

ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНАЛОГОВ СПИДРОИНОВ КАК БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ МАТРИКСОВ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

DOI: 10.17691/stm2017.9.1.04

УДК 576.535:57.085.23:61-003.93:615.2.001.6

Поступила 16.11.2016 г.



Р.Д. Лапшин, к.б.н., зав. отделом экспериментального моделирования ЦНИЛ¹;
 П.А. Логинов, младший научный сотрудник отдела экспериментального моделирования ЦНИЛ¹;
 И.И. Белоусова, к.б.н., научный сотрудник отдела экспериментального моделирования ЦНИЛ¹;
 Н.В. Жемарина, к.б.н., старший научный сотрудник отдела морфологии ЦНИЛ¹;
 Н.Н. Проданец, к.б.н., старший научный сотрудник отдела морфологии ЦНИЛ¹;
 Т.И. Соловьева, к.б.н., старший научный сотрудник отдела биохимии ЦНИЛ¹;
 Н.А. Щелчкова, к.б.н., зав. отделом молекулярно-клеточных технологий ЦНИЛ¹;
 Л.Б. Снопина, д.б.н., зав. отделом морфологии ЦНИЛ¹;
 И.В. Мухина, д.б.н., профессор, зав. ЦНИЛ¹; зав. кафедрой нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова¹;
 профессор кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины²; руководитель Центра трансляционных технологий²;
 Л.И. Давыдова, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории белковой инженерии³;
 В.Г. Богуш, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории белковой инженерии³

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, 603950, пр. Гагарина, 23;

³Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва, 117545, 1-й Дорожный пр., 1

Цель исследования — изучить токсические параметры (хроническую токсичность, местно-раздражающее и сенсибилизирующее действие) медицинских изделий Гидрогель RS и Микрогель RS, предназначенных для применения в области регенеративной медицины в качестве имплантатов для замещения дефектов мягких и костных тканей, в лечении глубоких ожогов, а также для культивирования клеток *in vitro* при испытании лекарств.

Материалы и методы. Работа выполнена на аутбредных крысах линии Wistar, кроликах породы шиншилла, морских свинок. Проведено изучение хронической токсичности, местно-раздражающего и сенсибилизирующего действия медицинских изделий Гидрогель RS и Микрогель RS (ГосНИИгенетика, Россия) на основе рекомбинантного спидроина при кожном нанесении и внутримышечном введении. При исследовании хронической токсичности регистрировали интегральные, гематологические, биохимические показатели. Местно-раздражающее действие изучалось в патоморфологических исследованиях места введения медицинских изделий. Для изучения сенсибилизации применяли методы максимального сенсибилизирующего воздействия и закрытых кожных аппликаций.

Результаты. Выявлено, что медицинские изделия Гидрогель RS и Микрогель RS являются безвредными средствами при использовании в течение 90 суток, не обладают раздражающим действием при кожном нанесении и внутримышечном введении, не имеют сенсибилизирующих свойств.

Заключение. Медицинские изделия Гидрогель RS и Микрогель RS могут быть рекомендованы для проведения клинических испытаний в качестве имплантатов для замещения дефектов мягких и костных тканей, при лечении глубоких ожогов, а также для культивирования клеток *in vitro* при испытании лекарств.

Ключевые слова: биodeградируемые матриксы; биodeградируемые скаффолды; рекомбинантные спидроины; Гидрогель RS; Микрогель RS.

Как цитировать: Lapshin R.D., Loginov P.A., Belousova I.I., Zhemarina N.V., Prodanets N.N., Solovyova T.I., Stchelchkova N.A., Snopova L.B., Mukhina I.V., Davydova L.I., Bogush V.G. Estimating the safety of using recombinant analogues of spidroins as biodegradable scaffolds for regenerative medicine. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2017; 9(1): 38–43, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.1.04>

Для контактов: Владимир Григорьевич Богуш, e-mail: vlbogush@mail.ru

Estimating the Safety of Using Recombinant Analogues of Spidroins as Biodegradable Scaffolds for Regenerative Medicine

R.D. Lapshin, PhD, Head of Experimental Modeling Department, Central Scientific Research Laboratory¹;
P.A. Loginov, Junior Researcher, Experimental Modeling Department, Central Scientific Research Laboratory¹;
I.I. Belousova, PhD, Researcher, Experimental Modeling Department, Central Scientific Research Laboratory¹;
N.V. Zhemarina, PhD, Senior Researcher, Morphology Department, Central Scientific Research Laboratory¹;
N.N. Prodanets, PhD, Senior Researcher, Morphology Department, Central Scientific Research Laboratory¹;
T.I. Solovyova, PhD, Senior Researcher, Biochemistry Department, Central Scientific Research Laboratory¹;
N.A. Stchelchkova, PhD, Head of Molecular Cellular Technology Unit, Central Scientific Research Laboratory¹;
L.B. Snopova, DSc, Head of Morphology Department, Central Scientific Research Laboratory¹;
I.V. Mukhina, DSc, Professor, Head of Central Scientific Research Laboratory¹; Head of the Department of Normal Physiology named after N.Y. Belenkov¹; Professor, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine²; Head of the Center of Translational Technology²;
L.I. Davydova, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Protein Engineering³;
V.G. Bogush, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Protein Engineering³

¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation;

²Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation;

³State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, 1, 1st Dorozhny proezd, Moscow, 117545, Russian Federation

The aim of the investigation was to study toxic properties (chronic toxicity, local irritant and sensitizing effects) of medical products Hydrogel RS and Microgel RS, intended for use in regenerative medicine as implants for replacing defects of soft and bone tissues, treatment of deep burns and for *in vitro* cell culturing when testing medications.

Materials and Methods. The work was carried out on outbred Wistar rats, Chinchilla rabbits, guinea pigs. There was investigated chronic toxicity, local irritant and sensitizing effects of medical products Hydrogel RS and Microgel RS (GosNIIGenetika, Russia) based on recombinant spidroin (with cutaneous and intramuscular routes of administration). While investigating chronic toxicity, there were recorded integral, hematological, biochemical indices. Local irritation was studied by pathomorphological examination of the areas of medical product introduction. Sensitization was studied using maximization method and closed epicutaneous applications.

Results. Medical products Hydrogel RS and Microgel RS were found to be relatively safe when used during 90 days, they have no irritant effect when introduced epicutaneously and intramuscularly, no sensitizing properties and can be recommended for clinical testing.

Conclusion. Medical products Hydrogel RS and Microgel RS can be recommended for clinical testing as implants for replacing defects of soft and bone tissues, treatment of deep burns and for *in vitro* cell culturing in testing medicines.

Key words: biodegradable matrixes; biodegradable scaffolds; recombinant spidroins; Hydrogel RS; Microgel RS.

Полимерные материалы различной природы находят широкое применение в разных областях: от изготовления предметов бытового назначения до регенеративной медицины (восстановление утраченных тканей и органов организма) [1, 2]. Главная проблема при использовании их в области регенеративной терапии — отсутствие биологически активных материалов, обладающих одновременно всем набором необходимых свойств: биосовместимостью, управляемой биодegradуемостью, пористостью, управляемой прочностью и др.

Один из возможных путей решения этой проблемы — использование рекомбинантных аналогов

белков каркасной нити паутины пауков-кругопрядов — спидроинов, которые кроме выдающихся физико-химических свойств (сочетание высокой прочности и эластичности, устойчивость к высоким и низким температурам, положительный заряд во всем диапазоне физиологических значений pH) обладают также высокой биосовместимостью, медленной биорезорбцией и позволяют направленно действовать на клетки, например включая в их структуру генно-инженерными методами различные биологически активные соединения, в том числе факторы адгезии и роста клеток, дифференцировочные факторы [3, 4]. Эти белки в водной среде способны образовывать различные надмоле-

кулярные структуры — пленки, гидрогели, микрогели, губки с регулируемым размером пор (от нано- до макро-размерных), микрокапсулы и т.д. [5, 6].

Клонированный в ГосНИИгенетике рекомбинантный аналог спидроина 1 — белок 1F9 [7, 8], нарабатываемый путем микробиологического синтеза в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, был использован для изготовления пористых матриц [9], а также гидрогеля и микрогеля, получаемого в результате механического дробления гидрогеля [10], на основе которых были разработаны медицинские изделия Гидрогель RS и Микрогель RS.

Установлено, что на поверхности гидрогеля и микрогеля присутствуют как макропоры диаметром до 500 мкм, так и микропоры диаметром 2–20 мкм, соединенные отверстиями, а в элементах рельефа — как нано-, так и микроструктуры размером соответственно 100–500 нм и 0,5–15 мкм [11], что делает их привлекательными для использования в качестве адгезионных клеточных культур и способствует процессам васкуляризации и иннервации в зоне имплантации.

Нанесение гидрогеля и микрогеля на поверхность ожоговой раны у экспериментальных животных ускоряет заживление по сравнению с традиционными методами лечения. Еще больший эффект наблюдается при подкалывании образцов под поверхность раны [11]. Исследование на мышах с использованием экспериментальной модели полнослойной кожной раны, имитирующей наиболее тяжелые повреждения кожного покрова, показало, что введение суспензии микрогеля интрадермальными инъекциями вокруг раны обеспечивает восстановление собственных тканей в месте кожного поражения, а также стимулирует процессы нейрогенеза и ангиогенеза [12], т.е. инициирует процессы тканеобразования в месте локального повреждения.

Эти результаты свидетельствуют о том, что медицинские изделия Гидрогель RS и Микрогель RS на основе рекомбинантного спидроина являются материалами, потенциально пригодными для использования в области регенеративной медицины, и могут быть наиболее востребованы в лечении глубоких ожогов, в качестве имплантатов для замещения дефектов мягких и костных тканей, а также для культивирования клеток *in vitro* при испытании лекарств.

Цель исследования — изучение токсических параметров (хронической токсичности, местно-раздражающего и сенсибилизирующего действий) медицинских изделий Гидрогель RS и Микрогель RS.

Материалы и методы. Образцы гидрогеля получали из 3% раствора высокоочищенного рекомбинантного спидроина 1F9 [8], а микрогель — путем физического дробления гидрогеля. Для получения медицинских изделий гидрогель и микрогель помещали в шприцы по 1 и 2 мл, стерилизовали методом тиндализации (трехкратное повторение процессов нагревания до 90°C и инкубации при комнатной температуре в течение 20 ч) и упаковывали в блистеры.

Токсикологические исследования медицинских из-

делий Гидрогель RS и Микрогель RS (ГосНИИгенетика, Россия) проводили на животных в соответствии с ГОСТ Р ИСО 10993-2009, чч. 1, 2, 10 и 11 и со Стандартными операционными процедурами исследователя, разработанными в ЦНИЛ НижГМА. Основные правила содержания и ухода соответствовали нормативам, данным в руководстве «Guide for care and use of laboratory animals (ILAR publication, 1996, National Academy Press)», национальном стандарте РФ — ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», в санитарно-эпидемиологических правилах СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденным главным государственным санитарным врачом Российской Федерации от 29 августа 2014 г. №51, зарегистрированных Министерством юстиции Российской Федерации от 31 октября 2014 года, регистрационный №34547, и согласованы с Этическим комитетом НижГМА.

Хроническая токсичность. Эксперименты проведены на 240 аутбредных крысах линии Wistar (120 самок и 120 самцов) массой 195,5±0,5 г, разделенных на следующие группы:

- а) контроль — физиологический раствор на кожу (10 самок + 10 самцов);
- б) контроль — физиологический раствор внутримышечно (10 самок + 10 самцов);
- в) Гидрогель RS/Микрогель RS — 0,5 мл/кг на кожу (10 самок + 10 самцов);
- г) Гидрогель RS/Микрогель RS — 5 мл/кг на кожу (10 самок + 10 самцов);
- д) Гидрогель RS/Микрогель RS — 0,5 мл/кг внутримышечно (10 самок + 10 самцов);
- е) Гидрогель RS/Микрогель RS — 5 мл/кг внутримышечно (10 самок + 10 самцов).

Изделия медицинского назначения Гидрогель RS и Микрогель RS вводили на кожу и внутримышечно однократно. В связи с низкой скоростью резорбции материала изделий наблюдение за ежедневным его воздействием на организм было возможным в течение 90 дней. В период до 90 дней (не более 10% продолжительности жизни крыс) регистрировали изменения интегральных показателей, оценивали неблагоприятный эффект, который возникает после однократного введения исследуемой пробы медицинского изделия, обладающего очень незначительной резорбцией.

Общее состояние животных определяли по проявлениям дыхательной функции, двигательной активности, наличию конвульсий, рефлексов, проводили офтальмоскопию, оценивали пульс, слюноотделение, состояние шерстного покрова, болевую реакцию, мышечный тонус, состояние желудочно-кишечного тракта, кожных покровов. Выполняли взвешивание, учитывали потребление воды и корма.

Кроме интегральных показателей в исходном состоянии и 1 раз в месяц после введения исследуемых изделий регистрировали гематологические

показатели (количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, уровень гемоглобина, СОЭ, лейкоцитарная формула), биохимические показатели и активность ферментов сыворотки крови крыс (общий белок, креатинин, мочевины, глюкоза, холестерин, общие липиды, билирубин общий, активность щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы, аспарат- и аланинаминотрансферазы, кальций, калий, натрий), оценивали функциональное состояние системы выделения по анализу мочи.

Патоморфологическое исследование крыс, проводившееся через 90 дней после введения, включало некропсию, макроскопическое исследование, взвешивание органов с определением массовых коэффициентов, гистологическое исследование.

Местно-раздражающее действие. Патоморфологические исследования места введения препарата проводили на кроликах породы Шиншилла при однократном нанесении ($n=24$) в двух группах для каждого изделия ($n=12$):

- а) контроль — физиологический раствор на кожно (3 самки + 3 самца);
- б) Гидрогель RS/Микрогель RS — 5 мл/кг на кожно (3 самки + 3 самца).

Для вычислений индекса раздражения использовали данные наблюдений, полученные через 24, 48, 72 ч. Индекс первичного раздражения определяли путем суммирования баллов первичного раздражения для каждого животного, вызванного исследуемым материалом, включая отеки и эритемы, в каждый интервал времени наблюдения и деления их на общее число наблюдений (на 6 — по 2 на каждый интервал времени). Для объективности исследований из балла первичного раздражения исследуемого материала вычитали балл первичного раздражения контрольной группы.

Сенсибилизирующее действие. Для исследования гиперчувствительности замедленного типа при использовании медицинских изделий Гидрогель RS и Микрогель RS в соответствии с ГОСТ Р ИСО 10993-10-2009 применяли метод максимального сенсибилизирующего воздействия (GPMT) и метод закрытых кожных аппликаций (Buehler) на морских свинках ($n=30$). Создавали по две группы на каждое изделие ($n=15$) [10]:

- а) контроль — физиологический раствор (5 самцов);
- б) Гидрогель RS/Микрогель RS (10 самцов).

Доза медицинского средства, вводимая внутрикожно в каждый исследуемый участок, составляла 0,1 мл. Для аппликаций пропитывали испытываемой пробой гигроскопичную марлевую подушечку (8 см²), которую прикладывали на выстриженные участки кожи и фиксировали окклюзионной повязкой вокруг тела животного. Через 24 ч снимали повязку и образцы и оценивали состояние опытных участков на наличие эритемы и отека в соответствии с классификацией Magnusson и Kligman.

Через 7 дней после внутрикожной индукционной фазы начинали кожные аппликации исследуемо-

го материала на участки инъекций (на внутрилопаточную область каждого животного), используя для этого пропитанные кусочки марли площадью 8 см². Накладывали окклюзионную повязку. Удаляли повязку через 48±2 ч.

Через 14 дней (±1 день) после завершения местной индукционной фазы провоцировали всех опытных и контрольных животных испытываемыми материалами. Для этого проводили аппликации исследуемого материала на интактные участки кожи бока каждого животного, накладывая гигроскопичную марлевую подушечку на 24 ч. Описывали и оценивали степень кожной реакции, включая эритему и отек (по Magnusson и Kligman), для каждого участка и в каждый интервал времени наблюдения.

Методы статистического анализа данных. Полученные результаты обрабатывали с помощью пакетов прикладных программ Statistica 5.5. Для сравнения выборок ($n=20$) при нормальном распределении совокупностей использовали параметрический *t*-критерий Стьюдента для парных выборок (для зависимых выборок) или непарных выборок (для независимых). В случае значительных отклонений распределения признака от нормального закона, а также при малых объемах выборки ($n \leq 10$) применяли непараметрические критерии: для двух зависимых выборок — критерий Вилкоксона, в случае двух независимых выборок — критерий Манна–Уитни, в случае сравнения более двух групп — критерий Крускалла–Уоллиса. Различия между группами считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Проведенные исследования на белых аутбредных крысах показали, что при однократном нанесении и внутримышечном введении подострых доз 0,5 и 5,0 мл/кг медицинские изделия Гидрогель RS и Микрогель RS являются безвредными веществами. Не наблюдалось гибели животных, не выявлено изменений в их общем состоянии: по проявлениям дыхательной функции, двигательной активности, по наличию конвульсий, рефлексов, по данным офтальмоскопии, оценки пульса, слюноотделения, состояния шерстного покрова, болевой реакции, мышечного тонуса, состояния желудочно-кишечного тракта, кожных покровов оно оставалось в пределах исходных значений. Не обнаружено различия в приросте массы тела у животных с введением исследуемых медицинских изделий и контрольных (табл. 1).

Также не установлено различий в биохимических и морфологических параметрах крови и мочи, массовых коэффициентах органов при однократном нанесении и однократном внутримышечном введении медицинских изделий Гидрогель RS и Микрогель RS в подострых дозах и у животных контрольной группы (табл. 2).

При изучении местно-раздражающего действия в процессе нанесения медицинских изделий Гидрогель RS и Микрогель RS на кожу кроликов раздражающего действия не выявлено. В период наблюдения призна-

Таблица 1

Влияние медицинских изделий Гидрогель RS и Микрогель RS на массу тела в течение 90 сут при однократном кожном нанесении и однократном внутримышечном введении белым аутбредным крысам, г ($M \pm SEM$)

Этап исследования	Контроль		Гидрогель RS		Микрогель RS	
	m (n=10)	f (n=10)	5 мл/кг		5 мл/кг	
<i>Однократное кожное нанесение</i>						
Фоновые показатели	209,30±1,67	199,60±2,16	211,00±2,19	198,00±1,93	209,00±1,89	201,00±2,02
7 сут	227,90±2,30	218,50±0,69	230,90±2,46	217,70±1,43	232,40±1,52	214,10±1,21
14 сут	251,20±1,66	226,30±1,16	253,40±1,51	226,40±1,24	248,40±1,48	227,30±0,70
21 сут	270,00±2,14	236,60±1,19	267,40±1,50	235,30±1,48	271,40±1,81	235,60±1,14
1 мес	288,20±1,58	245,40±0,99	286,00±2,28	246,40±1,39	289,40±2,03	244,90±1,41
2 мес	341,00±2,13	290,00±2,57	341,10±2,17	293,60±3,66	343,30±2,56	292,60±2,61
3 мес	375,40±4,16	328,90±4,14	371,70±2,60	326,30±2,29	375,10±4,04	330,00±3,34
<i>Однократное внутримышечное введение</i>						
Фоновые показатели	207,90±1,92	200,70±1,90	210,00±2,26	200,40±1,87	211,40±1,73	200,60±2,20
7 сут	227,20±1,66	214,80±1,24	226,60±2,13	216,10±1,02	230,40±2,05	215,60±1,32
14 сут	245,80±1,92	224,80±0,71	252,30±1,65	225,30±1,41	246,90±1,83	227,00±0,77
21 сут	265,40±1,71	234,20±0,93	270,70±2,20	236,60±1,39	270,40±2,19	235,10±1,51
1 мес	292,60±2,03	246,50±1,22	287,20±1,96	245,10±1,35	289,60±1,82	248,30±1,10
2 мес	342,10±2,39	290,20±2,81	344,60±2,19	297,00±2,88	343,20±2,80	291,80±2,76
3 мес	377,90±1,93	331,00±1,24	374,60±3,05	331,60±3,74	377,90±2,82	332,00±2,61

Здесь: m — самцы, f — самки.

Таблица 2

Влияние медицинских изделий Гидрогель RS и Микрогель RS на массовые коэффициенты органов через 90 сут после однократного кожного нанесения и однократного внутримышечного введения белым аутбредным крысам ($M \pm SEM$)

Органы	Контроль		Гидрогель RS		Микрогель RS	
	m (n=10)	f (n=10)	5 мл/кг		5 мл/кг	
<i>Однократное кожное нанесение</i>						
Сердце	2,72±0,05	3,08±0,12	2,12±0,09	2,94±0,13	2,58±0,11	2,98±0,07
Легкие	4,82±0,11	5,62±0,13	4,26±0,17	5,50±0,10	4,74±0,14	5,48±0,17
Тимус	0,75±0,01	0,92±0,05	0,72±0,05	0,90±0,05	0,75±0,02	0,97±0,02
Печень	27,67±0,83	30,02±1,31	26,91±1,04	30,15±0,94	27,34±0,85	30,91±0,91
Селезенка	3,08±0,07	3,10±0,10	3,03±0,18	3,20±0,10	2,94±0,15	3,29±0,14
Почки	4,59±0,13	5,33±0,11	4,46±0,09	5,34±0,12	4,68±0,15	5,21±0,12
Надпочечники	0,18±0,01	0,20±0,01	0,17±0,01	0,19±0,01	0,18±0,01	0,21±0,01
Головной мозг	5,21±0,08	5,36±0,09	5,18±0,06	5,30±0,10	5,20±0,10	5,29±0,07
Семенники/Яичники	8,27±0,18	0,53±0,02	7,94±0,44	0,52±0,03	7,93±0,22	0,54±0,02
<i>Однократное внутримышечное введение</i>						
Сердце	2,63±0,09	3,05±0,08	2,62±0,09	3,08±0,16	2,61±0,05	2,99±0,07
Легкие	4,77±0,20	5,13±0,18	4,90±0,14	5,21±0,24	4,61±0,14	5,03±0,12
Тимус	0,78±0,04	0,91±0,05	0,81±0,04	0,94±0,03	0,82±0,03	0,89±0,03
Печень	26,02±1,19	29,69±0,73	27,37±1,18	31,83±1,85	26,69±1,01	29,71±1,05
Селезенка	2,81±0,10	3,10±0,12	2,93±0,09	3,22±0,25	2,76±0,10	3,05±0,09
Почки	4,45±0,06	5,15±0,11	4,40±0,18	5,28±0,22	4,42±0,08	5,17±0,08
Надпочечники	0,17±0,01	0,17±0,01	0,17±0,01	0,19±0,01	0,17±0,01	0,17±0,01
Головной мозг	5,17±0,07	5,20±0,07	5,01±0,12	5,27±0,12	5,03±0,12	5,19±0,09
Семенники/Яичники	8,01±0,14	0,53±0,01	8,04±0,27	0,55±0,02	8,09±0,29	0,52±0,01

ков эритемы, отеков и других признаков раздражения не отмечалось.

В результате проведенных исследований на морских свинках выявлено, что медицинские изделия Гидрогель RS и Микрогель RS не имеют сенсibiliзирующих свойств. В тесте максимального сенсibiliзирующего воздействия после внутрикожной индукционной фазы на опытных участках не зафиксировано никакой кожной реакции, в том числе эритемы и отека, что соответствует 0 баллов по классификации Magnusson и Kligman.

После провокации животных исследуемым материалом после завершения индукционной фазы исследования также не обнаружено никакой кожной реакции, в том числе эритемы и отека, что соответствует 0 баллов по классификации Magnusson и Kligman (табл. 3).

Таким образом, медицинские изделия Гидрогель RS и Микрогель RS при использовании в течение 90 сут являются безвредными средствами по данным оценки интегральных параметров функционального состояния организма крыс (внешний вид, рефлекс, биохимические и морфологические показатели крови и мочи). Они не обладают раздражающим действием при накожном и внутримышечном введении, как показали опыты с кроликами, не обнаруживают сенсibiliзирующих свойств в опытах с морскими свинками.

Заключение. Медицинские изделия Гидрогель RS и Микрогель RS (ГосНИИгенетика, Россия) могут быть рекомендованы для проведения клинических испытаний в качестве имплантатов для замещения дефектов мягких и костных тканей, при лечении глубоких ожогов, а также для культивирования клеток *in vitro* при испытании лекарств.

Финансирование исследования. Работа поддержана Минобрнауки РФ (соглашение о предоставлении субсидии №14.579.21.0017 от 05.06.2014 г., уникальный идентификатор ПНИ — RFMEFI57914X0017).

Конфликт интересов отсутствует.

Литература/References

1. Girotti A., Orbanic D., Ibáñez-Fonseca A., Gonzalez-Obeso C., Rodríguez-Cabello J.C. Recombinant technology in the development of materials and systems for soft-tissue repair. *Adv Healthc Mater* 2015; 4(16): 2423–2455, <https://doi.org/10.1002/adhm.201500152>.
2. Carletti E., Motta A., Migliaresi C. Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture. *Methods Mol Biol* 2011; 695: 17–39, https://doi.org/10.1007/978-1-60761-984-0_2.
3. Kluge J.A., Rabotyagova O., Leisk G.G., Kaplan D.L. Spider silks and their applications. *Trends Biotechnol* 2008; 26(5): 244–251, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.02.006>.
4. Spiess K., Lammel A., Scheibel T. Recombinant spider silk proteins for applications in biomaterials. *Macromol Biosci* 2010; 10(9): 998–1007, <https://doi.org/10.1002/mabi.201000071>.
5. Schacht K., Jüngst T., Schweinlin M., Ewald A., Groll J., Scheibel T. Biofabrication of cell-loaded 3D spider silk

Т а б л и ц а 3

Результаты теста по изучению максимального сенсibiliзирующего воздействия медицинских изделий Гидрогель RS и Микрогель RS при использовании их на морских свинках, в баллах

Количество баллов	Контроль	Гидрогель RS	Микрогель RS
Внутрикожная индукционная фаза	0	0	0
Провокационная фаза	0	0	0

П р и м е ч а н и е. Интервал времени наблюдения — 24 ч.

constructs. *Angew Chem Int Ed Engl* 2015; 54(9): 2816–2820, <https://doi.org/10.1002/anie.201409846>.

6. Humenik M., Smith A.M., Scheibel T. Recombinant spider silks — biopolymers with potential for future applications. *Polymers* 2011; 3(4): 640–661, <https://doi.org/10.3390/polym3010640>.

7. Bogush V.G., Sokolova O.S., Davydova L.I., Klinov D.V., Sidoruk K.V., Esipova N.G., Neretina T.V., Orchanskiy I.A., Makeev V.Y., Tumanyan V.G., Shaitan K.V., Debabov V.G., Kirpichnikov M.P. A novel model system for design of biomaterials based on recombinant analogs of spider silk proteins. *J Neuroimmune Pharmacol* 2008; 4(1): 17–27, <https://doi.org/10.1007/s11481-008-9129-z>.

8. Bogush V.G., Davydova L.I., Moisenovich M.M., Sidoruk K.V., Arkhipova A.Yu., Kozlov D.G., Agapov I.I., Kirpichnikov M.P., Debabov V.G. Characterization of biodegradable cell micro and macro carriers based on recombinant spidroin. *Appl Biochem Microbiol* 2014; 50(8): 780–788, <https://doi.org/10.1134/s000368381408002x>.

9. Moisenovich M.M., Pustovalova O., Shackelford J., Vasiljeva T.V., Druzhinina T.V., Kamenchuk Y.A., Guzeev V.V., Sokolova O.S., Bogush V.G., Debabov V.G., Kirpichnikov M.P., Agapov I.I. Tissue regeneration in vivo within recombinant spidroin 1 scaffolds. *Biomaterials* 2012; 33(15): 3887–3898, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.02.013>.

10. ГОСТ Р ИСО 10993-10-2009. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 10. Исследования раздражающего и сенсibiliзирующего действия. М: Стандартиформ; 2010. *GOST R ISO 10993-10-2009. Izdeliya meditsinskikh izdeliy. Chast' 10. Issledovaniya razdrzhayushchego i sensibiliziruyushchego deystviya* [GOST R ISO 10993-10-2009. Medical devices. Biological evaluation of medical devices. Part 10. Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity]. Moscow: Standartinform; 2010.

11. Moisenovich M.M., Malyuchenko N.V., Arkhipova A.Y., Kotlyarova M.S., Davydova L.I., Goncharenko A.V., Agapova O.I., Drutskaya M.S., Bogush V.G., Agapov I.I., Debabov V.G., Kirpichnikov M.P. Novel 3D-microcarriers from recombinant spidroin for regenerative medicine. *Dokl Biochem Biophys* 2015; 463(1): 232–235, <https://doi.org/10.1134/s1607672915040109>.

12. Moisenovich M.M., Malyuchenko N.V., Arkhipova A.Y., Goncharenko A.V., Kotlyarova M.S., Davydova L.I., Vasil'eva T.V., Bogush V.G., Agapov I.I., Debabov V.G., Kirpichnikov M.P. Recombinant 1F9 spidroin microgels for murine full-thickness wound repairing. *Dokl Biochem Biophys* 2016; 466(1): 9–12, <https://doi.org/10.1134/s1607672916010038>.