

DOI: 10.15825/1995-1191-2026-2-163-172

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АДГЕЗИИ И ПРОЛИФЕРАЦИИ ФИБРОБЛАСТОВ ЛИНИИ NIH 3T3 НА ПОКРЫТИЯХ ИЗ ФИБРОИНА ДОМАШНЕГО И ДИКОГО ШЕЛКА И ИХ КОМПОЗИТАХ С ХИТОЗАНОМ

О. Досу<sup>1, 2</sup>, Е.И. Подболотова<sup>1, 2</sup>, О.И. Агапова<sup>1</sup>, А.Е. Ефимов<sup>1</sup>, И.И. Агапов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет)», Долгопрудный, Московская область, Российская Федерация

**Цель:** оценить *in vitro* цитотоксичность, адгезию и пролиферацию фибробластов на пленочных покрытиях из фиброина домашнего шелка *Bombyx mori*, фиброина дикого шелка (Tussah) и их композитов с хитозаном. **Материалы и методы.** В работе исследовали четыре типа пленочных покрытий: фиброин *Bombyx mori*, фиброин дикого шелка, а также их композиты с хитозаном. Покрытия получали методом литья водных растворов с последующей сушкой. Цитотоксичность оценивали в соответствии с ГОСТ Р ИСО 10993-5 методом исследования экстрактов. Адгезию фибробластов линии NIH 3T3 оценивали через 1 час после засева клеток на покрытия, пролиферацию – на 1-е, 2-е и 3-и сутки. Количество клеток определяли после окрашивания ядер 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) с использованием флуоресцентной микроскопии и автоматизированного анализа изображений. В качестве групп сравнения использовали культуральный пластик с чистой средой и средой с добавлением этилендиаминтетрауксусной кислоты или диметилсульфоксида. **Результаты.** Все исследованные покрытия поддерживали жизнеспособность фибробластов; показатели их метаболической активности находились на уровне, сопоставимом со значениями, полученными для культурального пластика. Установлено, что адгезия и пролиферация клеток на покрытиях из фиброина дикого шелка были эффективнее по сравнению с покрытиями из фиброина *Bombyx mori* на всех временных точках. Введение хитозана приводило к дополнительному увеличению числа адгезированных и пролиферирующих клеток. Наибольшие значения клеточного ответа зафиксированы для композитных покрытий на основе фиброина дикого шелка и хитозана. **Заключение.** Пленочные покрытия на основе фиброина дикого шелка демонстрируют повышенную способность поддерживать адгезию и пролиферацию фибробластов *in vitro* – более чем в 2 раза выше, чем фиброин *Bombyx mori* с хитозаном. Композитные системы с включением хитозана дополнительно усиливают эти свойства, что делает их перспективными кандидатами для разработки функциональных биомедицинских покрытий.

*Ключевые слова:* фиброин шелка, дикий шелк, Тусса, хитозан.

**Для корреспонденции:** Агапов Игорь Иванович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (495) 231-60-42. E-mail: igor\_agapov@mail.ru

**Corresponding author:** Igor Agapov. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (495) 231-60-42. E-mail: igor\_agapov@mail.ru

# A COMPARATIVE STUDY OF NIH 3T3 FIBROBLAST ADHESION AND PROLIFERATION ON COATINGS OF DOMESTIC AND WILD SILK FIBROIN AND THEIR CHITOSAN COMPOSITES

O. Dosi<sup>1, 2</sup>, E.I. Podbolotova<sup>1, 2</sup>, O.I. Agapova<sup>1</sup>, A.E. Efimov<sup>1</sup>, I.I. Agapov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russian Federation

**Objective:** To evaluate the *in vitro* cytotoxicity, adhesion, and proliferation of fibroblasts on film coatings made of *Bombyx mori* silk fibroin, wild silk (Tussah) fibroin, and their chitosan composites. **Materials and methods.** Four types of film coatings were investigated: *Bombyx mori* fibroin, wild silk fibroin, and their respective chitosan composites. The coatings were fabricated by casting aqueous polymer solutions followed by drying. Cytotoxicity was assessed in accordance with GOST R ISO 10993-5 using the extract assay method. NIH 3T3 fibroblast adhesion was evaluated 1 hour after seeding, while proliferation was assessed on days 1, 2, and 3 of culture. Cell quantification was performed following nuclear staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) using fluorescence microscopy combined with automated image analysis. Culture dishes containing sterile medium and medium supplemented with ethylenediaminetetraacetic acid or dimethyl sulfoxide served as control groups. **Results.** All tested coatings supported fibroblast viability, with metabolic activity levels comparable to those observed on standard culture plastic. Fibroblast adhesion and proliferation were consistently higher on wild silk fibroin coatings compared with *Bombyx mori* fibroin coatings at all time points. The incorporation of chitosan further enhanced both cell adhesion and proliferation. The most pronounced cellular response was observed on composite coatings based on wild silk fibroin and chitosan. **Conclusion.** Film coatings based on wild silk fibroin demonstrate an enhanced ability to support fibroblast adhesion and proliferation *in vitro* – more than twice as high as that of *Bombyx mori* fibroin with chitosan. Composite systems incorporating chitosan further enhance these properties, making them promising candidates for the development of functional biomedical coatings.

**Keywords:** silk fibroin, wild silk, Tussah, chitosan.

## ВВЕДЕНИЕ

Фибробласты играют ключевую роль в процессах репарации и регенерации тканей, обеспечивая синтез компонентов внеклеточного матрикса, сокращение раневого дефекта и ремоделирование поврежденных участков. Эффективность заживления во многом определяется способностью фибробластов адгезировать к матриксам и активно пролиферировать [1]. Поэтому характер взаимодействия клеток с поверхностью биоматериала является одним из определяющих факторов для покрытий, пленок и других систем, предназначенных для применения в раневой терапии и регенеративной медицине.

Клеточный ответ на поверхности материалов определяется совокупностью физико-химических и биохимических свойств, включая химический состав и заряд поверхности, микрорельеф и наличие адгезивных лигандов. После контакта материала с биологической средой на его поверхности происходит адсорбция сывороточных белков. Именно сформированный белковый слой обеспечивает адгезию клеток посредством взаимодействия с интегриновыми рецепторами и запускает внутриклеточные сигнальные механизмы, регулирующие организацию цитоскелета, миграцию и пролиферацию [2, 3]. В связи с этим оценка адгезии и пролиферации фибробластов

широко используется для сравнительного анализа биологических свойств новых покрытий и биоматериалов [4].

Фиброин шелка относится к числу наиболее изученных и перспективных белковых биоматериалов благодаря сочетанию механической прочности, биосовместимости и технологической универсальности [5, 6]. Его молекулярная структура характеризуется способностью формировать  $\beta$ -слои, что обеспечивает стабильность белка в физиологических условиях [7]. Кроме того, фиброин позволяет получать различные формы материалов – пленки, скаффолды, гидрогели и покрытия – при относительно простых условиях обработки [8, 9–11]. Эти особенности обуславливают широкое использование фиброина в качестве модельного материала при изучении реакции клеток на поверхность биоматериалов [6, 12].

Наиболее распространенным источником фиброина в биоматериаловедении является шелк тутового шелкопряда *Bombyx mori* (домашний шелк), структура и свойства которого уже детально охарактеризованы [5, 8]. Показано, что фиброин *Bombyx mori* поддерживает адгезию и рост различных типов клеток и часто используется как эталонный материал для сравнительных исследований [13]. В то же время фиброин дикого шелка, например шелка Тусса

(Tussah), отличается по аминокислотной последовательности и структуре и содержит RGD-мотивы, способствующие интегрин-зависимой адгезии клеток [2, 6]. Несмотря на это, в литературе представлены лишь единичные исследования, посвященные сопоставлению пленочных покрытий из фиброина дикого шелка и фиброина *Bombyx mori*, полученных в идентичных технологических условиях.

Помимо естественного наличия RGD-мотивов, адгезию клеток на поверхности можно дополнительно повысить путем модификации материала биополимерами. Так, хитозан представляет особый интерес благодаря биосовместимости, положительному заряду и способности усиливать адсорбцию белков и клеточную адгезию [14]. Вместе с тем большинство опубликованных работ посвящено изучению отдельных материалов, тогда как комплексные сравнительные исследования различных источников фиброина и их композитов с хитозаном в сопоставимых условиях встречаются относительно редко.

В связи с этим целью настоящей работы являлось сравнительное исследование адгезии и пролиферации фибробластов *in vitro* на пленочных покрытиях из фиброина домашнего шелка *Bombyx mori*, фиброина дикого шелка Тусса и их композитов с хитозаном.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Получение раствора фиброина шелка *Bombyx mori*

Раствор фиброина домашнего шелка получали из коконов шелкопряда *Bombyx mori*, которые были предоставлены директором Государственного научного учреждения «Республиканская научно-исследовательская станция шелководства Российской академии сельскохозяйственных наук» В.В. Богословским (Ставропольский край, г. Железноводск). Раствор получали по ранее описанной методике с незначительными модификациями [15]. Коконы измельчали и очищали от серицина (дегуммировали) в водном растворе гидрокарбоната натрия концентрацией 2,5 мг/мл (HiMedia Laboratories, Индия) при температуре 80 °С в течение 80 мин. После удаления серицина материал промывали для удаления остаточных солей: трижды выдерживали в дистиллированной воде при 99 °С по 30 минут с промежуточным ополаскиванием при комнатной температуре. Очищенный материал тщательно высушивали при 85 °С.

Растворение очищенного фиброина проводили в смеси дистиллированной воды, 95% этанола (КОНСТАНТА-ФАРМ М, Россия) и хлорида кальция (Sharlab S.L., Испания) в молярном соотношении 8 : 2 : 1 соответственно. Растворение осуществляли при непрерывном перемешивании при 90 °С в течение 40 мин до получения однородного раствора. Очистку раствора от хлорида кальция и этанола проводили методом десятикратного диализа в дистил-

лированной воде при 20 °С с интервалами 30 мин между сменами воды. После диализа раствор центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин на центрифуге SIGMA 6K10 2000W (Sigma, Германия) для удаления нерастворимых частиц. Перед использованием готовый раствор доводили до концентраций 20 мг/мл для покрытий из чистого фиброина и 40 мг/мл для приготовления покрытий с хитозаном.

### Получение раствора фиброина дикого шелка (Tussah)

Ткань из дикого шелка Tussah (декларация о соответствии EAC N RU Д-CN.PA09.B.91575/23, Tianjin Textile Industrial Supply And Sale Co., Ltd, Китай) предварительно дегуммировали по той же методике, что и коконы *Bombyx mori*, с целью удаления серицина. После дегуммирования и тщательной промывки дистиллированной водой высушенные волокна растворяли в спиртовом растворе нитрата кальция (CDH, Индия), приготовленном при молярном соотношении спирта и нитрата кальция 2 : 1 [16]. Обработку проводили до полного растворения шелковых волокон. Полученный раствор очищали от нитрата кальция и этанола методом десятикратного диализа по аналогичной схеме, описанной для фиброина *Bombyx mori*, после чего доводили до рабочих концентраций – 20 мг/мл для покрытий из чистого фиброина и 40 мг/мл для приготовления покрытий с хитозаном.

### Получение растворов фиброина с хитозаном

Водорастворимый хитозан («Биопрогресс», Россия; степень деацетилирования 75–95%, молекулярная масса 50–80 кДа) растворяли в дистиллированной воде при комнатной температуре при мягком перемешивании в течение 1 часа до получения однородного раствора с концентрацией 40 мг/мл. Полученный раствор хитозана смешивали с водными растворами фиброина шелка *Bombyx mori* и дикого шелка Тусса (40 мг/мл) в объемном соотношении 1 : 1 до получения однородных растворов. Конечная концентрация каждого компонента составляла 20 мг/мл, что соответствует массовому соотношению фиброин : хитозан = 1 : 1. Выбор конечной концентрации фиброина и хитозана (20 мг/мл) обусловлен необходимостью получения однородных стабильных систем, пригодных для формирования равномерных покрытий без признаков фазового разделения и существенного увеличения вязкости растворов. Данная концентрация фиброина используется как стандартная рабочая в серии предыдущих исследований [17] и обеспечивает воспроизводимое получение покрытий и сопоставимость результатов. Соотношение компонентов 1 : 1 было выбрано для оценки вклада каждого полимера в формирование клеточного ответа.

## Получение покрытий

Покрытия получали методом литья растворов фиброина шелка *Bombyx mori* и дикого шелка Tussah с добавлением или без добавления хитозана в чашки Петри диаметром 35 мм (Corning, США). Для каждого покрытия использовали по 1 мл соответствующего раствора. Образцы сушили при комнатной температуре в течение 48 ч. Перед использованием покрытия стерилизовали – в каждую чашку Петри вносили 70% раствор этанола в объеме, обеспечивающем полное покрытие поверхности материала и стенок чашки (2–3 мл), после чего высушивали в стерильных условиях. Перед нанесением клеток покрытия промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) не менее 5 раз для удаления остаточных следов этанола.

## Условия культивирования клеток

В работе использовали мышинные фибробласты линии NIH 3T3. Клетки культивировали в среде DMEM («ПанЭко», Россия), дополненной 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США) и раствором гентамицина (Sigma, Израиль). Культивирование проводили при температуре 37 °С в увлажненной атмосфере с содержанием 5% CO<sub>2</sub> в инкубаторе MCO-15AC (Sanyo, Япония) в культуральных флаконах площадью 75 см<sup>2</sup> (Costar, США). Пассирование клеток осуществляли с использованием 0,25% раствора трипсин-ЭДТА («ПанЭко», Россия). Морфологию клеток регулярно контролировали с помощью инвертированного микроскопа Axiovert 405M (ZEISS, Германия). Перед проведением экспериментов клетки поддерживали в диапазоне конfluence-энтности 20–80%. Все манипуляции с клеточными культурами выполняли в стерильных условиях в ламинарном боксе MSC.12 NF IX BROSS (JOUAN, Франция).

## Оценка цитотоксичности (МТТ-тест)

Цитотоксичность покрытий оценивали методом исследования экстрактов в соответствии с ГОСТ Р ИСО 10993-5. Экстракты получали путем инкубации образцов в культуральной среде при 37 °С в течение 24 ч при соотношении площади поверхности образца к объему среды 3 см<sup>2</sup> на 1 мл. Полученные экстракты использовали без дополнительного разведения.

Фибробласты NIH 3T3 высевали в 96-луночные планшеты (Costar, США) с плотностью 1,5 × 10<sup>4</sup> клеток/лунку и инкубировали в течение 24 ч. Затем культуральную среду заменяли соответствующими экстрактами и продолжали инкубацию еще 24 ч. В качестве групп сравнения использовали чистую среду и среду с добавлением 5% (об./об.) DMSO (PanReac, Германия).

После инкубации в лунки добавляли реагент МТТ (CDH, Индия) до конечной концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали планшеты при 37 °С в течение 3 ч.

Образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в DMSO, после чего оптическую плотность измеряли при длине волны 540 нм с использованием ридера Multiskan Ascent (Thermo LabSystems, Финляндия). Метаболическую активность клеток оценивали по значениям оптической плотности относительно групп сравнения.

## Исследование адгезии и пролиферации клеток

Для исследования адгезии фибробласты NIH 3T3 высевали на полученные покрытия с плотностью 1,4 × 10<sup>5</sup> клеток на чашку и инкубировали в течение 1 часа в стандартных условиях культивирования. В качестве групп сравнения использовали культуральный пластик с чистой средой и среду, содержащую 2 мМ ЭДТА (PanReac, Германия). После инкубации неадгезировавшие клетки и клеточный детрит удаляли путем мягкой промывки.

Для оценки пролиферации фибробласты NIH 3T3 высевали на покрытия с плотностью 7,2 × 10<sup>4</sup> клеток на чашку Петри и культивировали в течение 3 суток с анализом на 1-е, 2-е и 3-и сутки. В качестве групп сравнения использовали культуральный пластик с чистой средой и со средой с добавлением DMSO. Для удаления неадгезировавших и погибших клеток замену среды проводили один раз на 1-е сутки; дальнейшие замены среды не осуществляли с целью минимизации риска контаминации. На протяжении всего эксперимента использовали одну и ту же полную культуральную среду.

По завершении инкубации клетки фиксировали 4% раствором параформальдегида (PanReac, Германия) в течение 5 мин в объеме, достаточном для полного покрытия поверхности материала. После промывки образцы инкубировали в растворе Triton X-100 концентрацией 0,4% (Sigma-Aldrich, США) в течение 5 мин с последующей промывкой фосфатно-солевым буфером (ServiceBio, Китай). Далее образцы инкубировали в 1 мл фосфатно-солевого буфера, содержащего 1 мкл DAPI (Lumiprobe, Россия). Флуоресцентную съемку проводили с использованием микроскопа Axio Vert.A1 (ZEISS, Германия) при идентичных параметрах регистрации для всех образцов.

## Обработка изображений и количественный анализ клеток

Флуоресцентные изображения обрабатывали и анализировали с использованием программного обеспечения Fiji/ImageJ. Для обеспечения воспроизводимости и минимизации пользовательской предвзятости ко всем изображениям применяли единый автоматизированный алгоритм анализа. Этапы обработки включали преобразование изображений в 8-битный формат, снижение фоновой флуоресцен-

ции, коррекцию контраста и бинаризацию изображений.

Количественный учет клеток осуществляли методом автоматического анализа частиц с идентификацией и подсчетом окрашенных ядер на основе заранее заданных пороговых значений по размеру и округлости. Перекрывающиеся ядра обрабатывались программным обеспечением с использованием одинаковых параметров для всех образцов. Алгоритм автоматически анализировал все изображения в заданной папке, формировал сводные таблицы с числом клеток и сохранял аннотированные изображения с выделенными контурами ядер для визуальной верификации.

Изображения получали из случайно выбранных областей в пределах центральной зоны чашки Петри диаметром около 2 см. Для основного количественного анализа использовали по 10 полей зрения каждого образца. Для оценки варибельности дополнительно выделяли области интереса внутри изображений, а полученные значения масштабировали к полной площади изображения при представлении данных. Для всех экспериментальных групп использовали идентичные параметры съемки и обработки изображений.

## Анализ данных

Количественные данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартное отклонение для каждого показателя. Для экспериментов по цитотоксичности результаты МТТ-теста выражены в виде значений оптической плотности, нормированных относительно группы с чистой средой. Для экспериментов по адгезии и пролиферации количественные данные получали на основе автоматического подсчета окрашенных ядер. Статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием теста ANOVA, при этом значения  $p < 0,05$  считались статистически значимыми.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Цитотоксичность

Цитотоксическое воздействие экстрактов покрытий на фибробласты оценивали с использованием МТТ-теста (рис. 1).

По результатам МТТ-теста группа с добавлением цитотоксического агента характеризовалась заметно более низкими значениями оптической плотности по сравнению с другими экспериментальными группами. Все исследованные покрытия и группа с чистой средой демонстрировали близкие между собой значения оптической плотности, без выраженных различий между образцами. Статистический анализ показал отсутствие значимых различий между экспериментальными группами и средой без добавок ( $p > 0,05$ ), что указывает на отсутствие заметного цитотоксического воздействия исследованных ма-

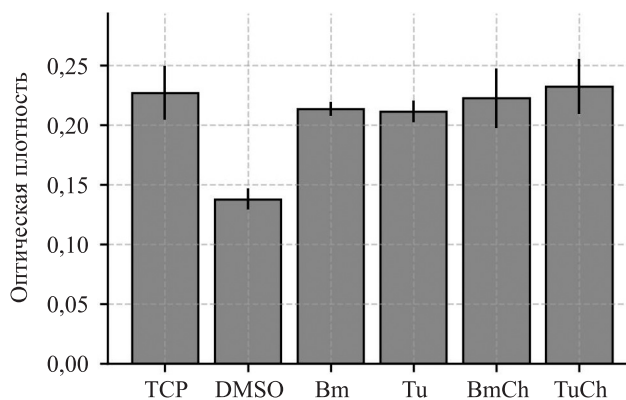


Рис. 1. Оценка цитотоксичности пленочных покрытий методом МТТ-теста. Метаболическая активность фибробластов линии NIH 3T3 после инкубации с экстрактами покрытий из фиброина *Bombyx mori* (Bm), фиброина *Bombyx mori* с хитозаном (BmCh), фиброина дикого шелка (Tu) и фиброина дикого шелка с хитозаном (TuCh). Контроль: культуральный пластик (TCP), клетки в стандартной культуральной среде; культуральный пластик (DMSO), клетки в среде с добавлением цитотоксического агента. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. Оптическая плотность измерена при длине волны 540 нм

Fig. 1. Assessment of cytotoxicity of film coatings using the MTT assay. Metabolic activity of NIH 3T3 fibroblasts after incubation with extracts of coatings based on *Bombyx mori* fibroin (Bm), *Bombyx mori* fibroin with chitosan (BmCh), wild silk fibroin (Tu), and wild silk fibroin with chitosan (TuCh). Controls included tissue culture plastic (TCP); cells in standard culture medium and DMSO-treated cells (medium supplemented with a cytotoxic agent). Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation. Optical density was measured at 540 nm

териалов и сохранение жизнеспособности клеток в условиях проведенного эксперимента.

### Адгезия клеток

Результаты оценки адгезии клеток после 1 часа инкубации представлены на рис. 2.

Адгезия клеток фибробластов на исследованных покрытиях была существенно выше по сравнению с группой с EDTA, демонстрирующим снижение начальной адгезии. Все покрытия способствовали более высокой адгезии по сравнению со средой без добавок. Покрытия из фиброина *Bombyx mori* и дикого шелка обеспечивали сопоставимый уровень прикрепления клеток, тогда как их композиты с хитозаном увеличивали число прикрепившихся клеток примерно на 20–25% по сравнению с чистыми покрытиями.

### Пролиферация клеток

Результаты исследования пролиферации клеток представлены количественными данными и характерными микроскопическими изображениями клеточного роста (рис. 3, 4).

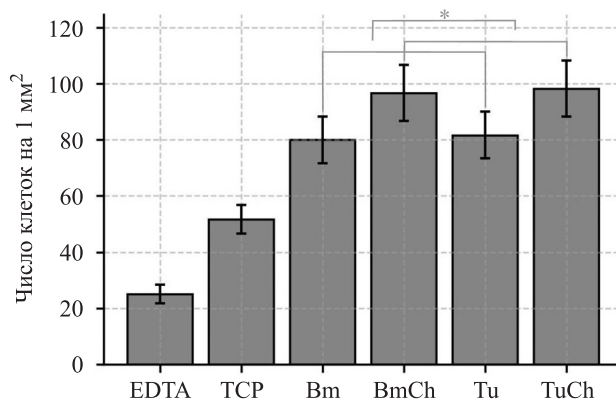


Рис. 2. Оценка адгезии фибробластов на пленочных покрытиях через 1 ч культивирования. Число фибробластов линии NIH 3T3, адгезировавших на покрытиях из фиброина *Bombyx mori* (Bm), фиброина *Bombyx mori* с хитозаном (BmCh), фиброина дикого шелка (Tu) и фиброина дикого шелка с хитозаном (TuCh). Культуральный пластик (TCP), клетки в стандартной культуральной среде; культуральный пластик (EDTA), клетки в среде с добавлением EDTA. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. \* –  $p < 0,05$

Fig. 2. Assessment of fibroblast adhesion to film coatings after 1 hour of culture. Number of NIH 3T3 fibroblasts adhering to coatings based on *Bombyx mori* fibroin (Bm), *Bombyx mori* fibroin with chitosan (BmCh), wild silk fibroin (Tu), and wild silk fibroin with chitosan (TuCh). Controls included tissue culture plastic (TCP; cells in standard culture medium) and EDTA-treated culture plastic (cells in medium supplemented with EDTA). Data are presented as mean ± standard deviation.  $p < 0.05$

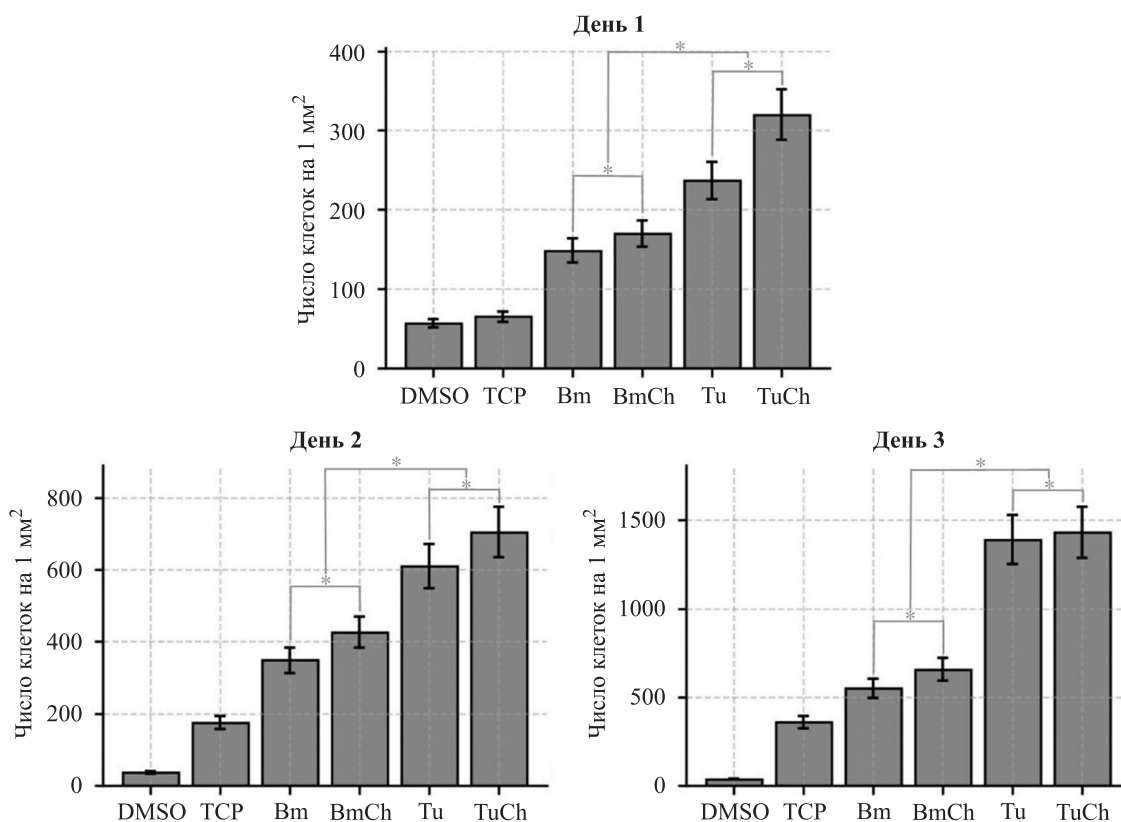


Рис. 3. Пролиферация фибробластов на пленочных покрытиях в течение 3 суток культивирования. Число фибробластов линии NIH 3T3 на покрытиях из фиброина *Bombyx mori* (Bm), фиброина *Bombyx mori* с хитозаном (BmCh), фиброина дикого шелка (Tu) и фиброина дикого шелка с хитозаном (TuCh) через 1, 2 и 3 суток после засева. Культуральный пластик (TCP), клетки в стандартной культуральной среде; культуральный пластик (DMSO), клетки в среде с добавлением цитотоксического агента. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. \* –  $p < 0,05$

Fig. 3. Fibroblast proliferation on film coatings over a 3-day culture period. Number of NIH 3T3 fibroblasts on coatings based on *Bombyx mori* fibroin (Bm), *Bombyx mori* fibroin with chitosan (BmCh), wild silk fibroin (Tu), and wild silk fibroin with chitosan (TuCh) at 1, 2, and 3 days after seeding. Controls included tissue culture plastic (TCP; cells in standard culture medium) and DMSO-treated cells (culture medium supplemented with a cytotoxic agent). Data are presented as mean ± standard deviation.  $p < 0.05$

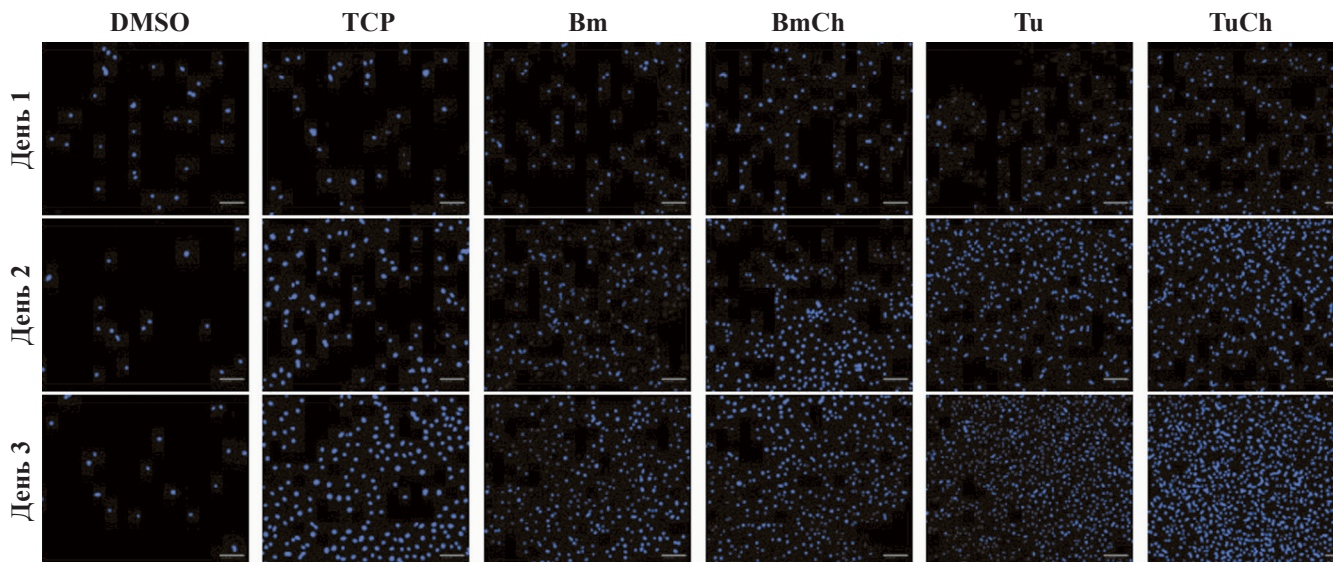


Рис. 4. Репрезентативные флуоресцентные изображения фибробластов на пленочных покрытиях в процессе пролиферации. Фибробласты линии NIH 3T3, окрашенные DAPI, на покрытиях из фиброина *Bombyx mori* (Bm), фиброина *Bombyx mori* с хитозаном (BmCh), фиброина дикого шелка (Tu) и фиброина дикого шелка с хитозаном (TuCh), в чистой среде (TCP) и среде с DMSO (DMSO) через 1, 2 и 3 суток культивирования. Масштабная линейка 100 мкм

Fig. 4. Representative fluorescence microscopy images of fibroblasts cultured on film coatings during the proliferation. NIH 3T3 fibroblasts were stained with DAPI and cultured on coatings based on *Bombyx mori* fibroin (Bm), *Bombyx mori* fibroin with chitosan (BmCh), wild silk fibroin (Tu), and wild silk fibroin with chitosan (TuCh), as well as on tissue culture plastic in standard medium (TCP) and in medium supplemented with DMSO (DMSO), after 1, 2, and 3 days of culture. Scale bar: 100  $\mu$ m

В группе с DMSO число клеток было существенно снижено на всех временных точках. В группе с чистой средой наблюдалось стабильное увеличение числа клеток в течение всего периода культивирования.

Все исследованные покрытия поддерживали рост клеток на протяжении всего эксперимента. Уже на 1-е сутки количество фибробластов на покрытии из фиброина дикого шелка Tussah было примерно на 60% выше, чем на покрытии из фиброина домашнего шелка *Bombyx mori*, и на 41% выше, чем на покрытии *Bombyx mori* с хитозаном.

На 2-е сутки разница между покрытием из фиброина дикого шелка и покрытием из композита фиброина домашнего шелка с хитозаном достигала 44%, а на 3-й день превысила 100%. Покрытия из дикого шелка стабильно обеспечивали более высокий рост клеток по сравнению с покрытием из домашнего шелка *Bombyx mori* с хитозаном на всех временных точках, а включение хитозана дополнительно усиливало пролиферацию.

Таким образом, полученные данные демонстрируют устойчивое преимущество покрытий из дикого шелка Tussah и его композитов с хитозаном в стимулировании пролиферации фибробластов *in vitro*.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе были исследованы покрытия на основе фиброина *Bombyx mori*, фиброина дикого

шелка (Tussah) и их композитов с хитозаном. Исследовалась их цитотоксичность, а также способность поддерживать адгезию и пролиферацию фибробластов *in vitro*. Все исследованные материалы обеспечивали сохранение жизнеспособности клеток, что указывает на отсутствие выраженных цитотоксических эффектов и свидетельствует о том, что наблюдаемые различия в клеточном ответе обусловлены особенностями клеточно-поверхностных взаимодействий, а не токсичностью материалов. Использование фиброина *Bombyx mori* в качестве базового эталонного материала позволило сфокусироваться на сравнительном анализе вклада физико-химической характеристики поверхности и внутренних биохимических сигналов в регуляцию клеточного поведения на покрытиях.

Оценка ранней адгезии проводилась через 1 час после засева – на временной точке, когда фибробласты взаимодействуют с подложкой в округлом, не поляризованном состоянии и еще не сформировали устойчивых фокальных контактов [18]. В этих условиях успешная адгезия клеток связана с сохранением транзиторных интегрин-поверхностных контактов, достаточных для инициации перестройки цитоскелета и последующего расплывания [19]. По сравнению с фиброином *Bombyx mori* покрытия, содержащие хитозан, обеспечивали более высокое число адгезировавших клеток, тогда как фиброин дикого

шелка демонстрировал сопоставимые уровни ранней адгезии. Усиление ранней адгезии на композитах с хитозаном согласуется с ролью хитозана как стабилизирующего компонента, способствующего электростатическим взаимодействиям и адсорбции белков, что увеличивает время жизни первичных контактов клетки с поверхностью [20]. В то же время сходные уровни ранней адгезии, наблюдаемые у фиброина дикого шелка и фиброина *Bombyx mori*, указывают на то, что показатели начального прикрепления не полностью отражают материал-зависимые различия, проявляющиеся при более длительном культивировании.

В ходе оценки пролиферации данные различия становились более выраженными и демонстрировали устойчивую иерархию, при которой покрытия на основе фиброина дикого шелка обеспечивали более высокую плотность клеток по сравнению с покрытиями на основе фиброина *Bombyx mori* на всех временных точках. Примечательно, что фиброин дикого шелка в виде однокомпонентного материала превосходил по уровню пролиферации композит фиброина *Bombyx mori* с хитозаном, несмотря на более выраженную раннюю адгезию на последнем. Это наблюдение свидетельствует о том, что улучшение начального прикрепления или стабилизация поверхности сами по себе не являются достаточными для объяснения устойчивого клеточного роста, и указывает на существование различных механизмов, регулирующих адгезию на этапе первичного контакта и в ходе последующих циклов клеточного деления.

Пролиферация адгезированных фибробластов требует успешной повторной адгезии после митоза – фазы, в которой клетки округляются, разборки фокальных контактов и перераспределения интегринов. После цитокинеза каждая дочерняя клетка должна быстро восстановить интегрин-опосредованные контакты с подложкой для распластывания, генерации тяговых сил и повторного входа в клеточный цикл. При ограниченной доступности адгезивных сигналов процесс постмитотической повторной адгезии приобретает вероятностный характер, в результате чего даже незначительные различия в доступности лигандов могут существенно влиять на вероятность сохранения стабильной адгезии обеими дочерними клетками. В этом контексте биохимические сигналы, непосредственно поддерживающие кластеризацию интегринов и последующую передачу сигналов, играют определяющую роль. Соответственно, стабильно более высокая пролиферация на фиброине дикого шелка указывает на то, что внутренние молекулярные особенности данного материала повышают вероятность успешной постмитотической повторной адгезии и поддержания интегрин-опосредованной сигнализации.

Представленная концепция позволяет объяснить, почему фиброин дикого шелка превосходит композит фиброина *Bombyx mori* с хитозаном по показателям пролиферации. В то время как хитозан улучшает раннюю адгезию за счет стабилизации неспецифических взаимодействий, он не вносит новых интегрин-специфических адгезивных мотивов. Напротив, фиброин дикого шелка содержит последовательности, ассоциированные с клеточной адгезией, включая RGD-мотивы, которые могут способствовать рецепторному связыванию в критический постмитотический период. В результате фиброин дикого шелка способен поддерживать более эффективное клеточное размножение во времени даже без добавления дополнительных стабилизирующих компонентов. С точки зрения материаловедения это является принципиально важным результатом, демонстрирующим, что природный биологически активный полимер может превосходить композитные системы, созданные для компенсации ограничений традиционного фиброина.

Наибольшее суммарное число клеток наблюдалось на композитных покрытиях из фиброина дикого шелка с хитозаном, что указывает на синергетический эффект данных компонентов. В этом случае хитозан повышает стабильность начального прикрепления и снижает потери клеток на ранних этапах, тогда как фиброин дикого шелка обеспечивает биохимические сигналы, увеличивающие вероятность успешной повторной адгезии в процессе и после митоза. Совокупность этих эффектов формирует поверхность, способную поддерживать как устойчивую раннюю адгезию, так и эффективную долгосрочную пролиферацию. Стабильное превосходство композитных покрытий из фиброина дикого шелка с хитозаном в тестах как на адгезию, так и на пролиферацию указывает на то, что интеграция фиброина дикого шелка с хитозаном является эффективной стратегией максимизации биологической эффективности шелковых систем.

В целом, выявленная последовательность – *Bombyx mori* < *Bombyx mori* с хитозаном < Tussah < Tussah с хитозаном – подчеркивает, что ранняя адгезия и устойчивый клеточный рост регулируются различными, но взаимодополняющими механизмами. Если на начальной стадии доминирует поверхностно-опосредованная стабилизация контактов, то долговременная пролиферация в большей степени определяется способностью материала поддерживать интегрин-опосредованную сигнализацию на протяжении последовательных клеточных циклов.

Полученные данные показывают, что фиброин дикого шелка может служить перспективной альтернативой традиционному фиброину *Bombyx mori* для биоматериалов, и выделяют композиты на основе дикого шелка и хитозана как еще более эффективные

субстраты для стимуляции пролиферации фибробластов. Вместе с тем следует учитывать, что все выводы основаны на использовании иммортализованной мышины клеточной линии NIH 3T3, которая отражает лишь общий характер клеточного ответа *in vitro* и не в полной мере воспроизводит поведение первичных человеческих дермальных фибробластов. Поэтому полученные результаты следует рассматривать как сравнительное исследование, требующее дальнейшей валидации на первичных клетках человека и более физиологически релевантных моделях.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе были получены и исследованы покрытия на основе фиброина *Bombyx mori*, фиброина дикого шелка и их композитов с хитозаном с целью оценки адгезии и пролиферации фибробластов *in vitro*. Все исследованные материалы продемонстрировали хорошую цитосовместимость и поддерживали прикрепление и рост клеток, что подтверждает их пригодность для применения в качестве клеточно-поддерживающих поверхностных материалов.

Сравнительный анализ показал, что как введение хитозана, так и использование фиброина дикого шелка приводят к усилению клеточного ответа по сравнению с фиброином *Bombyx mori*. Покрытия с добавлением хитозана способствовали улучшенной ранней адгезии клеток, тогда как покрытия на основе фиброина дикого шелка обеспечивали более высокий уровень клеточной пролиферации с течением времени, превышая в два раза показатели пролиферации на композитном покрытии из фиброина *Bombyx mori* с хитозаном. Наиболее выраженные биологические показатели были зафиксированы для композитных покрытий на основе фиброина дикого шелка с хитозаном, что отражает благоприятное сочетание свойств данных компонентов.

Полученные данные подчеркивают перспективность использования фиброина дикого шелка не только в качестве альтернативы традиционному фиброину *Bombyx mori* для создания пленочных биоматериалов, но и для разработки различных типов биоматериалов на его основе. Комбинирование фиброина дикого шелка с хитозаном демонстрирует потенциал для усиления клеточно-поверхностных взаимодействий и повышения функциональной активности таких материалов.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Tremel A, Cai A, Tirtaatmadja N, Hughes BD, Stevens GW, Landman KA et al. Cell migration and proliferation during monolayer formation and wound healing. *Chem Eng Sci.* 2009; 64: 247–253. doi: 10.1016/j.ces.2008.10.008.
2. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002; 110 (6): 673–687. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00971-6.
3. Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; 11: 633–643. doi: 10.1038/nrm2957.
4. Murphy WL, McDevitt TC, Engler AJ. Materials as stem cell regulators. *Nat Mater.* 2014; 13: 547–557. doi: 10.1038/nmat3937.
5. Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J et al. Silk-based biomaterials. *Biomaterials.* 2003; 24 (3): 401–416. doi: 10.1016/S0142-9612(02)00353-8.
6. Sahoo JK, Hasturk O, Falcucci T, Kaplan DL. Silk chemistry and biomedical material designs. *Nat Rev Chem.* 2023; 7: 302–318. doi: 10.1038/s41570-023-00486-x.
7. Hu X, Lu Q, Kaplan DL, Cebe P. Microphase separation controlled  $\beta$ -sheet crystallization kinetics in fibrous proteins. *Macromolecules.* 2009; 42: 2079–2087. doi: 10.1021/ma802481p.
8. Rockwood DN, Preda RC, Yücel T, Wang X, Lovett ML, Kaplan DL. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nat Protoc.* 2011; 6 (10): 1612–1631. doi: 10.1038/nprot.2011.379.
9. Агапова ОИ, Агапов ИИ. Биодegradуемые изделия на основе фиброина шелка для тканевой инженерии и регенеративной медицины. М.: Техносфера, 2018: 14–64. Agapova OI, Agapov II. Biodegradiruemye izdelija na osnove fibroina shelka dlya tkanevoj inzhenerii i regenerativnoj meditsiny. М.: Tekhnosfera, 2018: 14–64.
10. Подболотова ЕИ, Паушутин АР, Грудинин НВ, Агапова ОИ, Ефимов АЕ, Агапов ИИ. Исследование механических и структурных свойств шелковых скаффолдов для тканевой инженерии и реконструктивной хирургии. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2025; 27 (4): 125–132. Podbolotova EI, Pashutin AR, Grudinini NV, Agapova OI, Efimov AE, Agapov II. Silk-based scaffolds for tissue engineering and reconstructive surgery: mechanical and structural properties. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs.* 2025; 27 (4): 125–132. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2025-4-125-132.
11. Safonova L, Bobrova M, Efimov A, Lyundup A, Agapova O, Agapov I. A Comparative Analysis of the Structure and Biological Properties of Films and Microfibrous Scaffolds Based on Silk Fibroin. *Pharmaceutics.* 2021 Sep 26; 13 (10): 1561. doi: 10.3390/pharmaceutics13101561.
12. Pashutin A, Podbolotova E, Kirsanova L, Dosi O, Efimov AE, Agapova O, Agapov I. Silk fibroin microparticle/carboxymethyl cellulose composite gel for wound healing applications. *Biomimetics.* 2025; 10 (7): 434. doi: 10.3390/biomimetics10070434.
13. Minoura N, Aiba S, Gotoh Y, Tsukada M, Imai Y. Attachment and growth of cultured fibroblast cells on silk

- protein matrices. *J Biomed Mater Res.* 1995; 29: 1215–1221. doi: 10.1002/jbm.820291008.
14. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan – a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci.* 2011; 36 (8): 981–1014. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001.
  15. Ajisawa A. Dissolution of silk fibroin with calcium chloride/ethanol aqueous solution: Studies on the dissolution of silk fibroin. (IX). *J Seric Sci Jpn.* 1998; 67 (2): 91–94.
  16. Zhang H, Li LL, Dai FY, Zhang HH, Ni B, Zhou W et al. Preparation and characterization of silk fibroin as a biomaterial with potential for drug delivery. *J Transl Med.* 2012, 10: 117. doi: 10.1186/1479-5876-10-117.
  17. Сафонова ЛА, Боброва ММ, Агапова ОИ, Архипова АЮ, Гончаренко АВ, Агапов ИИ. Пленки на основе фиброина шелка для заживления полнослойной раны кожи у крыс. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2016; 18 (3): 74–84. Safonova LA, Bobrova MM, Agapova OI, Arkhipova AYU., Goncharenko AV, Agapov II. Fibroin silk based films for rat's full-thickness skin wound regeneration. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs.* 2016; 18 (3): 74–84. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2016-3-74-84.
  18. Partridge MA, Marcantonio EE. Initiation of attachment and generation of mature focal adhesions by integrin-containing filopodia in cell spreading. *Mol Biol Cell.* 2006 Oct; 17 (10): 4237–4248. doi: 10.1091/mbc.e06-06-0496.
  19. Keselowsky BG, Collard DM, Garcia AJ. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *J Biomed Mater Res A.* 2003 Aug 1; 66 (2): 247–259. doi: 10.1002/jbm.a.10537. PMID: 12888994.
  20. Yadav H, Malviya R, Kaushik N. Chitosan in biomedicine: A comprehensive review of recent developments. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications.* 2024; 8: 100551. doi: 10.1016/j.carpta.2024.100551.
- Статья поступила в редакцию 12.03.2026 г.  
The article was submitted to the journal on 12.03.2026*