

УДК 606: 677.37

<https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-2-33-54>

Возможности биотехнологической платформы тутового шелкопряда (*B. mori*) для регенеративной медицины

Е.Н. Юматов^{1,2}, Е.Г. Евлагина², В.Г. Евлагин², Е.Ф. Лейнвебер², Д.В. Товпеко³,
С.С. Дебенек³

¹ Индивидуальный предприниматель Юматов Е.Н., г. Самара, Россия

² Научно-исследовательская станция шелководства — филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр», Ставропольский край, г. Железноводск, Россия

³ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова», г. Санкт-Петербург, Россия

Адрес для корреспонденции: trast1207@mail.ru

Аннотация

Регенеративная медицина, стремящаяся изменить современную медицинскую практику путем устранения коренных причин болезней и расстройств, включает генную терапию, клеточную терапию и продукты тканевой инженерии, предназначенные для увеличения, восстановления, замены или регенерации органов, тканей, клеток, генов и метаболических процессов в организме. Биоматериалы — один из ключевых компонентов регенеративной медицины, на которых базируются успешные стратегии.

Представлен обзор биотехнологических методов, применяемых на этапах восходящего (USP) и нисходящего (DSP) процессов с использованием тутового шелкопряда (*B. mori*), направленных на улучшение качественных характеристик и получение новых видов биоматериалов для удовлетворения потребностей регенеративной медицины и биомедицины. Разнообразие биотехнологических решений, позволяющих получить широкий спектр биоматериалов: производные оболочки кокона — фиброин, серицин и их композиты, рекомбинантные производные, антимикробные пептиды, модифицированные трансгенные шелковые волокна, трансгенные волокна, содержащие факторы роста и пептиды и др., — в совокупности представляет уникальный базис для создания биоиндустриальной платформы на основе тутового шелкопряда.

Ключевые слова: тутовый шелкопряд, биоматериалы, рекомбинантные белки, антимикробные пептиды, фиброин, серицин, трансгенные шелковые волокна, биотехнологическая платформа

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Юматов Е.Н., Евлагина Е.Г., Евлагин В.Г., Лейнвебер Е.Ф., Товпеко Д.В., Дебенек С.С. Возможности биотехнологической платформы тутового шелкопряда (*B. mori*) для регенеративной медицины. *Регенерация органов и тканей*. 2023;1(2):33–54. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-2-33-54>

Поступила 11.12.2023

Обработана 19.12.2023

Принята к публикации 26.12.2023

Possibilities of *Bombyx mori* (*B. mori*) biotechnological platform for regenerative medicine

Evgeniy N. Yumatov^{1, 2}, Elena G. Evlagina, Viktor G. Evlagin², Evdokia F. Leinweber²,
Dmitry V. Tovpeko³, Semyon S. Debenok³

¹ Individual entrepreneur, Samara, Russia

² Sericulture Research Station — branch of the North Caucasus Federal Scientific Agrarian Center, Stavropol Region, Zheleznovodsk, Russia

³ Research Department (medical and biological research) of the Research Center of the Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russia

Correspondence address: trast1207@mail.ru

Abstract

Regenerative medicine aims at changing modern medicine practice by eliminating core reasons of diseases and disorders. Regenerative medicine includes gene therapy, cell therapy and products of tissue engineering that are destined for augmentation, regeneration or replacement of organs, tissues, genes and metabolic processes in the organism. Biomaterials are amongst key components of regenerative medicine on which successful strategies are based.

The review of biotechnological methods implemented in the USP and DSP stages with the use of *B. mori* was made. The methods analysed are aimed at improving quality characteristics and obtaining new kinds of biomaterials to meet the needs of regenerative medicine and biomedicine. The diversity of biotechnological solutions that allow to gain a wide spectrum of biomaterials (incl. derivatives of cocoon shell such as fibroin, sericin and their composites; recombinant derivatives; antimicrobial peptides; modified transgenic silk fibres; transgenic fibres that contain growth factors and peptides; etc.) is a unique basis for the bioindustrial platform on the *B. mori* basis.

Keywords: silkworm, biomaterials, recombinant proteins, antimicrobial peptides, fibroin, sericin, transgenic silk fibers, biotechnological platform

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Yumatov E.N., Evlagina E.G., Evlagin V.G., Leinweber E.F., Tovpeko D.V., Debenok S.S. Opportunities of the silkworm (*B. mori*) biotechnological platform for regenerative medicine. *Tissue and organ regeneration*. 2023;1(2):33–54. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-2-33-54>

Received 11.12.2023

Revised 19.12.2023

Accepted 26.12.2023

1. Введение

В качестве биополимера, одобренного FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, США), шелк рассматривается для широкого спектра применений, в том числе как многообещающий материал в регенеративной медицине, благодаря своей повышенной био/цитосовместимости, химической стабильности, механическим свойствам, технологичности, возможности контролируемого биоразложения, универсальности функционализации. Шелк как в кристалличе-

ской структуре, так и в аморфном состоянии, демонстрируя уникальные физические и биологические свойства, способствует миграции клеток, дифференциации, росту и взаимодействию белков с поверхностью. Возможность производить современные медицинские инструменты, такие как пленки, волокна, гидрогели, трехмерные пористые каркасы, нетканые каркасы, частицы или композиционные материалы, из необработанного водного раствора подчеркивает универсальность фиброина шелка (SF). Такие устройства способны удовлетворить самые разнообразные

потребности тканей; следовательно, они представляют собой инновационное клиническое решение для лечения костей/хрящей, сердечно-сосудистой системы, регенерации нервной, кожной и поджелудочной тканей, а также для многих других биомедицинских применений [1–3].

Издание Elsevier, учитывая значение шелка для тканевой инженерии и регенеративной медицины, представило уже второе издание — обязательный справочник, в котором всесторонне освещаются биоматериалы на его основе и их использование в биомедицине [4].

Биосовместимость и иммунологический ответ протеинов шелка (в основном фиброина) исследованы A. Thurber и соавт. еще в 2015 году. Представляя обзор биологических реакций на протеины шелка, они отмечали, что использование шелка в качестве биоматериала, помимо его роли шовного материала, изучается уже более десяти лет и благодаря обширным характеристикам *in vitro*, а в последнее время и исследованиям *in vivo* потенциально может стать стандартным клиническим лечением для многочисленных применений [5]. В отношении второго протеина шелка — серицина некоторое время существовало алогичное мнение о его спорной биобезопасности, но это недоразумение относительно серицина, якобы вызывающего неблагоприятные биологические реакции, было прояснено путем тщательного анализа соответствующей литературы и экспериментальной демонстрации того, что серицин вызывает легкие воспалительные реакции, незначительную аллергенность и низкую иммуногенность *in vivo*. Серицин является биобезопасным как природный биоматериал [6]. В последующих исследованиях было подтверждено, что серицин является биосовместимым материалом, не вызывающим тяжелых иммунных реакций, и является многообещающим устойчивым биоматериалом для биомедицинских и фармацевтических применений [7, 8].

Помимо биоматериалов, получаемых из оболочки кокона, тутовый шелкопряд используется в качестве продуцента рекомбинантных производных биоматериалов. Многие рекомбинантные белки были успешно получены в личинках или куколках тутового шелкопряда и использованы в академических и промышленных целях. Биотехнология шелкопряда представляет собой инновационный и простой подход к достижению высоких уровней экспрессии белка и явля-

ется очень многообещающей платформенной технологией в области наук о жизни [9].

Как представленные выше обзоры, так и обзоры, посвященные использованию фиброина шелка как функционального материала для доставки лекарств и генов [10], созданию гибкой электроники на основе фиброина [11], и многие другие великолепные статьи российских и зарубежных исследователей концентрируются на методах переработки оболочки кокона для получения фиброина и серицина шелка, и последующего преобразования, преобразовании в различные формы: гидрогели, губки, пленки, микро- и наносферы, аэрогели и др. и сферах применения производных продуктов, полученных на этапе DSP, то есть продуктов из готового сырья — оболочки кокона тутового шелкопряда в основном в части биополимеров. Биотехнологические возможности, позволяющие улучшать качественные характеристики сырья и получать другие биоматериалы на этапе USP, такие как рекомбинантные производные, материалы с улучшенными качественными характеристиками, менее освещены или представлены как отдельные публикации.

Таким образом, мы предпринимаем попытку представить краткий комплексный обзор исследовательских данных о совокупности основных биотехнологических решений с использованием тутового шелкопряда, которые позволяют, используя подходы снизу вверх в процессе выращивания тутового шелкопряда (восходящий процесс) и подходы сверху вниз, применяемые при переработке полученного сырья (нисходящий процесс), получить широкий спектр биоматериалов, необходимых для решения задач регенеративной медицины и биомедицины. Учитывая многообразие вариантов последующих преобразований в различные формы конечных продуктов и широкого спектра композиционных материалов в нисходящем процессе, уже показанное существующими многочисленными актуальными публикациями, представляемый обзор ограничивается описанием биотехнологических решений восходящего процесса и базовыми формами: фиброина, серицина, композитов фиброина и серицина, в нисходящем процессе.

2. Биотехнологии и биоматериалы этапа USP

В данном разделе освещены методы снизу вверх, реализуемые с целью улучшения качественных характеристик протеинов шелка и продуцирования рекомбинантных продуктов.

2.1. Молекулярная инженерия *B. mori*

Молекулярная инженерия *B. mori*, основанная на методах транзientной экспрессии, или стабильной трансформации зародышевой линии, позволяет получать различные биоматериалы.

Каждая система экспрессии, используемая для получения рекомбинантных производных, имеет свои преимущества и ограничения, на основании которых ее можно рассматривать или отвергать для производства конкретного белка. Поэтому очень важно изучить потенциал и ограничения нескольких систем экспрессии, чтобы выбрать подходящую для производства конкретного белка в промышленном масштабе. Критерии оптимизации системы экспрессии оцениваются по нескольким факторам, таким как продуктивность, эффективность, физиологические характеристики, общая стоимость, безопасность, удобство и условия последующей обработки [12].

Среди доступных систем экспрессии для получения рекомбинантных белков, как отмечал Т. Kato и соавт. (2010), системы клеток насекомых популярны и широко используются для производства белков из высших эукариот, поскольку клетки насекомых имеют сходную структуру и способность к котрансляционным и посттрансляционным модификациям, как и клетки млекопитающих, включая гликозилирование, фосфорилирование и процессинг белков. Клеточные системы насекомых включают систему экспрессии бакуловируса и стабильно трансформированную клеточную систему. В системе экспрессии бакуловируса для продукции белка можно использовать не только культивируемые клетки, но также личинки и куколки насекомых [9].

Сравнительную эффективность различных систем экспрессии, в рамках данной работы возможно частично продемонстрировать, представив данные по выходу конечного продукта. Так, например, при сравнении систем экспрессии рекомбинантного белка в бакуловирусной системе в клетках насекомых (Sf9) и тутового шелкопряда, А Usami и соавт. (2011) отмечали, что производство шелкопряда было более эффективным: один тутовый шелкопряд производил примерно в 70 раз больше белка, чем 10^6 клеток Sf9 в 2 мл культуральной среды [13]. В исследовании, представленном S. Minagawa и соавт. (2020), производство рекомбинантного

фибриногена (rFib) в трансгенной системе тутового шелкопряда составляло 20 мг на 1 г коконов (масса одного кокона — 28,4 мг) [14], а показатель высокоуровневой экспрессии рекомбинантного фибриногена человека с использованием клеток CHO DG44 за счет оптимизации системы экспрессии и условий культивирования составил 1,3 г/л и выше [15]. Для рекомбинантного человеческого кислого фактора роста фибробластов при использовании транзientной системы экспрессии тутового шелкопряда уровни экспрессии оценивались примерно в 600–700 мкг на личинку (вес зрелой личинки находится в диапазоне ~4,3–4,9 г. — Прим. авторов) [16], а в исследованиях по крупномасштабному получению высокостабильного рекомбинантного человеческого кислого фактора роста фибробластов в штамме *Escherichia coli*, представленных В. Yu и соавт. (2021), конечный выход чистого белка в культуре составил $158,6 \pm 6,8$ мг/л [17].

2.2. Факторы роста

Системы экспрессии *B. mori* успешно используются для производства различных рекомбинантных факторов роста, роль которых для регенеративной медицины важна так же, как и роль клеток и каркаса. В регенерации искусственных тканей должна быть установлена «треугольная» (триединая) связь между клетками, матрицами и факторами роста [18]. Ранее М. Супотницкий и соавт. (2015), рассматривая основные технологические процессы, используемые при производстве биомедицинских клеточных продуктов, выделяли в том числе принципы подбора питательной среды для выращивания мезенхимальных стволовых/стромальных клеток (МСК) для терапевтического применения, которые основываются на следующих принципах [19].

1. Питательная среда должна представлять собой «коктейль» из минеральных веществ, аминокислот, витаминов и не должна включать ксеногенные материалы, например сыворотку эмбрионов крупного рогатого скота (FCS) или бычий сывороточный альбумин (BSA), так как существует риск инфицирования культивируемых клеток возбудителями инфекционных болезней животных и последующей их передачи человеку.

2. В составе питательной среды должны быть факторы, ускоряющие рост МСК без изменения их дифференцировки. Например, добавление

в среду ростового фактора тромбоцитов (PDGF) и основного фактора роста фибробластов (bFGF) позволяет сократить цикл культивирования МСК с 4–6 нед. до 2–3 нед.

3. Наличие неохарактеризованных примесей биологически активных веществ способно повлиять на дифференцировку клеток. Например, ростовой фактор тромбоцитов, полученный из лизатов тромбоцитов (PL), сдвигает направление дифференцировки МСК костного мозга в сторону формирования остеобластов. Поэтому факторы роста должны быть получены генно-инженерным путем [20].

Факторы необходимо защищать и тщательно доставлять, поскольку они чувствительны к протеолитической деградации. Из-за их нестабильности при высоких температурах и измененных физиологических условиях используются новые подходы к контролируемому высвобождению факторов роста для повышения их терапевтической эффективности [21]. В связи с этим необходимо отметить, что производные протеины шелка, например в виде гидрогеля, могут служить в том числе и для доставки различных факторов. В частности, для улучшения регенерации ткани суставного хряща была разработана полуразлагаемая гидрогелевая система SF-PEGDMA (фиброин шелка и диметакрилат полиэтиленгликоля — PEGDMA) с помощью механизма физического и фотосшивания для хондрогенеза. Система содержала наночастицы PLGA, нагруженные трансформирующим фактором роста (TGF)- β 1, стволовыми клетками пульпы зуба и основным фактором роста фибробластов (bFGF). Эта двойная система доставки способствовала жизнеспособности клеток, пролиферации и хондрогенной дифференцировке в месте дефекта с образованием хрящеподобной структуры [22].

2.3. Вакцины на основе функциональных вирусоподобных частиц

Помимо рекомбинантных факторов роста, в системах экспрессии тутового шелкопряда возможно получение вирусоподобных частиц (VLP), выступающих в качестве альтернативы вакцинам, которые не обладают способностью к репликации, не имеют вредных эффектов и не являются патогенными. VLP использовались в качестве вакцин благодаря их способности стимулировать сильные клеточные и гуморальные реакции в качестве прямых иммуноге-

нов [23]. Они аналогичным образом имитируют структуру нативных вирусов. Следовательно, они могут усиливать выработку нейтрализующих антител против вирусов, представляя собой безопасную альтернативу вакцинам с аттенуированными живыми вирусами [24].

2.4. Рекомбинантный шелк паука

Нити из паучьего шелка обладают исключительными механическими свойствами, такими как прочность, эластичность и низкая плотность, которые достигают максимальных значений по сравнению с другими волокнистыми материалами. Эти свойства делают их привлекательными для разработки инновационных материалов для медицинской или технической продукции, а также косметики. Однако при выращивании пауков не удается достичь больших объемов шелка из-за каннибалистического поведения этих животных. Чтобы получить белки паучьего шелка (спидроины) в больших масштабах, предпринимаются попытки рекомбинантного производства в различных системах экспрессии, таких как растения, бактерии, дрожжи, насекомые, тутовые шелкопряды, клетки млекопитающих и животные [25]. Значимым событием в этом контексте и в области молекулярной инженерии тутового шелкопряда является фундаментальная работа в области получения высокопрочных цельных волокон паучьего шелка с использованием трансгенных тутовых шелкопрядов. J. Mi и соавт. (2023) применили редактирование генов с помощью технологии редактирования генов (CRISPR/Cas9), чтобы успешно синтезировать цельные полиамидные волокна паучьего шелка из трансгенных тутовых шелкопрядов [26].

2.5. Другие значимые рекомбинантные биоматериалы

К категории данных материалов возможно отнести биоматериалы, также получаемые с помощью методов молекулярной инженерии, такие как рекомбинантные человеческие: фибриноген (rFib), лактоферрин (hLF), фибронектин (rhFN), рекомбинантные белки E-selectin, проколлаген III типа, коллаген I и II типа, а также бифункциональные и модифицированные шелковые материалы, в том числе материалы с включенными синтетическими аминокислотами и волокна шелка, обогащенные антимикробными пептидами. Сводные данные по рекомбинантным и другим производным продуктам представлены в таблице 1.

Таблица 1. Биоматериалы, полученные с использованием методов молекулярной инженерии *B. mori*

Производные биоматериалы	Характеристики и преимущества
Факторы роста, получаемые с помощью методов транзientной (вирусной) экспрессии	
Костный морфогенетический белок-2 (rhBMP-2) [27]	Является широко используемым фактором роста при регенерации костей благодаря его высокой активности и способности индуцировать остеогенную дифференцировку остеобластов и предшественников остеобластов [28]
Кислый фактор роста фибробластов (aFGF) [29]	Играет важную роль в восстановлении повреждений и ремоделировании взрослых тканей в дополнение к эмбриональному развитию и регуляции метаболического гомеостаза [30]
Основной фактор роста фибробластов (bFGF) [29, 31]	Обычно используется для регенерации тканей и в качестве важного компонента в культуральных средах для поддержания индуцированных плюрипотентных стволовых (iPS) клеток и эмбриональных стволовых (ES) клеток в недифференцированном состоянии [31]
Двойной фактор роста стволовых клеток (rdhSCF) [32]	Способствует выживанию, пролиферации и дифференцировке гемопоэтических клеток [32]
Морфогенетический белок 4 кости человека (BMP4) [33]	Представляют собой цитокины с сильной способностью к образованию новой костной ткани [34]
Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (hGM-CSF) [35]	Широко используемый в качестве терапевтического средства, направленного на нейтропению, у онкологических больных, проходящих химиотерапию, а также у пациентов со СПИДом или после трансплантации костного мозга [35]
Факторы роста, получаемые с помощью стабильной трансформации зародышевой линии (трансгенные шелкопряды)	
Кислый фактор роста фибробластов (haFGF) [36]	Действует как сильный митоген, стимулируя пролиферацию многих типов клеток мезодермального, энтодермального и нейроэктодермального происхождения, и, соответственно, считается, что он играет важную роль в регуляции ангиогенеза и неоваскуляризации во время развития и заживления ран [37]
Фактор роста фибробластов-7 (FGF-7) [38]	Индуктировал пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов в 3D-культуре, способствуя образованию многослойного эпидермиса, экспрессирующего белки-маркеры положительной дифференцировки [38]
Эпидермальный фактор роста (hEGF) [39]	Может существенно способствовать пролиферации эмбриональных клеток, клеток кожи, эндотелиальных клеток и фибробластов, привлекает все большее внимание в области лечения язв и заживления кожных ран [40]
Нейротрофический фактор (нейротрофин-4 – NT-4) [41]	Играет важную роль в поддержании выживания нервных клеток, регуляции дифференцировки и апоптоза нейронов и содействии восстановлению повреждений нервов [41]
Фактор роста тромбоцитов человека (PDGF) [42]	Анализ биологической активности показали, что очищенный рекомбинантный PDGF-BB способен значительно стимулировать рост, пролиферацию и миграцию клеток линии эмбриональных фибробластов мыши (NIH/3T3). Является основным терапевтическим белком, пользующимся большим спросом в клинических условиях (в качестве эффективного митогена и ранозаживляющего агента) [42]
Другие значимые рекомбинантные биоматериалы	
Рекомбинантный фибриноген (rFib) [43]	Фибриноген из крови человека используется в качестве основного компонента коагулянтов, в том числе хирургических тканевых герметиков. Ожидается, что разработка рекомбинантного человеческого фибриногена (rFib) устранил риски инфекций, передающихся через кровь [43]
Рекомбинантный лактоферрин (hLF) [44]	Множественный биофункциональный белок, регулирующий иммунный ответ и, таким образом, имеющий большие перспективы для облегчения иммуносупрессии, вызванной химиотерапией [44]

Продолжение таблицы 1

Производные биоматериалы	Характеристики и преимущества
Рекомбинантные белки E-selectin [45]	Играют ключевую роль в обеспечении взаимодействий, участвующих в клеточной адгезии и миграции, а также в основных процессах, таких как иммунные реакции, метастазирование и трансплантация [45]
Рекомбинантные фибронектины человека: фибронектин Neosilk®, плазма, и фибронектин Neosilk®, клеточный [46]	Является важным белком внеклеточного матрикса и широко используется в качестве каркаса для клеточной культуры, но коммерчески доступные фибронектины обычно получают из крови, что несет в себе риск заражения патогенами и изменчивости от партии к партии [46]
Рекомбинантный проколлаген III типа [47], рекомбинантный коллаген типа II [48], рекомбинантный коллаген типа I [49]	Рекомбинантные коллагены потенциально могут быть использованы в качестве белковозаместительной терапии у пациентов, страдающих генетическими нарушениями, вызванными мутациями в генах коллагена [50]
Вакцины на основе функциональных вирусоподобных частиц	
Рекомбинантная белковая вакцина VP1 норовируса человека, а также белок S коронавируса SARS-2 [51]	Рекомбинантные белковые вакцины с использованием тутового шелкопряда, который имеет преимущество в производстве таких трудноэкспрессируемых вакцинных антигенов, особенно вирусоподобных частиц [51]
Поверхностный белок Plasmodium vivax ookinete (Pvs25) [52]	Кандидат на вакцину, блокирующую передачу вируса (TBV) малярии [52]
Вакцина против гриппа на основе VLP (продуцирование в куколках шелкопряда <i>Eri*</i>) [53]	Вакцина HA VLP против птичьего гриппа (подтип H5) [53]
Вакцина против гриппа на основе VLP (продуцирование в куколках шелкопряда <i>Eri</i> [54]	Продemonстрировала успешную широкую защитную активность против вируса гриппа A [54]
Бифункциональные шелковые материалы	
Бифункциональный шелк, полученный путем совместной экспрессии генов основного фактора роста фибробластов человека (FGF2) и трансформирующего фактора роста-β1 (TGF_β1) у тутового шелкопряда [55]	Улучшенная клеточная пролиферация и противовоспалительная активность [55]
Оболочки кокона с включенным фактором роста фибробластов-7 (FGF-7) [56]	Требуют простых процессов при переработке (лиофилизация и распыление). Успешно использованы для индукции пролиферации и миграции кератиноцитов. Более того, FGF-7, включенный в оболочку кокона, после переработки продемонстрировал замечательную стабильность: более 70% биологической активности сохранялось после хранения в виде суспензии при 25 °C в течение 3 месяцев [56]
Модифицированные протеины шелка	
Трансгенные шелкопряды с дефицитом фиброина [57, 58]	Упрощение методов экстракции и очистки протеинов шелка. Потенциальное использование в тканевой инженерии [57, 58]
Трансгенные шелкопряды, продуцирующие коконы, состоящие исключительно из фиброина [59]	Отсутствие необходимости удаления серицина (дегумирование). Потенциальное использование во всех сферах регенеративной и биомедицины [59]
Волокно, с микросомами серицина, диспергированными в фиброиновых фибриллах [60]	Повышаются водорастворимость и устойчивость фиброин-коллоида в железистой полости шелка, кристалличность, а также улучшаются механические свойства волокон кокона, влагопоглощение и влагоотделение шелка [60]
Включение синтетических аминокислот	
Трансгенные шелкопряды, продуцирующие азидофункционализированное шелковое волокно (AzPhe или AzidoSilk) [61]	Включение синтетических аминокислот, несущих азидогруппы, придает волокнам новые функциональные возможности, таким образом позволяя создавать высокоэффективные биоматериалы, потенциально востребованные в здравоохранении и медицине [61]

Продолжение таблицы 1

Производные биоматериалы	Характеристики и преимущества
Волокна шелка, обогащенные антимикробными пептидами	
Трансгенная линия шелкопряда, способных сверхэкспрессировать антимикробные пептиды цекропина В или морицина [62]	Полученные коконы характеризовались повышенными антимикробными свойствами, а полученное шелковое волокно было способно ингибировать рост бактерий грамотрицательной <i>Escherichia coli</i> [62]. Антимикробные пептиды – основные эффекторы врожденного иммунитета [63]
Рекомбинантный шелк паука	
Высокопрочные цельные волокна паучьего шелка с использованием трансгенных шелкопряда [64]	Волокна продемонстрировали впечатляющую прочность на разрыв 1299 Мпа и ударную вязкость 319 МДж/м ³ [64]

Примечание: Порода тутового шелкопряда *Eri* использовалась в силу преимущественных морфологических характеристик по отношению к японским породам тутового шелкопряда.

2.6. Модификации протеинов шелка с использованием методов, нацеленных на улучшение механических характеристик

Рассматриваемые в данном разделе методы направлены на улучшение в том числе одной из важнейших качественных характеристик биополимеров — механических свойств. Вкратце, для эффективности имплантата важны достаточные механические свойства биоматериала, который будет использоваться в тканевой инженерии. Такие факторы, как эластичность, прочность и абсорбция на границе раздела материалов и их деградация, зависят от биостабильности каркасов и имеют важное значение. В общем, биополимерные каркасы должны иметь механические свойства, соответствующие месту имплантации, и должны иметь прочность, необходимую для любой имплантации, требующей хирургической процедуры [65]. Механические характеристики каркаса зависят от материала и процесса производства, который влияет на структурные параметры, такие как геометрия, размер и форма пор [66, 67]. Свойства каркаса выбираются в соответствии с необходимым применением. Чтобы сохранить свою структурную целостность, каркасы также должны быть способны противостоять нагрузкам окружающей среды, возникающим во время эксплуатации. Кроме того, важно сбалансировать предельную прочность и соответствие окружающим тканям при построении каркасов для несущих нагрузок, например в костной тканевой инженерии. Таким образом, каркас должен иметь механические характеристики, аналогичные кости [68, 69].

Механические характеристики полимерного каркаса тесно зависят от молекулярной массы

и кристаллических свойств полимера, которые также влияют на скорость и механизм деградации [70]. D. Kochhar и соавт. (2021) представили обзор по материалобологии шелка, который обладает уникальными механическими свойствами, секвестрацией биоактивных компонентов, способностью к разложению, четко определенной архитектуре и биосовместимости, которые могут регулировать пространственно-временные биохимические и биофизические реакции [71]. Кроме того, механические свойства внеклеточной среды (ECM) тесно связаны с поведением клеток. Эти механические сигналы могут передаваться трансмембранными рецепторами, цитоскелетом или ядерным скелетом, регулируя таким образом экспрессию генов. Было показано, что эластичность матрикса участвует в выживании, пролиферации и дифференцировке клеток [72, 73]. Подходящие механические свойства ECM имеют решающее значение для гомеостаза клетки или ткани. За исключением костей, большинство тканей человека мягкие, о чем свидетельствуют значения модулей сжатия (модулей Юнга) от 1 до 200 кПа [74–76].

Хорошо известно, что многие варианты преобразований нативных форм природных биополимеров белковой природы как в процессе первичной переработки, так и на этапах последующих преобразований в различные формы влекут изменение структурных характеристик и механических характеристик. Интактная форма производных протеинов шелка при первичной переработке имеет отличные от сырья характеристики (подробнее — таблица 1. Механические свойства некоторых полимерных материалов, D. Wang и соавт., (2017)) [77].

Некоторые методы, используемые для улучшения механических характеристик протеинов шелка, представлены в таблице 2.

3. Биотехнологии и биоматериалы этапа DSP

В нисходящем процессе основные биотехнологические решения направлены: на переработку сырья — оболочку кокона, с целью получения различных форм производных продуктов; выделение и очистку рекомбинантных производных, если целевым продуктом являлись рекомбинантные белки и вирусоподобные частицы.

3.1. Методы выделения и очистки рекомбинантных белков

Исходя из места продуцирования рекомбинантных производных: в гемолимфе, жировом теле тутового шелкопряда, в оболочке кокона или в куколке, используются различные варианты экстракции и выделения. В частности (или вкратце), R. Minkner и соавт. (2020) пред-

ставили системный вариант по эффективной очистке рекомбинантного белка из гемолимфы личинок тутового шелкопряда, позиционируемый в качестве первого протокола, позволяющего масштабировать его и для промышленного использования [88]. Варианты очистки и рефолдинга для рекомбинантного haFGF, экспрессированного в коконах трансгенного шелкопряда, представлены F. Wang и соавт. (2015) [36]. Магнитные наночастицы (MNPs) были исследованы как подходящий инструмент для очистки белков из сложного матрикса жирового тела тутового шелкопряда [89]. H. Yagi и соавт. (2020), представляя метод экспрессии меченных изотопами гликопротеинов куколками тутового шелкопряда, описали в том числе и метод экспрессии и очистки рекомбинантного IgG (подробное описание — раздел 2.2) [90]. Вариант очистки вирусоподобных частиц VP1-VLP норовируса — T. Kusakabe (2023) (подробнее — раздел 2.5) [51].

Таблица 2. Модификации, направленные на улучшение механических характеристик биоматериалов протеинов шелка

Методы	Характеристики и преимущества
Методы, основанные на ограничении внешнего пространства при завивке кокона [78, 79]	Модифицированные коконы по сравнению с обычными коконами показали прочность на разрыв и модуль Юнга увеличенные на 44 и 100% соответственно. Термические и механические свойства значительно улучшаются. Имеет потенциальное применение в производстве высокоэффективных композитов и биомиметических материалов [78, 79]
Шелк сухого прядения (завивка кокона проводится при относительной влажности <4% и температуре 22 ± 2 °C) [80]	Шелковое сырье демонстрирует свойства текучести, очень похожие на свойства нативного непряженного шелка. Метод позволяет снизить уровень кристалличности β-листа в получаемом сырье, что в дальнейшем упрощает условия переработки [80]
Способ прямого кормления наночастицами металлов: Cu, Fe и TiO ₂ [81, 82], серебра [82]; диоксида титана [81, 83], оксида железа [84], наночастицы: на основе углерода и графена [85]	Установлено, что SF с наночастицами Cu или Fe обладают значительно лучшими механическими свойствами, а основная структура SF хорошо сохраняется [81]. Поглощение наночастиц диоксида титана (TiO ₂) шелкопрядами позволяет получить модифицированный шелк с улучшенной прочностью на разрыв и удлинением при разрыве [83]. По сравнению с обычным SF полученный MSF (магнитные шелковые волокна фиброина) обладает не только ожидаемыми магнитными свойствами, но также повышенной термической стабильностью и механическими свойствами [84]. Спектроскопическое исследование показало, что добавки наночастиц углерода препятствуют конформационному переходу фиброина шелка от случайного клубка и α-спирали к β-листу, что может способствовать увеличению модулей удлинения при разрыве и прочности [85]
Сверхпрочный флуоресцентный шелк, полученный путем кормления <i>B. mori</i> углеродными наноточками (CND) [86]	Прочность на разрыв и удлинение флуоресцентного шелка CNDs-1,25 достигали 521,9 ± 82,7 МПа и 19,2 ± 4,3% соответственно, что значительно выше, чем у обычного шелка, и сравнимо с шелками, модифицированными путем последующей обработки. Потенциально полезны в биовизуализации и других приложениях [86]
Метод кормления наночастицами жидкого металла, покрытыми альгинатом [87]	Шелк, обладающий высокой способностью к растяжению, продемонстрировал выдающиеся механические свойства по сравнению с обычным шелком благодаря прочности на разрыв 814 МПа и удлинению при разрыве до 70% — это самый высокий показатель, зарегистрированный на сегодняшний день. Метод позволит расширить производство многофункционального шелка [87]

3.2. Технологические методы и биоматериалы из оболочки кокона

3.2.1. Фиброин (SF)

Н. Yamada и соавт. (2001), анализируя молекулярную массу солюбилизованного фиброина, установили, что фиброин разрушается при наматывании, дегумировании (удаление серицина) и растворении шелковых нитей. На основании этих исследований ими был предложен протокол получения солюбилизованного протеина, сохраняющего свой нативный молекулярный размер, ключевым пунктом которого является использование именно свежих коконов (коконы, собранные сразу после завершения прядения), а не сухих или намотанных шелковых нитей [91]. Методы обработки фиброина шелка для получения шелковых биоматериалов для различных применений в виде конкретных протоколов, включающих методы извлечения и изготовления: гидрогелей, трубок, губок, композитов, волокон, микросфер и тонких пленок, были представлены D. Rockwood и соавт. в 2011 году [92]. Впоследствии новые исследовательские работы были направлены на оптимизацию и улучшение технологических параметров процесса, установление взаимосвязей между используемыми технологическими методами и качественными характеристиками производных продуктов. Замена стандартного протокола дегумирования повторными кратковременными микроволновыми обработками позволила получить неразложившийся дегумированный фиброин шелка [93]. Н. Kim и соавт. (2016) установили влияние молекулярной массы (MW) SF на физические свойства (т.е. степень набухания, модуль сдвига, прозрачность), а также клеточную адгезию гидрогелей [94]; взаимосвязь методов дегумирования и очистки фиброина шелка как ключевого этапа в протоколе приготовления SF, влияющего на целостность белка, средний размер, распределение и поверхностный заряд частиц [95]; дегумирование с использованием папаина для получения высокомолекулярного SF [96]; сравнительные исследования получения высокомолекулярного фиброина с использованием нейтральных протеаз, в котором бромелайн показал наилучшие результаты [97]; исследования фракций регенерированного фиброина шелка (RSF), установившие, что MW влияет на морфологию и механические свойства нановолокон и губок, хотя никакого влияния MW на вторичную структуру или кристалличность изготовленных материалов не наблюдалось [98]; комплексный обзор изготовления и применения регенерированных шелковых фиброиновых материалов *B. mori* [99].

Н. Kim и соавт. (2016) исследовали и установили влияние молекулярной массы (MW) SF на физические свойства: степень набухания, модуль сдвига, прозрачность, а также клеточную адгезию гидрогелей [94]. Взаимосвязь методов дегумирования и очистки фиброина шелка, как ключевого этапа в протоколе приготовления SF, влияющего на целостность белка, средний размер, распределение и поверхностный заряд частиц, была исследована G. Carissimi и соавт. (2019) [95]. Y. Feng и соавт. (2020) представили процесс дегумирования с использованием папаина для получения высокомолекулярного SF [96]. М. Aoki и соавт. (2021) исследовали фракции регенерированного фиброина шелка (RSF), установив, что MW влияет на морфологию и механические свойства нановолокон и губок, хотя никакого влияния MW на вторичную структуру или кристалличность изготовленных материалов не наблюдалось [97]. X. Liu и соавт. (2023) провели сравнительные исследования получения высокомолекулярного фиброина с использованием нейтральных протеаз, в котором бромелайн показал наилучшие результаты [98]. Комплексный обзор изготовления и применения регенерированных шелковых фиброиновых материалов *B. mori* представлен K. Wang и соавт. (2023) [99].

3.2.2. Серицин (SS)

Серицин шелка — природный белок, извлеченный из коконов тутового шелкопряда, широко изучался и использовался в биомедицинской области благодаря своей превосходной биологической активности и контролируемым химико-физическим свойствам. Серицин является биосовместимым и естественным клеточным адгезивом, обеспечивающим прикрепление, пролиферацию и дифференцировку клеток в материалах на основе серицина. Более того, его многочисленные функциональные группы из вариативного аминокислотного состава позволяют серицину химически модифицировать и сшивать (возможность сшивать это свойство биополимера, направленное на получение композитных материалов с улучшенными свойствами) с образованием универсальных конструкций, служащих альтернативными матрицами для биомедицинских применений. В последнее время серицин используется в различных типах биоматериалов для тканевой инженерии и регенеративной медицины, включая различные объемные конструкции (пленки, гидрогели, каркасы, каналы и устройства) и микронано-препараты [100].

Варианты получения и экстракции серицина шелка основаны на таких аспектах, как растворимость SS в горячих растворах, использование мыла, мочевины, ферментов, а также щелочных или кислотных веществ, или таких устройств, как автоклавы, микроволновые печи и т.п. Все они ориентированы на предотвращение деградации серицина [101]. Последующим этапом является выделение SS, осуществляемое путем фильтрации с использованием мембран, осаждения этанолом, а также сублимационной или распылительной сушки [102, 103]. Соответственно, метод экстракции имеет большое значение, так как влияет на MW полученного серицина [102, 103]. R. Bascou и соавт. (2022) представили сравнительное исследование по бесхимическим методам экстракции SS. В отличие от традиционных методов «обесклеивания» карбонатом натрия и нехимических методов (горячая вода и микроволновая печь), микроволновое рафинирование показало наилучший выход при экстракции, при котором было восстановлено 99,8% серицина [104].

3.2.3. Композиты фиброина и серицина (SF и SS)

Новый подход в биомедицинской науке предполагает получение композиционных материалов. Материалы компонентов обычно имеют ряд недостатков, в том числе механические свойства или плохая стабильность в водной среде, поскольку они набухают, а затем растворяются [105, 106]. Поэтому необходимо модифицировать материалы на основе полимеров путем добавления различных природных или синтетических полимеров [107, 108]. С целью получения биоматериалов, характеризующихся уникальными структурными и механическими свойствами, с лучшими физико-химическими свойствами, можно использовать смеси двух и более полимеров [109]. S. Grabska-Zielińska и соавт. (2021) в своем обзоре привели и обсудили методы улучшения физико-химических и биологических свойств материалов на основе шелка, представили сводные данные по широкой номенклатуре композиционных материалов: список композиционных материалов на основе фиброина шелка с природными — 8 наименований и синтетическими полимерами — 7 наименований для использования в биомедицинской области (табл. 6); трехкомпонентные смеси — 19 наименований для тканевой инженерии (табл. 7); перечень материалов на полимерной основе с наличием неорганических добавок — 6 вариантов по основным неорганическим добавкам (табл. 8) [109].

N. Johari и соавт. (2022) также классифицировали и обобщили смеси фиброина, в том числе и спироина, с двумя группами природных и синтетических полимеров, которые в основном разработаны для улучшения и модификации механических свойств и стимуляции клеточного взаимодействия, такого как прикрепление клеток и скорость пролиферации. Эти смеси разработаны для регенерации твердых и мягких тканей. Кроме того, в процессе исследовательской работы авторы выявили биомеханические закономерности, представленные в заключении: механические свойства, такие как прочность, модуль упругости и удлинение, корректируются так, чтобы имитировать нативный внеклеточный матрикс; кристалличность фиброина является основным фактором, определяющим механические свойства полимера, и изменяется в зависимости от смешивания; если компонент смешивания взаимодействует с фиброином посредством водородных или ковалентных связей, он может индуцировать структуру β -листа и повысить механические свойства до оптимального уровня; с другой стороны, уменьшение содержания фиброина снижает прочность из-за уменьшения части β -листа; в природных полимерах по мере снижения гидрофобности смеси молекулы воды действуют как пластификатор и снижают ударную вязкость [110].

S. Suzuki и соавт. (2019) — одни из первых исследователей, которые изучали композиты фиброина и серицина. Они отметили, что поскольку и фиброин, и серицин обладают уникальными, а также взаимодополняющими свойствами, они имеют потенциал для различных биомедицинских применений, представив метод производства смесей фиброина и серицина за один этап путем обработки целых коконов и последующего изготовления мембран, которые были охарактеризованы и оценены как субстраты для роста фоторецепторных клеток сетчатки [111]. Исследования, проведенные позднее (табл. 3), также выявили значительное улучшение качественных характеристик композитных материалов. В частности, M. Li и соавт. (2022), используя метод отжига горячей водой для получения смесей фиброина и серицина шелка, исследовали в том числе и показатели механической прочности новых композитных пленок SF/SS, показавших значительно более высокие результаты в сравнении с чистой пленкой SF (подробнее — табл. S2, дополнительные материалы) [112].

Таблица 3. Композиты фиброина и серицина (SF и SS), получаемые при первичной переработке

Методы	Характеристики и преимущества
Метод производства смесей фиброина и серицина за один этап путем обработки целых коконов шелкопряда (последующая форма – мембрана) [111]	Смешанные мембраны механически прочнее фиброиновых мембран и приводят к значительному усилению пролиферации клеток. Метод, разработанный в этом исследовании, обеспечивает мембраны на основе шелка с улучшенными характеристиками для применения в тканевой инженерии [111]
Метод переработки целых коконов непосредственно для изготовления новых белковых композитов SS-SF (формы: пленки, губки, монолиты) [113]	Успешное изготовление белковых композитов SS-SF, эффективно сокращающее процесс изготовления материала и сохраняющее нативные свойства белков шелка. Продемонстрирована биосовместимость и низкая иммуногенность этих белковых композитных материалов [113]
Методы: раздельной и одновременной экстракции SF и SS, последующее изготовление гидрогелей [114]	Лиофилизированный композитный гидрогель, образованный SF и SS, можно использовать для улучшения заживления ран при низком иммунном ответе и др. [114]
Метод с использованием обжига кипящей водой для получения смесей фиброина и серицина шелка за один этап путем обработки целых коконов шелка (форма – пленка) [112]	Разработанные композитные пленки SF/SS имеют улучшенные механические свойства. Композитные пленки SF/SS эффективно регулируют зарождение, рост и агрегацию НАр-подобных минералов, а присутствие SS ускоряет раннюю минерализацию материалов на основе SF. Эти композитные пленки могут стать перспективными биоматериалами для восстановления и регенерации надкостницы. [112]

Таким образом, в контексте вышесказанного композитные материалы SF и SS могут стать в ближайшей перспективе в силу своих превосходящих качественных характеристик, «самодостаточными» композитами или послужить основой для создания новых композиционных материалов с другими полимерами природного или синтетического происхождения.

4. Некоторые варианты использования биоматериалов протеинов шелка

Использование протеинов шелка в качестве заменителя фетальной бычьей сыворотки (FBS) для культуры клеток менее известно, но также важно в контексте регенеративной медицины.

Криоконсервация необходима для длительного хранения островковых клеток и повышения практичности клинической трансплантации островков. FBS с добавлением 10% диметилсульфоксида (DMSO) обычно используется в качестве среды для замораживания островковых клеток. Однако в идеале следует избегать использования FBS в культуре клеток и трансплантации. К. Ohnishi и соавт. (2012), исследуя влияние белка серицина на криоконсервированные островки крысы, выявили, что не было существенных различий между замораживающей средой, содержащей 1% серицина, и средой, содержащей 10% FBS, в отношении выживаемости островков и стимулированной секреции инсулина. После

трансплантации островки быстро устраняли гипергликемию и поддерживали нормальный гликемический контроль. Кроме того, использование 7% DMSO в качестве криопротектора с серицином показало те же результаты, что и более высокие концентрации DMSO с FBS [115].

Y. Miyamoto и соавт. (2012) протестировали жизнеспособность и адипогенный/остеогенный потенциал человеческих ASC после замораживания в криоконсервирующей среде, содержащей серицин (~30 кДа). Их экспериментальные результаты подтвердили, что криоконсервирующая среда с серицином благотворно влияет на замораживание человеческих ASC. Эту бессывороточную среду для криоконсервации возможно широко использовать в регенеративной медицине, трансплантации клеток и биологических исследованиях [116].

Y. Jo и соавт. (2019) исследовали протеина шелка с целью разработки заменителя FBS с использованием альтернатив, полученных из шелкопряда, таких как гемолимфа тутового шелкопряда, серицин шелка и фиброин шелка, которые обладают различными физиологическими эффектами и эффектами стимулирования клеток и могут производиться массово. После создания культуры клеток уровни пролиферации клеток и экспрессии генов, связанных с ростом клеток, сравнивали с уровнями контрольных клеток (клетки,

культивированные в среде с 10% FBS). Результаты показали, что экспериментальная группа, получавшая фиброин шелка, могла заменить 10% FBS [117].

5. Обсуждение

Опираясь на инновационные методы создания трансгенных тутовых шелкопрядов, разработанных в Японии, Н. Sezutsu и соавт. (2018) сообщили о создании платформы с использованием трансгенных *B. mori* для разработки фармацевтических и медицинских приложений [118]. F. Wang и соавт. (2021) отмечали, что биоактивные молекулы, такие как факторы роста и антитела, могут совместно экспрессироваться с фиброином/серицином в процессе производства тутового шелкопряда; современная

трансгенная биотехнология продемонстрировала использование тутового шелкопряда в качестве естественного биореактора для экспрессии значительных количеств рекомбинантных чужеродных белков, и, таким образом, эти усилия превратили древний шелковый материал в новый универсальный биофункциональный биоматериал [113].

Помимо интенсивных научных исследований, увеличивается темп внедрения новых продуктов на основе биоматериалов шелка для практического использования. В частности, в апреле 2023 года компания Vaxess Technologies объявила о результатах испытаний, которые показали, что составы фиброина шелка Vaxess защищают липидные наночастицы мПНК (LNPs) при высыхании



Рис. Возможности биотехнологической платформы тутового шелкопряда для регенеративной медицины и биомедицины

и сохраняют эффективность *in vivo* после хранения при 37 °С в течение двух недель. В августе 2023 года компания объявила о сотрудничестве с AstraZeneca для оценки прототипа вакцины против пандемического гриппа на основе РНК в формате пластыря [119]. В ЕС в рамках программы Horizon осуществляются проекты, направленные на изготовление глазных и коленных имплантатов нового поколения с использованием производных протеинов шелка [120].

Рассматривая в комплексе известные биотехнологические улучшения традиционного шелководства, мы видим, что их совокупность позволяет получить широкий спектр биоматериалов, таким образом, представляя собой биотехнологическую платформу (рис.). Представленные в блок-схеме базовые производные: фиброина и серицина, получаемые на основном этапе преобразования сырья, оболочки кокона тутового шелкопряда, — отнесены к данной категории исходя из возможности их лиофилизации с целью неограниченного хранения [92]. [Rockwood — повтор и др.] Лيوфилизированный SF можно повторно растворить в воде, муравьиной кислоте или 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропаноле (ГФИП) в желаемой концентрации [92]. Хранение серицина в сухом состоянии и последующего путем растворения его в горячей воде (например, при 90 °С в течение 5 минут) для приготовления водного раствора серицина были исследованы Н. Lee и соавт. (2023), что подтвердило возможность его использования в биологических целях без проблем с хранением [121]. Хотя в отношении композитов SF и SS еще нет аналогичных исследований, воз-

можно с большой уверенностью, предположить достижение аналогичных результатов в хранении после лиофилизации. Кроме возможности длительного хранения лиофилизированная форма продукта позволяет произвести его беспроблемную транспортировку в любое место и последующее преобразование в необходимые конечные формы.

6. Заключение

В совокупности биотехнологических решений, направленных как на улучшение производственно-экономических показателей традиционного шелководства, так и на получение новых видов продуктов, одним из ключевых является возможность выращивания *B. mori* с использованием искусственной питательной среды (ИПС). Разработанная в РФ ИПС позволяет стабильно выращивать тутового шелкопряда в течение всего года, открывая возможности для практической реализации представленных в обзоре биотехнологий тутового шелкопряда. Таким образом, совокупность улучшений в целом представляет собой уникальную биотехнологическую платформу на основе *B. mori*, способную удовлетворить значительную часть потребностей регенеративной медицины и биомедицины в биоматериалах.

Финансирование исследования: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00247, <https://rscf.ru/project/23-26-00247/>

Funding: The research was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation № 23-26-00247, <https://rscf.ru/project/23-26-00247/>

Литература

1. Nguyen TP, Nguyen QV, Nguyen V-H, Le T-H, Huynh VQN, Vo D-VN, et al. Silk Fibroin-Based Biomaterials for Biomedical Applications: A Review. *Polymers (Basel)*. 2019; 11(12):1933. DOI: 10.3390/polym11121933
2. Farahani A, Zarei-Hanzaki A, Abedi HR, Daryoush S, Ragheb ZD, Mianabadi F, et al. Silk-Based Biopolymers Promise Extensive Biomedical Applications in Tissue Engineering, Drug Delivery, and BioMEMS. *J Polym Environ*. 2023; 31(11):4559–4582. DOI: 10.1007/s10924-023-02906-x
3. Giorgio G de, Matera B, Vurro D, Manfredi E, Galstyan V, Tarabella G, et al. Silk Fibroin Materials: Biomedical Applications and Perspectives. *Bioengineering*. 2024;11(2):167. DOI: 10.3390/bioengineering11020167
4. Kundu SC. *Silk-based biomaterials for tissue engineering, regenerative and precision medicine*. Second edition. Oxford: Woodhead Publishing, 2023. P. 833–872.
5. Thurber A, Omenetto F, Kaplan D. In vivo bioresponses to silk proteins. *Biomaterials*. 2015;71:145–157. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.08.039

6. Jiao Z, Song Y, Jin Y, Zhang C, Peng D, Chen Z, et al. In Vivo Characterizations of the Immune Properties of Sericin: An Ancient Material with Emerging Value in Biomedical Applications. *Macromol Biosci.* 2017;17(12):1–6. DOI: 10.1002/mabi.201700229
7. Silva A, Costa E, Reis S, Spencer C, Calhella R, Miguel S et al. Silk Sericin: A Promising Sustainable Biomaterial for Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Polymers (Basel).* 2022;14(22):4931. DOI: 10.3390/polym14224931
8. Rahimpour S, Jabbari H, Yousofi H, Fathi A, Mahmoodi S, Jafarian MJ, et al. Regulatory effect of sericin protein in inflammatory pathways; A comprehensive review. *Pathol Res Pract.* 2023;243:154369. DOI: 10.1016/j.prp.2023.154369
9. Kato T, Kajikawa M, Maenaka K, Park EY. Silkworm expression system as a platform technology in life science. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2010;85(3):459–470. DOI: 10.1007/s00253-009-2267-2
10. Tomeh MA, Hadianamrei R, Zhao X. Silk Fibroin as a Functional Biomaterial for Drug and Gene Delivery. *Pharmaceutics.* 2019;11(10):494. DOI: 10.3390/pharmaceutics11100494
11. Wen D-L, Sun D-H, Huang P, Huang W, Su M, Wang Y, et al. Recent progress in silk fibroin-based flexible electronics. *Microsyst Nanoeng.* 2021;7(1):35. DOI: s41378-021-00261-2
12. Mukhtar H, Sahreen S, Sharif S, Ahmad H. Comparison of Host Expression Systems used for Efficient Recombinant Proteins Production. *PPASB.* 2023;60(1):5–28. DOI: 10.53560/PPASB (60-1)731
13. Usami A, Ishiyama S, Enomoto C, Okazaki H, Higuchi K, Ikeda M, et al. Comparison of recombinant protein expression in a baculovirus system in insect cells (Sf9) and silkworm. *J Biochem.* 2011;149(2):219–227. DOI: 10.1093/jb/mvq138
14. Minagawa S, Sekiguchi S, Nakaso Y, Igarashi T, Tomita M. Production of a correctly assembled fibrinogen using transgenic silkworms. *Transgenic research.* 2020;29(3):339–353. DOI: 10.1007/s11248-020-00202-1
15. Hirashima M, Imamura T, Yano K, Kawamura R, Meta A, Tokieda Y, et al. High-level expression and preparation of recombinant human fibrinogen as biopharmaceuticals. *J Biochem.* 2016;159(2):261–270. DOI: 10.1093/jb/mvv099
16. Wu X, Kamei K, Sato H, Sato SI, Takano R, Ichida M, et al. High-level expression of human acidic fibroblast growth factor and basic fibroblast growth factor in silkworm (*Bombyx mori* L.) using recombinant baculovirus. *Protein Expression and Purification.* 2001;21(1):192–200. DOI: 10.1006/prep.2000.1358
17. Yu B, Sun W, Huang Z, Sun G, Le Li, Gu J, et al. Large-Scale Preparation of Highly Stable Recombinant Human Acidic Fibroblast Growth Factor in *Escherichia coli* BL21(DE3) plysS Strain. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9:641505. DOI: 10.3389/fbioe.2021.641505
18. Pramanik N, Rath T. Current Scenario of Regenerative Medicine: Role of Cell, Scaffold and Growth Factor. In: S. Haidar Z, Y. Abdurakhmonov I, Barkaoui A, editors. *Biomechanics and Functional Tissue Engineering.* InTech; 2021. DOI: 10.5772/intechopen.94906
19. Sensebé L, Gadelorge M, Fleury-Cappellesso S. Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review. *Stem Cell Res. Therapy.* 2013;4:66. DOI: 10.1186/scrt217
20. Супотницкий М, Елапов А, Меркулов В, Борисевич И, Климов В, Миронов А. Основные технологические процессы, используемые при производстве биомедицинских клеточных продуктов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2015;2:36–45.
21. Madappura AP, Madduri S. A comprehensive review of silk-fibroin hydrogels for cell and drug delivery applications in tissue engineering and regenerative medicine. *Comput Struct Biotechnol J.* 2023;21:4868–4886. DOI: 10.1016/j.csbj.2023.10.012
22. Fathi-Achachelouei M, Keskin D, Bat E, Vrana NE, Tezcaner A. Dual growth factor delivery using PLGA nanoparticles in silk fibroin/PEGDMA hydrogels for articular cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2020;108(5):2041–2062. DOI: 10.1002/jbm.b.34544
23. Grgacic E, Anderson D. Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods.* 2006;40(1):60–65. DOI: 10.1016/j.ymeth.2006.07.018
24. Kato T, Deo V, & Park E. Functional Virus-Like Particles Production Using Silkworm and Their Application in Life Science. *Journal of Aquaculture & Research Development.* 2012;s9(01). DOI: 10.4172/2155-952X.S9-001

25. Ramezaniaghdam M, Nahdi ND, Reski R. Recombinant Spider Silk: Promises and Bottle-necks. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:835637. DOI: 10.3389/fbioe.2022.835637
26. Mi J, Zhou Y, Ma S, Zhou X, Xu S, Yang Y, et al. High-strength and ultra-tough whole spider silk fibers spun from transgenic silkworms. *Matter.* 2023;6(10):3661–3683. DOI: 10.1016/j.matt.2023.08.013
27. Ishida N, Tsujimoto M, Kanaya T, Shimamura A, Tsuruoka N, Kodama S, et al. Expression and characterization of human bone morphogenetic protein-2 in silkworm larvae infected with recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J Biochem.* 1994;115(2):279–285. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124329
28. Fung SL, Wu X, Maceren JP, Mao Y, Kohn J. In Vitro Evaluation of Recombinant Bone Morphogenetic Protein-2 Bioactivity for Regenerative Medicine. *Tissue Eng Part C Methods.* 2019;25(9):553–559. DOI: 10.1089/ten.tec.2019.0156
29. Wu X, Kamei K, Sato H, Sato SI, Takano R, Ichida M, et al. High-level expression of human acidic fibroblast growth factor and basic fibroblast growth factor in silkworm (*Bombyx mori* L.) using recombinant baculovirus. *Protein Expr Purif.* 2001;21(1):192–200. DOI: 10.1006/prep.2000.1358
30. Chen K, Rao Z, Dong S, Chen Y, Wang X, Luo Y, et al. Roles of the fibroblast growth factor signal transduction system in tissue injury repair. *Burns & Trauma.* 2022;10:tkac005. DOI: 10.1093/burnst/tkac005
31. Masuda A, Xu J, Minamihata K, Kagawa G, Hamada Y, Morifuji Y, et al. Production of a biologically active human basic fibroblast growth factor using silkworm-baculovirus expression vector system. *Journal of Asia-Pacific Entomology.* 2018;21(2):716–720. DOI: 10.1016/j.aspen.2018.05.002
32. Han J, Zang Y, Lu H, Zhu J, Qin J. A novel recombinant dual human SCF expressed in and purified from silkworm, *Bombyx mori*, possesses higher bioactivity than recombinant monomeric human SCF. *Eur J Haematol.* 2004;72(4):273–279. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2004.00221.x
33. Imai S, Li Z, Iiyama K, Miyagawa Y, Toyoda M, Umezawa A, Lee J., et al. Biologically active human bone morphogenetic protein 4 fused to collagen-binding domain produced in silkworm-baculovirus expression system. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* 2013;82(2):2039–2044. DOI: 10.11416/jibs.82.2_039
34. Bessa PC, Balmayor ER, Azevedo HS, Nürnberger S, Casal M, van Griensven M, et al. Silk fibroin microparticles as carriers for delivery of human recombinant BMPs. Physical characterization and drug release. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine.* 2010;4(5):349–355. DOI: 10.1002/term.245
35. Kinoshita Y, Xu J, Masuda A, Minamihata K, Kamiya N, Mon H, et al. Expression and purification of biologically active human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) using silkworm-baculovirus expression vector system. *Protein Expr Purif.* 2019;159:69–74. DOI: 10.1016/j.pep.2019.03.010
36. Wang F, Wang R, Wang Y, Zhao P, Xia Q. Large-scale production of bioactive recombinant human acidic fibroblast growth factor in transgenic silkworm cocoons. *Sci Rep.* 2015;5:16323. DOI: 10.1038/srep16323
37. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(3):235–253. DOI: 10.1038/nrd2792
38. Maruta R, Takaki K, Yamaji Y, Sezutsu H, Mori H, Kotani E. Effects of transgenic silk materials that incorporate FGF-7 protein microcrystals on the proliferation and differentiation of human keratinocytes. *FASEB Bioadv.* 2020;2(12):734–744. DOI: 10.1096/fba.2020-00078
39. Wu M, Ruan J, Ye X, Zhao S, Tang X, Wang X, et al. P25 Gene Knockout Contributes to Human Epidermal Growth Factor Production in Transgenic Silkworms. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):2709. DOI: 10.3390/ijms22052709
40. Chouhan D, Mandal BB. Silk biomaterials in wound healing and skin regeneration therapeutics: From bench to bedside. *Acta Biomater.* 2020;103:24–51. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.11.050
41. Zhang W, Li Z, Lan W, Guo H, Chen F, Wang F, et al. Bioengineered silkworm model for expressing human neurotrophin-4 with potential biomedical application. *Front Physiol.* 2022;13:1104929. DOI: 10.3389/fphys.2022.1104929

42. Chen W, Wang F, Tian C, Wang Y, Xu S, Wang R, et al. Transgenic Silkworm-Based Silk Gland Bioreactor for Large Scale Production of Bioactive Human Platelet-Derived Growth Factor (PDGF-BB) in Silk Cocoons. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(9):2533 DOI: 10.3390/ijms19092533
43. Minagawa S, Sekiguchi S, Nakaso Y, Igarashi T, Tomita M. Production of a correctly assembled fibrinogen using transgenic silkworms. *Transgenic Res*. 2020;29(3):339–353. DOI: 10.1007/s11248-020-00202-1
44. Xu S, Tan H, Yang Q, Wang R, Tian C, Ji Y, et al. Fabrication of a Silk Sericin Hydrogel System Delivering Human Lactoferrin Using Genetically Engineered Silk with Improved Bioavailability to Alleviate Chemotherapy-Induced Immunosuppression. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2021;13(38):45175–45190. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsaami.1c08409>
45. Aleisa F, Sakashita K, Lee J, AbuSamra D, Al Alwan B, Nozue S, et al. Functional binding of E-selectin to its ligands is enhanced by structural features beyond its lectin domain. *Journal of Biological Chemistry*. 2020;295(11):3719–3733. DOI: 10.1074/jbc.RA119.010910
46. IBL America Online Store. Fibronectin Neosilk®, Cellular. 2023. <https://www.ibl-america.com/fibronectin-neosilk-cellular> [Accessed Dec 14, 2023].
47. Tomita M, Munetsuna H, Sato T, Adachi T, Hino R, Hayashi M, et al. Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nat Biotechnol*. 2003;21(1):52–56. DOI: 10.1038/nbt771.
48. Qi Q, Yao L, Liang Z, Yan D, Li Z, Huang Y et al. Production of human type II collagen using an efficient baculovirus-silkworm multigene expression system. *Mol Genet Genomics*. 2016;291(6):2189–2198. DOI: 10.1007/s00438-016-1251-7
49. Protein Production Business using Transgenic Silkworms | Immuno-Biological Laboratories Co.,Ltd. | IBL. 2023. <https://www.ibl-japan.co.jp/en/business/silkworm> [Accessed Dec 14, 2023].
50. Fertala A. Three Decades of Research on Recombinant Collagens: Reinventing the Wheel or Developing New Biomedical Products? *Bioengineering*. 2020;7(4):155. DOI: 10.3390/bioengineering7040155
51. Kusakabe T. Production of antiviral vaccine antigens using a silkworm-baculovirus expression system. *J Pharmacol Sci*. 2023;151(3):156–161. DOI: 10.1016/j.jphs.2023.01.002
52. Miyata T, Minamihata K, Kurihara K, Kamizuru Y, Gotanda M, Obayashi M, et al. Highly efficient protein expression of Plasmodium vivax surface antigen, Pvs25 by silkworm, *Bombyx mori* and its biochemical analysis; 2022. DOI: 10.1101/2022.03.03.482736
53. Maegawa K, Shibata T, Yamaguchi R, Hiroike K, Izzati UZ, Kuroda K, et al. Overexpression of a virus-like particle influenza vaccine in Eri silkworm pupae, using Autographa californica nuclear polyhedrosis virus and host-range expansion. *Archives of virology*. 2018;163(10):2787–2797. DOI: 10.1007/s00705-018-3941-4
54. Nerome K, Imagawa T, Sugita S, Arasaki Y, Maegawa K, Kawasaki K, et al. The potential of a universal influenza virus-like particle vaccine expressing a chimeric cytokine. *Life Sci Alliance*. 2023;6(1). DOI: 10.26508/lsa.2022015
55. Wang Y, Wang F, Xu S, Wang R, Chen W, Hou K, et al. Genetically engineered bi-functional silk material with improved cell proliferation and anti-inflammatory activity for medical application. *Acta Biomater*. 2019;86:148–157. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.12.036
56. Lian A, Yamaji Y, Kajiwaru K, Takaki K, Mori H, Liew MWO, et al. A Bioengineering Approach for the Development of Fibroblast Growth Factor-7-Functionalized Sericin Biomaterial Applicable for the Cultivation of Keratinocytes. *Int J Mol Sci*. 2022;23(17): 9953. DOI: 10.3390/ijms23179953
57. Otsuki R, Yamamoto M, Matsumoto E, Iwamoto S, Sezutsu H, Suzui M, et al. Bioengineered silkworms with butterfly cytotoxin-modified silk glands produce sericin cocoons with a utility for a new biomaterial. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114(26):6740–6745. DOI: 10.1073/pnas.1703449114
58. Li Y, Wei Y, Zhang G, Zhang Y. Sericin from Fibroin-Deficient Silkworms Served as a Promising Resource for Biomedicine. *Polymers (Basel)*. 2023;15(13):2941.DOI: 10.3390/polym15132941

59. Yamano M, Hirose R, Lye P, Takaki K, Maruta R, On Liew M, et al. Bioengineered Silkworm for Producing Cocoons with High Fibroin Content for Regenerated Fibroin Biomaterial-Based Applications. *Int J Mol Sci.* 2022;23(13):7433. DOI: 10.3390/ijms23137433
60. Chen X, Wang Y, Wang Y, Li Q, Liang X, Wang G, et al. Ectopic expression of sericin enables efficient production of ancient silk with structural changes in silkworm. *Nat Commun.* 2022;13(1):6295. DOI: 10.1038/s41467-022-34128-5
61. Teramoto H, Iga M, Tsuboi H, Nakajima K. Characterization and Scaled-Up Production of Azido-Functionalized Silk Fiber Produced by Transgenic Silkworms with an Expanded Genetic Code. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3): 616. DOI: 10.3390/ijms20030616
62. Saviane A, Romoli O, Bozzato A, Freddi G, Cappelletti C, Rosini E, et al. Intrinsic antimicrobial properties of silk spun by genetically modified silkworm strains. *Transgenic Res.* 2018;27(1):87–101. DOI: 10.1007/s11248-018-0059-0
63. Li Z, Jiang Y, Cao G, Li J, Xue R, Gong C. Construction of transgenic silkworm spinning antibacterial silk with fluorescence. *Mol Biol Rep.* 2015;42(1):19–25. DOI: 10.1007/s11033-014-3735
64. Mi J, Zhou Y, Ma S, Zhou X, Xu S, Yang Y, et al. High-strength and ultra-tough whole spider silk fibers spun from transgenic silkworms. *Matter.* 2023;6(10):3661–3683. DOI: 10.1016/j.matt.2023.08.013
65. Reddy MSB, Ponnammam D, Choudhary R, Sadasivuni KK. A Comparative Review of Natural and Synthetic Biopolymer Composite Scaffolds. *Polymers (Basel).* 2021;13(7):1105. DOI: 10.3390/polym13071105
66. Biopolymer-Based Formulations. Elsevier; 2020.
67. George AM, Reddy Peddireddy SP, Thakur G, Rodrigues FC. Biopolymer-based scaffolds. In: *Biopolymer-Based Formulations.* Elsevier; 2020. P. 717–749. DOI: 10.1016/B978-0-12-816897-4.00029-1
68. Chen F-M, Liu X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Progress in Polymer Science.* 2016;53:86–168. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004
69. Pilia M, Guda T, Appleford M. Development of composite scaffolds for load-bearing segmental bone defects. *BioMed Research International.* 2013;2013:458253. DOI: 10.1155/2013/458253
70. Goonoo N, Bhaw-Luximon A, Bowlin GL, Jhurry D. An assessment of biopolymer- and synthetic polymer-based scaffolds for bone and vascular tissue engineering. *Polymer International.* 2013;62(4):523–533. DOI: 10.1002/pi.4474
71. Kochhar D, DeBari MK, Abbott RD. The Materiobiology of Silk: Exploring the Biophysical Influence of Silk Biomaterials on Directing Cellular Behaviors. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9:697981. DOI: 10.3389/fbioe.2021.697981
72. Helenius J, Heisenberg C-P, Gaub HE, Muller DJ. Single-cell force spectroscopy. *J Cell Sci.* 2008;121(11):1785–1791. DOI: 10.1242/jcs.030999
73. Vogel V. Mechanotransduction involving multimodular proteins: converting force into biochemical signals. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2006;35:459–488. DOI: 10.1146/annurev.biophys.35.040405.102013
74. Chang G, Kim HJ, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL, Kandel R. Enhancing annulus fibrosus tissue formation in porous silk scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2010;92(1):43–51. DOI: 10.1002/jbm.a.32326
75. Hendriks FM, Brokken D, Oomens CWJ, Bader DL, Baaijens FPT. The relative contributions of different skin layers to the mechanical behavior of human skin in vivo using suction experiments. *Med Eng Phys.* 2006;28(3):259–266. DOI: 10.1016/j.medengphy.2005.07.001
76. Salameh N, Peeters F, Sinkus R, Abarca-Quinones J, Annet L, Beek LC, et al. Hepatic viscoelastic parameters measured with MR elastography: correlations with quantitative analysis of liver fibrosis in the rat. *J Magn Reson Imaging.* 2007;26(4):956–962. DOI: 10.1002/jmri.21099
77. Wang D, Liu H, Fan Y. Silk fibroin for vascular regeneration. *Microscopy Research and Technique.* 2017;80(3):280–290. DOI: 10.1002/jemt.22532
78. Cheng L, Tong X, Li Z, Liu Z, Huang H, Zhao H, et al. Natural Silkworm Cocoon Composites with High Strength and Stiffness Constructed in Confined Cocooning Space. *Polymers (Basel).* 2018;10(11):1214. DOI: 10.3390/polym10111214

79. Cheng L, Li Z, Liu Z, Chen S, Bao Y, Gao L, et al. Enhanced thermal and mechanical properties of natural silkworm cocoon composites constructed by multi-silkworm larvae simultaneously. *Materials Letters*. 2019;247:126–130. DOI: 10.1016/j.matlet.2019.03.108
80. Boulet-Audet M, Holland C, Gheysens T, Vollrath F. Dry-Spun Silk Produces Native-Like Fibroin Solutions. *Biomacromolecules*. 2016;17(10):3198–3204. DOI: 10.1021/acs.biomac.6b00887
81. Wu G, Song P, Zhang D, Liu Z, Li L, Huang H, et al. Robust composite silk fibers pulled out of silkworms directly fed with nanoparticles. *Int J Biol Macromol*. 2017;104:533–538. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.069
82. Cheng L, Huang H, Chen S, Wang W, Dai F, Zhao H. Characterization of silkworm larvae growth and properties of silk fibres after direct feeding of copper or silver nanoparticles. *Materials & Design*. 2017;129:125–134. DOI: 10.1016/j.matdes.2017.04.096
83. Cai L, Shao H, Hu X, Zhang Y. Reinforced and Ultraviolet Resistant Silks from Silkworms Fed with Titanium Dioxide Nanoparticles. *ACS Sustainable Chem. Eng*. 2015;3:2551–2557. DOI: 10.1021/acssuschemeng.5b00749
84. Wang J-T, Li L-L, Feng L, Li J-F, Jiang L-H, Shen Q. Directly obtaining pristine magnetic silk fibers from silkworm. *Int J Biol Macromol*. 2014;63:205–209. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.11.006
85. Wang Q, Wang C, Zhang M, Jian M, Zhang Y. Feeding Single-Walled Carbon Nanotubes or Graphene to Silkworms for Reinforced Silk Fibers. *Nano Lett*. 2016;16:6695–6700. DOI: 10.1021/acs.nanolett.6b03597
86. Fan S, Zheng X, Zhan Q, Zhang H, Shao H, Wang J, et al. Super-strong and Intrinsically Fluorescent Silkworm Silk from Carbon Nanodots Feeding. *Nanomicro Lett*. 2019;11(1):75. DOI: 10.1007/s40820-019-0303-z
87. Gao Z-F, Zheng L-L, Fu W-L, Zhang L, Li J-Z, Chen P. Feeding Alginate-Coated Liquid Metal Nanodroplets to Silkworms for Highly Stretchable Silk Fibers. *Nanomaterials (Basel)*. 2022;12(7):1177. DOI: 10.3390/nano12071177
88. Minkner R, Xu J, Zagst H, Wätzig H, Kato T, Oltmann-Norden I, et al. A systematic and methodical approach for the efficient purification of recombinant protein from silkworm larval hemolymph. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2020;1138:121964. DOI: 10.1016/j.jchromb.2019.121964
89. Minkner R, Xu J, Takemura K, Boonyakida J, Wätzig H, Park EY. Ni-modified magnetic nanoparticles for affinity purification of His-tagged proteins from the complex matrix of the silkworm fat body. *J Nanobiotechnol*. 2020;18(1):159. DOI: 10.1186/s12951-020-00715-1
90. Yagi H, Yanaka S, Yogo R, Ikeda A, Onitsuka M, Yamazaki T, et al. Silkworm Pupae Function as Efficient Producers of Recombinant Glycoproteins with Stable-Isotope Labeling. *Biomolecules* 2020;10(11):1482. DOI: 10.3390/biom10111482
91. Yamada H, Nakao H, Takasu Y, Tsubouchi K. Preparation of undegraded native molecular fibroin solution from silkworm cocoons. *Materials Science and Engineering*. 2001;14(1–2):41–46.
92. Rockwood D, Preda R, Yücel T, Wang X, Lovett M, Kaplan D. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nat Protoc*. 2011;6(10):1612–631. DOI: 10.1038/nprot.2011.379.
93. Wöltje M, Kölbel A, Aibibu D, Cherif C. A Fast and Reliable Process to Fabricate Regenerated Silk Fibroin Solution from Degummed Silk in 4 Hours. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(19):10565. DOI: 10.3390/ijms221910565
94. Kim H, Song D, Kim M, Ryu S, Um I, Ki C, et al. Effect of silk fibroin molecular weight on physical property of silk hydrogel. *Polymer*. 2016;90:26–33. DOI: 10.1016/j.polymer.2016.02.054
95. Carissimi G, Lozano-Pérez A, Montalbán M, Aznar-Cervantes S, Cenis J, Villora G. Revealing the Influence of the Degumming Process in the Properties of Silk Fibroin Nanoparticles. *Polymers (Basel)*. 2019;11(12):2045. DOI: 10.3390/polym11122045
96. Feng Y, Lin J, Niu L, Wang Y, Cheng Z, Sun X, et al. High Molecular Weight Silk Fibroin Prepared by Papain Degumming. *Polymers (Basel)*. 2020;12(9):2105. DOI: 10.3390/polym12092105

97. Aoki M, Masuda Y, Ishikawa K, Tamada Y. Fractionation of Regenerated Silk Fibroin and Characterization of the Fractions. *Molecules*. 2021;26(20):6317. DOI: 10.3390/molecules26206317
98. Liu X, Huang Q, Pan P, Fang M, Zhang Y, Yang S, et al. Comparative Study of the Preparation of High-Molecular-Weight Fibroin by Degumming Silk with Several Neutral Proteases. *Polymers (Basel)*. 2023;15(16): 3383. DOI: 10.3390/polym15163383
99. Wang K, Ma Q, Zhou H-T, Zhao J-M, Cao M, Wang S-D. Review on Fabrication and Application of Regenerated Bombyx mori Silk Fibroin Materials. *AUTEX Research Journal*. 2023;23(2):164–183. DOI: 10.2478/aut-2021-0059
100. Liu J, Shi L, Deng Y, Zou M, Cai B, Song Y, et al. Silk sericin-based materials for biomedical applications. *Biomaterials*. 2022;287(17):121638. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2022.121638
101. Castrillón Martínez DC, Zuluaga CL, Restrepo-Osorio A, Álvarez-López C. Characterization of sericin obtained from cocoons and silk yarns. *Procedia Engineering*. 2017;200:377–383. DOI: 10.1016/j.proeng.2017.07.053
102. Aramwit P, Kanokpanont S, Nakpheng T, Srichana T. The effect of sericin from various extraction methods on cell viability and collagen production. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010;11(5):2200–2211. DOI: 10.3390/ijms11052200
103. Rocha LK, Favaro LI, Rios AC, Silva EC, Silva WF, Stigliani TP, et al. Sericin from Bombyx mori cocoons. Part I: Extraction and physicochemical-biological characterization for biopharmaceutical applications. *Process Biochemistry*. 2017;61:163–177. DOI: 10.1016/j.procbio.2017.06.019
104. Bascou R, Hardouin J, Mlouka M, Guénin E, Nesterenko A. Detailed investigation on new chemical-free methods for silk sericin extraction. *Materials Today Communications*. 2022;33:104491. DOI: 10.1016/j.mtcomm.2022.104491
105. Buckley CT, Vinardell T, Thorpe SD, Haugh MG, Jones E, McGonagle D et al. Functional properties of cartilaginous tissues engineered from infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cells. *J Biomech*. 2010;43(5):920–926. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2009.11.005
106. Yang L, Korom S, Welti M, Hoerstrup SP, Zünd G, Jung FJ, et al. Tissue engineered cartilage generated from human trachea using DegraPol scaffold. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2003;24(2):201–207. DOI: 10.1016/s1010-7940(03)00263-x
107. Sionkowska A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. *Progress in Polymer Science*. 2011;36(9):1254–1276. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.05.003
108. Sionkowska A, Michalska M, Walczak M. Preparation and characterization of silk fibroin/collagen sponge with nanohydroxyapatite. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*. 2016;640(1):106–112. DOI: 10.1080/15421406.2016.1257332
109. Grabska-Zielińska S, Sionkowska A. How to Improve Physico-Chemical Properties of Silk Fibroin Materials for Biomedical Applications?-Blending and Cross-Linking of Silk Fibroin-A Review. *Materials*. 2021;14(6):1510. DOI: 10.3390/ma14061510
110. Johari N, Khodaei A, Samadikuchaksaraei A, Reis RL, Kundu SC, Moroni L. Ancient fibrous biomaterials from silkworm protein fibroin and spider silk blends: Biomechanical patterns. *Acta Biomater*. 2022;153:38–67. DOI: 10.1016/j.actbio.2022.09.030
111. Suzuki S, Rayner C, Chirila T. Silk fibroin/sericin native blends as potential biomaterial templates. *ATROA*. 2019;5(1): 11–19. DOI: 10.15406/atroa.2019.05.00093
112. Li M, Tian W, Zhang Y, Song H, Yu Y, Chen X, et al. Enhanced Silk Fibroin/Sericin Composite Film: Preparation, Mechanical Properties and Mineralization Activity. *Polymers (Basel)*. 2022;14(12):2466. DOI: 10.3390/polym14122466
113. Wang F, Guo C, Yang Q, Li C, Zhao P, Xia Q, et al. Protein composites from silkworm cocoons as versatile biomaterials. *Acta Biomater*. 2021;121:180–192. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.11.037
114. Han C, Liu F, Zhang Y, Chen W, Luo W, Ding F, et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes Delivered Using Silk Fibroin and Sericin Composite Hydrogel Promote Wound Healing. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:713021. DOI: 10.3389/fcvm.2021.713021

115. Ohnishi K, Murakami M, Morikawa M, Yamaguchi A. Effect of the silk protein sericin on cryopreserved rat islets. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2012;19(4):354–360. DOI: 10.1007/s00534-011-0415-4
116. Miyamoto Y, Oishi K, Yukawa H, Noguchi H, Sasaki M, Iwata H, et al. Cryopreservation of human adipose tissue-derived stem/progenitor cells using the silk protein sericin. *Cell Transplant.* 2012;21(2-3):617–622. DOI: 10.3727/096368911X605556
117. Jo Y, Kweon H, Ji S, Kim J, Kim K. Silk Protein as a Fetal Bovine Serum Substitute for Animal Cell Culture. *Microbiology and Biotechnology Letters.* 2019;47(4):487–497. DOI: 10.4014/mbl.1901.01015
118. Sezutsu H, Sumitani M, Kondo M, Kobayashi I, Takasu Y, Suzuki T, et al. Construction of a Platform for the Development of Pharmaceutical and Medical Applications Using Transgenic Silkworms. *Yakugaku Zasshi.* 2018;138(7):863–874. DOI: 10.1248/yakushi.17-00202-1
119. Biopharma-reporter.com. Vaxess announces \$9 million in funding for mRNA vaccine patch (2023). <https://www.biopharma-reporter.com/Article/2023/09/14/vaxess-announces-9-million-funding-for-mrna-vaccine-patch> [Accessed Dec 14, 2023].
120. Horizon Magazine. Spinning silk into next-generation eye and knee implants (2023). <https://projects.research-and-innovation.ec.europa.eu/en/horizon-magazine/spinning-silk-next-generation-eye-and-knee-implants> [Accessed Dec 15, 2023].
121. Lee HG, Jang MJ, Park B-D, Um IC. Structural Characteristics and Properties of Redissolved Silk Sericin. *Polymers (Basel).* 2023;15(16):3405. DOI: 10.3390/polym15163405

Об авторах

Юматов Евгений Николаевич — индивидуальный предприниматель, научный сотрудник Научно-исследовательской станции шелководства — филиала ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр»

Евлагина Елена Григорьевна — директор Научно-исследовательской станции шелководства — филиала ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр»

Евлагин Виктор Григорьевич — научный сотрудник Научно-исследовательской станции шелководства — филиала ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр»

Лейнвебер Евдокия Федотовна — кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник Научно-исследовательской станции шелководства — филиала ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр»

Товпеко Дмитрий Викторович — младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории (военной терапии) научно-исследовательского отдела (экспериментальной медицины) научно-исследовательского центра Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова

Дебенюк Семён Сергеевич — старший лаборант научно-исследовательской лаборатории (тканевой инженерии) научно-исследовательского отдела (медико-биологических исследований) научно-исследовательского центра Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова

Authors

Evgeniy N. Yumatov — individual entrepreneur, researcher Research Station of Sericulture — branch of the North Caucasus federal agricultural research centre

Elena G. Evlagina — director of the RS of Sericulture — branch of the North Caucasus FARC

Viktor G. Evlagin — researcher Research Station of Sericulture — branch of the North Caucasus federal agricultural research centre

Evdokia F. Leinweber — Ph.D. of Agricultural Sciences, senior researcher Research Station of Sericulture — branch of the North Caucasus federal agricultural research centre

Юматов Е.Н., Евлагина Е.Г., Евлагин В.Г., Лейнвебер Е.Ф., Товпеко Д.В., Дебенюк С.С.

Возможности биотехнологической платформы тутового шелкопряда (*B. mori*) для регенеративной медицины

Dmitry V. Tovpeko — junior researcher of the Research Laboratory of military therapy of the Research Department of experimental medicine of the Research Center of the S.M. Kirov Military Medical Academy

Semyon S. Debenok — senior laboratory assistant of Research Laboratory of tissue engineering of the Research Department of medical and biological research of the Research Center of the S.M. Kirov Military Medical Academy