

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА С НАТИВНЫМИ ВОЛОКНАМИ ФИБРОИНА ШЕЛКА

© Ю. А. Нащекина,^{1–3,*} П. О. Никонов,¹ Н. М. Юдинцева,¹ А. В. Нащекин,²
А. И. Лихачев,² О. А. Москалюк,³ В. Е. Юдин,³ М. И. Блинова¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194156,

² Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе, Санкт-Петербург, 194021, и

³ С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251;

* электронный адрес: yuliya.shved@gmail.com

Использование природных материалов, в том числе и волокон фиброина шелка, в качестве субстратов для культивирования и трансплантации клеток требует разработки способов улучшения свойств этих материалов. В настоящей работе волокна фиброина шелка обрабатывали раствором щелочи (1 М) при комнатной температуре и при 70 °С. Показано, что обработка при комнатной температуре улучшает механические характеристики волокон — увеличиваются прочность, упругость и относительное удлинение, а обработка при 70 °С эти характеристики заметно снижает. Тем не менее обработка волокон раствором щелочи как при комнатной температуре, так и при 70 °С не влияет на жизнеспособность клеток и их способность к адгезии. МТТ-тест показал, что жизнеспособность клеток через 1 сут культивирования одинакова для всех образцов. Через 1 нед культивирования клетки образуют плотную сеть взаимосвязанных структур.

Ключевые слова: фиброин шелка, мезенхимные стромальные клетки кролика.

Принятые сокращения: МСК — мезенхимные стромальные клетки, СЭМ — сканирующая электронная микроскопия, ФШ — фиброин шелка.

В настоящее время проблема восстановления обширных повреждений различных органов и тканей, полученных в результате травм, болезней или хирургических операций, чрезвычайно актуальна. Перспективным направлением современной регенеративной медицины является тканевая инженерия, основная цель которой заключается в создании композитов на основе полимерных каркасов и клеток, предназначенных для регенерации поврежденных органов или ткани. Для каждого типа клеток, а также в зависимости от места и степени повреждения органа или ткани требуется каркас определенной структуры и формы. В качестве последних используют губки со сквозными порами различного диаметра, а также нетканые материалы на основе волокон природного или синтетического происхождения. Неоднократно показано, что каркасы, сформированные из волокон, являются хорошей подложкой для адгезии и пролиферации различных клеток.

В литературе представлен ряд работ по исследованию влияния на культивируемые клетки диаметра волокна, который может варьировать от нескольких нанометров до десятков микрон. Согласно литературным данным, функциональная активность клеток, а именно адгезия, пролиферация, дифференцировка и миграция, зависят от диаметра волокон. Показано, что количество адгезированных мезенхимных стромальных клеток (МСК) на волокнах диаметром 1 мкм на 40 % больше по сравнению с количеством клеток, прикрепившихся на аналогичных волокнах, но с меньшим диаметром — 0.5 мкм

(Finne-Wistrand et al., 2008). При исследовании адгезии 3Т3-фибробластов на тех же волокнах наблюдали обратную зависимость (Chen et al., 2007). Жизнеспособность клеток также зависит от диаметра волокон. Продемонстрировано, что количество жизнеспособных эндотелиальных клеток больше на волокнах с диаметром от 1 до 1.5 мкм по сравнению с волокнами диаметром до 1 мкм (Rubenstein et al., 2007).

Помимо формы и структуры каркаса немаловажную роль играет природа материала, из которого он сформирован. В настоящее время в тканевой инженерии предложен достаточно большой выбор полимерных материалов синтетического и природного происхождения. Активно используемыми синтетическими материалами являются полимеры на основе молочной и гликолиевой кислот, полиоксибутираты и др. (Швед и др., 2006).

Среди полимеров природного происхождения особый интерес представляют такие белки внеклеточного матрикса, как коллаген и фибрин, а также белок природного происхождения фиброин шелка (ФШ). Наиболее интенсивно используемым фибрином в тканевой инженерии является шелк, полученный от тутового шелкопряда *Bombyx mori*, для которого характерно высокое содержание глицина и аланина (77 %), а также серина и тирозина (11 %) (Кричевский, 2001). Молекулярная масса ФШ колеблется от 25 кДа для «легких» цепей до 350 кДа для «тяжелых», которые связаны между собой дисульфидными связями (Altman, 2003).

Шелк является достаточно прочным и в то же время пластичным материалом (Rajkhowa et al., 2000). Волокна ФШ имеют высокую растяжимость (Du et al., 2011). Сочетание хороших механических характеристик и высокой биосовместимости обуславливает применение регенерированного и нативного ФШ в качестве каркасов для тканевой инженерии. На основе ФШ формируют пленочные материалы и трехмерные каркасы с различными модификациями для восстановления костной, хрящевой и нервной тканей (Tomizawa, 1995; Park et al., 2010).

Основной подход к получению каркасов из ФШ заключается в растворении его в концентрированных кислотах и растворах солей с последующим испарением растворителя (Goujon et al., 2012). Такой способ позволяет получать каркасы различной структуры и с различным размером пор.

Следует отметить, что, несмотря на превосходные механические свойства нативных шелковых волокон, большинство шелковых материалов, изготовленных из раствора ФШ, достаточно ломкие. Например, прочность шелковой пленки составляет 20 МПа, а удлинение при разрыве — менее 2 %, что существенно ниже аналогичных характеристик нативной шелковой нити (прочность 500—600 МПа и удлинение при разрыве 10—40 %) (Rajkhowa et al., 2011). В литературе представлен ряд способов улучшения механических свойств регенерированного шелка до значений нативных волокон (Ha et al., 2005; Zuo et al., 2006; Jiang et al., 2007). Однако эти дополнительные процедуры требуют затраты времени и усилий. В связи с этим нативные волокна представляются перспективным, удобным и доступным материалом для формирования каркасов, предназначенных для культивирования и трансплантации различных типов клеток. Средний диаметр нативных волокон ФШ составляет порядка 10 мкм и сопоставим со средним диаметром многих клеток в суспензии. Известны работы по использованию нативных волокон ФШ для регенеративной медицины (Altman et al., 2002; Gellynck et al., 2008).

Несмотря на то что шелк является биосовместимым и биодеградируемым материалом, недостаточная гидрофильность и отсутствие специфических сайтов связывания ограничивают прикрепление и размножение на нем клеток (Amornsudthiwat et al., 2013).

Улучшение гидрофильности, а также увеличение общего количества функциональных групп на поверхности нативных волокон ФШ возможны при его частичном гидролизе раствором щелочи. В результате такой обработки происходит разрыв пептидных связей, приводящий к образованию дополнительных карбонильных и амидных связей. Однако такая обработка также может привести к изменению механических характеристик волокон. Целью настоящего исследования стало изучение влияния щелочной обработки на механические характеристики нативных волокон ФШ, а также на адгезию и распластываемость на них МСК костного мозга.

Материал и методика

Обработка волокон ФШ. Волокна получали из кокона тутового шелкопряда *Bombyx mori*. Для удаления серицина волокна кипятили в растворе 0.03 М NaHCO_3 (Реахим, Россия) в течение 1 ч, после чего тщательно промывали в дистиллированной воде.

Частичный гидролиз волокон ФШ проводили в растворе NaOH (1 М) (Реахим, Россия) в течение 30 мин при комнатной температуре и при 70 °С. После обработки волокна тщательно промывали в дистиллированной воде до нейтрального уровня pH, который контролировали по лакмусовой бумаге. Стерилизацию волокон проводили УФ-облучением в течение 2 ч.

Культивирование МСК костного мозга. МСК выделяли из плоских костей таза новорожденного кролика. Клетки в концентрации $1 \cdot 10^6$ кл./см² высевали в чашки Петри и культивировали в среде α MEM (Sigma, США) с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США) и смеси пенициллина и стрептомицина (Invitrogen, Великобритания) в инкубаторе с 5%-ным содержанием CO_2 при 37 °С. В эксперименте использовали клетки 2—6-го пассажей. Прижизненное наблюдение за клетками, культивируемыми на волокнах ФШ, проводили с помощью оптического микроскопа Eclipse LV150 (Nikon, Япония).

Анализ структуры ФШ и МСК на волокнах ФШ методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Структуру волокон ФШ до и после обработки раствором щелочи исследовали методом СЭМ на микроскопах JSM 7001F и JSM-35C (Jeol, Япония). Для исследования взаимодействия клеток с волокнами ФШ образцы предварительно обрабатывали раствором глутарового альдегида (2.5 %), затем на лиофильно высушенные препараты методом вакуумного термического испарения наносили слой золота.

Измерение деформационно-прочностных характеристик. Деформационно-прочностные свойства волокон ФШ до и после обработки исследовали с помощью универсальной испытательной машины INSTRON, модель 5943 (Великобритания). Базовая длина образцов волокон составляла 30 мм, скорость растяжения — 1 мм/мин. На основе полученных диаграмм растяжения определяли прочность волокон (σ_p , МПа), удлинение при разрыве (ϵ_p , %) и модуль упругости (E_0 , ГПа).

МТТ-тест количества жизнеспособных клеток на волокнах ФШ. Интактные, т. е. необработанные, и обработанные волокна ФШ помещали в 96-луночную плату. Образцы волокон стерилизовали УФ-облучением в течение 2 ч. По истечении указанного времени в каждую лунку вносили 100 мкл суспензии МСК в количестве 3000 клеток на лунку (3-й пассаж) в среде α MEM с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США). Клетки культивировали в течение 1, 2 ч и 1 сут. Для оценки адгезии МСК на исследуемых волокнах клетки обрабатывали МТТ (Sigma, США). После инкубации клеток с раствором МТТ последний удаляли, в лунки вносили ДМСО (Sigma, США), планшет встряхивали, затем удаляли образцы волокон из лунок и проводили измерения на иммуноферментном анализаторе (Флюорофот, ПРОБАНАУЧПРИБОР, Россия) при длине волны 570 нм.

Окраска актинового цитоскелета МСК. МСК в количестве 10 000 клеток в среде α MEM с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки высевали на волокна ФШ, прикрепленные к покровному стеклу. По истечении 1 ч и 1 сут неприкрепившиеся клетки удаляли, оставшиеся промывали раствором PBS (Биолот, Россия) и фиксировали в 4%-ном растворе формалина (Sigma, США) в течение 15 мин. Все процедуры выполняли при комнатной температуре. Затем препараты

отмывали от формалина раствором PBS и на 15 мин добавляли 0.1%-ный раствор Тритона X-100 (Sigma, США). С целью выявления актиновых структур клетки окрашивали раствором родамин-фаллоидина (Invitrogen, Великобритания) в течение 15 мин в темноте. После трехкратной отмывки раствором PBS для выявления клеточных ядер вносили раствор DAPI (Invitrogen, Великобритания) и инкубировали 5 мин в темноте. После промывки препараты помещали в заключающую среду (Invitrogen, Великобритания). Анализ актиновых структур выполняли с помощью конфокального микроскопа LSM 5 (Pascal, Германия).

Статистическая обработка результатов. Результаты, полученные для 3—5 повторностей, обрабатывали в программе Microsoft Excel 2007, определяя среднее значение и стандартную ошибку среднего. Для сравнения результатов использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

Целью настоящей работы было изучение влияния щелочной обработки на механические характеристики нативных волокон ФШ, а также на адгезию и распластываемость на них МСК костного мозга.

После предварительных экспериментов по обработке волокон ФШ раствором щелочи различной концентрации выбрали оптимальные условия обработки — концентрацию раствора щелочи, температуру и продолжительность. Оптимальная концентрация NaOH, не приводящая к деструкции волокон, составила 1 М. Также выбрали время обработки — 30 мин и температуру раствора щелочи — 70 °С. Увеличение концентрации раствора, а также его температуры выше 70 °С приводило к существенной деструкции волокон, не позволяющей использовать их в экспериментах.

Электронно-микроскопические исследования волокон ФШ до и после обработки раствором щелочи. Влияние условий обработки на топографию поверхности волокон ФШ оценивали методом СЭМ (рис. 1).

До обработки раствором щелочи поверхность волокон ФШ имеет гладкую текстуру (рис. 1, а, б), после обработки при комнатной температуре (рис. 1, в, з) и при 70 °С (рис. 1, д, е) поверхность волокон приобретает шероховатость, обусловленную, по-видимому, частичной деструкцией внешнего слоя волокна. Диаметр волокон ФШ после обработки раствором щелочи при комнатной температуре почти не меняется, составляя примерно 10 мкм (рис. 1, з). Обработка волокон раствором щелочи при нагревании приводит к частичному набуханию и соответственно увеличению диаметра до 12 мкм (рис. 1, е). Из литературных данных известно, что в водной среде ФШ не растворяется, а набухает, и его поперечное сечение может увеличиваться на 20 % (Perrone et al., 2014).

Измерение деформационно-прочностных характеристик волокон ФШ. Для оценки влияния условий обработки на механические характеристики волокон ФШ проводили их испытания на растяжение по определенному регламенту.

На рис. 2, а видно, что прочность волокон ФШ после обработки раствором щелочи при комнатной температуре увеличивается на 30 %. Так, среднее значение прочности σ_p контрольного образца составляет около 183 МПа, а

обработанного щелочью при комнатной температуре — 274 МПа. Прочность же волокон ФШ, обработанных щелочью при 70 °С, составляет 110 МПа, что, однако, не отличается от контроля ($p > 0.05$). Изменений модуля упругости волокон до и после обработки щелочью как при комнатной температуре, так и при нагревании не отмечается (рис. 2, б). Что касается удлинения волокон при разрыве (рис. 2, в), обработка щелочью приводит к увеличению удлинения волокон, обработанных как при комнатной температуре, так и при нагревании ($p < 0.05$). По-видимому, увеличение удлинения при разрыве, а также прочности волокон после обработки щелочью при комнатной температуре обусловлено набуханием образцов. В то же время нагревание волокон до 70 °С при обработке щелочью приводит к ускорению гидролитического расщепления макромолекул ФШ до аминокислот и как следствие к снижению механических характеристик образца.

Взаимодействие МСК с модифицированными и интактными волокнами ФШ. В литературе встречаются сведения о биосовместимости волокон ФШ (Allmeling et al., 2006). Первичная культура хондроцитов, культивируемая на волокнах ФШ, достаточно интенсивно пролиферировала в течение нескольких недель (Gellynck et al., 2008).

В данной работе взаимодействие МСК кролика с волокнами ФШ оценивали методами СЭМ, а также флуоресцентной и оптической микроскопии.

Через 1 ч после посева количество МСК, адгезированных на волокнах ФШ, и степень их взаимодействия с волокнами зависят от условий обработки (рис. 3, а, в, д). Так, с необработанными волокнами в течение 1 ч после посева клетки практически не взаимодействуют (рис. 3, а). Обработка волокон щелочью без нагревания (рис. 3, в) и при 70 °С (рис. 3, д) способствует адгезии клеток к волокнам. Через 1 сут культивирования во всех образцах наблюдали взаимодействие МСК с волокнами (рис. 3, б, г, е). На рис. 3, б, г, е видно, что через 1 сут клетки везде хорошо распластаны, имеют вытянутую форму и ориентируются вдоль волокон ФШ. Внутри клеток наблюдали длинные нити полимеризованного актина. Способность клеток вытягиваться вдоль волокон ФШ была продемонстрирована ранее на клетках нервной ткани (Allmeling et al., 2006). Также следует отметить, что через 1 сут изменяется не только форма клеток, но и диаметр волокон ФШ — их толщина увеличивается почти в 2 раза и достигает 20 мкм. Это обусловлено способностью волокон набухать в водной среде (Perrone et al., 2014). О существенных структурных изменениях волокон шелка после обработки раствором щелочи при нагревании косвенно свидетельствует более интенсивное фиолетовое окрашивание волокон, которое существенно отличается от яркосиней окраски волокон без обработки и после обработки без нагревания (рис. 3, д, е). По-видимому, обработка щелочью при 70 °С делает поверхность волокон более рыхлой, что приводит к достаточно активной сорбции волокнами родамин-фаллоидина. Также следует отметить, что набухание в ростовой среде волокон после обработки при 70 °С больше по сравнению с другими образцами. Очевидно, такие результаты обусловлены тем, что при нагревании в растворе щелочи происходит значительное разрушение оболочки волокон фибрина шелка, вследствие чего молекулы воды проникают в образовавшиеся дефекты.

Данные СЭМ демонстрируют отсутствие разницы в степени взаимодействия клеток с волокнами, обработан-

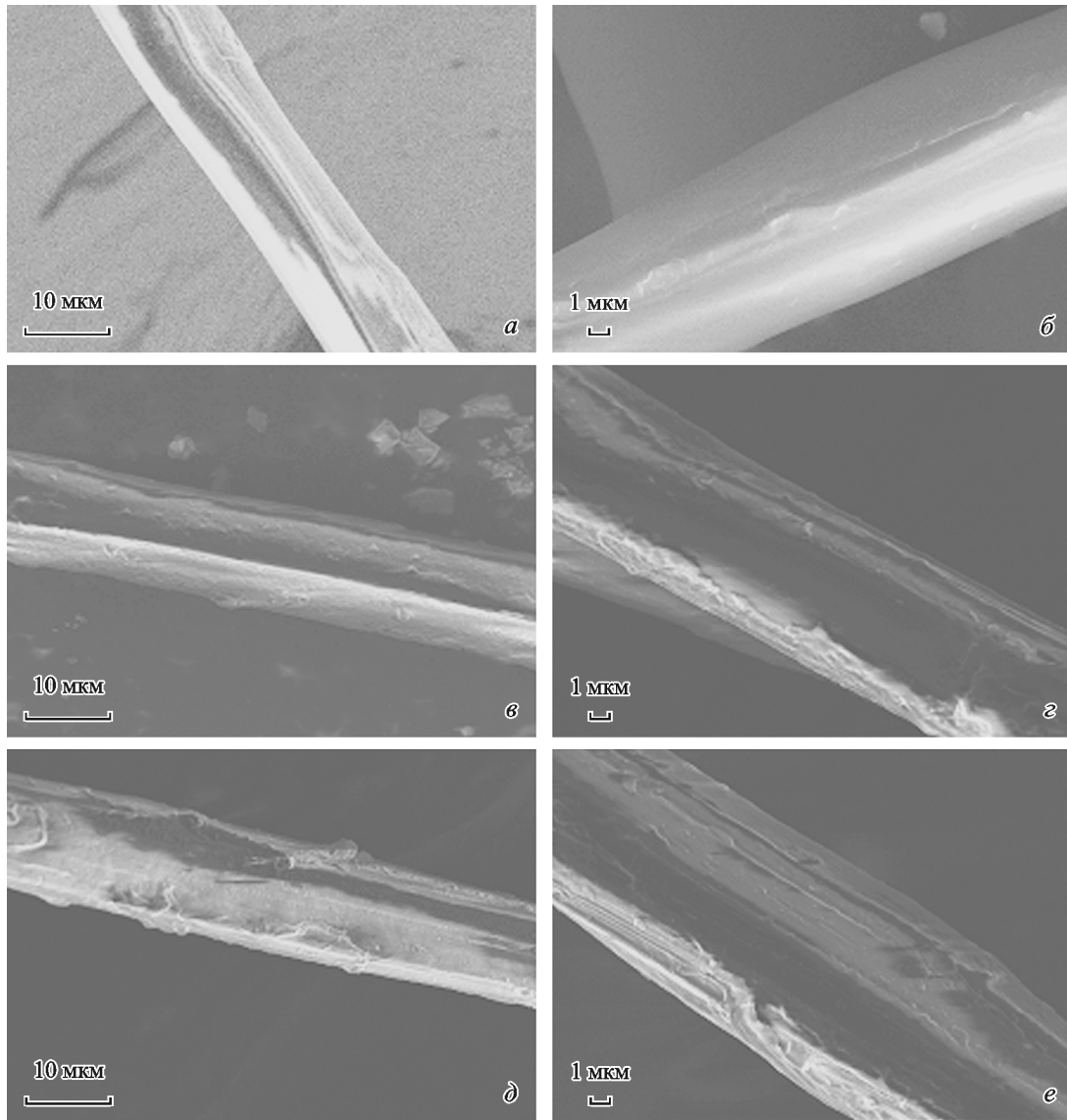


Рис. 1. Волокна фиброина шелка — intactные (*a, б*) и после обработки раствором щелочи (1 М) при комнатной температуре (*в, г*) и при 70 °С (*д, е*). Электронно-микроскопические изображения сделаны при разном увеличении.

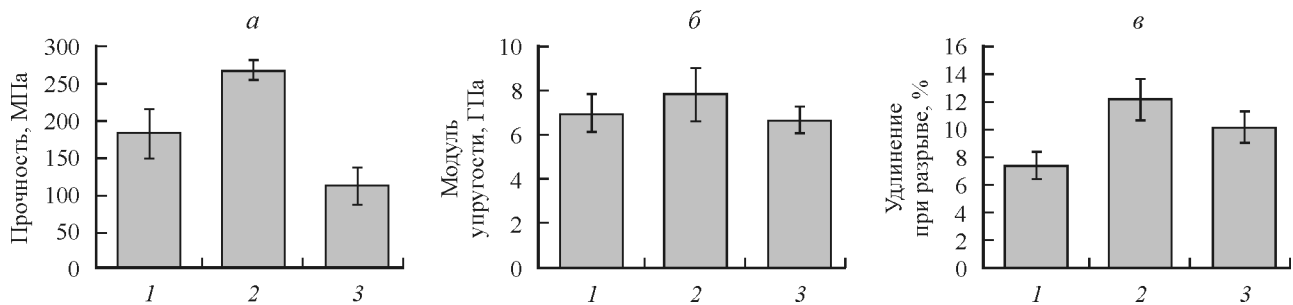


Рис. 2. Деформационно-прочностные свойства волокон фиброина шелка — intactного (1), а также обработанного раствором щелочи (1 М) при комнатной температуре (2) и при 70 °С (3).

a — показатель прочности волокон; *б* — модуль упругости волокон; *в* — показатель удлинения при разрыве волокон.

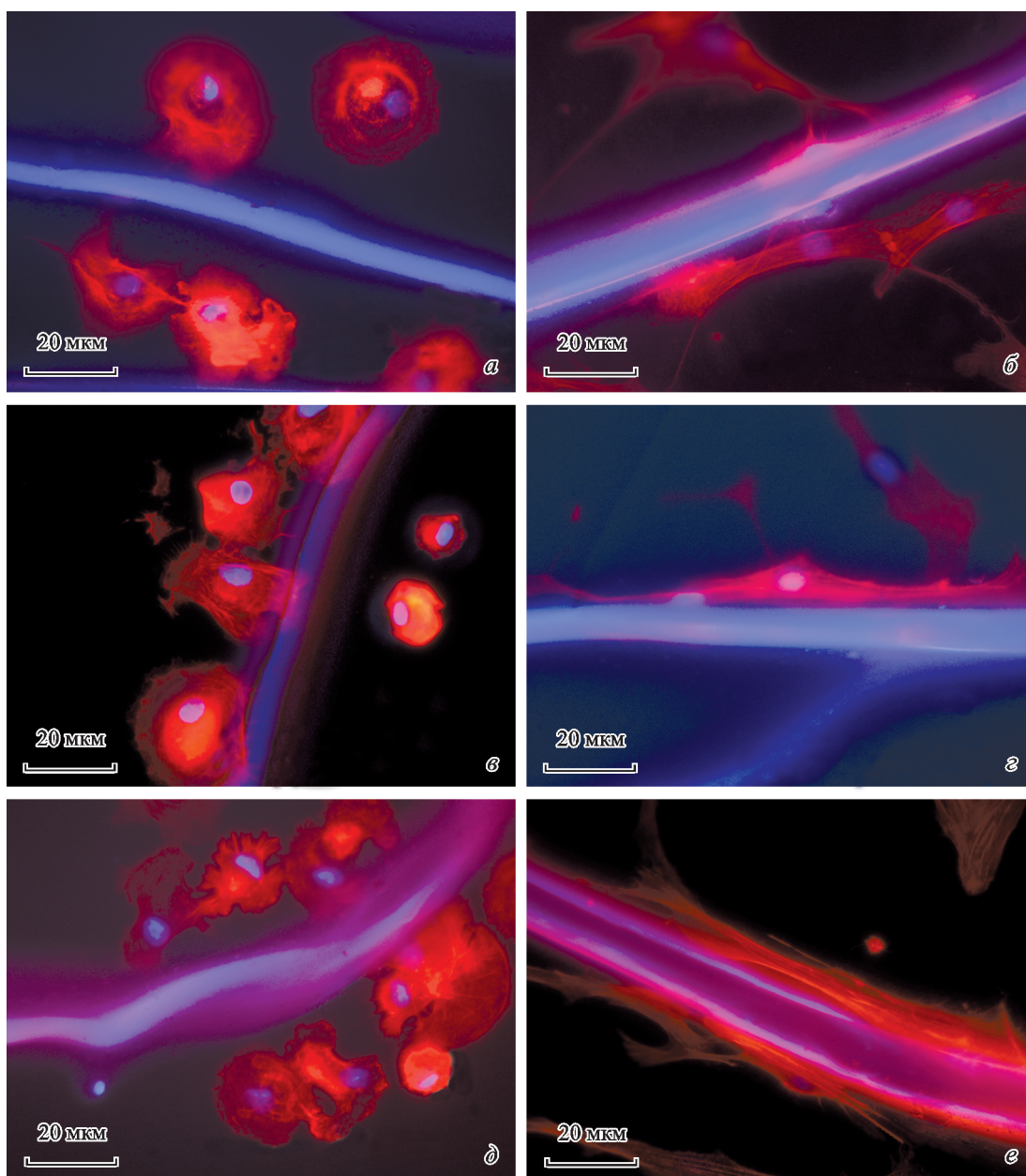


Рис. 3. Иммунофлуоресцентная микроскопия МСК, культивируемых на волокнах шелка в течение 1 ч (*а, в, д*) и 1 сут (*б, з, е*). Фиброин шелка — интактный (*а, б*) и после обработки в течение 30 мин раствором щелочи (1 М) при комнатной температуре (*в, з*) и при 70 °С (*д, е*).

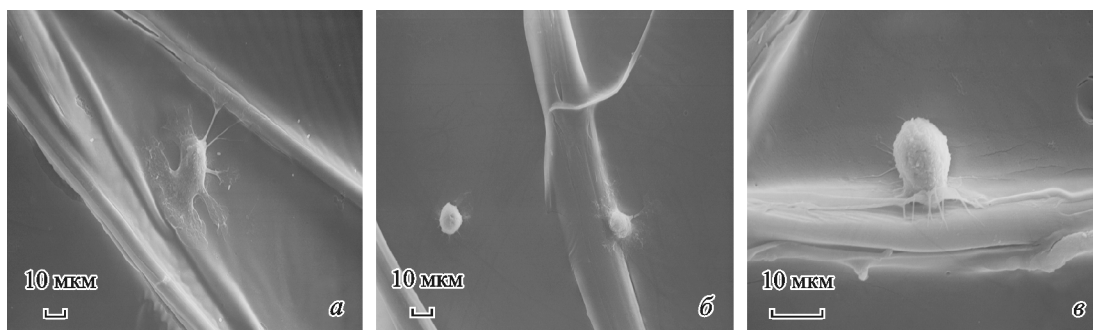


Рис. 4. Электронно-микроскопические изображения МСК после 4 ч культивирования на волокнах фибрина шелка — интактных (*а*) и после обработки раствором щелочи (1 М) в течение 30 мин при комнатной температуре (*б*) и при 70 °С (*в*).

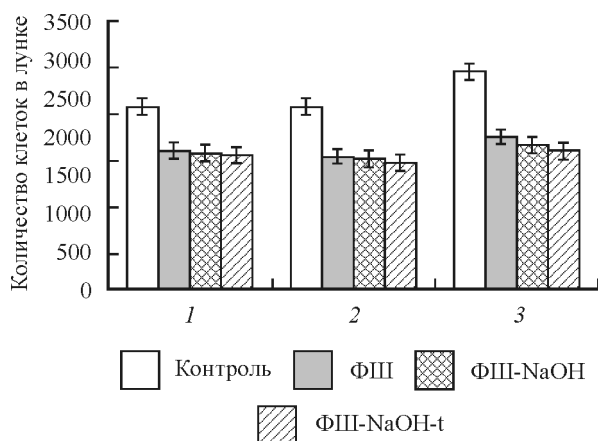


Рис. 5. Результаты МТТ-теста МСК, культивируемых на волокнах фиброина шелка в течение 1 (1), 2 (2) ч и 1 сут (3). ФШ — интактные волокна фиброина шелка, ФШ-NaOH — волокна после обработки раствором щелочи (1 М) при комнатной температуре, ФШ-NaOH-t — они же после обработки при 70 °С.

ными при различных условиях, уже после 4 ч культивирования на них МСК (рис. 4). Во всех трех случаях клетки филоподиями прикрепляются к волокнам.

Для оценки количества жизнеспособных клеток на волокнах ФШ использовали МТТ-тест. Разницы в количестве адгезировавших МСК через 1 и 2 ч культивирования не наблюдали (рис. 5). Через 1 сут культивирования количество клеток во всех случаях не меняется по сравнению с количеством клеток, адгезировавших на образец в течение первых 2 ч культивирования ($p > 0.05$). Это свидетельствует о том, что все клетки адгезировали в первые 2 ч и что присутствие обработанных или необработанных волокон ФШ не влияет на их жизнеспособность. Значительное увеличение количества клеток в контроле на пластике по сравнению с экспериментом — обработанными и интактными волокнами ФШ — обусловлено особенностью проведения эксперимента. После культивирования МСК на волокнах ФШ образцы с клетками перед обработкой раствором МТТ переносили в чистые лунки. Таким образом, часть клеток, которые высевали на исследуемые волокна, оставалась в лунке, а остальные переносили вместе с ФШ в чистые лунки.

После 1 нед культивирования различия между образцами, обработанными щелочью, и без обработки не наблюдали. Во всех трех вариантах клетки образовывали с волокнами сеть взаимосвязанных структур (рис. 6). Плотность этих сетей с течением времени увеличилась, и после 3 нед культивирования МСК образовали с волокнами ФШ прочную тканеподобную структуру, полностью заполненную клетками.

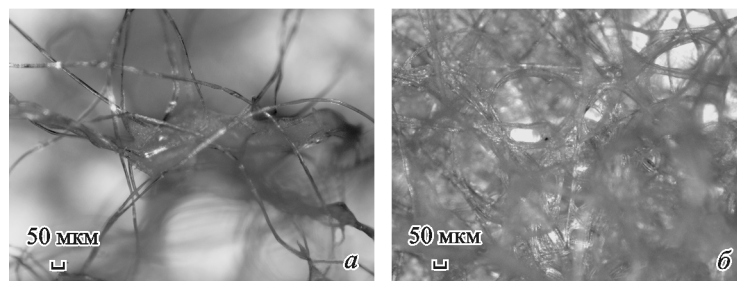


Рис. 6. Микрофотографии МСК на интактных волокнах фиброина шелка после культивирования в течение 1 (а) и 3 (б) нед.

Волокна ФШ являются перспективным материалом для культивирования и трансплантации клеток. Как продемонстрировали данные микроскопии и МТТ-анализа, адгезионная способность МСК к волокнам ФШ не зависит от условий обработки. В то же время механические свойства волокон изменяются — увеличиваются прочность и удлинение при разрыве волокон после обработки щелочью при комнатной температуре и уменьшается прочность волокон при аналогичной обработке с нагревом. Методом СЭМ показано, что такая обработка приводит к изменению топологии поверхности волокон и может способствовать сорбции биологически активных веществ. В дальнейшем будет проведена сорбция биологически активных веществ, способствующих улучшению функциональной активности клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068 — работа с клеточными культурами и проект 14-33-00003 — механические испытания образцов). СЭМ исследования выполнены на оборудовании ЦКП «Материаловедение и диагностика в передовых технологиях».

Список литературы

- Кричевский Г. Е. 2001. Химическая технология текстильных материалов. М.: РосЗИТЛП. 540 с. (Krichevskiy G. E. 2001. Chemical technology of textile materials. Moscow: RosZITLP. 540 p.)
- Швед Ю. А., Кухарева Л. В., Зорин И. М., Соловьев А. Ю., Блинова М. И., Билибин А. Ю., Пинаев Г. П. 2006. Культивирование фибробластов кожи человека на полимерной полилактидной подложке. Цитология. 48 (2) : 161—168. (Shved Yu. A., Kukhareva L. V., Zorin I. M., Solovyov A. Yu., Blinova M. I., Bilibin A. Yu., Pinaev G. P. 2006. Cultivation of human dermal fibroblasts on the polylactide polymer films. Tsitologiya. 48 (2) : 161—168.)
- Allmeling C., Jokuszies A., Reimers K., Kall S., Vogt P. M. 2006. Use of spider silk fibres as an innovative material in a biocompatible artificial nerve conduit. J. Cell Mol. Med. 10 : 770—777.
- Altman G. H. 2003. Silk-based biomaterials. Biomaterials. 24 : 401—416.
- Altman G. H., Horan R. L., Lu H. H., Moreau J., Martin I., Richmond J. C., Kaplan D. L. 2002. Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. Biomaterials. 23 : 4131—4141.
- Amornsudthiwat P., Mongkolnavin R., Kanokpanont S., Panpranot J., Wong C. S., Damrongsakul S. 2013. Improvement of early cell adhesion on Thai silk fibroin surface by low energy plasma. Colloids and surface B: Biointerfaces. 111 : 579—586.
- Chen M., Patra P. K., Warner S. B., Bhowmick S. 2007. Role of fiber diameter in adhesion and proliferation of NIH 3T3 fibroblast on electrospun polycaprolactone scaffolds. Tissue Eng. 13 : 579—587.

Du N., Yang Z., Liu X. Y., Li Y., Xu H. Y. 2011. Structural origin of strain-hardening of spider silk. *Adv. Funct. Mater.* 21 : 772—778.

Finne-Wistrand A., Albertsson A. C., Kwon O. H., Kawazoe N., Chen G., Kang I. K., Hasuda H., Gong J., Ito Y. 2008. Resorbable scaffolds from three different techniques: electrospun fabrics, salt-leaching porous films, and smooth flat surfaces. *Macromol. Biosci.* 8 : 951—959.

Gellynck K., Verdonk P., Van Nimmen E., Almqvist K., Gheysens T., Schoukens G., Van Langenhove L., Kiekens P., Mertens J., Verbruggen G. 2008. Silkworm and spider silk scaffolds for chondrocyte support. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19 : 3399—3409.

Goujon N., Wang X., Rajkhowa R., Byrne N. 2012. Regenerated silk fibroin using protic ionic liquids solvents: towards an all-ionic-liquid process for producing silk with tunable properties. *Chem. Commun.* 48 : 1278—1280.

Ha S. W., Tonelli A. E., Hudson S. M. 2005. Structural studies of *Bombyx mori* silk fibroin during regeneration from solutions and wet fiber spinning. *Biomacromolecules.* 6 : 1722—1731.

Jiang C., Wang X., Gunawidjaja R., Lin Y.-H., Gupta M. K., Kaplan D. L., Naik R. R., Tsukruk V. V. 2007. Mechanical properties of robust ultrathin silk fibroin films. *Adv. Funct. Mater.* 17 : 2229—2237.

Omenetto F. G., Kaplan D. L. 2010. New opportunities for an ancient material. *Science.* 329 : 528—531.

Park S. H., Gil E. S., Shi H., Kim H. J., Lee K., Kaplan D. L. 2010. Relationships between degradability of silk scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.* 31 : 6162—6172.

Perrone G. S., Leisk G. G., Lo T. J., Moreau J. E., Haas D. S., Papenburg B. J., Golden E. B., Partlow B. P., Fox S. E., Ibrahim A. M. S., Lin S. J., Kaplan D. L. 2014. The use of silk-based devices for fracture fixation. *Nature Communications.* 5 : 3385.

Rajkhowa R., Gupta V. B., Kothari V. K. 2000. Tensile stress-strain and recovery behavior of Indian silk fibers and their structural dependence. *J. Appl. Polym. Sci.* 77 : 2418—2429.

Rajkhowa R., Levin B., Redmond S. L., Wang L., Kanwar J. R., Atlas M. D., Wang X. 2011. Structure and properties of biomedical films prepared from aqueous and acidic silk fibroin solutions. *J. Biomed. Mater. Res. Pt A.* 97A : 37—45.

Rubenstein D., Han D., Goldgraben S., El-Gendi H., Gouma P. I., Frame M. D. 2007. Bioassay chamber for angiogenesis with perfused explanted arteries and electrospun scaffolding. *Microcirculation.* 14 : 723—737.

Tomizawa Y. 1995. Vascular prostheses for aortocoronary bypass grafting: a review. *Artif. Organs.* 19 : 39—45.

Zuo B., Dai L., Wu Z. 2006. Analysis of structure and properties of biodegradable regenerated silk fibroin fibers. *J. Mater. Sci.* 41 : 3357—3361.

Поступила 1 VII 2016

BONE MARROW MESENCHYMAL CELLS INTERACTION WITH NATIVE SILK FIBROIN

Yu. A. Nashchekina,^{1–3,*} P. O. Nikonov,¹ N. M. Yudin,¹ A. V. Nashchekin,² A. I. Likhachev,²
O. A. Moskalyuk,³ V. E. Yudin,³ M. I. Blinova¹

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194156; ² A. F. Ioffe Institute, St. Petersburg, 194021, and

³ Peter the Great St. Petersburg State Polytechnic University, St. Petersburg, 195251;

* e-mail: yuliya.shved@gmail.com

Natural materials use, including silk fibroin fibers, as substrates for cell cultivation and transplantation requires the methods development for improving these materials properties. Silk fibroin fibers were treated with alkali solution (1 M) at room temperature and at 70 °C. We observed the improvement of mechanical properties of the fibers treated with an alkali solution at room temperature — an increased strength, elasticity and elongation, and the significant decrease of these characteristics of the fibers after the processing of alkali solution at 70 °C. Nevertheless, fibers after alkali treatment at room temperature and at 70 °C does not affect the viability of the cells and their ability to adhere. MTT-test method has shown that the number of viable cells after 1 day was the same for all samples. After cultivation during 1 week cells formed a dense network of interconnected structures.

Key words: silk fibroin, bone marrow mesenchymal stromal cells.