

На правах рукописи

**Боброва
Мария Михайловна**

**РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ СКАФФОЛДОВ НА ОСНОВЕ
ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОЙ ТКАНИ ПЕЧЕНИ ДЛЯ БИОИНЖЕНЕРНЫХ
КОНСТРУКЦИЙ**

14.01.24 – трансплантология и искусственные органы

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Доктор биологических наук,
профессор

Агапов Игорь Иванович

Официальные оппоненты:

Посыпанова Галина Ароновна - доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и молекулярной медицины Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

Манухов Илья Владимирович - доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной генетики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «15» октября 2019 года в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 208.055.01 при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, по адресу: 123182, г. Москва, ул. Щукинская, д.1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, а также на сайте <http://transpl.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2019 года

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 208.055.01

кандидат ветеринарных наук

Елена Алексеевна Волкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Разработка быстрых и эффективных способов восстановления поврежденных или утраченных органов и фрагментов тканей - это важнейшая задача современной регенеративной медицины. Существующие медицинские имплантаты из синтетических материалов имеют некоторые преимущества (в том числе и улучшенные механические свойства), но методы получения таких имплантатов не позволяют повторить необходимые архитектуру, микро- и наноструктурные особенности и функциональную активность нативных тканей. Эта проблема может быть решена использованием в регенеративной медицине биологических конструкций, включающих в себя компоненты нативной ткани. Децеллюляризация органов, то есть получение лишённого клеток межклеточного матрикса за счет перфузии с растворами детергентов, является одной из новых технологий в регенеративной медицине для создания трансплантатов и скаффолдов. При использовании данного метода сохраняется состав, архитектура, сосудистое русло и биологическая активность межклеточного матрикса. Компоненты межклеточного матрикса в составе изделий создают естественное микроокружение, благоприятное для клеток, схожее с нативным, а также межклеточный матрикс может быть прекрасным материалом для клеточной адгезии, пролиферации и дифференцировки, так как межклеточный матрикс - это не инертный компонент, а динамический регулятор функционирования клеток (Londono R. et al. 2015). Метод децеллюляризации позволяет получить васкуляризованный межклеточный матрикс печени с разветвленной системой пор (Baptista P.M. et al., 2011). Основными компонентами матрикса являются коллаген (тип I, III, IV, небольшое количество VI, XIV и XVIII типа), фибронектин, ламинин, эластин, гликозаминогликаны и протеогликианы и связанные с ними факторы роста клеток и цитокины. Таким образом, нативный трехмерный матрикс является перспективным материалом для тканевой инженерии и регенеративной медицины (Nelson C.M. et al., 2006; Stellaro T.R. et al., 2010).

Необходимо отметить, что трехмерная микро- и наноструктура (система микро- и нанопор, микро- и нанофибрилл) биосовместимых матриксов имеет определяющее значение для эффективности их использования при замене участков поврежденных или утраченных органов и тканей. Метод сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ), основывающийся на объединении техники ультрамикротомии с последовательным анализом поверхности наноразмерных структур после произведенного среза методом сканирующей зондовой микроскопии, позволяет исследовать нативную трехмерную микро- и наноструктуру биоматериалов с разрешением в десятки нанометров (Efimov A.E. et al., 2014; Mochalov K.E. et al., 2013). Использование данной методики для наномасштабного контроля трехмерной морфологии, структуры, а также пространственной организации матрикса является ключевым аспектом, необходимым для получения высокоэффективных клеточных конструкций с нативными структурными и биологическими свойствами.

Цель исследования

Разработка биodeградируемых скаффолдов на основе децеллюляризованной ткани печени, исследование их структуры и биологических свойств.

Задачи исследования

1. Разработать методики, позволяющие получить биodeградируемые скаффолды на основе децеллюляризованной ткани печени в виде макрочастиц, фрагментов межклеточного матрикса и 2D композитных скаффолдов из фиброина шелка.
2. Исследовать особенности микро- и наноструктуры, механических свойств, биodeградации разработанных скаффолдов на основе децеллюляризованной ткани печени.
3. Исследовать биологические свойства разработанных биodeградируемых скаффолдов на основе децеллюляризованной ткани печени.
4. Оценить регенеративный потенциал разработанных биodeградируемых скаффолдов на основе децеллюляризованной ткани печени в экспериментальной модели заживления полнослойной раны кожи.

Научная новизна

1. Разработаны оригинальные методики получения большого спектра биodeградируемых скаффолдов на основе децеллюляризованной ткани печени в виде макрочастиц, фрагментов межклеточного матрикса и 2D композитных скаффолдов из фиброина шелка.
2. Впервые изучены и охарактеризованы микро- и наноструктурные особенности биodeградируемых скаффолдов на основе децеллюляризованной ткани печени в виде макрочастиц, фрагментов межклеточного матрикса и 2D композитных скаффолдов методом сканирующей зондовой нанотомографии.
3. Впервые показано, что особенности микро- и наноструктуры и топографии поверхности, физико-механические свойства определяют высокий уровень регенеративного потенциала и биологических свойств биodeградируемых скаффолдов на основе децеллюляризованной ткани печени в виде макрочастиц, фрагментов межклеточного матрикса и 2D композитных скаффолдов в модели *in vitro*.
4. Впервые показан высокий регенеративный потенциал биodeградируемых скаффолдов на основе децеллюляризованной ткани печени в виде фрагментов межклеточного матрикса и 2D композитных скаффолдов *in vivo* в экспериментальной модели заживления полнослойной раны кожи.

Практическая значимость

Разрабатываемые методы позволят создать перспективные биомедицинские конструкции для биоинженерии, поскольку разработанные в ходе работы биodeградируемые скаффолды на основе децеллюляризованной ткани печени могут стать универсальными бесклеточными платформами для создания персонализированных биомедицинских клеточных продуктов. Полученные конструкции после витализации собственными клетками пациента могут стать одними из эффективных продуктов для регенеративной медицины.

Методология и методы диссертационного исследования

В ходе выполнения диссертационной работы был использован комплекс молекулярно-биохимических, гистологических, физико-химических, клеточных, микроскопических методов исследований:

1. Получение децеллюляризованной ткани печени крысы породы Wistar.
2. Изготовление макрочастиц из децеллюляризованной ткани печени крысы породы Wistar, Изготовление микрочастиц из децеллюляризованной ткани печени крысы породы Wistar, изготовление лиофилизированных фрагментов децеллюляризованной ткани печени крысы породы Wistar, изготовление скаффолдов в виде пленок, содержащих микрочастицы децеллюляризованной ткани печени крысы породы Wistar.
3. Изучение структуры разработанных биodeградируемых скаффолдов методами сканирующей электронной микроскопии и сканирующей зондовой нанотомографии.
4. Изучение механических свойств децеллюляризованной ткани и скаффолдов с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы породы Wistar на разрывной машине, изучение скорости биodeградации биосовместимых конструкций в ферментативной среде.
5. Методы культивирования мышинных фибробластов 3T3 и клеток культуры гепатокарциномы человека Hep-G₂ на разработанных биodeградируемых скаффолдах, оценка адгезии и пролиферации клеток с применением 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ), и флуоресцентной микроскопии.
6. Оценка и сравнение регенеративного потенциала лиофилизированных фрагментов децеллюляризованной ткани печени и скаффолдов в виде пленок, содержащих микрочастицы децеллюляризованной ткани печени крысы породы Wistar, в экспериментальной модели заживления полнослойной раны кожи крысы.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанный метод получения микрочастиц межклеточного матрикса со средним размером 1-5 мкм позволяет получить композитные 2D скаффолды с наноструктурированной поверхностью.
2. Полученные по оригинальной методике фрагменты межклеточного матрикса и композитные 2D скаффолды с включенными в состав микрочастицами межклеточного матрикса печени являются биосовместимыми, поддерживают адгезию и пролиферацию клеток.
3. Разработанные по оригинальной методике биodeградируемые скаффолды на основе децеллюляризованной ткани печени в модельной системе ускоряют заживление раны кожи и характеризуются высоким уровнем регенеративного потенциала.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность и обоснованность полученных результатов обеспечена достаточным объёмом экспериментальных исследований (2 линии клеток – Hep-G₂ и 3T3 для экспериментов по исследованию биосовместимости *in vitro* и 20 самцов крыс породы Wistar для экспериментов по исследованию биосовместимости *in vivo*) и применением современных лабораторных и инструментальных методов анализа (сканирующая электронная микроскопия, сканирующая зондовая микроскопия, сканирующая зондовая нанотомография, биохимические методы исследований, методы работы с клеточными линиями), а также адекватных методов статистической обработки данных.

Апробация работы состоялась 9 июля 2019 года на совместной конференции научных и клинических подразделений Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных

органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова»).

Результаты и материалы, полученные в рамках диссертационного исследования, представлены на 8 российских конференциях: VII Всероссийский съезд трансплантологов, XXI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2014», XXII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2015», II Национальный конгресс по регенеративной медицине, XXVII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», XXIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016», VIII Всероссийский съезд трансплантологов, Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2017», Третий российский национальный конгресс с международным участием «Трансплантация и донорство органов», IX Всероссийский съезд трансплантологов; и 3 международных конференциях: XLIII Congress of the European Society for Artificial Organs, 44th ESAO and 7th IFAO Congress, 45th ESAO Congress.

Внедрение результатов исследования в практику

Технология децеллюляризации ткани печени и метод получения композитных скаффолдов на основе фиброина шелка разработаны и внедрены в практику ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова». Технология исследования биodeградируемых скаффолдов на основе децеллюляризованной ткани печени методом сканирующей зондовой нанотомографии внедрена в практику ООО «СНОТРА» (участник Фонда Сколково).

Личный вклад автора

Автор принимала непосредственное участие в постановке цели и задач исследования, участвовала в разработке концепции и в составлении плана экспериментальных исследований. Самостоятельно проводила децеллюляризацию печени крысы, изготавливала биodeградируемые скаффолды на основе децеллюляризованной ткани, создавала модель оценки регенеративного потенциала полученных биodeградируемых скаффолдов. Проводила исследования биосовместимости скаффолдов *in vitro*, изучение структуры методами сканирующей электронной микроскопии и сканирующей зондовой нанотомографии. Автором самостоятельно сформирована база данных, проведена статистическая обработка, анализ и интерпретация полученных результатов.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 13 статей, из них 10 в российских журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий ВАК РФ, а также в одну из международных баз Web of Science или Scopus, и 3 статьи в зарубежных журналах. Также по результатам диссертационной работы получено пять российских патентов.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной материалам и методам исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка литературы, включающего 180 источников, в том числе 16 отечественных и 164 зарубежных. Работа изложена на 146 страницах машинописного текста, иллюстрирована 34 рисунками, содержит 7 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Децеллюляризация печени крысы. Децеллюляризацию печени крысы породы Wistar проводили через портальную вену. На первом этапе печень перфузировали натрий-фосфатным буфером со скоростью 150 мл/ч, чтобы освободить орган от крови. Далее готовили три группы образцов печени, в процедуре децеллюляризации которых использовали 3 варианта лизирующих растворов для перфузии следующего состава: группа 1. 500 мл натрий-фосфатного буфера, 0,1% додецилсульфата натрия, 1% тритона X-100; группа 2. Последовательная перфузия двух растворов 0,1% додецилсульфата натрия в натрий-фосфатном буфере (500 мл) с увеличивающейся концентрацией тритона X-100: 1% и 2%; группа 3. последовательная перфузия трех растворов 0,1% додецилсульфата натрия в натрий-фосфатном буфере (500 мл) с увеличивающейся концентрацией тритона X-100: 1%, 2% и 3%. Перфузию проводили со скоростью 150 мл/ч. Содержащиеся в растворах детергенты удаляли из печени перфузией с натрий-фосфатным буфером со скоростью 150 мл/ч.

Анализ сосудистого русла матрикса печени крысы. Децеллюляризованную печень крысы окрашивали на выявление сосудистого русла путем перфузии 0,5% раствора голубого декстрана с молекулярной массой 2 МДа со скоростью 150 мл/ч.

Получение макрочастиц децеллюляризованной ткани печени крысы. Для получения макрочастиц децеллюляризованную ткань печени крысы измельчали с помощью хирургических ножниц, перемещали в пробирку и доводили объем до 15 мл раствором 15% глицерина в натрий-фосфатном буфере с pH=7,4. Инкубировали 20 минут, после чего центрифугировали 10 минут при 8500 g. Осадок измельчали в жидком азоте с помощью предварительно охлажденных пестика и ступки в течение 5 минут. Полученные частицы перемещали в чистую предварительно охлажденную пробирку и доводили объем до 25 мл дистиллированной водой при перемешивании. Полученную массу пропускали через марлю, сложенную вдвое, для избавления от крупных не размельченных частиц ткани. Оставшуюся суспензию частиц центрифугировали 3 раза по 10 минут 450 g. После каждого центрифугирования отбирали супернатант. Из полученного осадка отбирали 500 мкл и переносили в 500 мкл 70% этанола, центрифугировали 3 раза по 5 минут при 450 g. Процесс фракционирования частиц контролировали визуально на оптическом микроскопе Carl Zeiss Axio Vert.A1 (Carl Zeiss, Германия) с камерой AxioCam 305 color (Carl Zeiss, Германия). После фракционирования 80% макрочастиц имели размер в диапазоне 207±50 мкм.

Получение микрочастиц децеллюляризованной ткани печени крысы. Для получения микрочастиц децеллюляризованную ткань печени крысы измельчали с помощью хирургических ножниц, перемещали в пробирку и доводили объем до 15 мл раствором 15% глицерина в натрий-фосфатном буфере с pH=7,4. Инкубировали 20 минут, после чего центрифугировали 10 минут при 8500 g. Осадок измельчали в жидком азоте с помощью предварительно охлажденных пестика и ступки в течение 15 минут. Полученные частицы перемещали в чистую предварительно охлажденную пробирку и доводили объем до 35 мл дистиллированной водой при перемешивании. После оседания полученной суспензии частиц в течение суток, отбирали верхнюю 1/3 часть суспензии осевших частиц, которые центрифугировали в течение 10 минут при 1355 g дважды. Затем супернатант

центрифугировали 10 минут при 720 g. Полученный супернатант центрифугировали 10 минут при 12100 g 4 раза. После этого, отбирали супернатант полностью, полученный осадок разводили в бидистиллированной воде в объеме в 10 раз меньшем, чем объем отобранной суспензии частиц после измельчения в жидком азоте.

Изготовление скаффолдов в виде пленок. Скаффолды в виде пленок изготавливали на основе фиброина шелка методом полива. Фиброин для изготовления скаффолдов выделяли из шелковых нитей тутового шелкопряда *Bombyx mori*. Для этого нити шелка диаметром 4-0 (Моснитки, Россия) в количестве 1 г разрезали на фрагменты по 0,5 см. Кипятили на водяной бане в течение 40 минут в растворе с добавлением двууглекислого натрия для очистки нитей от серицина и других примесей. Затем промывали 3600 мл дистиллированной воды. Кипятили 3 раза по 30 минут в бидистиллированной воде, промывая после каждого кипячения 3600 мл дистиллированной воды. После чего высушивали в сушильном шкафу. Для получения водного раствора фиброина в 1 мл спиртового раствора хлорида кальция раствора приготовленного из расчета 389 мг хлорида кальция, 388 мкл этанола и 544 мкл бидистиллированной на 1 мл, вносили навеску фиброина до конечной концентрации 130 мг/мл. Нагревали на водяной бане при 40°C в течение 4 часов. После чего производили четырехкратный диализ раствора против бидистиллированной воды и спектрофотометрическое определение концентрации фиброина на установке Thermo Genesis 10 UV (Thermo Fisher Scientific, США) в полученном после диализа растворе при длине волны 280 нм (коэффициент молярной экстинкции фиброина 1,07). Полученный водный раствор фиброина разводили до концентрации 20 мг/мл и наносили на поверхность полированного тефлона, высушивали в течение 48 часов при комнатной температуре. После высушивания, на полученные скаффолды в виде пленок наносили 96% этанол и инкубировали в течение 30 минут, затем скальпелем отделяли пленки от поверхности тефлона. Изолированные пленки переносили в 70% этанол. Для изготовления композитных скаффолдов на основе фиброина шелка в виде пленок в раствор фиброина шелка вносили суспензию микрочастиц децеллюляризованной ткани печени крысы. Перед внесением суспензию тщательно диспергировали и вносили в раствор для изготовления скаффолда до конечной концентрации микрочастиц 8 мг/мл.

Изучение механических свойств полученных скаффолдов. Изучение механических свойств конструкций проводили в лаборатории химии и технологии материалов для сердечно-сосудистой хирургии Национального медицинского исследовательского центра сердечно-сосудистой Хирургии Института имени А.Н. Бакулева под руководством Новиковой С.П. Исследование механических свойств полученных образцов проводили на разрывной машине Zwick/Roell BZ 2.5/TNIS (Zwick GmbH & Co. KG, Германия). Для работы на аппарате готовили препаратов размером 5 см в длину и 15 мм в ширину. Было две группы образцов: группа 1- скаффолды в виде пленок на основе фиброина шелка, группа 2- композитные скаффолды в виде пленок на основе фиброина шелка с микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы. В каждой группе было по 5 образцов. Толщину образцов измеряли и учитывали при расчетах. Образцы помещали в зажимы прибора. Предварительная нагрузка была равна 0,05 Н. Далее проводили испытание образцов на растяжение со скоростью 50 мм/мин. Измеряли значения двух величин: прочность на разрыв в МПа и эластичность или удлинение в процентах от первоначальной длины образца.

Полученные кривые зависимости силы от удлинения обрабатывали статистически с помощью программы TestXpert (Zwick Roell, Германия).

Анализ структуры образцов методом сканирующей зондовой нанотомографии. Анализ трехмерной структуры образцов фрагментов децеллюляризованной ткани печени крысы методом сканирующей зондовой нанотомографии был выполнен с использованием зондовой нанолaborатории Ntegra Tomo (NT-MDT, Москва). Данный приборный комплекс представляет собой комбинацию сканирующего зондового микроскопа и ультрамикротомы (Leica EM UC6, Leica Microsystems GmbH, Австрия) и позволяет получать СЗМ-изображения поверхности образца непосредственно после выполнения сверхтонких срезов поверхности ультрамикротомом. Образцы фиксировали в растворе 2,5% глутарового альдегида в фосфатно-солевом буфере в течение 2 часов в темноте при +4°C. Далее фиксированные образцы отмывали 3 раза по 10 минут в фосфатно-солевом буфере. Затем образцы обезвоживали проводкой по спиртам с увеличивающейся концентрацией (30%-50%-70%-80%-96%), инкубируя 10 минут в каждом, и переносили в пропиленоксид, в котором проводили инкубацию 3 раза по 10 минут. Далее образцы переносили в смесь пропиленоксид:эпоксидная смола в соотношении 1:1 и инкубировали в этой смеси в течение 30 минут комнатной температуре, затем проводили инкубацию в течение 30 минут в смеси пропиленоксид:эпоксидная смола в соотношении 1:2 комнатной температуре. Образцы переносили в эпоксидную смолу и инкубировали при температуре 45°C в течение 24 часов и при температуре 60°C в течение 72 часов до полного затвердевания. После этого выполняли серию последовательных срезов образцов. Последовательные срезы образца выполнялись с использованием ультразвукового алмазного ножа Ultra sonic 35 (Diatome AG, Швейцария) с шириной режущей кромки 3.0 мм. СЗМ-измерения проводились в полуконтактном режиме при скорости сканирования 1 Гц с использованием кремниевых зондов-кантилеверов ETALON HA_HR (Tipnano OÜ, Эстония) с резонансной частотой 390 кГц и радиусом кривизны острия < 10 нм. Первичная обработка СЗМ изображений проводилась в программе Nova ImageAnalysis 1.0.26.1443 (NT-MDT, Москва). По полученной серии СЗМ-изображений была реконструирована трехмерная структура образца. Для визуализации трехмерной структуры использовался программный пакет ImagePro Plus 6.0 (MediaCybernetics Inc, США).

Анализ цитотоксичности образцов. Оценку цитотоксичности проводили согласно ГОСТ ISO 10993-2-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*» с помощью 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (МТТ). Анализ цитотоксичности образцов производили на примере линии клеток мышечных фибробластов 3Т3. Для этого мышечные фибробласты 3Т3 культивировали в 300 мкл культуральной среды DMEM- low glucose, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 4мМ глутамин и 40 мкг/мл гентамицина, в 96-луночной планшете в термостате при 37°C, 5% CO₂ в течение 3 дней. Затем производили смену питательной среды и вносили образцы в лунки: на 1 лунку один фрагмент. Далее инкубировали образцы в термостате при 37°C, 5% CO₂ в течение 7 дней. В качестве контроля использовали культуральный пластик. Далее в каждую лунку планшета вносили по 60 мкл раствора МТТ с концентрацией 5 мг/мл. Инкубировали в термостате при 37°C при содержании 5% CO₂ в течение 4 часов до выпадения темно- синих

кристаллов формазана. Затем планшет центрифугировали в течение 5 минут при 885 g, предварительно удалив исследуемые образцы. Супернатант удаляли, осадок формазана растворяли в 300 мкл диметилсульфоксида в течение 20 минут и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 540 нм на приборе Picon (Picon incorporated company, Униплан, Россия).

Анализ пролиферативной активности клеток на скаффолдах и лиофилизированных фрагментах децеллюляризованной ткани. Эксперимент проводили в 96-луночном планшете. Для проведения эксперимента скаффолды на основе фиброина шелка и лиофилизированные фрагменты децеллюляризованной ткани печени позиционировали в лунки планшета. В качестве контроля использовали культуральный пластик. Перед проведением теста образцы подвергали стерилизации: скаффолды сначала обрабатывали 70%-ным спиртом в течение 30 минут, затем облучали ультрафиолетом (Длина волны 253,7 нм, лампа Philips TUV 15W/G15; Philips Lighting B.V., Нидерланды) скаффолды и лиофилизированные фрагменты в течение 30 минут. После этого в планшет вносили стерильный раствор фосфатно-солевого буфера и инкубировали в течение 15 минут, после чего производили смену фосфатно-солевого буфера. Данную процедуру повторяли три раза. Далее в планшет вносили по 300 мкл среды инкубации на 30 минут.

Суспензию клеток в среде инкубации переносили в 96-луночные планшеты из расчета 1000 клеток лунку. В эксперименте использовали две линии клеток – линию мышечных фибробластов 3T3 и линию клеток гепатокарциномы человека Hep-G₂. Клетки инкубировали в термостате при 37°C и 5% CO₂ в течение 7 дней.

Оценку адгезии и пролиферативной активности клеток проводили визуально с помощью микроскопа Carl Zeiss Axio Vert.A1 (Zeiss, Германия). Для этого образцы окрашивали флуоресцентным красителем DAPI, который связывается с ДНК клеток. Перед окрашиванием производили двукратную отмывку образцов от среды инкубации и неадгезированных клеток раствором фосфатно-солевого буфера. После этого вносили водный раствор красителя с концентрацией 3 мкг/мл из расчета 300 мкл на чашку Петри и инкубировали в термостате при 37°C и 5% CO₂ в течение 5 минут. Затем образцы двукратно отмывали от несвязавшегося красителя раствором фосфатно-солевого буфера. Полученные образцы анализировали на флуоресцентном микроскопе с помощью фильтра с диапазоном возбуждения 360-370 нм, диапазоном эмиссии 420-470 нм.

Изображения клеток получали с помощью камеры AxioCam 305 color (Carl Zeiss, Германия), полученные изображения обрабатывали в программе Zen 2.3 Blue Edition (Carl Zeiss, Германия). По полученным изображениям проводили подсчет клеток в поле зрения микроскопа.

Изготовление образцов децеллюляризованной ткани печени. Децеллюляризованную печень измельчали хирургическими ножницами, размер полученных фрагментов 8±2 мм. Полученную массу перемещали в пробирку и инкубировали в бидистиллированной воде в течение 30 минут. Далее переносили децеллюляризованную ткань в чашку Петри и отбирали избытки влаги, сохраняя расстояние между частями матрикса вдвое больше их размера. В течение одного часа замораживали образцы при температуре -80°C, затем лиофильно высушивали с помощью лиофильной сушилки IShinBioBase FD8580 (IShinBioBase Co. Ltd., Южная Корея). Полученные лиофильно высушенные образцы

измельчали до размера 2x2 мм и стерилизовали под ультрафиолетом (Длина волны 253,7 нм, лампа Philips TUV 15W/G15; Philips Lighting B.V., Нидерланды) в течение 30 минут.

Проведение эксперимента по заживлению полнослойной кожной раны крысы *in vivo*. Эксперимент *in vivo* проводили на модели заживления кожного покрова крысы породы Wistar. Эксперимент проходил на шести группах животных: группа 1- отрицательный контроль, нанесенную рану не покрывали каким-либо материалом, способствующим заживления кожи, группа 2- экспериментальная, рану покрывали фрагментами лиофилизированной децеллюляризованной ткани печени крысы, группа 3-экспериментальная, рану покрывали скаффолдами в виде пленок на основе фиброина шелка, группа 4-экспериментальная, рану покрывали скаффолдами в виде пленок на основе фиброина шелка с внесенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы. В каждой группе было по 5 крыс. Все манипуляции производили под ингаляционным эфирным наркозом, обеспечиваемым с помощью эксикатора из расчета 50 мг/кг, при этом животные находились на спонтанном дыхании. Крысу фиксировали на операционном столе, на спине в области лопаток выщипывали шерсть, кожу обрабатывали 70% спиртом. Наносили хирургическими ножницами круглую рану таким образом, чтобы были затронуты все слои кожи: эпидермис, дерма и гиподерма. Рану обрабатывали 0,05% водным раствором хлоргексидин биглюконата. Далее раны крыс из контрольной группы покрывали стерильной марлевой повязкой. На раны животных экспериментальных групп размещали образцы конструкций, затем рану смачивали 0,05% водным раствором хлоргексидин биглюконата и покрывали стерильной марлевой повязкой. Конструкции для групп 2 и 3 подготавливали следующим образом: На поверхность раны крыс распределяли частицы лиофильно высушенного матрикса печени так, чтобы рана была закрыта на 70%. Конструкции в виде пленок из групп 4,5 и 6 распределяли на слегка подсушенной ране, расправляя края пленки, до полного смачивания пленки на ране. Всех крыс помещали в одиночные клетки, с полным доступом воды и пищи. Оценку заживления кожных покровов для экспериментальных группы проводили на 3-ий, 9ый, 14-ый, 18-ый и 23-ий день эксперимента, для контрольной- на 3-ий, 9ый, 14-ый, 18-ый, 23-ий, 28-ой, 35-ый, 40-ой день. Изображения ран получали с помощью фотокамеры Nikon D5100 18-105 VR Kit с объективом Nikon AF-S DX 18-105 mm f/3,5-5,6 G ED VR (Nikon, Япония). В качестве количественной характеристики успешной терапии раны использовали коэффициент уменьшения раны, рассчитываемый по формуле 1:

$$A = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

Где A_0 - диаметр раны при ее нанесении,

A_t -диаметр раны в контрольный день.

По полученным значениям строили кривые заживления кожного покрова. По достижению визуального полного закрытия полнослойной кожной раны, производили забор образцов кожи размером 20x20 мм, фиксировали с помощью смеси формалина, этанола и уксусной кислоты в объемном соотношении 4:1:0,3 и проводили гистологический анализ ткани.

Статистическая обработка результатов экспериментов. Данные были обработаны методом дисперсионного анализа. Статистическая значимость различий результатов оценивалась по критерию Манна-Уитни. Уровень статистической значимости p считали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках работы были получены образцы печени, последовательно децеллюляризованной тремя 0,1% растворами додецилсульфат натрия, содержащими 1%, 2% и 3% тритона X-100, путём перфузии через портальную вену. Образцы представляют собой освобожденный от клеток полупрозрачный матрикс печени крысы (Рисунок 1).

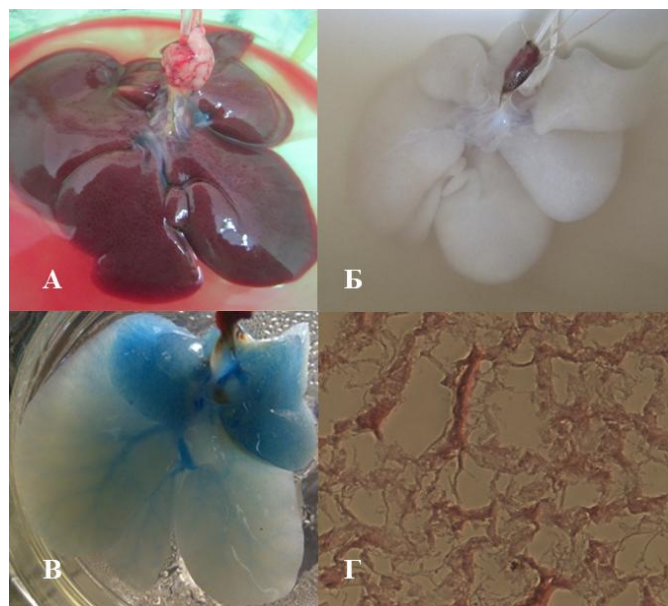


Рисунок 1. Децеллюляризация печени крысы породы Wistar. А-нативная печень; Б-децеллюляризованная печень; В- визуализированная сосудистая сеть печени путем перфузии 0,5% раствора голубого декстрана; Г- Межклеточный матрикс печени, окрашивание Гематоксилин-Эозин, увеличение $\times 200$.

Чтобы продемонстрировать сохранение функционального сосудистого русла, матрикс децеллюляризованной ткани печени крысы окрашивали внутрисосудистым введением раствора голубого декстрана. На рисунке 1В продемонстрировано сохранение сосудистого русла, как крупных сосудов, так и мелких капилляров. При анализе гистологических препаратов было показано, что после перфузии сохранен нативный структурный матрикс. Гистологическая оценка не показала ядерного или цитоплазматического окрашивания в децеллюляризованной ткани. Далее был проведен анализ содержания остаточной ДНК после выделения тотальной ДНК из образцов нативной и децеллюляризованной ткани печени. Концентрация остаточной ДНК в исследуемых образцах децеллюляризованной ткани печени крысы составила 38 ± 8 нг на 1 мг сухого веса нативной ткани, что составляет менее 1% от количества ДНК в нативной ткани. А также не было обнаружено фрагментов остаточной ДНК длиной более 200 пар нуклеотидов. Таким образом, полученная децеллюляризованная ткань печени крысы отвечает минимальным критериям успешного удаления клеточного материала из межклеточного матрикса и может быть использована для дальнейших экспериментов *in vitro* и *in vivo*. Биохимический состав децеллюляризованной ткани печени крысы проводили на MS/MS-спектрометре. Было показано, что в состав полученного межклеточного матрикса входят: коллаген I, III, IV и VI типов, бигликан, фибриллин.

Далее из децеллюляризованной ткани были получены три вида конструкций: макрочастицы, со средним размером 200 мкм, микрочастицы, со средним размером 1-5 мкм, и фрагменты лиофилизированной децеллюляризованной ткани печени крысы.

Наноструктуру межклеточного матрикса исследовали методами сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) и сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ). СЗМ анализ межклеточного матрикса макрочастицы децеллюляризованной ткани печени подтвердил данные гистологического исследования об отсутствии клеток в матриксе после децеллюляризации ткани печени. Была выявлена шероховатая и извилистая топография полученного матрикса (рисунок 2).

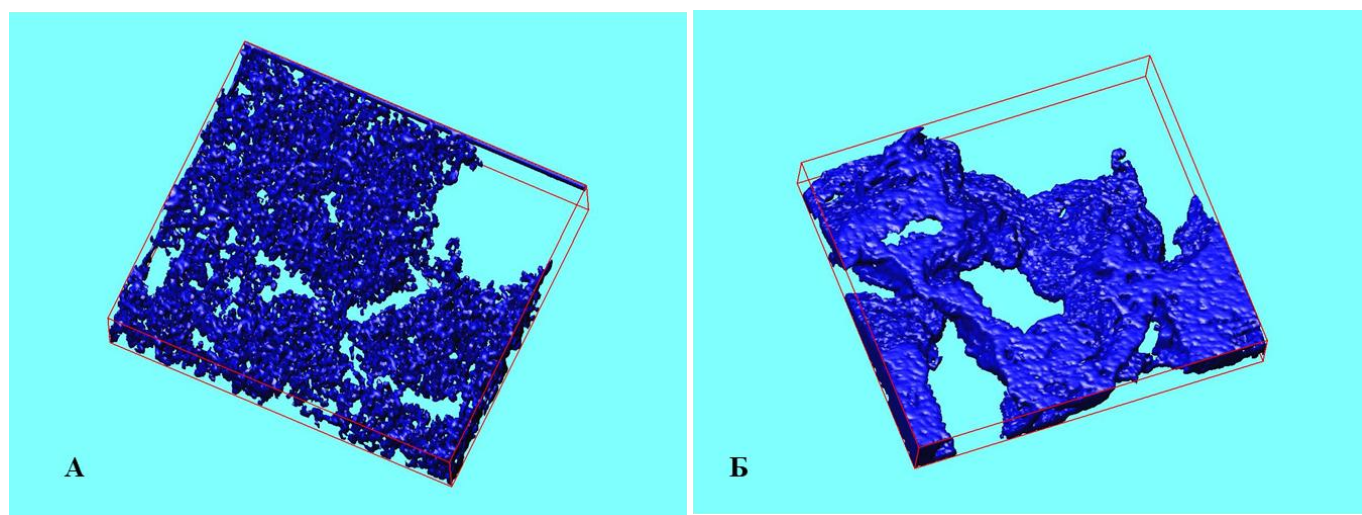


Рисунок 2. Трехмерные реконструкции, полученные методом СЗНТ. А-децеллюляризованная печень, область сканирования - 40x30x6.4 мкм, количество срезов-16, толщина среза – 400 нм; Б-лиофилизированный фрагмент децеллюляризованной печени, область сканирования- 60.0×50.0×6.0 мкм, количество срезов- 24, толщина срезов- 250 нм.

В ходе анализа полученной методом СЗНТ трехмерной реконструкции была выявлена высокопористая структура матрикса децеллюляризованной печени с большим количеством нанопор, степень объемной пористости составила $78.4 \pm 4.7\%$, отношение площади поверхности к объему составило $5.81 \pm 0.10 \mu\text{m}^{-1}$. Также были обнаружены микропоры со средним размером от 2,5 до 20 мкм, образованных после вымывания клеток, и систему связанных нанопор со средним размером от 50 до 400 нм (рисунок 2А). Исходя из анализа полученной трехмерной реконструкции лиофилизированного фрагмента межклеточного матрикса степень объемной пористости матрикса составляет $61.8 \pm 5.4\%$. Также, полученные трехмерные данные позволяют определить отношение площади поверхности к объему, который составляет $0.83 \pm 0.04 \mu\text{m}^{-1}$. Наношероховатость поверхности стенок лиофилизированного фрагмента межклеточного матрикса децеллюляризованной ткани составляет $49.2 \pm 3.8 \text{ нм}$ (рисунок 2Б).

Возможность применения лиофилизированных фрагментов межклеточного матрикса и их регенеративный потенциал был изучен в модели полнослойной кожной раны крысы. Крысам на спине наносили рану, животным в контрольной группе рану закрывали стерильной марлевой повязкой, экспериментальным животным на ране

распределяли частицы лиофильно высушенного матрикса печени размером 2-3 мм так, чтобы рана была закрыта на 70%. Частицы лиофильно высушенного межклеточного матрикса являются гидрофильными, при наложении на рану набухают и легко фиксируются на ней. Вследствие пористости межклеточного матрикса такие частицы способны удерживать влагу и не требуют дополнительного увлажнения в ходе операции. Эти свойства облегчают процесс наложения раневого покрытия, а отсутствие хирургических манипуляций при фиксации скаффолда позволяет сделать процедуру безболезненной и менее инвазивной. Далее производили оценку заживления кожных покровов: производили измерение диаметра ран в ходе эксперимента и проводили качественную и количественную оценки заживления кожи. Было продемонстрировано ускорение заживления раны при использовании в качестве раневого покрытия лиофильно высушенных частиц межклеточного матрикса децеллюляризованной ткани печени по сравнению с контролем на 22 дня, то есть в 2,2 раза (рисунок 3). Качественный анализ заживления полнослойной раны кожи проводили путем гистологического анализа. Было выявлено наличие трех слоев кожи, что свидетельствует об успешном заживлении. Морфология срезов двух групп не отличается. Очагов воспаления или наличие макрофагов не было выявлено, что является важным показателем заживления.



Рисунок 3. Проведение эксперимента по заживлению кожного покрова крысы in vivo. Группа 1- нанесенную рану покрывали стерильной повязкой, Группа 2- в качестве раневого покрытия использовали фрагменты лиофильно высушенной децеллюляризованной ткани печени крысы.

Далее в рамках диссертационной работы методом полива были изготовлены скаффолды в виде пленок на основе фибрина шелка с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы (рисунок 4). Микрочастицы были получены путем измельчения децеллюляризованной ткани печени в жидком азоте. Все скаффолды были бесцветными, прозрачными и имели толщину от 20 до 60 мкм.

Микро- и наноструктуру поверхности полученных скаффолдов, а также структуру микрочастиц в составе скаффолдов исследовали методом сканирующей зондовой микроскопии. На рисунках 4В и 4Г представлены СЗМ-изображения поверхности среза скаффолдов.

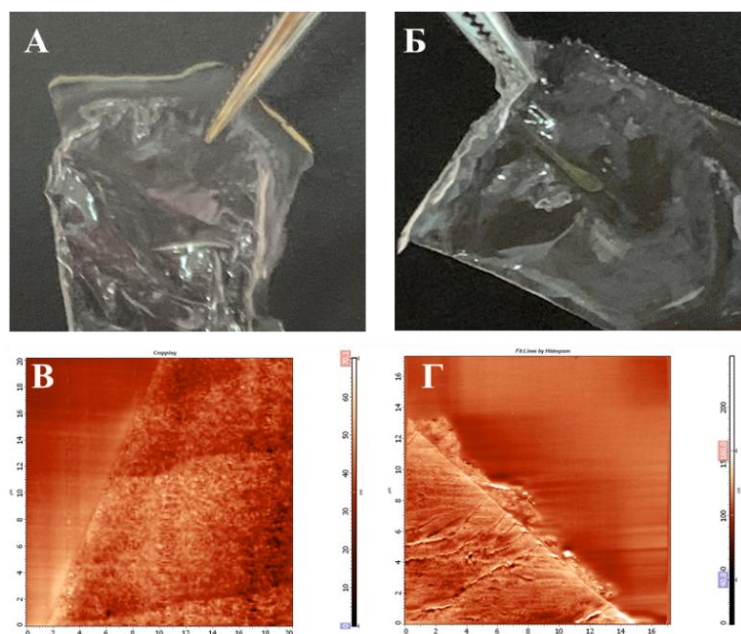


Рисунок 4. Скаффолды на основе фиброина шелка. А- внешний вид скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка, Б- внешний вид скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка, с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы. В- СЗМ изображения поверхности поперечного среза скаффолда на основе фиброина шелка (область сканирования 20x20 мкм), Б- СЗМ изображения поверхности поперечного среза скаффолда на основе фиброина шелка, с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы (область сканирования 17x17 мкм).

На поверхности композитных скаффолдов были обнаружены микрочастицы децеллюляризованной ткани, помимо микрочастиц, располагающихся в толще пленки. При этом микрочастицы децеллюляризованной ткани печени крысы распластаны по поверхности скаффолда и создают шероховатый рельеф поверхности пленки. По полученным СЗМ-изображениям был произведен количественный анализ шероховатости исследуемых скаффолдов. Данные о шероховатости поверхностей скаффолдов представлены в таблице 1. Представленные в таблице данные свидетельствуют о том, что включение в состав микрочастиц межклеточного матрикса ткани печени увеличило шероховатость поверхности конструкций в 5 раз.

Таблица 1. Данные о средней шероховатости поверхности полученных скаффолдов. Указаны значения стандартного отклонения для 6 независимых измерений.

Состав скаффолда	Средняя шероховатость скаффолда, нм
Скаффолд в виде пленки на основе фиброина шелка	36,5±10,6
Скаффолд в виде пленки на основе фиброина шелка, с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы	195,0±40,0

Исследование микро- и наноструктуры полученных композитных скаффолдов проводили методом СЗНТ. Для количественного анализа конструкций были построены трехмерные реконструкции, посредством совмещения серии СЗМ-срезов скаффолдов (рисунок 5). Полученные трехмерные реконструкции были получены для расчета отношения объема микрочастиц к объему скаффолда, которое составило $1,4\% \pm 0,4$.

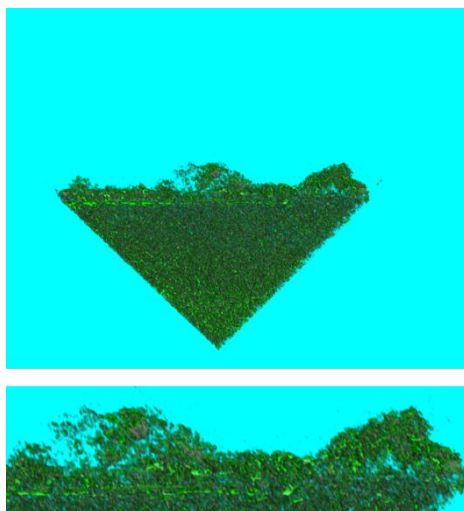


Рисунок 5. Трехмерная реконструкция структуры композитного скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка, с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы (область сканирования $15,20 \times 13,70 \times 2,25$ мкм, количество срезов 15, толщина срезов-150 нм).

Было проведено исследование влияния включения в состав скаффолдов в виде пленок на основе фиброина шелка микрочастиц децеллюляризованной ткани на механические свойства конструкции. Включение в состав микрочастиц децеллюляризованной ткани не влияет на показатели эластичности и прочности на разрыв скаффолда в виде пленки (рисунок 6).

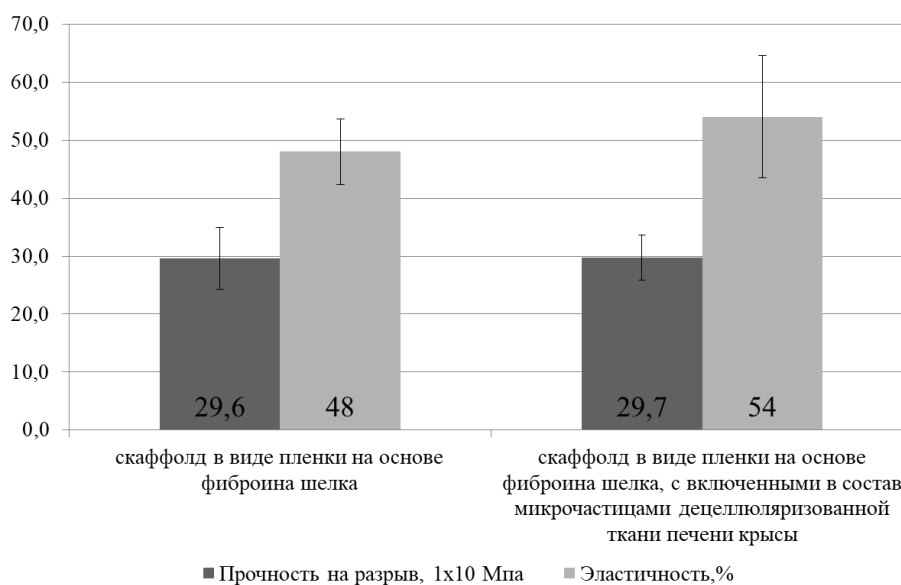


Рисунок 6. Механические свойства полученных скаффолдов.

Все полученные скаффолды не токсичны. Оценку биосовместимости скаффолдов производили на примере клеток двух культур – мышинных фибробластов и клеток гепатокарциномы человека. В ходе эксперимента было показано, что все скаффолды поддерживают адгезию клеток, достоверных различий между скаффолдами и контролем не было выявлено. На композитных скаффолдах пролиферативная активность клеток на 7 день наблюдения была выше, чем на немодифицированных скаффолдах, что может быть обусловлено оптимальными показателями шероховатости композитных скаффолдов (рисунок 7).

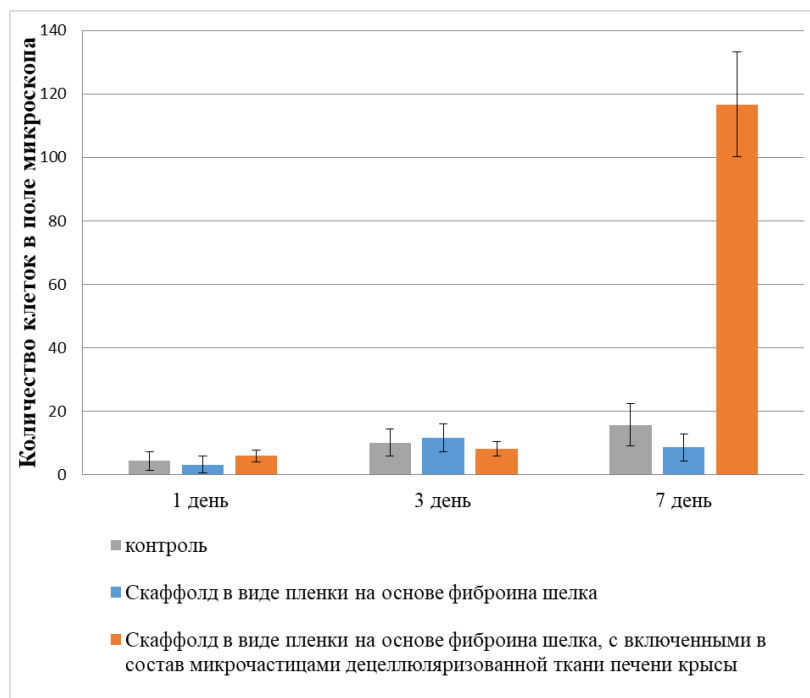


Рисунок 7. Данные о пролиферативной активности клеток культуры Нер- G_2 на 1, 3 и 7 дни эксперимента на полученных скаффолдах на основе фиброина шелка. Указаны значения стандартного отклонения для 5-ти независимых измерений.

Регенеративный потенциал и возможность применения композитных скаффолдов были изучены в экспериментальной модели полнослойной кожной раны крысы. Всем крысам были успешно имплантированы исследуемые скаффолды. Скаффолды являются гигроскопичными, легко позиционируются на ране, фиксируются на ране без наложения шовного материала (рисунок 8). Количественную оценку заживления кожных покровов производили путем измерения диаметра ран. Применение в качестве раневого покрытия композитных скаффолдов ускоряет заживление раны на 17 дней по сравнению с контролем, и на 5 дней по сравнению с немодифицированным скаффолдом. Качественный анализ заживления полнослойной раны кожи проводили путем гистологического анализа. Было выявлено наличие трех слоев кожи, что свидетельствует об успешном заживлении. Морфология среза экспериментальной группы с использованием некомпозитного скаффолда отличается более выраженным роговым слоем эпидермиса и рыхлой структурой дермы. Очагов воспаления или наличие макрофагов не было выявлено. Было показано наличие волосяных фолликулов при использовании композитных скаффолдов, что свидетельствует и о полном функциональном восстановлении кожи (рисунок 9). Таким образом, можно утверждать о высоком регенеративном потенциале полученных скаффолдов на основе фиброина шелка с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени.

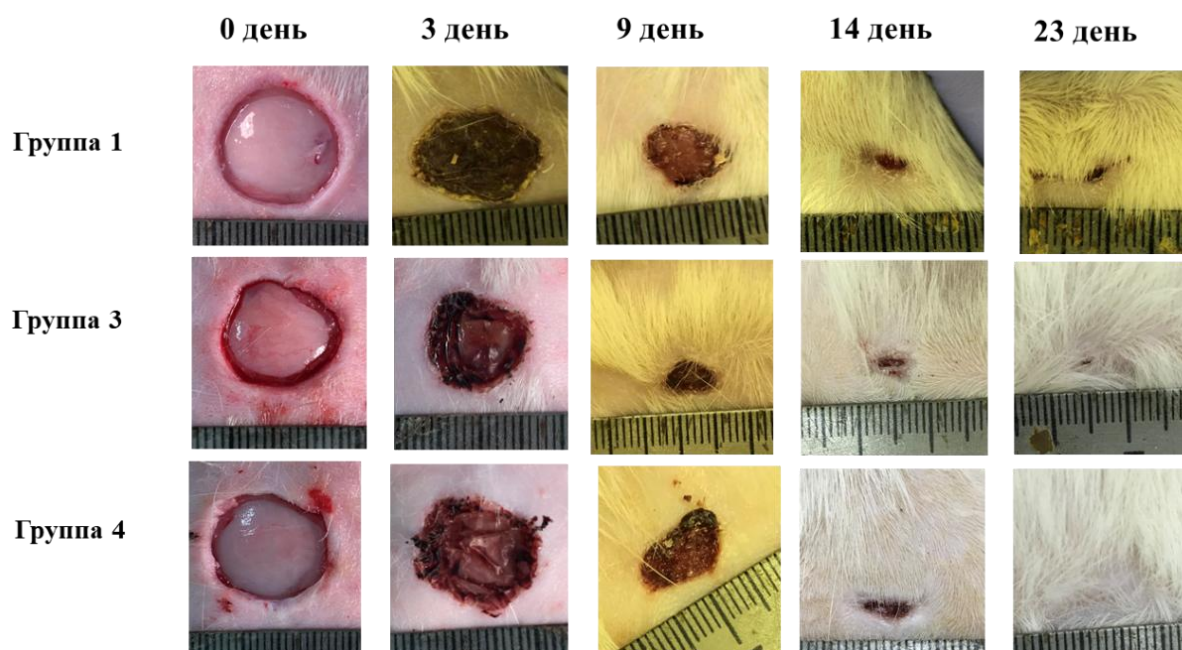


Рисунок 8. Проведение эксперимента по заживлению кожи крысы. Приведены фото оценки заживления кожных покровов на 3-ий, 9-ый, 14-ый, 18-ый и 23-ий день эксперимента. Группа 1: Контроль - нанесенную рану покрывали стерильной повязкой, группа 3: в качестве раневого покрытия использовали скаффолды на основе фиброина шелка, группа 4: в качестве раневого покрытия использовали скаффолды на основе фиброина шелка с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы.

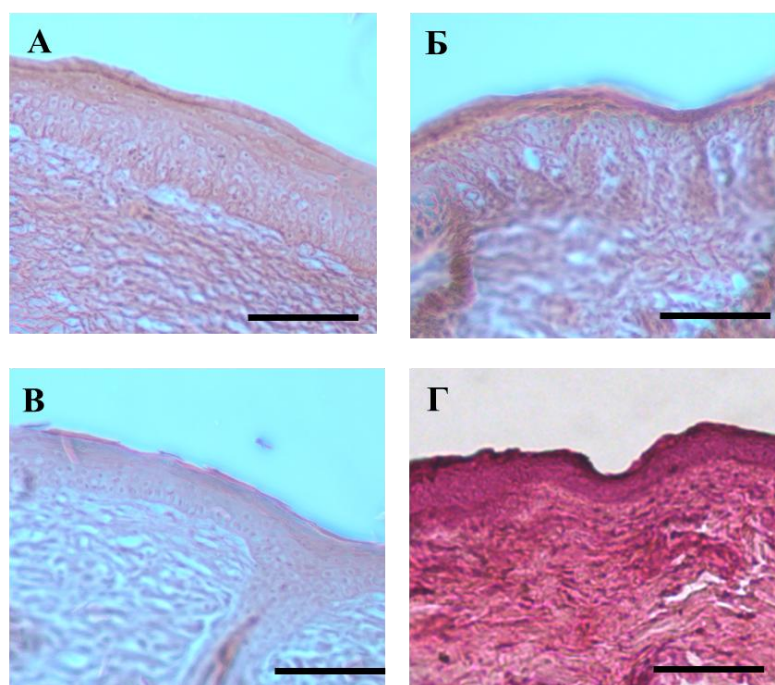


Рисунок 9. Изображение гистологических срезов кожи после заживления полнослойной раны, окрашенные гематоксилин-эозином. Масштабный отрезок-100 мкм. А- нанесенную рану покрывали стерильной повязкой (40 день), Б- рану покрывали скаффолдами в виде пленок на основе фиброина шелка (28 день), В- рану покрывали скаффолдами в виде пленок на основе фиброина шелка с внесенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы (23 день), Г- нативная кожа крысы (норма).

Разработка конструкций для регенеративной медицины является междисциплинарной задачей, направленной на воссоздание в процессе восстановления поврежденного органа необходимых физических параметров, микро- и наноструктуры, а также биологических свойств нативной ткани. Использование биополимеров, нативного межклеточного матрикса, а также их композитов позволит расширить возможности создания высокоэффективных конструкций для различных направлений тканевой инженерии. Разработанные методы в рамках диссертационной работы позволят создать перспективные биомедицинские конструкции для регенеративной медицины, которые будут являться универсальными бесклеточными платформами для создания персонализированных биомедицинских клеточных продуктов.

Таким образом, полученные конструкции на основе децеллюляризованной ткани печени обладают высоким регенеративным потенциалом, способны воссоздавать нативную архитектуру и окружение для клеток, и могут быть рассмотрены как перспективные конструкции для тканевой инженерии и регенеративной медицины.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны методики получения биodeградируемых скаффолдов на основе децеллюляризованной ткани печени в виде макрочастиц, фрагментов межклеточного матрикса и 2D композитных скаффолдов из фиброина шелка, позволяющие воссоздать нативное микроокружение для клеток.
2. Используемый для создания скаффолдов межклеточный матрикс отвечает критериям децеллюляризованной ткани: не было выявлено фрагментов клеточных ядер, не были обнаружены фрагменты ДНК размером более 200 пар нуклеотидов, общее содержание ДНК в 1 мг сухого веса матрикса составило менее 50 нг.
3. Разработанные скаффолды характеризуются высокой пористостью: степень объемной пористости макрочастиц и фрагментов межклеточного матрикса составила $78.4 \pm 4.7\%$ и $61.8 \pm 5.4\%$ соответственно. Оригинальная методика получения 2D композитных скаффолдов позволила увеличить шероховатость поверхности в 5 раз по сравнению с немодифицированным скаффолдом, что способствовало улучшению функциональных свойств образцов.
4. Межклеточный матрикс децеллюляризованной ткани биodeградирует в ферментативной среде и стабилен в нейтральной. Механические свойства полученных скаффолдов совместимы с хирургическими манипуляциями при их имплантации.
5. Разработанные биodeградируемые скаффолды на основе децеллюляризованной ткани печени в виде макрочастиц, фрагментов межклеточного матрикса и композитных скаффолдов из фиброина шелка не токсичны, поддерживают высокий уровень адгезии и пролиферации клеток культур мышинных фибробластов 3T3 и гепатокарциномы человека Hep-G₂.
6. Разработанные биodeградируемые скаффолды на основе децеллюляризованной ткани печени в виде фрагментов межклеточного матрикса и композитных скаффолдов из фиброина шелка в экспериментальной модельной системе *in vivo* ускоряют заживление полнослойной кожной раны в среднем в 2 раза, обладают высоким регенеративным потенциалом, и являются перспективными для использования в регенеративной медицине.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Ефимов А.Е.** Исследование микро- и наноструктуры биосовместимых матриц из регенерированного фиброина *Bombyx mori* методом сканирующей зондовой нанотомографии / А.Е. Ефимов, М.М. Мойсенович, А.Г. Кузнецов, Л.А. Сафонова, М.М. Боброва, И.И. Агапов // **Российские нанотехнологии.-2014.-Т. 9.-№9-10.-С.59-63.**
2. **Боброва М.М.** Использование технологии децеллюляризации для создания искусственных органов и тканей. В кн.: XXI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2014», тезисы докладов. Москва, 7-11 апреля 2014. С.:24-25.
3. **Сафонова Л.А.** Биологические свойства пленок из регенерированного фиброина шелка / Л.А. Сафонова, М.М. Боброва, О.И. Агапова, М.С. Котлярова, А.Ю. Архипова, М.М. Мойсенович, И.И. Агапов // **Современные технологии в медицине.-2015.-Т. 7.-№3.-С.6-13.**
4. **Боброва М.М.** Децеллюляризация ткани печени как перспективная технология получения пористого матрикса для тканевой инженерии и регенеративной медицины / М.М. Боброва, Л.А. Сафонова, О.И. Агапова, М.Е. Крашенинников, М.Ю. Шагидулин, И.И. Агапов // **Современные технологии в медицине.-2015.-Т. 7.- №4.-С.6-13.**
5. Шагидулин М.Ю., Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е., Немец Е.А., Григорьев А.М., Бабий Е.В., Ильинский И.М., Можейко Н.П., Боброва М.М., Сафонова Л.А. Аврамов П.В., Севастьянов В.И., Готье С.В. Получение тканеспецифического матрикса печени для тканевой инженерии. В кн.: II Национальный конгресс по регенеративной медицине, Материалы конгресса. Москва, 3-5 декабря 2015. С.:201.
6. **Соколова А.И.** Зависимость биологических свойств скаффолдов из фиброина шелка и желатина от состава и технологии изготовления / А.И. Соколова, М.М. Боброва, Л.А. Сафонова, О.И. Агапова, М.М. Мойсенович, И.И. Агапов // **Современные технологии в медицине.-2016.-Т. 8.- №3.-С.6-15.**
7. **Онищенко Н.А.** Гепатоспецифический мелкодисперсный матрикс как важный компонент имплантируемых клеточно-инженерных конструкций вспомогательной печени / Н.А. Онищенко, М.Е. Крашенинников, М.Ю. Шагидулин, М.М. Боброва В.И. Севастьянов, С.В. Готье // **Гены и Клетки.-2016.-Т. 11.-№1.-С.54-60.**
8. **Сафонова Л.А.** Пленки на основе фиброина шелка для заживления полнослойной раны кожи у крыс / Л.А. Сафонова, М.М. Боброва, О.И. Агапова, А.Ю. Архипова, А.В. Гончаренко, И.И. Агапов // **Вестник трансплантологии и искусственных органов.-2016.-Т. 18.-№3.-С.80-83.**

9. **Ефимов А.Е. Наноструктурные особенности контактов фибробластов и двухмасштабного биосовместимого полиуретанового матрикса / А.Е. Ефимов, О.И. Агапова, Л.А. Сафонова, М.М. Боброва, В.А. Парфенов, Е.В. Кудан, Ф.Д.А.С. Перейра, Е.А. Буланова, В.А. Миронов, И.И. Агапов // Российские нанотехнологии. – 2016.- Т. 11.- №11-12.- С. 116-119.**
10. **Боброва М.М.**, Сафонова Л.А., Агапова О.И. Биологические и механические свойства децеллюляризованной ткани печени. В кн.: XXVII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии»: сборник тезисов. Москва, 8-11 февраля 2016. С.163.
11. Агапова О.И., Ефимов А.Е., **Боброва М.М.**, Сафонова Л.А., Агапов И.И. Исследование наноструктурных и адгезионных свойств альгинатных клеточных микроносителей. VIII Всероссийский съезд трансплантологов. Москва, Россия, 27-29 июня 2016. С.182.
12. **Bobrova M.**, Safonova L., Agarova O., Krashennnikov M., Shagidulin M., Agarov I., Gautier S. Liver tissue decellularization as a technology obtaining porous scaffold for tissue engineering and regenerative medicine. Abstracts from the XLIII Congress of the European Society for Artificial Organs. Warsaw, Poland, 14-17 September 2016. P.345.
13. Agarova O., Efimov A., Safonova L., **Bobrova M.**, Agarov I. Study of nanostructure and adhesion properties of alginate cell microcarriers. Abstracts from the XLIII Congress of the European Society for Artificial Organs. Warsaw, Poland, 14-17 September 2016. P.384-385.
14. **Efimov A.E. Cryo scanning probe nanotomography study of the structure of alginate microcarriers / А.Е. Efimov, О.И. Agarova, L.A. Safonova, М.М. Bobrova, A.D. Volkov, L. Khamkhash, I.I. Agarov // RSC Advances. – 2017.- V. 7.- P. 8808-8815.**
15. **Ефимов А.Е. Трехмерный анализ микро- и наноструктуры биоматериалов и клеток методом сканирующей зондовой крионанотомографии / А.Е. Ефимов, О.И. Агапова, Л.А. Сафонова, М.М. Боброва, И.И. Агапов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2017.- Т. 19.-№4.-С.78-87.**
16. Целых И.О., **Боброва М.М.**, Сафонова Л.А. Микрочастицы из децеллюляризованной печени для регенеративной медицины и тканевой инженерии. Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2017» / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. [Электронный ресурс] — М.: МАКС Пресс, 2017. — 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM); 12 см. - Систем. требования: ПК с процессором 486+; Windows 95; дисковод DVD-ROM; Adobe Acrobat Reader. — 1186 Мб. — 9000 экз. ISBN 978-5-317-05504-2.
17. **Bobrova M.**, Safonova L., Tselykh I., Agarova O., Agarov I. Microparticles from decellularized human liver tissue for increasing the biocompatibility of artificial grafts. Abstracts from the 44th ESAO and 7th IFAO Congress. Vienna, Austria, 6-9 September 2017. P.462.

18. Ефимов А.Е., Агапова О.И., Сафонова Л.А., **Боброва М.М.**, Агапов И.И. Трехмерный анализ микро- и наноструктуры биоматериалов, клеток и тканей методом сканирующей зондовой нанотомографии. Третий российский национальный конгресс с международным участием «Трансплантация и донорство органов», 2-4 октября 2017 г. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2017;19(3):6-230.
19. **Боброва М.М.** Анализ пролиферативной активности клеток в микрочастицах, полученных из децеллюляризованной ткани печени и почки / **М.М. Боброва, Л.А. Сафонова, О.И. Агапова, А.Е. Ефимов, И.И. Агапов** // Вестник трансплантологии и искусственных органов.- 2018.-Т. 20. №4.- С.69-75.
20. **Bobrova M.**, Safonova L., Efimov A., Agapova O., Agapov I. Investigation Of Decellularized Liver Tissue Structure By Novel Method Scanning Probe Nanotomography. Abstracts from the 45th ESAO Congress. Madrid, Spain, 12-15 September 2018. P. 510. The International Journal of Artificial Organs 2018, Vol. 41(9) 486–631.
21. **Боброва М.М.**, Сафонова Л.А., Ефимов А.Е., Агапова О.И., Агапов И.И. Исследование структуры децеллюляризованной ткани печени методом сканирующей зондовой нанотомографии. IX Всероссийский съезд трансплантологов. Москва, Россия, 17-19 сентября 2018. С.146.
22. **Moisenovich M.M.** Effect of Silk Fibroin on Neuroregeneration After Traumatic Brain Injury / **M.M. Moisenovich, E.Y. Plotnikov , A.M. Moysenovich , D.N. Silachev, T.I. Danilina, E.S. Savchenko , M.M. Bobrova, L.A. Safonova , V.V. Tatarskiy , M.S. Kotliarova , I.I. Agapov, D.B. Zorov** // **Neurochemical Research.- 2018.-V38(9). P.1-12.**
23. **Efimov A.E.** 3D scanning probe nanotomography of tissue spheroid fibroblasts interacting with electrospun polyurethane scaffold / **A.E. Efimov , O.I. Agapova , L.A. Safonova , M.M. Bobrova , V.A. Parfenov, E.V. Koudan , F.D.A.S. Pereira , E.A. Bulanova, V.A. Mironov , I.I. Agapov** // **Express Polymer Letters.-2019.-V13(3). P.632-641.**

Патенты

1. Пат. 2606843 РФ МПК А61К 9/14 (2006.01), А61К 35/12 (2015.01), А61К 35/407 (2015.01), А61К 47/36 (2006.01), А61К 47/48 (2006.01) Способ получения модифицированных альгинатных микросфер / Агапов И.И., Агапова О.И., Ефимов А.Е., Соколов Д.Ю., **Боброва М.М.**, Сафонова Л.А.; заявитель и патентообладатель: ФГБУ «ФНЦТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава РФ, ООО «СНОТРА».-№ 2015145455; заявл. 22.10.2015; опубл. 10.01.2017. бюл. №1.-с.14.
2. Пат. 2653428 РФ МПК С12М 3/00 (2006.01) Способ получения биodeградируемых скаффолдов на основе тканей из натурального шелка / Агапов И.И., Агапова О.И., Ефимов А.Е., Соколов Д.Ю., **Боброва М.М.**, Сафонова Л.А.; заявитель и патентообладатель: ФГБУ «ФНЦТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава РФ.- №2017108939; заявл. 17.03.2017; опубл. 08.05.2018. бюл. №13.-с. 10.
3. Пат. 2680726 РФ МПК G01Q 60/00 (2010.01), В82У 35/00 (2011.01) Способ исследования трехмерных структур посредством сканирующей оптической зондовой нанотомографии / Агапов И.И., Агапова О.И., Ефимов А.Е., Соколов Д.Ю., **Боброва М.М.**, Сафонова Л.А.; заявитель и патентообладатель: ФГБУ «НМИЦТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава РФ, ООО «СНОТРА».-№2017138865; заявл. 08.11.2017; опубл. 26.02.2019. бюл. №6.-с. 17.
4. Пат. 2683557 РФ МПК С12М 3/00 (2006.01), А61F 2/02 (2006.01) Способ получения биodeградируемых скаффолдов из фиброина шелка с улучшенными биологическими свойствами / Агапов И.И., Агапова О.И., Ефимов А.Е., Соколов Д.Ю., **Боброва М.М.**, Сафонова Л.А.; заявитель и патентообладатель: ФГБУ «НМИЦТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава РФ.-№20171400585; заявл. 22.11.2017; опубл. 28.03.2019. бюл. №10.-с. 7.
5. Пат. 2684769 РФ МПК С12М 3/00 (2006.01), А61F 2/02 (2006.01) Композиция для изготовления биodeградируемых скаффолдов и способ ее получения / Агапов И.И., Агапова О.И., Ефимов А.Е., Соколов Д.Ю., **Боброва М.М.**, Сафонова Л.А.; заявитель и патентообладатель: ФГБУ «НМИЦТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава РФ.-№20171400583; заявл. 22.11.2017; опубл. 12.04.2019. бюл. №11.-с. 9.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

МТТ - бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия

СЭМ - сканирующая электронная микроскопия

СЗНТ - сканирующая зондовая нанотомография

СЗМ - сканирующая зондовая микроскопия

DAPI - 4', 6-диамидино-2-фенилиндол

DMEM - среда Игла, модифицированная по методу Дульбекко