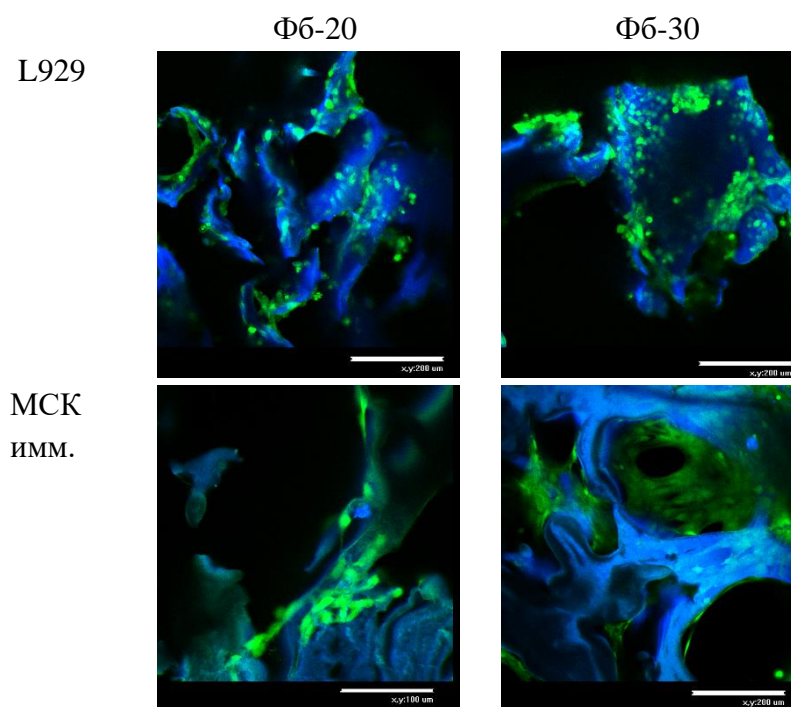


Рисунок 59 – Микрофотографии распределения фибробластов L929 и МСКИмм. после 7 дней культивирования в криоструктуратов.

Жизнеспособные клетки окрашены красителем Calcein AM (зеленый цвет), а гели визуализированы с помощью красителя DAPI (синий цвет).

Конфокальная микроскопия. Шкала 100 и 200 мкм.

Сравнительное изучение роста клеток при длительном культивировании в криоструктуратах из смеси фиброина и хитозана, сшитых дженипином, по сравнению с криоструктуратами из чистого хитозана.

Морфологию клеток в криоструктуратах из фиброина с хитозаном оценивали в сравнении с гелями из чистого хитозана при помощи конфокальной микроскопии после 5 дней культивирования (рис. 60). Как видно из таблицы, на полученных гелях клетки так же распластывались, при этом распределение клеток по поверхности пор во всех типах гидрогелей было достаточно равномерным.

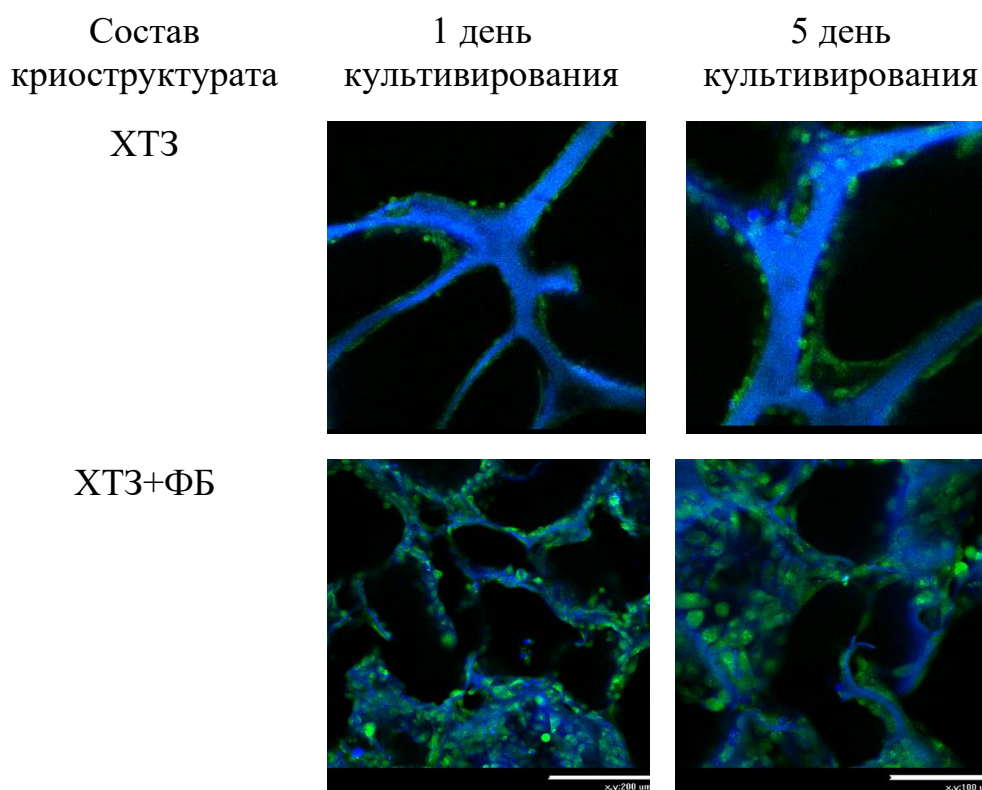


Рисунок 60 – Микрофотографии фибробластов мыши линии L929 в образцах криоструктуратов хитозана и хитозана с фиброином, сделанные методом конфокальной микроскопии.

3.6.2 Изучение цитотоксичности и использование волокнистых материалов на основе фиброина, полученных методом электроформования в качестве 3D-подложки для культивирования животных клеток

Культивирование клеток. Для оценки поведения клеток в матриксе их электроформованных фиброиновых волокон, клетки линии мышечных фибробластов L929 и иммортализованных МСК (МСК имм.) сажали на волокна и культивировали в течение 3х дней и 5 дней (МСК имм.). Рост и пролиферацию животных клеток контролировали с помощью, просвечивающей световой и конфокальной микроскопии. Клетки распластывались и росли на волокнах нетканой подложки (рис. 61).

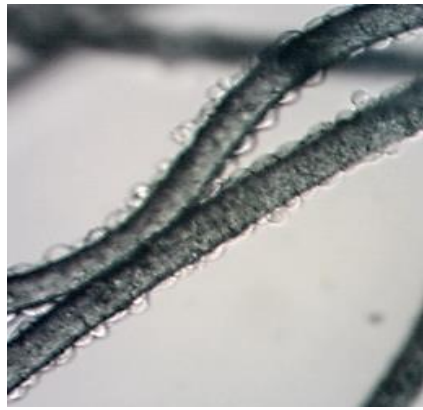
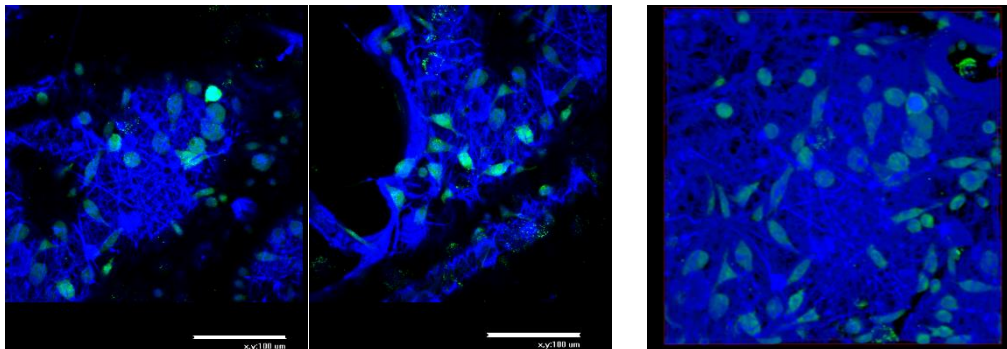


Рисунок 61 – Микрофотографии клеток после 3 дней культивирования.
Световая микроскопия. Увеличение 10х.

Из микрофотографий, полученных с помощью конфокальной микроскопии (рис. 62) видно, что клетки проникают между волокнами и имеют веретенообразную (нативную) морфологию, т.е. распластываются. Таким образом, такие фиброиновые волокна способны поддерживать трехмерный рост как мышечных фибробластов, так и МСК имм. При этом в случае стволовых клеток уже через 3 дня культивирования формируется живая ткань (рис. 62).

L929



МСК
ИММ.

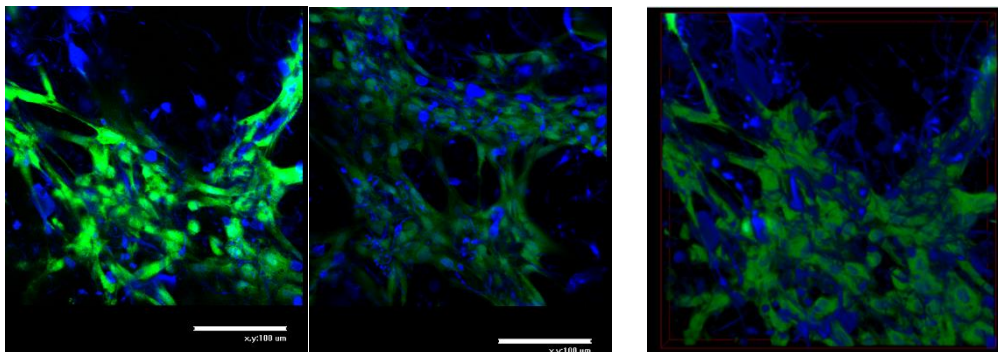


Рисунок 62 – Распределение и морфология клеток линии L929 и МСК после 3 дней культивирования на волокнистых матриксах. Шкала 100 мкм.

Влияние волокнистых матриц на морфофункциональное состояние различных живых цитообъектов (компонентов крови).

Изучение в моделях *in vitro* и *in vivo* влияния состава модифицированных биополимерных материалов на отдельные популяции клеток иммунной системы и продукцию противовоспалительных цитокинов. Была изучена биологическая активность отдельных компонентов модифицированных биополимерных материалов: пленок различного состава из аминокислотных полимеров, сшитых дженипином.

Изменение морфофункционального состояния цитообъектов при контакте с биополимерными материалами, сформованными на зеркальной подложке, оценивали методом интерференционной микроскопии (рис. 63). Клетки при контакте с анализируемыми поверхностями проявляют признаки функциональной активности, количественно характеризующиеся увеличением диаметра, периметра, площади и объема клеток. Следует отметить, что наибольшей биологической активностью обладают материалы, в составе которых соотношение фиброин/хитозан – 1:1. Иммуномодулирующие свойства, связанные с активацией иммунокомпетентных клеток, проявлялись в разной степени. Более высокая иммуномодулирующая активность выявлена у волокон состава фиброин/хитозан – 1:1.

Оценку адгезивности и иммуногенности волокнистой матрицы оптимального состава проводили на различных популяциях клеток (тромбоцитах, нейтрофилах, лимфоцитах, МСК).

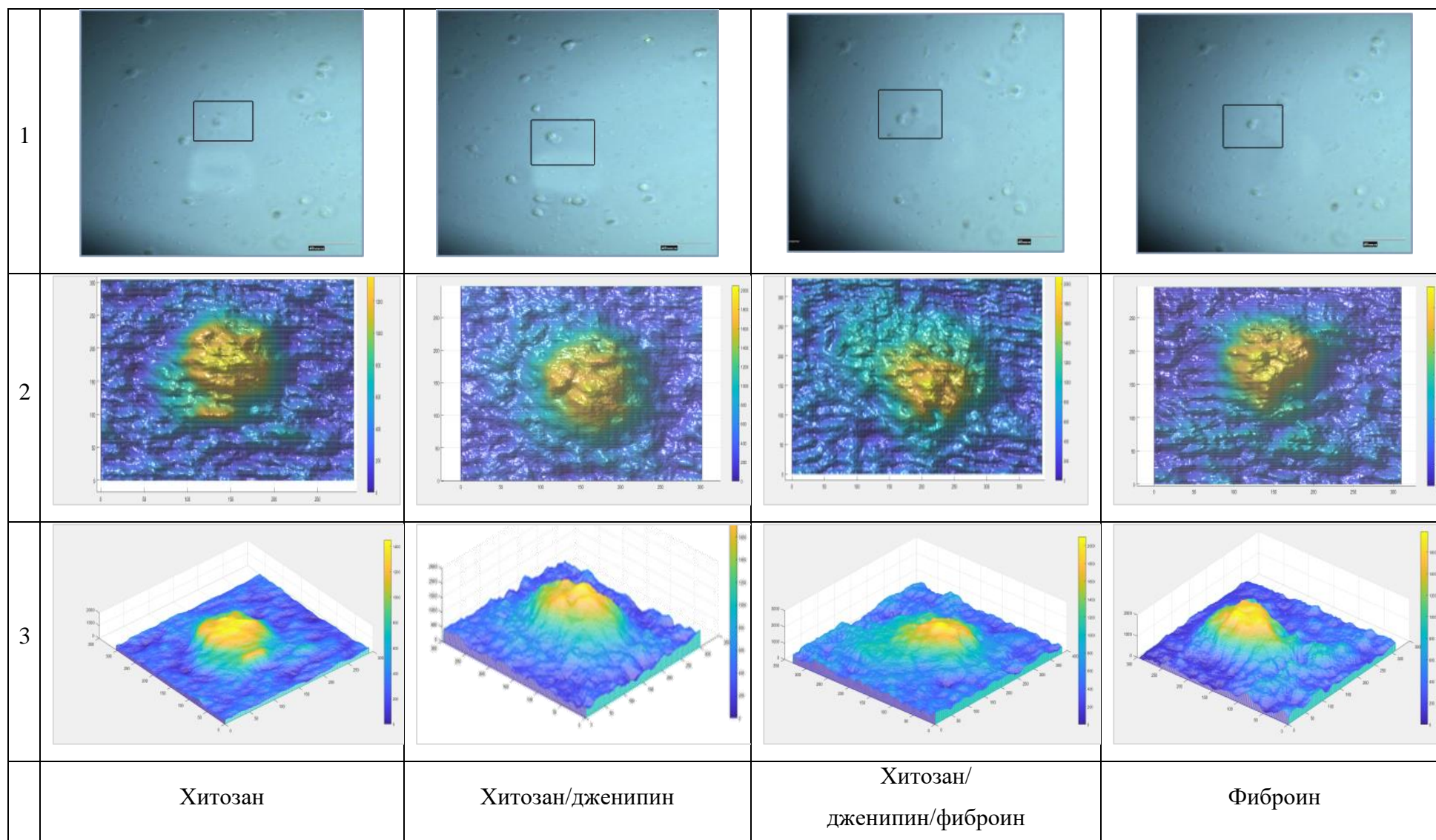


Рисунок 63 – Визуализация CD3+лимфоцитов (1 – оптическое изображение, 2 – фазовое изображение (топограмма) лимфоцита; 3 – 3D-реконструкция) при контакте с образцами хитозан- и фиброин содержащих полимерных пленок, полученная с использованием интерференционной микроскопии.

Получен массив данных фазовых изображений живых тромбоцитов, нейтрофилов (CD15+), лимфоцитов (CD3+) и мезенхимальных стволовых клеток интактных и после взаимодействия с волокнистым материалом. В качестве иллюстрации на рисунке 64 приведены наиболее типичные фазовые портреты клеток, включая двумерную топограмму.

Статистически значимые различия морфоденситометрических показателей клеток выявлены для популяции тромбоцитов. Величина среднепопуляционного диаметра клеток после контакта с волокнами хитозана увеличивалась практически на 39%, средний периметр – на 31% за счет увеличения числа активированных клеток с тенденцией к расплыванию и формированию многочисленных отростков

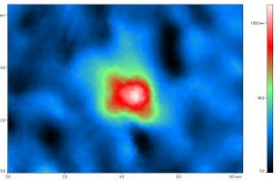
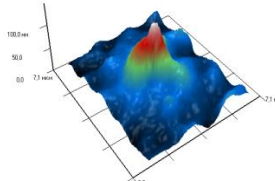
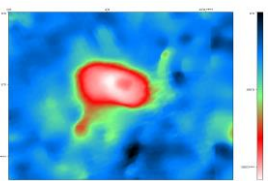
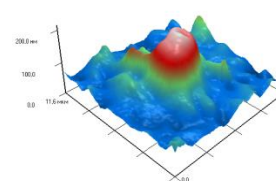
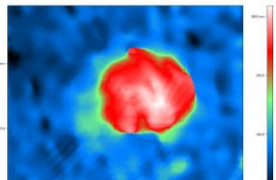
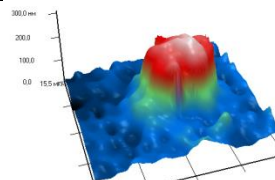
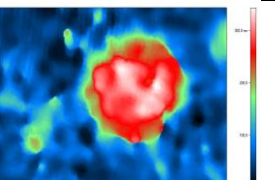
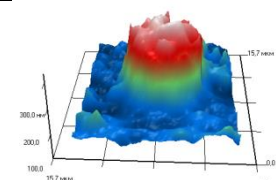
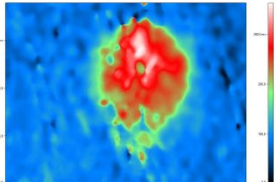
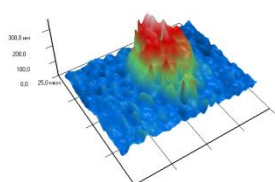
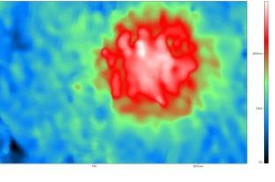
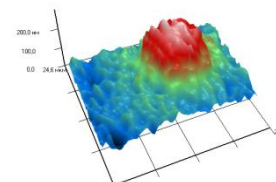
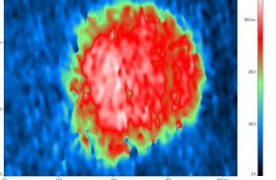
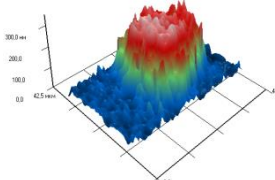
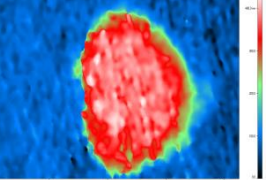
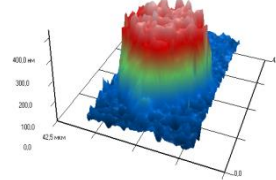
	Интактные клетки		Клетки после контакта с волокнистыми материалами	
1				
2				
3				
4				
	Топограмма 2D	Реконструкция 3D	Топограмма 2D	Реконструкция 3D

Рисунок 64 – Визуализация (топограмма, 3D-реконструкция и профиль) живых тромбоцитов (1), нейтрофилов (2), лимфоцитов (3) и МСК (4), полученная с использованием интерференционной микроскопии.

Полученные результаты свидетельствуют о достаточно значимой степени активации анализируемой популяции клеток после контакта с волокнистым субстратом. Согласно «модели клеточной адгезии», чем больше клетка прилипает, тем больше она показывает большее количество химических связей, которые она имеет на своей поверхности. Средство клеток к субстрату является решающим фактором в проектировании и разработке биоматериалов. Можно предположить, что на уровень активации популяции тромбоцитов, включая выраженность адгезивных свойств, влияет степень неоднородности образцов полимера.

Изучение влияния разработанных покрытий и волокнистых биополимерных материалов на развитие и исход местной воспалительной реакции на модели животных в динамике при подкожном введении.

Было изучено влияние разработанных волокнистых материалов на развитие и исход местной воспалительной реакции при их подкожном введении. Было показано, что нетканые волокнистые материалы, подвергнутые обработке дженипином, не содержащие биологически активной компоненты, вызывают развитие местной воспалительной реакции, сопровождающейся формированием фиброзной ткани. Из исследуемых образцов волокон образец со степенью сшивки 0,03 моль Дж/моль NH₂ показал достоверно более быстрый рост и созревание соединительной (рубцовой) ткани, признаки воспалительной реакции менее выражены, что позволяет сделать вывод о его более высокой биологической совместимости. На это указывают результаты гистологических исследований:

- более зрелая соединительная ткань, упорядоченным строением коллагеновых волокон;
- наличие регенерирующего мышечного слоя;
- незначительная, по сравнению, с другими образцами степень лимфоцитарной инфильтрации;
- уменьшение степени интерстициального отека.

На основании проведенных биологических исследований сделаны следующие выводы:

- анализ гистологических данных выявил влияние степени сшивки на реакцию организма;

- образцы с пленок с минимальной степенью сшивки 0,01 моль/моль и в отсутствие сшивающего реагента не давали отрицательной реакции после трансплантации в ткани живого организма.

В экспериментах *in vivo* получены новые данные, демонстрирующие, что белковые молекулы, секретируемые мезенхимальными стволовыми клетками, которые блокируют патологический неоангиогенез и осуществляют профилактику местной воспалительной реакции, и высвобождаясь из волокнистых матриц, обладают выраженной способностью модулировать морфофункциональное состояние иммунокомпетентных клеток, изменять их секреторную активность.

* * *

Таким образом, установленные закономерности конформационного перехода в фиброине в водно-спиртовых растворах и особенности реакции взаимодействия фиброина и его смеси с хитозаном со сшивающим реагентом природного происхождения дженипином позволили разработать методы модификации биополимеров в формовочных растворах или в готовом полимерном материале. Определены пути управления процессами формирования композиционных биodeградируемых волокон и гидрогелей путем контролируемой модификации аминокислотных биополимеров хитозана и фиброина.

С использованием предложенных технологических решений в области формирования не растворимых в воде биополимерных материалов, основанных на реализации перехода фиброина в β -конформацию и химической сшивке дженипином, был разработан ассортимент биополимерных материалов, полученных на основе хитозана и фиброина (таблица 16) и показаны их

биосовместимость и перспективы использования в качестве матриц для регенерации живых тканей и систем с пролонгированным высвобождением биологически активных соединений.

Таблица 16 – Ассортимент биополимерных материалов, полученных на основе хитозана и фиброина, модифицированных дженипином.

№ п/п	Тип полимерного материала	Способ получения	Состав полимерной композиции			Назначение
			Фиброин	Хитозан	БАС	
1	Волокнистый материал	Электроформование, сшивка спиртовым раствором дженипина	1	0	-	Регенерация живых клеток
		Электроформование, введение дженипина в формовочный раствор	5	1	-	
		10	1	-		
2	Мононить	Коагуляционное формование, введение дженипина в формовочный раствор, осадительная ванна с этанолом	0	1	-	Шовный материал
			1	1	-	
			1	1	-	
3	Пленка	Испарение растворителя, введение дженипина в формовочный раствор	0	1	Мирамистин	Раневые покрытия
			1	1		
			0	1	Лидокаин	
			1	1		
			1	1	Белково-пептидный препарат	Ускоренное заживление ран
4	Широкопористый гидрогель (криоструктурат)	Криоструктурирование, сшивка спиртовым раствором дженипина	0	1	-	Регенерация живых клеток и тканей
			1	0	-	
			1	1	-	

ВЫВОДЫ

1. Разработаны методы химической и структурной модификации фиброина при получении не растворимых в воде биodeградируемых волокнистых и гидрогелевых материалов.

2. Разработаны методы получения не растворимых в воде волокнистых и гидрогелевых материалов путем переработки формовочных композиций на основе растворов регенерированного фиброина, хитозана и сшивающего реагента, перспективных для применения в качестве пористых биополимерных матриц для тканевой инженерии и систем с контролируемым высвобождением лекарственных соединений.

3. Определена роль конформационных переходов фиброина при определении условий его дегуммирования и формовании не растворимых в воде волокон и гидрогелей.

4. Установлены закономерности процесса сшивки и гелеобразования в смешанных растворах хитозана и фиброина в присутствии природного сшивающего реагента дженипина, показано, что макромолекулы белка включаются в пространственную сетку геля.

5. С использованием флуоресцентной метки установлены особенности пролонгированного высвобождения из гидрогелевых материалов иммобилизованного комплекса противовоспалительных и антибактериальных пептидов и белков, секретируемых стволовыми клетками. Установлено, что изменение концентрации дженипина позволяет регулировать фармако-кинетические свойства хитозан-фиброиновых пленок.

4. Разработан способ получения модифицированных широкопористых криоструктуратов хитозана и его композиций с фиброином.

5. В опытах *in vitro* показаны биосовместимость и отсутствие цитотоксичности разработанных пленок и нановолокнистых материалов. Установлена способность фиброин-содержащих волокон поддерживать трехмерный рост мышечных фибробластов и стволовых мезенхимальных клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lewis R. Unraveling the weave of spider silk // *Bioscience*. – 1996. – V. 46. – №. 9. – P. 636-638.
2. Ayoub N. A. et al. Blueprint for a high-performance biomaterial: full-length spider dragline silk genes // *PloS one*. – 2007. – V. 2. – №. 6. – P. e514.
3. Putthanarat S. et al. Investigation of the nanofibrils of silk fibers // *Polymer*. – 2000. – V. 41. – №. 21. – P. 7735-7747.
4. Altman G.H. et al. Silk-based biomaterials // *Biomaterials*. – 2003. – V. 24. – №. 3. – P. 401-416.
5. Tsukada M., Gotoh Y., Minoura N.J. // *Seric. Sci. Jpn.* – 1990 – V. 59 – №. 2. – P. 325–330.
6. Gotoh Y. et al. Preparation of lactose–silk fibroin conjugates and their application as a scaffold for hepatocyte attachment // *Biomaterials*. – 2004. – V. 25. – №. 6. – P. 1131-1140.
7. Shimura K. et al. Studies on silk fibroin of *Bombyx mori*. I. Fractionation of fibroin prepared from the posterior silk gland // *The Journal of Biochemistry*. – 1976. – V. 80. – №. 4. – P. 693-702.
8. Zhou C.Z. et al. Silk fibroin: structural implications of a remarkable amino acid sequence // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2001. – V. 44. – №. 2. – P. 119-122.
9. Sashina E.S. et al. Structure and solubility of natural silk fibroin // *Russian journal of applied chemistry*. – 2006. – V. 79. – №. 6. – P. 869-876.
10. Tanaka K., Inoue S., Mizuno S. Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the HL complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori* // *Insect biochemistry and molecular biology*. – 1999. – V. 29. – №. 3. – P. 269-276.
11. Sehnal F., Žurovec M. Construction of silk fiber core in *Lepidoptera* // *Biomacromolecules*. – 2004. – V. 5. – №. 3. – P. 666-674.

12. Inoue S. et al. Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6: 6: 1 molar ratio // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – V. 275. – №. 51. – P. 40517-40528.
13. Kundu B., Kundu S.C. Osteogenesis of human stem cells in silk biomaterial for regenerative therapy // *Progress in polymer science*. – 2010. – V. 35. – №. 9. – P. 1116-1127.
14. Inoue S. et al. Nanostructure of Natural Fibrous Protein: In Vitro Nanofabric Formation of *Samia cynthia ricini* Wild Silk Fibroin by Self Assembling // *Nano Letters*. – 2003. – V. 3. – №. 10. – P. 1329-1332.
15. Vollrath F., Porter D. Spider silk as a model biomaterial // *Applied Physics A*. – 2006. – V. 82. – №. 2. – P. 205-212.
16. Lefèvre T., Rousseau M. E., Pézolet M. Protein secondary structure and orientation in silk as revealed by Raman spectromicroscopy // *Biophysical journal*. – 2007. – V. 92. – №. 8. – P. 2885-2895.
17. Becker M. A. et al. Silk Polymers: Materials Science and Biotechnology // Kaplan, D. – 1994. – P. 252-269.
18. Valluzzi R., Gido S. P. The crystal structure of *Bombyx mori* silk fibroin at the air–water interface // *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*. – 1997. – V. 42. – №. 6. – P. 705-717.
19. Shimura K. et al. The occurrence of small component proteins in the cocoon fibroin of *Bombyx mori* // *The Journal of Sericultural Science of Japan*. – 1982. – V. 51. – №. 1. – P. 20-26.
20. Baker E.N., Hubbard R.E. Hydrogen bonding in globular proteins // *Progress in biophysics and molecular biology*. – 1984. – V. 44. – №. 2. – P. 97-179.
21. Dill K.A. Dominant forces in protein folding // *Biochemistry*. – 1990. – V. 29. – №. 31. – P. 7133-7155.
22. Trabbic K.A., Yager P. Comparative structural characterization of naturally-and synthetically-spun fibers of *Bombyx mori* fibroin // *Macromolecules*. – 1998. – V. 31. – №. 2. – P. 462-471.

23. Wen D. J. et al. Conformation and crystallinity of silk fibroin // *J. Textile. Res.* – 2005. – V. 26. – P. 110-112.
24. Padol A.R. et al. Safety evaluation of silk protein film (a novel wound healing agent) in terms of acute dermal toxicity, acute dermal irritation and skin sensitization // *Toxicology international.* – 2011. – V. 18. – №. 1. – P. 17.
25. Langer R., Vacanti J.P. Tissue engineering // *Science.* – 1993. – V. 260. – №. 5110. – P. 920-926.
26. Lazo N.D., Downing D.T. Crystalline regions of *Bombyx mori* silk fibroin may exhibit β -turn and β -helix conformations // *Macromolecules.* – 1999. – V. 32. – №. 14. – P. 4700-4705.
27. Dwyer D. S. Molecular simulation of the effects of alcohols on peptide structure // *Biopolymers: Original Research on Biomolecules.* – 1999. – V. 49. – №. 7. – P. 635-645.
28. Vollrath F., Knight D.P. Liquid crystalline spinning of spider silk // *Nature.* – 2001. – V. 410. – №. 6828. – P. 541-548.
29. Vollrath F. Strength and structure of spiders' silks // *Reviews in Molecular Biotechnology.* – 2000. – V. 74. – №. 2. – P. 67-83.
30. Omenetto F.G., Kaplan D.L. New opportunities for an ancient material // *Science.* – 2010. – V. 329. – №. 5991. – P. 528-531.
31. Keten S. et al. Nanoconfinement controls stiffness, strength and mechanical toughness of β -sheet crystals in silk // *Nature materials.* – 2010. – V. 9. – №. 4. – P. 359-367.
32. Frische S., Maunsbach A.B., Vollrath F. Elongate cavities and skin-core structure in nephila spider silk observed by electron microscopy // *Journal of microscopy.* – 1998. – V. 189. – P. 64-70.
33. Poza P. et al. Fractographic analysis of silkworm and spider silk // *Engineering Fracture Mechanics.* – 2002. – V. 69. – №. 9. – P. 1035-1048.
34. Akai H., Nagashima T., Aoyagi S. Ultrastructure of posterior silk gland cells and liquid silk in indian tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera:

Saturniidae) // International Journal of Insect Morphology and Embryology. – 1993. – V. 22. – №. 5. – P. 497-506.

35. Wang H.Y., Zhang Y.Q. Effect of regeneration of liquid silk fibroin on its structure and characterization // Soft Matter. – 2013. – V. 9. – №. 1. – P. 138-145.

36. Kundu B. et al. Isolation and processing of silk proteins for biomedical applications // International journal of biological macromolecules. – 2014. – V. 70. – P. 70-77.

37. Haider Z.A., Arai M., Hirabayashi K. Mechanism of the gelation of fibroin solution // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 1993. – V. 57. – №. 11. – P. 1910-1912.

38. Hu X. et al. Regulation of silk material structure by temperature-controlled water vapor annealing // Biomacromolecules. – 2011. – V. 12. – №. 5. – P. 1686-1696.

39. Dal Pra I. et al. De novo engineering of reticular connective tissue in vivo by silk fibroin nonwoven materials // Biomaterials. – 2005. – V. 26. – №. 14. – P. 1987-1999.

40. Ajisawa A. Studies on the dissolution of silk fibroin III. The dissolution of silk fibroin by $\text{CaCl}_2\text{-H}_2\text{O-OH}$ ternary system solution // The Journal of Sericultural Science of Japan. – 1969. – V. 38. – №. 4. – P. 340-346.

41. Jin H.J. et al. Water-stable silk films with reduced β -sheet content // Advanced Functional Materials. – 2005. – V. 15. – №. 8. – P. 1241-1247.

42. Tao W., Li M., Zhao C. Structure and properties of regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin in aqueous solution // International Journal of Biological Macromolecules. – 2007. – V. 40. – №. 5. – P. 472-478.

43. Rajan M.K., Balakrishnan A., Jayaraman K. Development of an antibody against a 170-kDa fragment of fibroin isolated from cocoon fibres of *Bombyx mori* // Journal of biochemical and biophysical methods. – 1992. – V. 25. – №. 1. – P. 37-43.

44. Mathur A. B. et al. The dissolution and characterization of Bombyx mori silk fibroin in calcium nitrate-methanol solution and the regeneration of films // *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*. – 1997. – V. 42. – №. 1. – P. 61-74.
45. Zhao C. et al. Structural characterization and artificial fiber formation of Bombyx mori silk fibroin in hexafluoro-iso-propanol solvent system // *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*. – 2003. – V. 69. – №. 2. – P. 253-259.
46. Yao J. et al. Artificial Spinning and Characterization of Silk Fiber from Bombyx mori Silk Fibroin in Hexafluoroacetone Hydrate // *Macromolecules*. – 2002. – V. 35. – №. 1. – P. 6-9.
47. Um I. C. et al. Wet spinning of silk polymer: I. Effect of coagulation conditions on the morphological feature of filament // *International journal of biological macromolecules*. – 2004. – V. 34. – №. 1-2. – P. 89-105.
48. Nazarov R., Jin H.J., Kaplan D.L. Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin // *Biomacromolecules*. – 2004. – V. 5. – №. 3. – P. 718-726.
49. Hirabavashi. K., Ishikawa. H., Kasai. N., Kakudo. M. Fiber-formation mechanism of tussah silk fibroin // *Kogyo Kagaku Zashi*. – 1970. – V.73.
50. Magoshi J., Nakamura S. Studies on physical properties and structure of silk. Glass transition and crystallization of silk fibroin // *J Of Appl. Polym Sci*. – 1975. – V. 19. – P. 1013-1015.
51. Matsumoto A. et al. Silk fibroin solution properties related to assembly and structure // *Macromolecular bioscience*. – 2008. – V. 8. – №. 11. – P. 1006-1018.
52. Su D. et al. Enhancing mechanical properties of silk fibroin hydrogel through restricting the growth of β -sheet domains // *ACS applied materials & interfaces*. – 2017. – V. 9. – №. 20. – P. 17489-17498.
53. Nogueira G.M. et al. Preparation and characterization of ethanol-treated silk fibroin dense membranes for biomaterials application using waste silk fibers as raw material // *Bioresource technology*. – 2010. – V. 101. – №. 21. – P. 8446-8451.

54. Zuo B., Liu L., Wu Z. Effect on properties of regenerated silk fibroin fiber coagulated with aqueous methanol/ethanol // *Journal of applied polymer science*. – 2007. – V. 106. – №. 1. – P. 53-59.
55. Li M. et al. Controlling molecular conformation of regenerated wild silk fibroin by aqueous ethanol treatment // *Polymers for Advanced Technologies*. – 2003. – V. 14. – №. 10. – P. 694-698.
56. Mo C. et al. The effect of water on the conformation transition of *Bombyx mori* silk fibroin // *Vibrational Spectroscopy*. – 2009. – V. 51. – №. 1. – P. 105-109.
57. Chen X. et al. Conformation transition kinetics of *Bombyx mori* silk protein // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2007. – V. 68. – №. 1. – P. 223-231.
58. Zhang K., Qian Y., Wang H., Fan L., Huang C., Yin A., Mo X. Genipin-crosslinked silk fibroin/hydroxybutyl chitosan nanofibrous scaffolds for tissue-engineering application // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2010. – V. 95A. – P. 870–881.
59. Kim U.J. et al. Structure and properties of silk hydrogels // *Biomacromolecules*. – 2004. – V. 5. – №. 3. – P. 786-792.
60. Yucel T., Cebe P., Kaplan D.L. Vortex-induced injectable silk fibroin hydrogels // *Biophysical journal*. – 2009. – V. 97. – №. 7. – P. 2044-2050.
61. Wang X. et al. Sonication-induced gelation of silk fibroin for cell encapsulation // *Biomaterials*. – 2008. – V. 29. – №. 8. – P. 1054-1064.
62. Yucel T. et al. Non-equilibrium silk fibroin adhesives // *Journal of structural biology*. – 2010. – V. 170. – №. 2. – P. 406-412.
63. Bhardwaj N., Chakraborty S., Kundu S.C. Freeze-gelled silk fibroin protein scaffolds for potential applications in soft tissue engineering // *International journal of biological macromolecules*. – 2011. – V. 49. – №. 3. – P. 260-267.
64. Matsumoto A. et al. Mechanisms of silk fibroin sol– gel transitions // *The journal of physical chemistry B*. – 2006. – V. 110. – №. 43. – P. 21630-21638.

65. Lu Q. et al. Silk fibroin electrogelation mechanisms // *Acta biomaterialia*. – 2011. – V. 7. – №. 6. – P. 2394-2400.
66. Samal S. K., Kaplan D.L., Chiellini E. Ultrasound sonication effects on silk fibroin protein // *Macromolecular Materials and Engineering*. – 2013. – V. 298. – №. 11. – P. 1201-1208.
67. Ak F. et al. Macroporous silk fibroin cryogels // *Biomacromolecules*. – 2013. – V. 14. – №. 3. – P. 719-727.
68. Wu X. et al. Sodium dodecyl sulfate-induced rapid gelation of silk fibroin // *Acta biomaterialia*. – 2012. – V. 8. – №. 6. – P. 2185-2192.
69. Calabrese R., Kaplan D.L. Silk ionomers for encapsulation and differentiation of human MSCs // *Biomaterials*. – 2012. – V. 33. – №. 30. – P. 7375-7385.
70. Fini M. et al. The healing of confined critical size cancellous defects in the presence of silk fibroin hydrogel // *Biomaterials*. – 2005. – V. 26. – №. 17. – P. 3527-3536.
71. Zhang W. et al. The use of injectable sonication-induced silk hydrogel for VEGF165 and BMP-2 delivery for elevation of the maxillary sinus floor // *Biomaterials*. – 2011. – V. 32. – №. 35. – P. 9415-9424.
72. Pallotta I. et al. Characteristics of platelet gels combined with silk // *Biomaterials*. – 2014. – V. 35. – №. 11. – P. 3678-3687.
73. Aghaloo T.L., Moy P.K., Freymiller E.G. Evaluation of platelet-rich plasma in combination with anorganic bovine bone in the rabbit cranium: a pilot study // *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. – 2004. – V. 19. – №. 1. – P.59-65.
74. Dallari D. et al. Enhanced tibial osteotomy healing with use of bone grafts supplemented with platelet gel or platelet gel and bone marrow stromal cells // *JBJS*. – 2007. – V. 89. – №. 11. – P. 2413-2420.
75. Kanthan S. R. et al. Platelet-rich plasma (PRP) enhances bone healing in non-united critical-sized defects: a preliminary study involving rabbit models // *Injury*. – 2011. – V. 42. – №. 8. – P. 782-789.

76. Correia C. et al. Development of silk-based scaffolds for tissue engineering of bone from human adipose-derived stem cells // *Acta biomaterialia*. – 2012. – V. 8. – №. 7. – P. 2483-2492.
77. Oliveira A.L. et al. Aligned silk-based 3-D architectures for contact guidance in tissue engineering // *Acta biomaterialia*. – 2012. – V. 8. – №. 4. – P. 1530-1542.
78. Jin H.J. et al. Electrospinning Bombyx mori silk with poly (ethylene oxide) // *Biomacromolecules*. – 2002. – V. 3. – №. 6. – P. 1233-1239.
79. Min B.M. et al. Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro // *Biomaterials*. – 2004. – V. 25. – №. 7-8. – P. 1289-1297.
80. Hofmann S. et al. Remodeling of tissue-engineered bone structures in vivo // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2013. – V. 85. – №. 1. – P. 119-129.
81. Ki C.S. et al. Development of 3-D nanofibrous fibroin scaffold with high porosity by electrospinning: implications for bone regeneration // *Biotechnology letters*. – 2008. – V. 30. – №. 3. – P. 405-410.
82. Park S.Y. et al. Electrospun silk fibroin scaffolds with macropores for bone regeneration: an in vitro and in vivo study // *Tissue Engineering Part A*. – 2010. – V. 16. – №. 4. – P. 1271-1279.
83. Ghosh S. et al. Direct-write assembly of microperiodic silk fibroin scaffolds for tissue engineering applications // *Advanced Functional Materials*. – 2008. – V. 18. – №. 13. – P. 1883-1889.
84. Dababneh A.B., Ozbolat I.T. Bioprinting technology: a current state-of-the-art review // *Journal of Manufacturing Science and Engineering*. – 2014. – V. 136. – №. 6.
85. Suntivich R. et al. Inkjet printing of silk nest arrays for cell hosting // *Biomacromolecules*. – 2014. – V. 15. – №. 4. – P. 1428-1435.

86. Das S. et al. Bioprintable, cell-laden silk fibroin–gelatin hydrogel supporting multilineage differentiation of stem cells for fabrication of three-dimensional tissue constructs // *Acta biomaterialia*. – 2015. – V. 11. – P. 233-246.
87. Tamada Y. New process to form a silk fibroin porous 3-D structure // *Biomacromolecules*. – 2005. – V. 6. – №. 6. – P. 3100-3106.
88. Roseti L. et al. Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives // *Materials Science and Engineering: C*. – 2017. – V. 78. – P. 1246-1262.
89. Chocholata P., Kulda V., Babuska V. Fabrication of scaffolds for bone-tissue regeneration // *Materials*. – 2019. – V. 12. – №. 4. – P. 568.
90. Qu H. et al. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review // *RSC advances*. – 2019. – V. 9. – №. 45. – P. 26252-26262.
91. Turnbull G. et al. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering // *Bioactive materials*. – 2018. – V. 3. – №. 3. – P. 278-314.
92. Dwivedi R. et al. Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature // *Journal of oral biology and craniofacial research*. – 2020. – V. 10. – №. 1. – P. 381-388.
93. Seal B.L., Otero T.C., Panitch A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration // *Materials Science and Engineering: R: Reports*. – 2001. – V. 34. – №. 4-5. – P. 147-230.
94. Nair L.S., Laurencin C.T. Biodegradable polymers as biomaterials // *Progress in polymer science*. – 2007. – V. 32. – №. 8-9. – P. 762-798.
95. Kasoju N., Bora U. Silk fibroin in tissue engineering // *Advanced healthcare materials*. – 2012. – V. 1. – №. 4. – P. 393-412.
96. Wharram S.E. et al. Electrospun silk material systems for wound healing // *Macromolecular bioscience*. – 2010. – V. 10. – №. 3. – P. 246-257.
97. Wang X. et al. Biomaterial coatings by stepwise deposition of silk fibroin // *Langmuir*. – 2005. – V. 21. – №. 24. – P. 11335-11341.

98. Minoura N. et al. Attachment and growth of cultured fibroblast cells on silk protein matrices // *Journal of biomedical materials research*. – 1995. – V. 29. – №. 10. – P. 1215-1221.
99. Inouye K. et al. Use of *Bombyx mori* silk fibroin as a substratum for cultivation of animal cells // *Journal of biochemical and biophysical methods*. – 1998. – V. 37. – №. 3. – P. 159-164.
100. Sofia S. et al. Functionalized silk-based biomaterials for bone formation // *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*. – 2001. – V. 54. – №. 1. – P. 139-148.
101. Mandal B.B., Kundu S.C. Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds // *Biomaterials*. – 2009. – V. 30. – №. 15. – P. 2956-2965
102. Servoli E. et al. Surface properties of silk fibroin films and their interaction with fibroblasts // *Macromolecular bioscience*. – 2005. – V. 5. – №. 12. – P. 1175-1183.
103. Marelli B. et al. Compliant electrospun silk fibroin tubes for small vessel bypass grafting // *Acta Biomaterialia*. – 2010. – V. 6. – №. 10. – P. 4019-4026.
104. Bhattacharjee P. et al. Investigating the potential of combined growth factors delivery, from non-mulberry silk fibroin grafted poly (ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite nanofibrous scaffold, in bone tissue engineering // *Applied Materials Today*. – 2016. – V. 5. – P. 52-67.
105. Kim H.J. et al. Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells // *Biomaterials*. – 2005. – V. 26. – №. 21. – P. 4442-4452.
106. Uebersax L. et al. Biocompatibility and osteoconduction of macroporous silk fibroin implants in cortical defects in sheep // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2013. – V. 85. – №. 1. – P. 107-118.
107. Kim U.J. et al. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin // *Biomaterials*. – 2005. – V. 26. – №. 15. – P. 2775-2785.

108. Sugihara A. et al. Promotive effects of a silk film on epidermal recovery from full-thickness skin wounds (44552) // *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. – 2000. – V. 225. – №. 1. – P. 58-64.
109. Denkbaş E.B., Seyyal M., Pişkin E. Implantable 5-fluorouracil loaded chitosan scaffolds prepared by wet spinning // *Journal of Membrane Science*. – 2000. – V. 172. – №. 1-2. – P. 33-38.
110. Deville S., Saiz E., Tomsia A. P. Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering // *Biomaterials*. – 2006. – V. 27. – №. 32. – P. 5480-5489.
111. Landi E., Valentini F., Tampieri A. Porous hydroxyapatite/gelatin scaffolds with ice-designed channel-like porosity for biomedical applications // *Acta Biomaterialia*. – 2008. – V. 4. – №. 6. – P. 1620-1626.
112. Sadeghianmaryan A. et al. Extrusion-based printing of chitosan scaffolds and their in vitro characterization for cartilage tissue engineering // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – V. 164. – P. 3179-3192.
113. Lauritano D. et al. Nanomaterials for periodontal tissue engineering: Chitosan-based scaffolds. A systematic review // *Nanomaterials*. – 2020. – V. 10. – №. 4. – P. 605.
114. Jayakumar R. et al. Graft copolymerized chitosan—present status and applications // *Carbohydrate Polymers*. – 2005. – V. 62. – №. 2. – P. 142-158.
115. Mourya V.K., Inamdar N.N. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore // *Reactive and Functional Polymers*. – 2008. – V. 68. – №. 6. – P. 1013-1051.
116. VandeVord P.J. et al. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice // *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. – 2002. – V. 59. – №. 3. – P. 585-590.

117. Madhally S.V., Matthew H.W.T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering // *Biomaterials*. – 1999. – V. 20. – №. 12. – P. 1133-1142.
118. Nettles D.L., Elder S.H., Gilbert J.A. Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering // *Tissue engineering*. – 2002. – V. 8. – №. 6. – P. 1009-1016.
119. O'Brien F.J. et al. Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds // *Biomaterials*. – 2004. – V. 25. – №. 6. – P. 1077-1086.
120. Никоноров В.В. и др. Синтез и свойства криогелей хитозана, сшитого глутаровым альдегидом // *Высокомолекулярные соединения. Серия А*. – 2010. – Т. 52. – №. 8. – С. 1436-1443.
121. Никоноров В.В. и др. Влияние молекулярной массы полимерного предшественника на особенности формирования и свойства ковалентно-сшитых хитозановых криогелей // *Высокомолекулярные соединения. Серия А*. – 2011. – Т. 53. – №. 12. – С. 2067-2067.
122. De la Riva B. et al. VEGF-controlled release within a bone defect from alginate/chitosan/PLA-H scaffolds // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2009. – V. 73. – №. 1. – P. 50-58.
123. De la Riva B. et al. Local controlled release of VEGF and PDGF from a combined brushite–chitosan system enhances bone regeneration // *Journal of Controlled Release*. – 2010. – V. 143. – №. 1. – P. 45-52.
124. Lu H. et al. Porous chitosan scaffolds with embedded hyaluronic acid/chitosan/plasmid-DNA nanoparticles encoding TGF- β 1 induce DNA controlled release, transfected chondrocytes, and promoted cell proliferation // *PloS one*. – 2013. – V. 8. – №. 7. – P. e69950.
125. Li M., Ogiso M., Minoura N. Enzymatic degradation behavior of porous silk fibroin sheets // *Biomaterials*. – 2003. – V. 24. – №. 2. – P. 357-365.
126. Horan R.L. et al. In vitro degradation of silk fibroin // *Biomaterials*. – 2005. – V. 26. – №. 17. – P. 3385-3393.

127. Numata K., Cebe P., Kaplan D.L. Mechanism of enzymatic degradation of beta-sheet crystals // *Biomaterials*. – 2010. – V. 31. – №. 10. – P. 2926-2933.
128. Lu Q. et al. Water-insoluble silk films with silk I structure // *Acta biomaterialia*. – 2010. – V. 6. – №. 4. – P. 1380-1387.
129. You R. et al. Comparison of the in vitro and in vivo degradations of silk fibroin scaffolds from mulberry and nonmulberry silkworms // *Biomedical Materials*. – 2014. – V. 10. – №. 1. – P. 015003.
130. Pritchard E.M. et al. Incorporation of proteinase inhibitors into silk-based delivery devices for enhanced control of degradation and drug release // *Biomaterials*. – 2011. – V. 32. – №. 3. – P. 909-918.
131. Aghabegi Moghanjoughi A., Khoshnevis D., Zarrabi A. A concise review on smart polymers for controlled drug release // *Drug delivery and translational research*. – 2016. – V. 6. – №. 3. – P. 333-340.
132. Ulery B.D., Nair L.S., Laurencin C.T. Biomedical applications of biodegradable polymers // *Journal of polymer science Part B: polymer physics*. – 2011. – V. 49. – №. 12. – P. 832-864.
133. Tian H. et al. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application // *Progress in Polymer Science*. – 2012. – V. 37. – №. 2. – P. 237-280.
134. Yang N. et al. γ -Polyglutamic acid mediated crosslinking PNIPAAm-based thermo/pH-responsive hydrogels for controlled drug release // *Polymer Degradation and Stability*. – 2017. – V. 144. – P. 53-61.
135. Vashist A., Sharif A. Hydrogels: smart materials for drug delivery // *Oriental Journal of Chemistry*. – 2013. – V. 29. – №. 3. – P. 861-870.
136. Patil J.S. et al. Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: the novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: a review // *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. – 2010. – V. 5. – №. 1. – P. 241-248.
137. Wei M. et al. Stimuli-responsive polymers and their applications // *Polymer Chemistry*. – 2017. – V. 8. – №. 1. – P. 127-143.

138. Rasool A., Ata S., Islam A. Stimuli responsive biopolymer (chitosan) based blend hydrogels for wound healing application // Carbohydrate polymers. – 2019. – V. 203. – P. 423-429.
139. Racine L. et al. Design of interpenetrating chitosan and poly (ethylene glycol) sponges for potential drug delivery applications // Carbohydrate polymers. – 2017. – V. 170. – P. 166-175.
140. Sizílio R.H. et al. Chitosan/pvp-based mucoadhesive membranes as a promising delivery system of betamethasone-17-valerate for aphthous stomatitis // Carbohydrate polymers. – 2018. – V. 190. – P. 339-345.
141. Перепелкин К.Е. Физико-химические особенности формирования природных фиброиновых нитей. Возможности применения принципов биомиметики в перспективных технологиях получения химических волокон // Известия высших учебных заведений. Химия и химическая технология. – 2007. – Т. 50. – №. 11. – С. 3-13.
142. Сашина Е.С. и др. Строение и растворимость фиброина природного шелка (Обзор) // Журнал прикладной химии. – 2006. – Т. 79. – №. 6. – С. 881-888.
143. Ajisawa A. Dissolution of silk fibroin with calciumchloride/ethanol aqueous solution Studies on the dissolution of silk fibroin.(IX) // The Journal of Sericultural Science of Japan. – 1998. – V. 67. – №. 2. – P. 91-94.
144. Bhattarai N. et al. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility // Biomaterials. – 2005. – V. 26. – №. 31. – P. 6176-6184.
145. Chen J.P., Chen S.H., Lai G.J. Preparation and characterization of biomimetic silk fibroin/chitosan composite nanofibers by electrospinning for osteoblasts culture // Nanoscale research letters. – 2012. – V. 7. – №. 1. – P. 1-11
146. Kildeeva N. et al. Influence of genipin crosslinking on the properties of chitosan-based films // Polymers. – 2020. – V. 12. – №. 5. – P. 1086.
147. Сажнев Н. А. и др. Получение криоструктуратов хитозана с регулируемой пористой морфологией и их использование в качестве 3D-

подложек для культивирования животных клеток // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54. – №. 5. – С. 455-464.

148. Kildeeva N.R., Sazhnev N.A., Zakharova V.A., Gubochkina A.A. Biologically active films and fibers based on chitosan cross-linked by genipin. // Binanotox. 11-th International Conference. – 2020. – P.24.

149. Al-Rekabi Z., Contera S. Multifrequency AFM reveals lipid membrane mechanical properties and the effect of cholesterol in modulating viscoelasticity // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2018. – V. 115. – №. 11. – P. 2658-2663.

150. Marshall Jr G.W. et al. Mechanical properties of the dentinoenamel junction: AFM studies of nanohardness, elastic modulus, and fracture // Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials. – 2001. – V. 54. – №. 1. – P. 87-95.

151. Baker S. R. et al. Determining the mechanical properties of electrospun poly-ε-caprolactone (PCL) nanofibers using AFM and a novel fiber anchoring technique // Materials Science and Engineering: C. – 2016. – V. 59. – P. 203-212.

152. Liu Y., Chen W., Kim H.-I. Mechanical and Antimicrobial Properties of Genipin-Crosslinked Chitosan/Poly(Ethylene Glycol) IPN. // Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics. – 2012. – V. 51. – P. 1069-1079

153. Frick J.M., Ambrosi A. et al. Influence of Glutaraldehyde Crosslinking and Alkaline Post-treatment on the Properties of Chitosan-Based Films // J Polym Environ. – 2018. – V. 26. – P. 2748–2757.

154. Silva R.M. et al. Preparation and characterisation in simulated body conditions of glutaraldehyde crosslinked chitosan membranes // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2004. – V. 15. – P. 1105–1112.

155. Garavand F., Rouhi M. et al. Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach: A review // International Journal of Biological Macromolecules. – 2017. – V.104. – P.687–707.

156. Uhrich K.E. et al. Polymeric systems for controlled drug release // Chemical Reviews-Columbus. – 1999. – V. 99. – №. 11. – P. 3181-3198.

157. Oh J.Y. et al. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury // *Stem cells*. – 2008. – V. 26. – №. 4. – P. 1047-1055.

158. Khubutiya M.S. et al. Paracrine mechanisms of proliferative, anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of mesenchymal stromal cells in models of acute organ injury // *Cytotherapy*. – 2014. – V. 16. – №. 5. – P. 579-585.

159. Khubutiya M. S. et al. Effect of conditioned medium and bone marrow stem cell lysate on the course of acetaminophen-induced liver failure // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2015. – V. 159. – №. 1. – P. 118-123.

160. Hoffmann A. et al. High and low molecular weight fluorescein isothiocyanate (FITC)–dextrans to assess blood-brain barrier disruption: Technical considerations // *Translational stroke research*. – 2011. – V. 2. – №. 1. – P. 106-111.