

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 57.089.67: 576.54

ФОТООТВЕРЖДАЕМЫЕ ПЛЕНКИ НА ОСНОВЕ ФИБРОИНА И ЖЕЛАТИНА
ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖНЫХ ПОКРОВОВ

М.С. Котлярова^{1,*}, А.С. Солдатенко¹, А.Ю. Архипова^{2,3}, И.В. Бессонов⁴,
Л.И. Давыдова⁵, А.М. Мойсенович¹, В.Г. Богущ⁵, В.Г. Дебабов⁵, Штиль А.А.⁶,
М.М. Мойсенович², К.В. Шайтан¹

¹ Кафедра биоинженерии и ² лаборатория конфокальной микроскопии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

³ Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского, Россия, 129110, г. Москва, ул. Щепкина, д. 61/2;

⁴ АО «ЭФФЕРОН», Россия, 121205, г. Москва, территория Инновационного центра «Сколково», ул. Нобеля, д. 7;

⁵ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Россия, 117545, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1;

⁶ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23

*e-mail: kotlyarova.ms@gmail.com

Поиск новых подходов для восстановления кожных покровов — актуальная задача современной регенеративной медицины. Перспективным направлением в данной области является использование биосовместимых материалов. Конструкции из них могут служить основой биомедицинских изделий, предназначенных для замещения поврежденной ткани, или выполнять роль раневых покрытий. В данной работе были созданы фотополимеризуемые пленки на основе фиброина шелка и метакрилированного желатина (Ф-МЖ). В ходе исследования *in vitro* было выявлено, что использование пленок в качестве субстрата для культивирования фибробластов NIH 3T3 и кератиноцитов HaCaT приводит к изменению кинетики роста клеток. По данным МТТ-теста, на фотополимеризуемых пленках скорость пролиферации фибробластов была меньше, а кератиноцитов больше по сравнению с культуральным пластиком. Оценка влияния полученных пленок на регенерацию кожи была произведена *in vivo* в модели полнослойной раны кожи мыши. Использование пленок Ф-МЖ в качестве раневых покрытий способствовало ускорению заживления раны и более полному восстановлению структуры кожи по сравнению с контролем (применение марли). У животных в экспериментальной группе наблюдалось формирование волосяных фолликулов и сокращение площади рубца на 28 сут.

Ключевые слова: раневые покрытия, фиброин, метакрилированный желатин, фотополимеризация, кератиноциты, фибробласты, тканевая инженерия

Одной из ключевых функций кожного покрова является защита внутренней среды организма от агрессивных внешних воздействий. Его повреждения приводят к нарушению этого барьера, что вызывает риск инфицирования, а в ряде случаев, например при тяжелых ожогах, к смертельному исходу. При обширных полнослойных ранах требуется замещение утраченного участка кожи [1]. При этом использование кожных трансплантатов связано с рядом ограничений и риском, в том числе возможностью переноса инфекций в случае аллогенных трансплантатов и необходимостью дополнительных и часто многократных операций по получению кожных пластов — в случае аутологичных. Менее тяжелые повреждения, как правило, могут заживать без хирургического вмешательства. В результате формируются рубцы,

выраженность которых зависит, главным образом, от глубины повреждений. Они могут приводить к нарушению подвижности конечностей, обезображиванию лица и тела [2].

В связи с этим разрабатываются новые подходы к восстановлению повреждений кожи. Применение биосовместимых материалов позволяет создавать раневые покрытия, которые обеспечивают защиту от механических повреждений и проникновения бактерий, а также отводят излишек экссудата при сохранении раневого ложа во влажном состоянии, что благоприятно влияет на процесс заживления [3]. С другой стороны, конструкции на их основе можно использовать для создания эквивалентов кожи, что особенно актуально при значительных повреждениях. В качестве материалов могут быть использованы различные биораз-

лагаемые полимеры синтетического или естественного происхождения [4].

Ранее был получен фотополимеризуемый гидрогель на основе двух биосовместимых природных полимеров: фиброина и метакрилированного желатина [5]. Фиброин – структурный белок шелка тутового шелкопряда *Bombyx mori*, характеризуется высокой биосовместимостью, уникальной прочностью и способностью к биodeградации [6]. Метакрилированный желатин является химическим производным продукта деградации коллагена, а потому, как и коллаген, содержит сайты связывания интегринов, обеспечивающих адгезию клеток [7]. Создание композиционных материалов на основе нескольких биополимеров позволяет сочетать достоинства каждого из компонентов и получить материал с превосходными механическими и биологическими характеристиками и возможностью формирования конструкций с заданными, тонко регулируемыми физическими свойствами и архитектурой [8]. Ранее было показано, что микроносители на основе комбинации фиброина и желатина поддерживают адгезию и пролиферацию клеток *in vitro* [9], а также способствуют ускоренному заживлению полнослойных ран и восстановлению структуры кожи и препятствуют формированию рубца *in vivo* [10]. В данной работе были изготовлены фотополимеризуемые пленки на основе фиброина шелка и метакрилированного желатина, которые могут применяться в качестве раневых покрытий, а также как основа для создания искусственной кожи. Было оценено их взаимодействие с фибробластами и кератиноцитами – основными типами клеток, участвующих в регенерации, – а также влияние свойств материала на процесс восстановления ткани в модели полнослойной раны кожи мыши.

Материалы и методы

Синтез метакрилированного желатина. Навеску кристаллического желатина (160 Bloom, Carl Roth, Германия) растворяли в 0,1М калий-фосфатном буфере (pH 7,2) в круглодонной колбе при перемешивании на магнитной мешалке при 50°C. Итоговая концентрация составляла 5% (w/v). После полного растворения навески добавляли метакриловый ангидрид (Sigma-Aldrich, Германия) из расчета 1 мл на 1 г кристаллического желатина. Реакцию проводили при тех же условиях в течение 1 ч. По ее завершении остужали раствор с взвесью метакрилированного желатина, разбавляли дистиллированной водой в два раза и диализовали против двадцатикратного объема дистиллированной воды при постоянном перемешивании на магнитной мешалке в течение 3 сут со сменой каждый час до исчезновения запаха метакрилового ангидрида. Содержимое мешка перемещали в чашки Петри, замораживали в течение 1 ч при –18°C и лиофилизировали в течение ночи.

Получение водного раствора фиброина. Навеску шелковых хирургических нитей растворяли при 80°C в 9,3М растворе LiBr, после чего диализовали против двадцатикратного объема дистиллированной воды в течение суток, при этом производили 10 смен воды во внешнем резервуаре. На спектрофотометре определяли концентрацию фиброина по поглощению при 280 нм и разбавляли раствор дистиллированной водой до 60 мг/мл.

Получение фотополимеризуемой смеси и формирование пленок. Навеску метакрилированного желатина из расчета 60 мг/мл растворяли в ДМСО (Sigma-Aldrich, Германия) при 50°C в термошкафу, после этого добавляли фотоинициатор фенил-бис(2,4,6-триметил-бензоил)фосфин оксид ТРО (Sigma-Aldrich, Германия), концентрация в растворе составляла 3% от массы метакрилированного желатина. Затем добавляли водный раствор фиброина с концентрацией 60 мг/мл. Соотношение фиброина и метакрилированного желатина в конечном растворе составляло 1:1 (w/w). Пленки изготавливали в ламинарном шкафу. Фотополимеризуемую смесь объемом 8 мл наносили на поверхность полированной тефлоновой пластины, формировали квадрат со стороной 8 см и облучали светом ультрафиолетовой лампы в течение 30 мин при комнатной температуре. По окончании полимеризации пластину с пленкой помещали на 10 мин в 96% этанол, затем отделяли пленку и переносили на хранение в 96% этанол.

Сканирующая электронная микроскопия. Для изучения структуры пленки обезвоживали в восходящей концентрации этанола и ацетона, после чего высушивали на приборе Hitachi critical point dryer HCP-2 (Hitachi, Ltd., Япония). Используя прибор Ion Coater IB3 (Eiko Engineering Co, Япония) напыляли слой платины толщиной 20 нм. Образцы изучали на микроскопе Camscan S2 (Cambridge Instruments, Великобритания), изображения получали в программе MicroCapture (SMA, РФ)

Культивирование фибробластов NIH 3T3 и кератиноцитов HaCaT на поверхности фотоотвержденных пленок. В эксперименте использовали две линии клеток. Фибробласты NIH 3T3 получены из эмбрионов мыши и являются стандартной фибробластоподобной линией для проверки биосовместимости материалов; получены из Российской коллекции клеточных культур. Кератиноциты HaCaT – иммортализованная линия, выделенная из кожи человека; любезно предоставлены Е.Б. Цитриным (ФГБУН «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН», Москва, Россия).

Из пленки круглым ножом вырезали диски диаметром 6 мм, стерилизовали их в 70% этаноле в течение 40 мин и отмывали минимальной средой Игла в модификации Дульбекко (ДМЕМ,

ПанЭко, РФ). Образцы переносили в лунки 96-луночной плашки и наносили по 100 мкл суспензии клеток (около 1,5 тыс фибробластов или кератиноцитов на диск) в среде DMEM с 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США). Образцы выдерживали в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ в течение 7 сут. На 1, 3, 7 сут культивирования проводили МТТ-тест: вносили в лунки по 10 мкл раствора МТТ-реагента (5 мг/мл в фосфатно-солевом буфере) и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 4 ч. После этого отбирали среду и растворяли образовавшиеся фиолетовые кристаллы формазана в ДМСО. Определяли оптическую плотность раствора при 540 нм. В качестве контроля использовали культуральный пластик.

Модель полнослойной раны кожи мыши. В работе использовали мышей линии C57BL/6N, полученных из питомника «Пушино». Животных анестезировали внутривенной инъекцией 100 мкл смеси 10% анестетика (Zoletil 100, Virbac, Франция) и 20% миорелаксанта (Рометар, Bioveta, Чехия) в стерильном фосфатно-солевом буфере. По достижении полного отсутствия рефлексов на укол задних конечностей приступали к операции. Со спины удаляли шерсть с использованием депиляционного крема, промывали кожу водой и обрабатывали 70%-ным этанолом. Формировали полнослойную асептическую рану стерильным одноразовым ножом для биопсии, диаметр 4 мм (EPITHEASY, Medax, Италия). Раны в экспериментальной группе животных закрывали соответствующего размера дисками, вырезанными из пленки, стерилизованными в 70% этаноле и отмытыми стерильным фосфатно-солевым буфером. В контрольной группе применяли стерильную марлю. Покрытия в обеих группах закрепляли пластырем Tegaderm (3М, США).

Морфометрический анализ скорости затягивания раны и проведение гистологических исследований. Для анализа скорости затягивания раны получали макроизображения ран (на поздних точках рубцов) непосредственно после операции и на 2, 4, 7, 14, 28 сут. Использовали фотокамеру с макрообъективом AF MICRO NIKKOR 200mm 1:4 D. Обрабатывали изображения в программе ImageJ (Национальный институт здоровья, США): выделяли область раны и рассчитывали пиксельную площадь. Ее оценивали в процентах относительно нулевой точки по формуле: (площадь раны на день n/площадь исходной раны) × 100%. Для получения гистологических препаратов на 28 сут животных анестезировали и подготавливали к операции описанным выше способом. Затем вырезали образцы кожи с рубцами размером 1x1 см, расправляли и выдерживали в течение 1 сут в растворе Буена (насыщенный водный раствор пикриновой кислоты, формалин и ледяная уксусная кислота в соотношении 15:5:1 соответственно). Мышей умертвляли путем цервикальной дислока-

ции. По завершении инкубации образцы разрезали по средней линии в области травмы, обезживали в спирте восходящей концентрации, после чего заключали в Histomix (БиоВитрум, РФ). Настраивали прибор для резки таким образом, чтобы получались срезы толщиной 5–7 мкм. Полученные препараты депарафинизировали, проводили их регидратацию, окрашивали гематоксилином и эозином и заключали в бальзам. Препараты исследовали на микроскопе Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия), используя камеру AxioCam MRC 5 (Carl Zeiss, Германия). Рассчитывали количество волосных фолликулов на 1 мм² среза по формуле: количество фолликул по всей площади новообразованной ткани × 1 мм² / площадь новообразованной ткани в мм²

Результаты и обсуждение

В данной работе были получены фотополимеризуемые пленки Ф-МЖ, изображения представлены на рис. 1. Изготовленные структуры характеризовались гибкостью, но были достаточно прочны, чтобы не повреждаться при отделении от тефлона и при различных манипуляциях (рис. 1, А). В гидратированном состоянии полученные пленки представляли собой гибридные гидрогели. Ранее было выявлено, что гидрогели на основе фиброина и метакрилированного желатина имеют пористую внутреннюю структуру [5]. Как показал анализ изображений, полученных методом электронной сканирующей микроскопии (рис. 1, Б), внешняя поверхность исследуемой пленки преимущественно гладкая, без выраженной пористой структуры, с нерегулярно расположенными на ней гранулами. Такие частицы могут быть агрегатами фиброина, образовавшимися при формировании бета-структур после обработки спиртом [11].

Фибробласты и кератиноциты являются клеточными компонентами кожи, активно участвующими в процессах регенерации. Фибробласты синтезируют внеклеточный матрикс и секретируют некоторые факторы роста, необходимые для заживления, а также участвуют в формировании рубцов. Кератиноциты играют ключевую роль в восстановлении эпидермиса после повреждения, что достигается за счет их миграции и пролиферации [12]. Взаимодействие этих двух типов клеток с биосовместимыми материалами в условиях *in vivo* может инициировать процессы регенерации, но требуются предварительные эксперименты *in vitro*.

МТТ-тест позволяет оценить активность дегидрогеназ митохондрий клеток. Величина определяемой оптической плотности формазана линейно зависит от числа живых клеток в исследуемых образцах [13]. Значения этого сигнала для Ф-МЖ и культурального пластика, используемого в качестве контроля, не отличались на 1 сут куль-

тивирования фибробластов NIH 3T3, а на 3 и 7 сут эксперимента отмечено, что использование фотополимеризуемой пленки в качестве субстрата приводит к снижению значений оптической плотности по сравнению с контролем (рис. 1, В). При оценке доли живых и мертвых клеток с использованием оптической микроскопии было выявлено, что показатели жизнеспособности на исследуемом субстрате не отличались от показателей контрольного образца (данные не представлены), из чего был сделан вывод, что такой эффект вызван не токсичностью, а регуляторным воздействием субстрата. Пролиферативная активность фибробластов важна для восстановления кожи, однако ее избыточность является одной из причин фиброза *in vivo* [14].

При культивировании кератиноцитов на Ф-МЖ на 1 и 3 сут эксперимента оптическая плот-

ность формазана не имела статистически значимых отличий от контроля. Ее значения возрастали с течением времени, что свидетельствовало о пролиферации клеток. На 7 сут эксперимента сигнал для образцов пленки был выше по сравнению с культуральным пластиком. Вероятно, компоненты пленки способны оказывать активирующее влияние на пролиферацию кератиноцитов. Ранее показано, что метакрирированный желатин может использоваться для культивирования кератиноцитов и формирования на нем многослойного эпителия [15]. Аналогичные эксперименты проведены и с материалами на основе фиброина [16].

Способность фотополимеризуемых пленок регулировать активность фибробластов и усиливать пролиферацию эпидермальных клеток может способствовать активации процессов репарации и подавлению образования рубца.

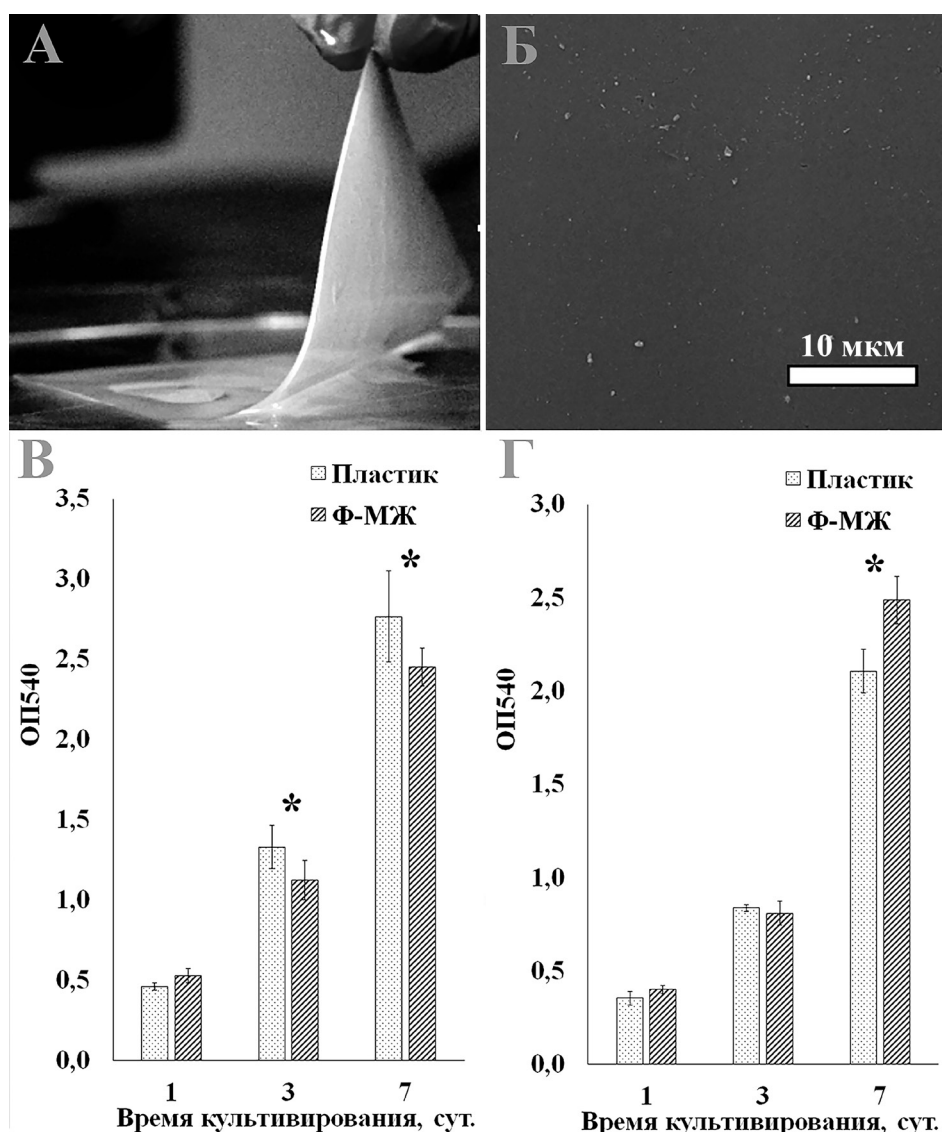


Рис. 1. Фотополимеризуемая пленка на основе фиброина и метакрирированного желатина (А, Б) и динамика метаболической активности и роста клеток, участвующих в регенерации кожи (В, Г) на пленке и пластике, данные МТТ-теста (* – t-тест Стьюдента, статистически значимые отличия, $p < 0,05\%$). А – внешний вид пленки. Б – структура поверхности пленки, изображение получено методом сканирующей электронной микроскопии. В – результаты МТТ-теста для фибробластов линии NIH 3T3. Г – результаты МТТ-теста для кератиноцитов линии HaCaT.

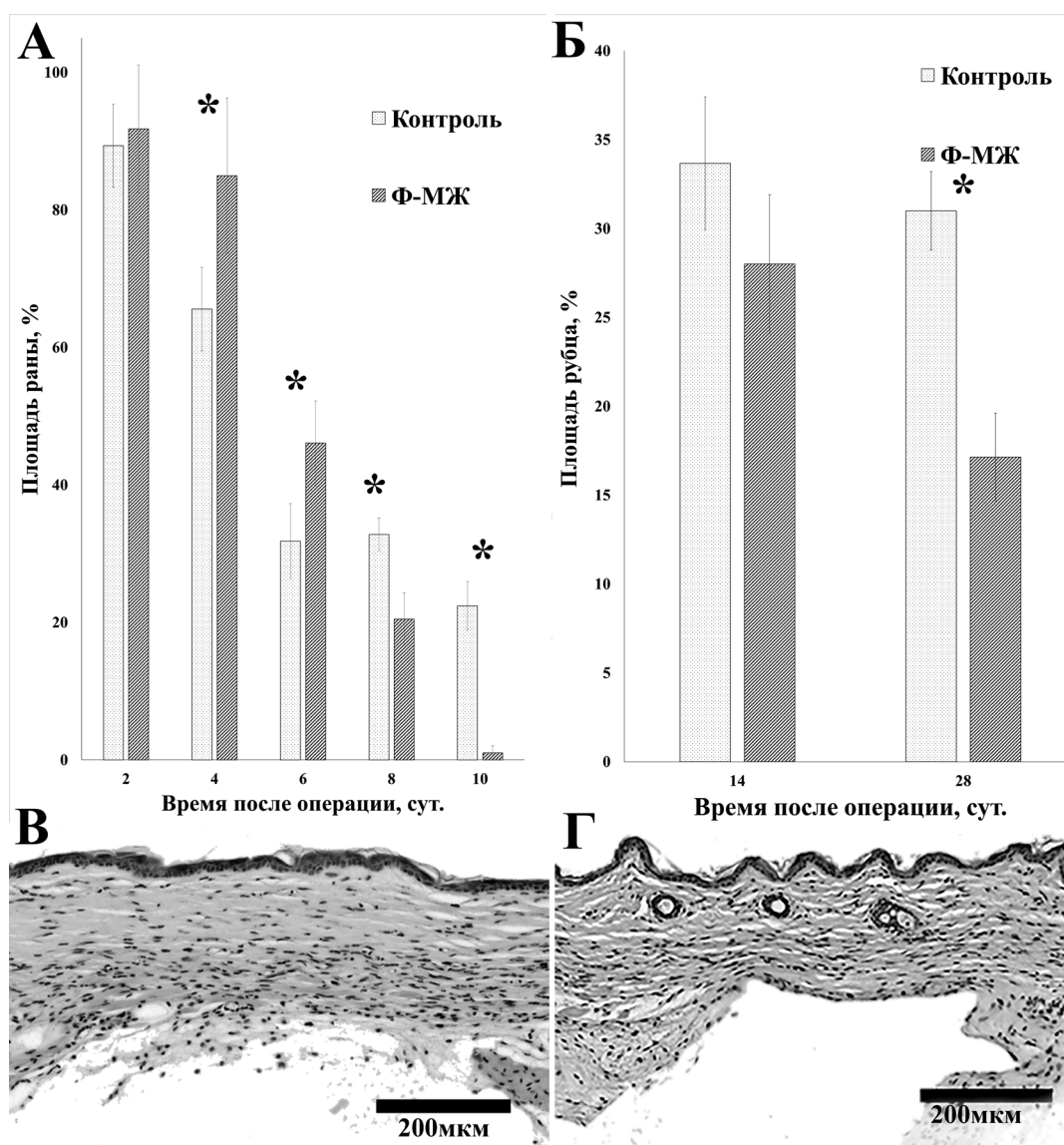


Рис. 2. Морфометрический анализ скорости затягивания ран (А) и оценка площади рубца (Б) при использовании пленки из фиброина и метакрилизованного желатина и марли (контроль) в качестве раневых покрытий. (* – t-тест Стьюдента, статистически значимые отличия, $p < 0,05\%$). Гистологический анализ тканей, сформированных на месте полнослойной раны кожи мыши через 28 сут после повреждения при использовании в качестве раневого покрытия марли (контроль) (В) или фотополимеризуемой пленки (Г).

Влияние фотополимеризуемых пленок на регенерацию оценивали в модели полнослойной раны кожи мыши. В ходе проведенного исследования *in vivo* выявлено, что использование пленок Ф-МЖ для закрытия полнослойных ран снижало их контракцию в первую неделю после операции (рис. 2, А). Вместе с тем дальнейшее затягивание раны происходило быстрее, чем в контрольной группе, где в качестве раневого покрытия использовали марлю, вероятно, за счет ускорения процесса эпителизации. Сходный эффект при заживлении полнослойных ран кожи мышей наблюдался во время исследований коммерческих гидроколлоидных раневых покрытий [17].

При использовании Ф-МЖ формировались менее выраженные рубцы, чем в случае применения марли (рис. 2, Б). Это также подтверждено

данными гистологического анализа. На 28 сут после нанесения повреждений у мышей в контрольной группе была сформирована плотная ткань с характерным для рубца расположением волокон коллагена, а в экспериментальной – сходная с нормальной дермой кожи (рис. 2, В). Эпителий имел большую протяженность, в подлежащей ткани присутствовало значительное количество волосных фолликулов. Их наличие в центре ран, которые закрывали пленками, может указывать на их образование *de novo*. Ранее показано, что этот процесс может протекать при заживлении ран генетически нормальных мышей и на молекулярном уровне имеет сходство с происходящим в ходе эмбриогенеза, а придатки формируются из клеток межфолликулярного эпидермиса [18]. Раневые покрытия могут повышать

эффективность регенерации за счет поддержания оптимальной влажности, что способствует миграции кератиноцитов [19]. Ускоренное восстановление эпидермиса, в свою очередь, является одним из факторов, предотвращающих образование рубцовой ткани [20].

Таким образом, полученные фотополимеризуемые пленки способны активировать пролиферацию кератиноцитов, в то время как их влияние на рост фибробластов противоположно. Исследование *in vivo* продемонстрировало, что использование пленок Ф-МЖ в качестве раневых покрытий способствовало более полному восстановлению тканей в модели полнослойной раны кожи мыши по сравнению с контрольной группой. Заживление раны происходило быстрее в экспериментальной группе, чем в контрольной, и характе-

ризовалось снижением контракции. Кроме того, наблюдалось восстановление придатков кожи в зоне повреждения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований: комплексный проект № 17-00-00359 (научные проекты: № 17-00-00356, № 17-00-00357 и № 17-00-00358) и грант № 18-34-00875 с использованием оборудования, приобретенного в рамках «Программы развития Московского Университета до 2020 года», и оборудования ЦКП МГУ имени М.В. Ломоносова.

Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Комиссией по биоэтике МГУ. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stone R., Natesan Sh., Kowalczewski C.J., Mangum L.H., Clay N.E., Clohessy R.M., Carlsson A.H., Tassin D.H., Chan R.K., Rizzo J.A., Christy R.J. Advancements in regenerative strategies through the continuum of burn care // *Front. Pharmacol.* 2018. Vol. 9. N 1: 672.
2. Varkey M., Visscher D.O., van Zuijlen P.P.M., Atala A., Yoo J.J. Skin bioprinting: the future of burn wound reconstruction? // *Burns Trauma.* 2019. Vol. 7. N 1. P. 4–15.
3. Hu Sh., Cai X., Qu X., Yu B., Yan Ch., Yang J., Li F., Zheng Yu., Shi X. Preparation of biocompatible wound dressings with long-term antimicrobial activity through covalent bonding of antibiotic agents to natural polymers // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. Vol. 123. N 1. P. 1320–1330.
4. Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Yakovlev S.G. et al. 3D-scaffolds from poly(3-hydroxybutyrate)poly(ethylene glycol) copolymer for tissue engineering // *J. Biomater. Tissue Eng.* 2016. Vol. 6. N 1. P. 42–52.
5. Bessonov I.V., Kotliarova M.S., Kopitsyna M.N., Fedulov A.V., Moysenovich A.M., Arkhipova A.Y., Bogush V.G., Bagrov D.V., Ramonova A.A., Mashkov A.E., Shaitan K.V., Moisenovich M.M. Photocurable hydrogels containing spiroin or fibroin // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 1. P. 24–27.
6. Kundu B., Rajkhowa R., Kundu S.C., Wang X. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013 Vol. 65. N 4. P. 457–470.
7. Zhu A., Fang N., Chan-Park M., Chan V. Adhesion contact dynamics of 3T3 fibroblasts on poly (lactide-co-glycolide acid) surface modified by photochemical immobilization of biomacromolecules // *Biomaterials.* 2006. Vol. 27. N 12. P. 2566–2576.
8. Жаркова И.И., Бонарцев А.П., Босхонджиев А.П., Ефремов Ю.М., Багров Д.В., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Воинова В.В., Яковлев С.Г., Филатова Е.В., Зернов А.Л., Андреева Н.В., Иванов Е.А., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В. Влияние модификации поли-3-оксибутирата полиэтиленгликолем на жизнеспособность клеток, культивируемых на полимерных пленках // *Биомедицинская химия.* 2012. Vol. 58. N 5. P. 579–591.
9. Moisenovich M.M., Kulikov D.A., Arkhipova A.Yu., Malyuchenko N.V., Kotlyarova M.S., Goncharenko A.V., Kulikov A.V., Mashkov A.E., Agapov I.I., Paleev F.N., Svistunov A.A., Kirpichnikov M.P. Fundamental bases for the use of silk fibroin-based bioresorbable microvehicles as an example of skin regeneration in therapeutic practice // *Ter. Arkh.* 2015. Vol. 87. N 12. P. 66–72.
10. Arkhipova A.Yu., Nosenko M.A., Malyuchenko N.V., Zvartsev R.V., Moisenovich A.M., Zhdanova A.S., Vasil'eva T.V., Gorshkova E.A., Agapov I.I., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A., Moisenovich M.M. Effects of fibroin microcarriers on inflammation and regeneration of deep skin wounds in mice // *Biochem.* 2016. Vol. 81. N 11. P. 1251–1260.
11. Qi Y., Wang H., Wei K., Yang Y., Zheng R.Y., Kim I.S., Zhang K.Q. A review of structure construction of silk fibroin biomaterials from single structures to multi-level structures // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18. N 3. P. 237.
12. ter Horst B., Chouhan G., Moimen N.S., Grover L.M. Advances in keratinocyte delivery in burn wound care // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2018. Vol. 123. N 1. P. 18–32.
13. Gomez L.A., Alekseev A.E., Aleksandrova L.A., Brady P.A., Terzic A. Use of the MTT assay in adult aentricular cardiomyocytes to assess viability: effects of adenosine and potassium on cellular survival // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1997. Vol. 29 N 4. P. 1255–1266.
14. Kuphal S., Bosserhoff A. Recent progress in understanding the pathology // *J. Pathol.* 2009. Vol. 219. N 4. P. 400–409.
15. Zhao X., Lang Q., Yildirimer L., Lin Z.Y., Cui W., Annabi N., Ng K.W., Dokmeci M.R., Ghaemmaghami A.M., Khademhosseini A. Photocrosslinkable gelatin hydrogel for epidermal tissue engineering // *Adv. Healthc. Mater.* 2016. Vol. 5. N 1. P. 108–118.
16. Min B.-M., Lee G., Kim S.H., Nam Y.S., Lee T.S., Park W.H. Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts *in vitro* // *Biomaterials.* 2004. Vol. 25. N 7–8. P. 1289–1297.
17. Schunck M., Neumann C., Proksch E. Artificial barrier repair in wounds by semi-occlusive foils reduced wound contraction and enhanced cell migration and reepithelization in mouse skin // *J. Invest. Dermatol.* 2005. Vol. 125. N 5. P. 1063–1071.

18. Ito M., Yang Z., Andl T., Cui C., Kim N., Millar S.E. *Cotsarelis G.* Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding // *Nature*. 2007. Vol. 447. N 7142. P. 316–320.

19. Rittié L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals // *J. Cell Commun. Signal*. 2016. Vol. 10. N. 2. P. 103–120.

20. Ferguson M.W.J., O’Kane S. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic interven-

tion // *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* 2004. Vol. 359. N 1445. P. 839–850.

Поступила в редакцию
18.11.2019 г.

После доработки
01.01.2020 г.

Принята в печать
15.01.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

PHOTOCURABLE FILMS BASED ON FIBROIN AND GELATIN FOR REGENERATION OF SKIN COVER

M.S. Kotliarova^{1,*}, A.S. Soldatenko¹, A.Yu. Arkhipova^{2,3}, I.V. Bessonov⁴,
L.I. Davydova⁵, A.M. Moysenovich¹, V.G. Bogush⁵, V.G. Debabov⁵, A.A. Shtil⁶,
M.M. Moisenovich², K.V. Shaitan¹

¹Department of Bioengineering and ²Laboratory of Confocal Microscopy, Faculty of Biology,
Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

³M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Schepkina ul. 61/2, Moscow, 129110, Russia;

⁴JSC “EFFERON”, Nobel ul. 7, Skolkovo territory of the Innovation Center, Moscow, 121205, Russia;

⁵State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of the National Research Center
“Kurchatov Institute”, 1st Dorozhny proezd 1, Moscow, 117545, Russia;

⁶N.N. Blokhin Russian Cancer Research Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Kashirskoe sh. 23, Moscow, 115478, Russia

*e-mail: kotlyarova.ms@gmail.com

The search for new approaches for skin restoration is an urgent task of modern regenerative medicine. A promising area is the use of biocompatible materials. Designs from them can serve as the basis for biomedical products designed to replace damaged tissue, or serve as wound dressings. In this work, photopolymerized films based on silk fibroin and methacrylated gelatin (F-MG) were created. An *in vitro* study revealed that the use of films as a substrate for the cultivation of NIH 3T3 fibroblasts and HaCaT keratinocytes leads to a change in the kinetics of cell growth. According to the MTT assay, the fibroblasts proliferation rate was lower on photopolymerized films, and keratinocytes’ one was higher compared to culture plastic. An assessment of the effect of the obtained films on skin regeneration was performed *in vivo* in a model of a full-layer wound of mouse skin. The use of F-MG films as wound dressings contributed to the acceleration of wound healing and a more complete restoration of the skin structure compared to control (use of gauze). In animals in the experimental group, the formation of hair follicles and the reduction in the scar area by 28 days were observed.

Keywords: wound dressings, fibroin, methacrylated gelatin, photopolymerization, keratinocytes, fibroblasts, tissue engineering

Сведения об авторах

Котлярова Мария Сергеевна — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: kotlyarova.ms@gmail.com

Солдатенко Анна Сергеевна — студент кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: an.soldatenko@yandex.ru

Архипова Анастасия Юрьевна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ, ст. науч. сотр. научно-исследовательской лаборатории ГБУЗ МО МОНИКИ имени М.Ф. Владимирского. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: anastasia-yu-arkhipova@yandex.ru

Бессонов Иван Викторович — директор по науке АО «ЭФФЕРОН». Тел.: 8-499-348-95-58; e-mail: ivanbessonov@gmail.com

Давыдова Любовь Ивановна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории белковой инженерии Государственного научно-исследовательского института генетики и селек-

ции промышленных микроорганизмов национального исследовательского центра «Курчатовский институт». Тел.: 8-495-315-04-56; e-mail: liddvd@mail.ru

Мойсенович Анастасия Михайловна – аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: a-moisenovich@mail.ru

Богущ Владимир Григорьевич – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории белковой инженерии Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов национального исследовательского центра «Курчатовский институт». Тел.: 8-495-315-04-56; e-mail: vlbogush@mail.ru

Дебабов Владимир Георгиевич – докт. биол. наук, академик РАН, научный руководитель Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов национального исследовательского центра «Курчатовский институт». Тел.: 8-495-315-37-47; e-mail: debabov@genetika.ru

Штиль Александр Альбертович – докт. мед. наук, зав. лабораторией механизмов гибели опухолевых клеток Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Тел.: 8-499-324-24-24; e-mail: shtilaa@yahoo.com

Мойсенович Михаил Михайлович – канд. биол. наук, зав. лабораторией конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: mmoisenovich@mail.ru

Шайтан Константин Вольдемарович – докт. физ.-мат. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-23-74; e-mail: shaytan49@yandex.ru