

DOI: 10.7868/S3034574X26020024
УДК 544.773.432:577.11

Оригинальная статья

КРИОСТРУКТУРАТЫ НА ОСНОВЕ ФИБРОИНА И ЕГО КОМПОЗИЦИЙ С ХИТОЗАНОМ. ПОЛУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В КАЧЕСТВЕ МАКРОПОРИСТЫХ НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК

Н.Р. Кильдеева^{1,*}, Н.А. Сажнев^{1,5}, М.Г. Дроздова², Е.А. Марквичева², А.Д. Иванова²,
Е.А. Свидченко³, Н.М. Сурин³, В.И. Лозинский⁴

¹ФГБОУ ВО Российский государственный университет им. А.Н. Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство),
Москва, Российская Федерация

²ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, Российская Федерация

³ФГБУН Институт синтетических полимерных материалов имени Н.С. Ениколопова РАН, Москва,
Российская Федерация

⁴ФГБУН Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Российская Федерация

⁵ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

*E-mail: kildeeva@mail.ru

Аннотация. Выделенный из натурального шелка регенерированный фиброин и его смешанные растворы с хитозаном были использованы для получения криоструктуратов макропористых гидрогелевых матриц, предназначенных для применения в тканевой инженерии в качестве носителей для культивирования клеток. Изучены условия стабилизации структуры этих биополимерных носителей путем сшивания фиброина (Фб) и хитозана (Хит) дженипином (Гр) в спиртовых растворах и особенности роста клеток на полученных материалах. Исследование взаимодействия дженипина с фиброином и хитозаном показало, что скорость реакции, приводящей к сшивке макромолекулярных цепей аминокислотных биополимеров, и концентрация продукта превращения дженипина могут быть существенно увеличены по сравнению с использованием индивидуального белка. С помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии изучена структура макропористых носителей и показана их способность поддерживать 3D рост мышечных фибробластов (L929) в модели *in vitro*. Полученные биоматериалы могут быть использованы для тканевой инженерии.¹

Ключевые слова: тканевая инженерия, матрикс, хитозан, фиброин, дженипин, химическая сшивка, криоструктурат, гидрогель

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-13-00261-П).

Соблюдение этических стандартов. Настоящая работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

Конфликт интересов. Авторы данной работы заявляют, что у них отсутствует конфликт интересов.

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи.

© Н. Р. Кильдеева, Н. А. Сажнев, М. Г. Дроздова, Е. А. Марквичева, А. Д. Иванова, Е. А. Свидченко,
Н. М. Сурин, В. И. Лозинский, 2026

¹ Сокращения: Фб — фиброин; Хит — хитозан; Гр — дженипин.

Благодарности. Спектральные исследования проведены на оборудовании Центра коллективного пользования Института синтетических полимерных материалов им. Ениколопова РАН.

Ссылка для цитирования: Кильдеева Н.Р., Сажнев Н.А., Дроздова М.Г., Марквичева Е.А., Иванова А.Д., Свидченко Е.А., Сурин Н.М., Лозинский В.И. Криоструктураты на основе фиброина и его композиций с хитозаном. Получение и использование в качестве макропористых носителей для культивирования клеток. *Прикладная биохимия и микробиология / Applied biochemistry and microbiology*. 2026. Т. 62. № 2. С. 155–168. <https://doi.org/10.7868/S3034574X26020024>

DOI: 10.7868/S3034574X26020024

Original Article

CRYOSTRUCTURATES BASED ON FIBROIN AND ITS COMPOSITIONS WITH CHITOSAN. PREPARATION AND USE AS MACROPOROUS CARRIERS FOR CELL CULTURING

N.R. Kildeeva^{1,*}, N.A. Sazhnev^{1,5}, M.G. Drozdova², E.A. Markvicheva², A.D. Ivanova²,
E.A. Svidchenko³, N.M. Surin³, V.I. Lozinsky⁴

¹*A.N. Kosygin Russian State University (Technologies. Design. Art), Moscow, Russian Federation*

²*M.M. Shemyakin & Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

³*N.S. Enikolopov Institute of Synthetic Polymeric Materials of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

⁴*A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

⁵*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

*E-mail: kildeeva@mail.ru

Abstract. Regenerated fibroin isolated from natural silk and its mixed solutions with chitosan were used to obtain cryostructurates — macroporous hydrogel matrices intended for application in tissue engineering as carriers for cell culturing. The conditions for stabilizing the structure of such biopolymeric carriers by cross-linking fibroin (Fb) and chitosan (Chi) with genipin (Gp) in alcoholic solutions and the features of cell growth on the obtained materials were studied. Investigation of the interaction of genipin with fibroin and chitosan acetate showed that the reaction rate leading to the cross-linking of macromolecular chains of amino-containing biopolymers, and the concentration of the genipin conversion product, can be significantly increased compared to using the individual protein. Using confocal laser scanning microscopy, the structure of macroporous carriers was studied, and their ability to support 3D growth of mouse fibroblasts (L929) in an in vitro model was demonstrated. The obtained biomaterials are promising for use in tissue engineering.

Keywords: tissue engineering, matrix, chitosan, fibroin, genipin, chemical cross-linking, cryostructurate, hydrogel

Funding. This work was supported by the Russian Science Foundation (Project No. 22-13-00261-P).

Ethics declarations. This work does not contain any studies involving humans or animals.

Conflict of interest. The authors of this work declare that they have no conflicts of interest.

Author contributions. All authors made significant contributions to the concept development, conduct of the study, and preparation of the article.

Acknowledgments. Spectral studies were conducted using equipment at the Shared Use Center of the Enikolopov Institute of Synthetic Polymer Materials of the Russian Academy of Sciences.

For Citation: Kildeeva N.R., Sazhnev N.A., Drozdova M.G., Markvicheva E.A., Ivanova A.D., Svidchenko E.A., Surin N.M., Lozinsky V.I. Cryostructures based on fibroin and its compositions with chitosan. Preparation and use as macroporous carriers for cell culturing. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya / Applied biochemistry and microbiology*. 2026;62(2):155–168. (In Russ.) <https://doi.org/10.7868/S3034574X26020024>

ВВЕДЕНИЕ

Фиброин шелка из коконов тутового шелкопряда *Bombyx mori* — природный биополимер, обладающий уникальными механическими свойствами, биосовместимостью и способностью к биодеградации, что делает его перспективным материалом для тканевой инженерии и регенеративной медицины [1]. Нативный фиброин шелка состоит из повторяющихся белковых последовательностей: легкие цепи (26 кДа) и тяжелые (390 кДа) связаны друг с другом дисульфидными мостиками. В итоге образуется плотная структура из соединенных между собой гидрофобных β -складчатых доменов. Такая организация белка, наряду со склеиванием фибриллярных структур серицином, обеспечивает гидрофобность и высокую прочность волокон шелка [2]. Выделенный из натурального шелка регенерированный фиброин после удаления серицина переходит в водорастворимую форму и может быть использован для создания новых материалов: биополимерных лекарственных форм, раневых покрытий и искусственных матриц для регенеративной медицины. Ключевым ограничением его применения является растворимость в водных средах полученных на его основе материалов, что требует модифицирования для стабилизации структуры и придания гидрофобных свойств.

Для улучшения стабильности и функциональности материалов из фиброина часто применяют химическую сшивку. Среди бифункциональных соединений особое место занимает природный сшивающий реагент — дженипин, экстрагируемый из *Gardenia jasminoides*. Дженипин — иридоидный гликозид, способный образовывать ковалентные связи с аминокруппами белков, включая фиброин [3]. В отличие от традиционных сшивающих агентов (глутаровый альдегид, карбодииимиды), дженипин обладает меньшей цитотоксичностью и сохраняет биосовместимость материала [4]. Дженипин содержит реакционноспособные группы, способные взаимодействовать с аминокруппами лизина и концевыми аминокруппами в фиброине [5]. Исследования показали, что сшивка дженипином повышает механическую прочность фиброиновых

матриц [6], способствует поддержанию пролиферации клеток, что критически важно для тканевой инженерии [7]. Дженипин-модифицированный фиброин медленно деградирует *in vivo* (14–28 сут против 7–14 сут для несшитого фиброина) [8]. Однако скорость сшивки фиброина дженипином на порядок ниже, чем у синтетических агентов [9] или при сшивке других аминоксодержащих соединений, за счет небольшого количества аминокрупп у остатков аминокислот фиброина, поэтому в целом ряде работ прибегают к другому способу придать белку устойчивость к воде.

Обработка спиртами (этанолом и метанолом) приводит к дегидратации фиброина, способствуя перераспределению водородных связей и упорядочению полипептидных цепей в β -складчатую конформацию [10]. Это значительно повышает механическую прочность и устойчивость к растворению, что критически важно для применения в тканевой инженерии [11]. Однако длительная обработка может приводить к избыточной кристалличности материала фиброинового носителя, снижая его эластичность и ухудшая клеточную адгезию [12]. Этанол-модифицированные фиброиновые пленки активно исследуют в качестве матриц для регенерации кожной и мышечной тканей. Исследование [13] показало, что такие пленки поддерживают пролиферацию фибробластов, но гидрофобность данных пленок ограничивает клеточную миграцию. Кроме того, в работе [12] показано, что эффективность их использования сильно зависит от конкретных условий обработки этанолом, влияющих на поверхностные свойства фиброиновых материалов.

Ключевым направлением исследований биополимерных матриц на основе регенерированного фиброина может стать разработка композитных систем с добавлением других биополимеров (например, хитозана, желатина и др.). Хитозан, продукт дезацетилирования хитина, широко применяется в биомедицине благодаря своим антибактериальным, гемостатическим и ранозаживляющим свойствам [14, 15]. Хитозан используют для получения подложек с контролируемой пористостью для ре-

генерации костной ткани [14, 16], а также нано- и микроволокон методом электроформования [17]. В комбинации с фиброином он может образовывать гидрогели, которые обеспечивают улучшенную адгезию клеток [7, 18]. Главные преимущества таких систем заключаются в синергии механических свойств (хитозан придает упругость, фиброин — прочность) и улучшенной клеточной адгезии за счет положительного заряда хитозана [19].

Фиброин шелка, особенно в сочетании с дженипином и хитозаном, представляет собой мощную платформу для разработки биоматериалов нового поколения. Остаются вопросы, связанные с оптимизацией условий формирования биополимерного носителя, включающие сшивку и реализацию конформационного перехода в фиброине, поэтому дальнейшие исследования должны быть направлены на решение этих вопросов.

Цель работы — изучение условий стабилизации структуры биополимерных широкопористых матриц на основе фиброина и хитозана путем сшивания дженипином в спиртовых растворах и особенностей роста клеток на полученных материалах.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. В работе были использованы следующие вещества и препараты: хитозан с ММ 190 кДа и степенью деацетилирования 87 % (Roerig, Германия); ацетат хитозана с ММ 200 кДа (ИНЭОС РАН); коконы тутового шелкопряда *Bombyx mori* производства Guangxi Liuzhou Fast Long Trade Co., Китай; сшивающий реагент дженипин (Gr, Sigma-Aldrich, США).

Реагенты. В работе с культурами клеток использовали среду для культивирования Игла в модификации Дульбекко (DMEM, «ПанЭко», Россия), глутамин («ПанЭко», Россия), стрептомицин-пенициллин («ПанЭко», Россия), пируват натрия (Panreac, Испания), 2-меркаптоэтанол (Loba Feinchemie AG, Австрия), эмбриональную телячью сыворотку (РАА Laboratories GmbH, Австрия), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолий (МТТ, «ПанЭко», Россия), кальцеин АМ (eBioscience, Великобритания), флуорескамин (Sigma, США), 4',6-диамидино-2-фенилиндо́л дигидрохлорид (DAPI, Sigma, США) и диметилсульфоксид (ДМСО, «Геликон», Россия).

Получение регенерированного фиброина. Для получения регенерированного фиброина шелк-сырец обрабатывали в 0,02 М растворе карбоната натрия или гидрокарбоната натрия в течение 1 ч для очищения волокон от загрязнений, удаления серицина и остаточных жиров. Далее шелк трехкратно промывали в дистиллированной воде, затем выдерживали в бидистиллированной воде при температуре 90–100 °С до 2 часов и сушили при комнатной температуре в течение сут. Очищенный шелк рас-

творяли в 9 М растворе бромида лития при 70 °С в течение 1 ч. Полученный раствор центрифугировали и фильтровали, затем диализовали против воды в течение трех суток со сменой среды каждые 3–4 часа для удаления солей, лиофильно высушивали и получали порошок водорастворимого фиброина.

Получение ацетата хитозана. Ацетат хитозана получен (В.Е. Тихоновым, ИНЭОС РАН) на основе хитозана со средневесовой молекулярной массой 190 кДа осаждением из растворов хитозана в водном растворе уксусной кислоты.

Приготовление растворов фиброина, ацетата хитозана и дженипина. Растворы ацетата хитозана, фиброина (концентрация 20 % — Фб-20 и концентрация 30 % — Фб-30) и дженипина в воде необходимой концентрации готовили по точной навеске ($\pm 0,0002$ г) с учетом влажности. Растворение полимера проводили на магнитной мешалке при 1000 об/мин.

Определение времени гелеобразования. Гелеобразование в растворе ацетата хитозана и в растворах хитозана в водном растворе уксусной кислоты в присутствии сшивающего реагента (Gr) исследовали при различном мольном соотношении сшивающего реагента на аминогруппу хитозана. Образование геля в системе определяли в момент, при котором раствор полимера прекращал течь под действием собственного веса при переворачивании пробирки диаметром 1 см. Полученные данные представляли в виде зависимости времени гелеобразования от мольного соотношения Gr/NH₂.

Спектроскопические исследования реакции сшивки фиброина и хитозана дженипином. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV 2501 PC (Shimadzu, Япония) в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см. Периодически отбирали 0,4 мл раствора фиброина и разбавляли в 4,6 мл воды (разбавление в 12,5 раза, обозначен как разбавленный раствор). Запись вели в кювете толщиной 2 мм при температуре 24 °С. Эксперимент проводили сериями — 0–7 ч, 8–16 ч, 17–23 ч, 24–30 ч.

Для анализа были выбраны полосы поглощения: 240 нм (полоса поглощения дженипина), 287 нм (из разностного спектра поглощения следует, что при сшивке появляется новая полоса поглощения), 360 нм (появляется на начальном этапе сшивки) и 610 нм (соответствует вторичной реакции сшивки).

Получение криоструктуратов на основе хитозана и фиброина. Для получения криоструктуратов на основе хитозана и фиброина 2%-ный раствор ацетата хитозана в воде (рН 5,6) использовали для растворения фиброина (фиброин-хитозан 1:1), а затем полученный смешанный раствор замораживали в чашках Петри и лиофильно высушивали. Чтобы обработка водно-спиртовым раствором джени-

пина не привела к растворению или разрушению пористой структуры образца, солевую форму хитозана переводили в форму основания. Для этого после лиофильной сушки образцы погружали в 10%-ный раствор аммиака в этаноле на 24 ч. Получение криоструктуратов проводили погружением пористых хитозановых матриц в 10%-ный раствор дженипина в растворе этанола и воды (80:20) на 24 ч. Образцы криоструктуратов имели насыщенный синий цвет.

Конфокальная лазерная микроскопия. Для визуализации пористой структуры к образцам биополимерного носителя добавляли раствор флуоресцентного красителя флуорескамина (0,3 мг/мл в ацетоне) и инкубировали в течение 10 мин. Супернатант декантировали, промывали физиологическим раствором и изучали образцы на инвертированном микроскопе Nikon TE-2000 (Япония) с использованием стандартного пакета программ.

Культивирование клеток. Для культивирования использовали клеточную линию фибробластов мыши L929. Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10%-ной телячьей эмбриональной сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 1 мМ пирувата натрия, 50 мкМ 2-меркаптоэтанола, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Культивирование проводили в 25 см³ флаконах в CO₂-инкубаторе (Heraeus B5060 EK/CO₂, Германия) в газовой среде, содержащей 5 % CO₂, при температуре 37 °С.

Стерилизация образцов гидрогелей. Гидрогели нарезали на образцы размером 4 x 4 мм и весом

2,5 ± 0,5 мг. Образцы стерилизовали инкубацией в этиловом спирте в течение 1 ч, после чего образцы трижды промывали стерильным физиологическим раствором (1 мл). Затем образцы инкубировали в среде DMEM с добавлением 10%-ной телячьей эмбриональной сыворотки 24 ч в термостате при 37 °С.

Определение цитотоксичности биополимерных носителей. Цитотоксичность гидрогелевых носителей изучали методом тестирования экстрактов. Для этого суспензию клеток (100 мкл, 10⁵ клеток /мл) вносили в каждую лунку 96-луночного планшета и культивировали в течение 24 ч. Затем заменяли среду в каждой лунке на 100 мкл экстрактов. Экстракты были получены следующим образом: к стерилизованным образцам биополимерного носителя добавляли среду DMEM, содержащую 10 % сыворотки, (1 мл среды на 25 мг образца) и инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Затем экстракты отбирали и добавляли к монослою клеток. В качестве контроля использовали клетки, культивируемые в среде без экстрактов. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста через 24 ч инкубации клеток в экстрактах. Для этого среду с экстрактами в каждой лунке заменяли на 100 мкл раствора МТТ (0,5 мг / мл) в DMEM и инкубировали в течение 2 ч при 37 °С. Далее смесь удаляли, кристаллы формазана растворяли в 100 мкл ДМСО и измеряли оптическую плотность (ОП) при длинах волн 540/690 нм на многоканальном планшет-ридере Multiscan (Flow Laboratories, США). Количество жизнеспособных клеток рассчитывали по формуле 1.

$$\text{Доля жизнеспособных клеток} = \frac{\text{ОП в тестовых лунках}}{\text{ОП в контрольных лунках}} \times 100\% \quad (1)$$

Определение жизнеспособности клеток после длительного культивирования в гидрогелях. В каждую лунку с предварительно стерилизованными образцами добавляли суспензию клеток (50 мкл, 4x10⁵ кл./мл) в культуральной среде, содержащей 10 % сыворотки. Кроме того, суспензию клеток вносили в пустые лунки и использовали как контроль. Далее помещали планшет в CO₂-инкубатор и культивировали в стандартных условиях. Через 1 ч в каждую лунку вносили еще по 100 мкл среды. Оценку жизнеспособности клеток проводили с помощью МТТ-теста после 5 сут культивирования: жидкость в лунках заменяли на 100 мкл раствора МТТ (0,5 мг/мл в DMEM), инкубировали в течение 1,5 ч при 37 °С. Далее раствор отбирали, а кристаллы формазана, образованные в живых клетках, растворяли в 200 мкл ДМСО, отбирали аликвоту

100 мкл и измеряли оптическую плотность при 540/690 нм с использованием планшет-ридера Multiscan (Thermo, США).

Для учета влияния матриц на результат МТТ-теста получали калибровочные кривые в присутствии гидрогелей. Для этого в лунки 96-луночного планшета вносили определенное количество клеток L929 (50, 100, 150 и 200 тыс.). Образцы гидрогелей были подготовлены также как образцы гидрогелей для культивирования клеток. После того как клетки прикреплялись к дну лунок (через 1–3 ч), среду в лунках заменяли на среду без сыворотки, образцы гидрогелей добавляли к клеткам и проводили МТТ-тест, как описано выше.

Количество жизнеспособных клеток рассчитывали по формуле 1. Результаты выражали как среднее ± стандартное отклонение для трех повторов.

Изучение распределения и морфологии клеток. Для визуализации клеток и структуры гидрогелей образцы гидрогелей с растущими на них клетками инкубировали в 100 мкл среды для культивирования (без сыворотки), содержащей Calcein AM (0,5 мкг/мл) и DAPI (10 мкг/мл), в течение 30 мин при 37 °С. Далее супернатант декантировали, добавляли в каждую лунку по 150 мкл среды DMEM и образцы изучали на инвертированном микроскопе Nikon TE-2000 (Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенных ранее исследованиях нами была показана возможность получения криоструктуров хитозана, сшитых дженипином, и использования их в качестве макропористых носителей клеток для тканевой инженерии [16]. С целью стабилизации пористой структуры биополимерного материала сшивку хитозана проводили на лиофильно высушенных образцах. Однако в отличие от хитозана, содержащего аминогруппу практически в каждом элементарном звене, число первичных аминогрупп в фиброине составляет менее 1 % [20], поэтому результат взаимодействия с дженипином не является очевидным.

Изучение взаимодействия фиброина с дженипином. В процессе химической сшивки биополимеров происходит увеличение вязкости их водных растворов, которое завершается гелеобразованием. В условиях, приводящих к гелеобразованию хитозана, добавление дженипина к раствору фиброина не привело к гелеобразованию, но наблюдаемое изменение окраски на синюю свидетельствовало об образовании продукта, поглощающего в области $\lambda=600$ нм. Изучение кинетики изменения характеристических полос в электронных спектрах поглощения фиброина и дженипина позволит установить особенности взаимодействия фиброина с дженипином.

Добавление дженипина к раствору фиброина приводило к появлению и изменению полос поглощения в нескольких диапазонах видимой и ультрафиолетовой областей спектра (240, 287, 360 и 610 нм), соответствующих уменьшению поглощения гетероцикла дженипина, переходам хромофора, образующегося при внедрении азота аминогруппы в гетероцикл дженипина (первичная реакция), и росту поглощения олигомерных форм дженипина, содержащих сопряженные связи (610 нм) (рис. 1). Первичная реакция активно протекает в течение 10 ч, затем замедлялась (изменение ОП при λ_{287} и λ_{360}). Она сопровождалась расходом дженипина (снижение поглощения при 240 нм). Вторичная реакция, которая завершала процесс, началась после образования достаточного количества продуктов первичной реакции (примерно через 4 ч) и протекала с высокой скоростью до 10 ч, после чего продолжалась с меньшей

скоростью в течение всего времени наблюдения (появление и рост поглощения при 610 нм) (рис.1).

Таким образом, установлено образование продуктов взаимодействия дженипина с первичными аминогруппами фиброина, поглощающими электромагнитное излучение в тех же областях, что и продукты реакции дженипина с хитозаном, однако скорость образования продукта реакции, как и скорость гелеобразования в растворах фиброина значительно ниже, чем в растворах хитозана. Этот факт накладывал определенные ограничения на возможность и условия получения нерастворимых в воде материалов на основе фиброина.

Получение криоструктуров на основе фиброина. Для получения нерастворимых в воде и среде для культивирования клеток криоструктуров на основе фиброина был использован способ, при котором сшивку дженипином проводили путем обработки водно-спиртовым раствором дженипина пористых матриц, полученных лиофильной сушкой водных растворов фиброина. Растворы фиброина с концентрацией 20 и 30 % разливали в чашки Петри и выдерживали при температуре -10 °С в течение 30 мин. После лиофильной сушки образцы представляли собой растворимые в воде легкие пористые пластины криоструктуров фиброина толщиной 1 см.

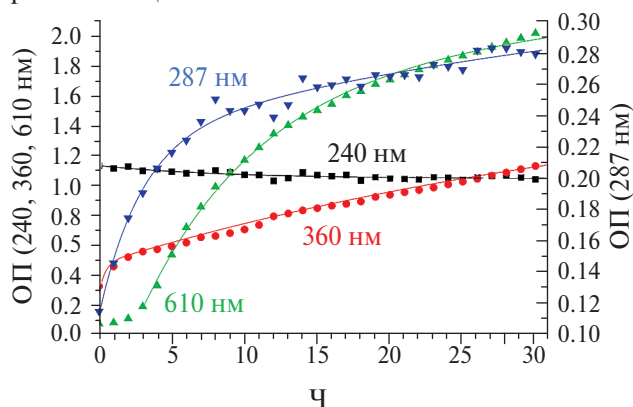


Рис. 1. Кинетические зависимости интенсивности характеристических полос поглощения в растворе фиброина в процессе реакции с дженипином

Fig. 1. Kinetic dependences of the intensity of characteristic absorption bands in fibroin solution during the reaction with genipin

Модифицирование криоструктуров проводили погружением пористых фиброиновых (или фиброин-хитозановых) матриц в 10%-ный раствор дженипина в смесь с этанолом с водой (80:20 об.%). Состав растворителя был выбран на основании изучения условий конформационного перехода регенерированного фиброина в нерастворимую в воде форму [7]. Время сшивки определяли по времени распространения синей окраски на весь образец.

Фотографии шитых дженипином криоструктуратов приведены на рис. 2.

Поверхность и внутренняя структура полученных биополимерных материалов была исследована методами оптической и конфокальной лазерной микроскопии. На рис. 3 приведены микрофотографии этих материалов и 3D реконструкция их пористой структуры, а также распределение пор по размерам. Результаты исследования свидетель-

ствуют о том, что полученные материалы обладали системой взаимосвязанных пор, размер которых можно изменять, меняя концентрацию фиброина: из растворов с большей концентрацией формируются криоструктураты с более крупными порами и толстыми стенками. Средний размер пор образцов гидрогелей был 41 ± 4 мкм и 40 ± 4 мкм для образцов гидрогелей Фб-20 и Фб-30 соответственно (рис. 4).

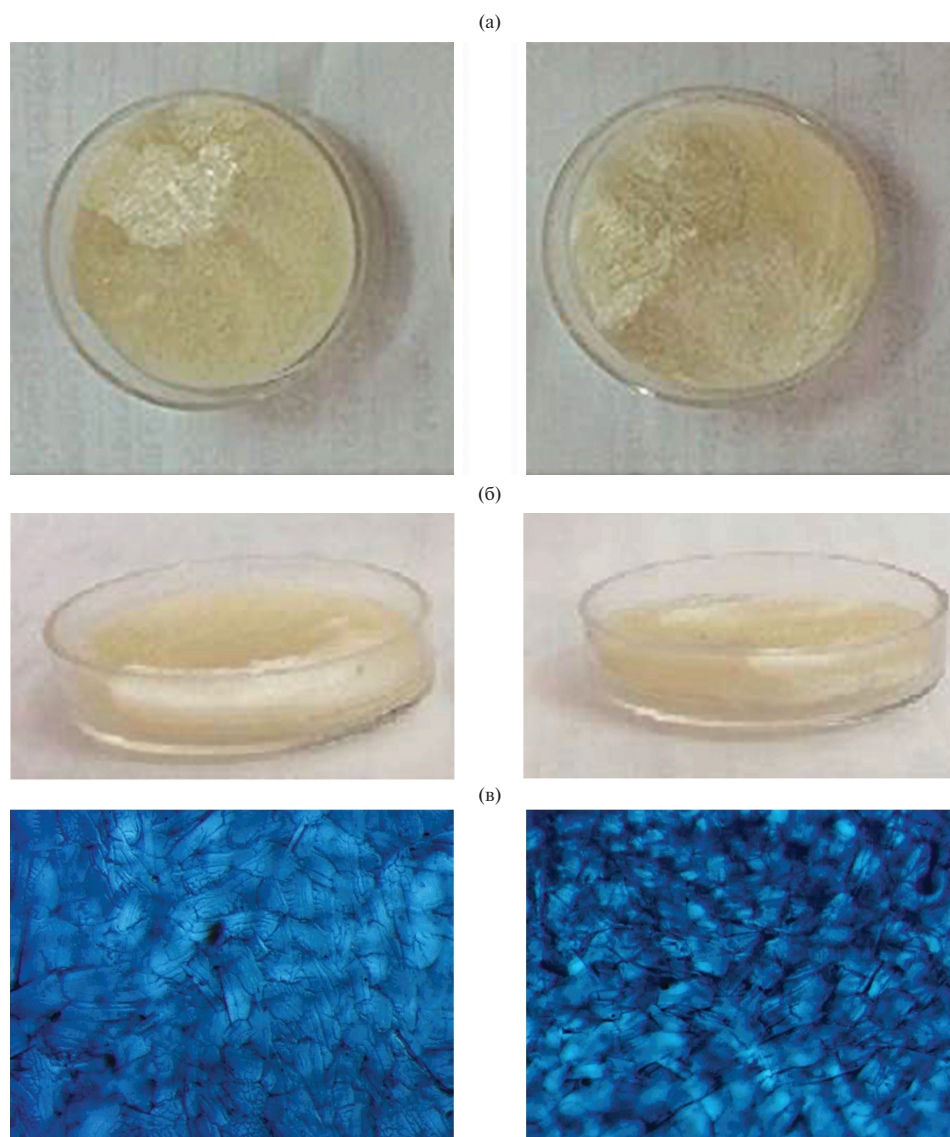


Рис. 2. Образцы фиброина после лиофильной сушки 20- и 30-процентных растворов (а) и выдерживания в 10-процентном растворе дженипина в растворе этанола и воды (80:20) (б), фотография поверхности криоструктурата (размер изображения 1000x1000 мкм) (в)

Fig. 2. Fibroin samples after freeze-drying of 20% and 30% solutions (a) and exposure to a 10% genipin solution in an ethanol-water solution (80:20) (b), photograph of the cryostructure surface (image size 1000×1000 μm) (c)

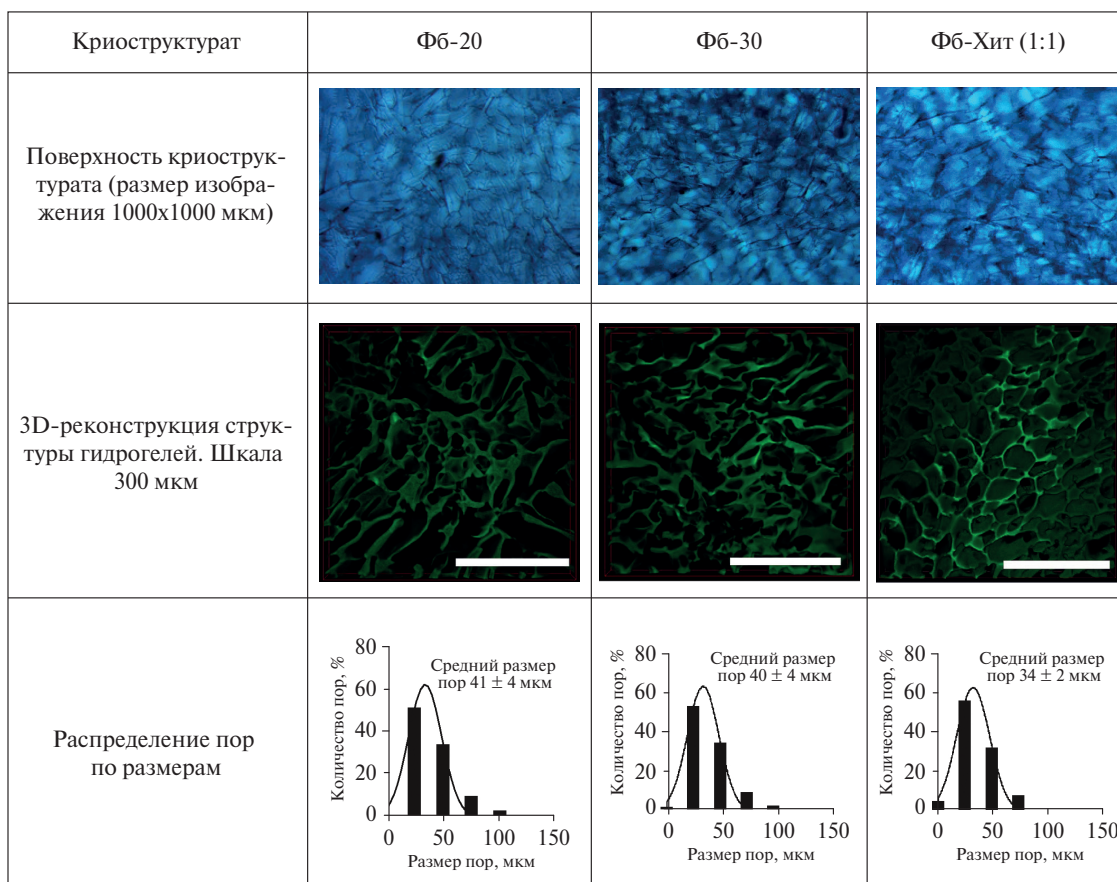


Рис. 3. Структура криоструктуратов на основе фиброина, сшитого дженипином, полученных из растворов с концентрацией 20 % (Фб-20) и 30 % (Фб-30) и Фб-Хит (1:1)

Fig. 3. Structure of cryostructures based on fibroin cross-linked with genipin, obtained from solutions with concentrations of 20% (Fb-20) and 30% (Fb-30) and Fb-Chit (1:1)

На рис. 4 приведены результаты изучения набухания образцов гидрогелевых криоструктуратов через 24 ч инкубации в среде для культивирования животных клеток. Равновесное набухание образцов, полученных из 20- и 30-процентных растворов фиброина, практически не различалось и составило $3,7 \pm 1,3$ и $4,9 \pm 1,7$ мл/г соответственно. Влагодерживающая способность может быть результатом набухания гелевых стенок, а также иммобилизации свободной воды внутри пор криоструктурата, однако набухание образцов после удаления свободной воды также не зависело от концентрации фиброина (20 или 30 %) и составило $0,7 \pm 0,1$ мл/г.

Криоструктураты погружали в воду и оставляли на несколько часов, затем высушивали до постоянной массы. Было обнаружено, что полученные материалы в течение суток не теряли массу. Отсутствие растворимости обеспечивалось как за счет создания условий перевода фиброина в β -конформацию, так и химической сшивкой дженипином, которая протекала в водно-спиртовой среде.

Изучение полимерных систем на основе растворов фиброина и хитозана. Для установления пути воз-

действия на реакцию сшивки аминокислотных биополимеров в растворе, приводящей к образованию нерастворимых в воде продуктов, а также с целью разработки волокнистых материалов, имитирующих внеклеточный матрикс (естественную среду организма), состоящий из полисахаридов и белков, были использованы фиброин-содержащие растворы хитозана. Изучено влияние состава раствора на положение точки эквивалентности при обратном потенциометрическом титровании (рис. 5). С повышением концентрации биополимеров объем, пошедший на титрование щелочи, закономерно увеличивается. При повышении содержания фиброина в растворе (кривые 1 и 2) снижалось количество щелочи, пошедшей на титрование смешанного раствора хитозана и фиброина, а также рН, соответствующее точке эквивалентности сопряженной кислоты (протонированных аминокислот). В свою очередь, снижение числа протонированных аминокислот указывало на образование с их участием полиэлектrolитного комплекса хитозана с фиброином.

Для получения гидрогелей и материалов на их основе используют растворы хитозана в водном

растворе уксусной кислоты. В таких системах хитозан находится в виде уксуснокислой соли, а в растворе содержится свободная уксусная кислота. В настоящей работе для приготовления смешанных с фиброином растворов использовали не хитозан, а его уксуснокислую соль, полученную

осаждением из растворов хитозана. В отличие от хитозана регенерированный фиброин растворим во всем диапазоне рН, тем не менее, для получения однофазных растворов в общем растворителе рН доводили до 5,6.

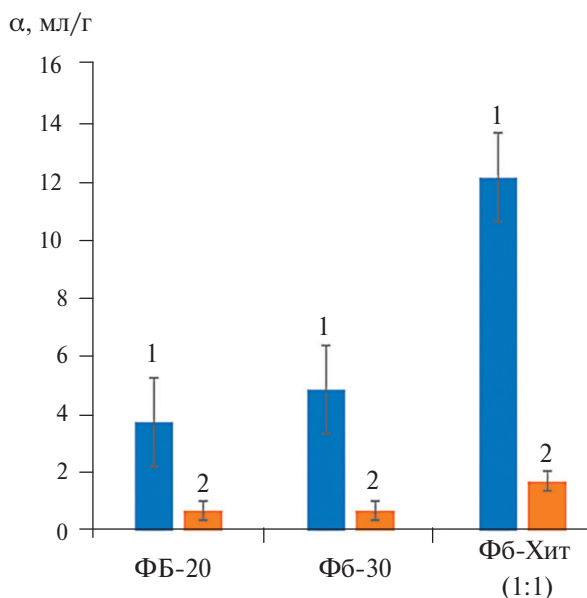


Рис. 4. Влагоудерживающая способность криоструктуратов фиброина после инкубации в культуральной среде DMEM в течение 24 ч (общее влагопоглощение (1) и поглощение среды полимерными стенками)

Fig. 4. Water-holding capacity of fibroin cryostructures after incubation in DMEM culture medium for 24 hours (total moisture absorption (1) and absorption of the medium by the polymer walls)

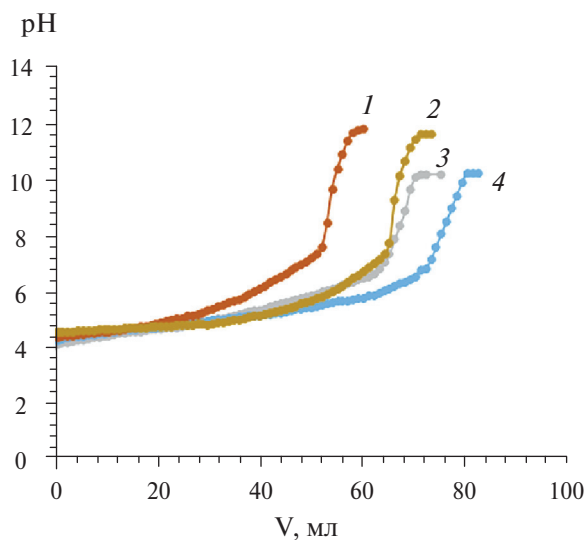


Рис. 5. Кривые титрования смешанных растворов хитозана и фиброина (1:1) с концентрацией хитозана 1 % (1) и 2 % (2) и кривые титрования растворов чистого хитозана с концентрацией 1 % (3), 2 % (4)

Fig. 5. Titration curves of mixed solutions of chitosan and fibroin (1:1) with chitosan concentrations of 1% (1) and 2% (2), and titration curves of pure chitosan solutions with concentrations of 1% (3) and 2% (4)

Увеличение числа аминогрупп в растворе влияло на закономерности и кинетику взаимодействия с дженипином.

Спектральные и реологические исследования кинетики сшивки и гелеобразования в смешанных растворах хитозана и фиброина. С целью установления особенностей реакции сшивки хитозана и фиброина в их совместных растворах по сравнению с растворами индивидуальных аминокислотных полимеров была исследована кинетика изменения поглощения при $\lambda=610$ нм (рис. 6). Кроме того, было изучено изменение вязкости и определена точка гелеобразования реакционных смесей на основе растворов ацетата хитозана, содержащих фиброин (соотношение хитозан-фиброин 1:1), в присутствии дженипина (рис. 7). Увеличение интенсивности полосы 610 нм в растворах хитозана и фиброина имело несколько участков: отсутствия роста оптической плотности (индукционный период), малой скорости (за счет накопления первичных продуктов присоединения дженипина) и почти линейного роста оптической плотности (рис. 6): в этот период происходило образование продуктов второй стадии реакции — олигомеризации дженипина в конечном продукте реакции сшивки. Период роста вязкости (рис. 7) прекращался в момент

формирования вязко-упругого геля при разном содержании продукта реакции (рис. 8).

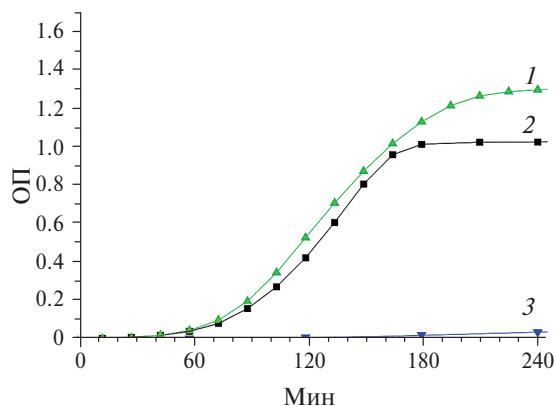


Рис. 6. Кинетические кривые изменения интенсивности полосы поглощения λ_{610} (1 см, pH 5,6) в процессе сшивки дженипином хитозана и фиброина: Фб-Хит (1:1) (1), Хит (2), Фб (3)

Fig. 6. Kinetic curves of change in intensity of the absorption band at λ_{610} (1 cm, pH 5.6) during cross-linking with genipin of chitosan and fibroin: Fb-Chit (1:1) (1), Chit (2), Fb (3)

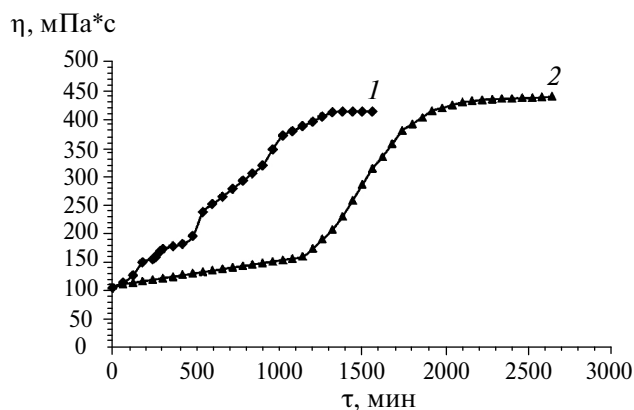


Рис. 7. Кинетика гелеобразования в 2%-ных растворах хитозана (1) и хитозана с фиброином (1:1) в присутствии дженипина 0,02 моль/моль (2)

Fig. 7. Gelation kinetics in 2% solutions of chitosan (1) and chitosan with fibroin (1:1) in the presence of genipin 0.02 mol/mol (2)

Обнаружено неоднозначное влияние добавления фиброина в раствор хитозана, являющееся результатом действия двух противоположных факторов. С одной стороны, это приводило к незначительному возрастанию концентрации аминокрупп, так как фиброин содержит не более 1 % аминокислотных остатков, содержащих первичные аминокруппы. С другой стороны, увеличение расстояния между модифицированными аминокруппами хитозана затрудняло протекание вторичной реакции, приводящей к сшивке хитозана. Индукционный период реакции сшивки фиброина, детектируемый по стадии роста интенсивности синего цвета, составил 5 ч, что в 3 раза превышало продолжительность

первой стадии реакции в присутствии хитозана в аналогичных условиях проведения. Несмотря на низкий вклад самого фиброина в интенсивность полосы поглощения 610 нм (рис. 6, нижняя кривая), глубина протекания реакции в смешанном растворе хитозана с фиброином была выше по сравнению с чистым хитозаном. Эти факты можно также объяснить образованием полиэлектролитного комплекса с участием аминокрупп хитозана.

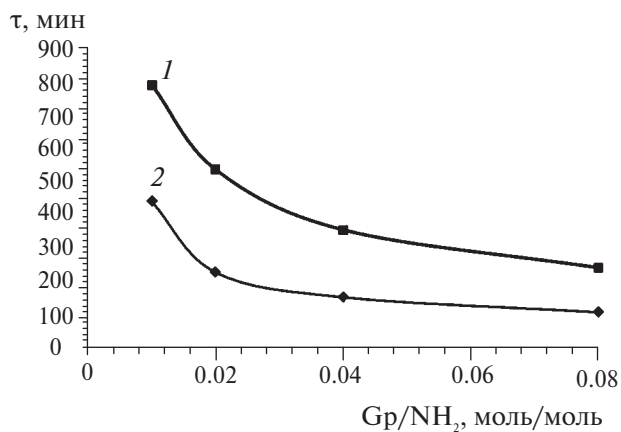


Рис. 8. Зависимость времени гелеобразования в 2%-ных растворах хитозана (1) и хитозана с фиброином (1:1, 2) от соотношения Gp/NH_2

Fig. 8. Dependence of gelation time in 2% solutions of chitosan (1) and chitosan with fibroin (1:1, 2) on the Gp/NH_2 ratio

Изучение цитотоксичности криоструктуратов на основе фиброина и его композиций с хитозаном, стабилизированных сшивкой дженипином, в модели *in vitro* с использованием клеточной культуры фибробластов. На первом этапе *in vitro* исследований изучали цитотоксичность гидрогелей методом тестирования экстрактов. Этот метод позволил оценить влияние экстрагируемых из носителя веществ на жизнеспособность клеток. В качестве модельных клеток использовали линию мышинных фибробластов L929. Количество жизнеспособных клеток определяли с помощью МТТ-теста через 24 ч инкубации клеток с экстрактами, полученными из исследуемых криоструктуратов (рис. 9 а). Результаты представляли как долю жизнеспособных клеток в лунках с экстрактами по сравнению с контрольными лунками. Из рис. 9 а видно, что во всех изучаемых образцах снижения жизнеспособности клеток не наблюдалось. Можно сделать вывод о том, что полученные криоструктураты из фиброина и хитозана не цитотоксичны.

Пористые носители на основе полисахарида и белка имитируют естественную среду организма и поэтому можно ожидать, что использование криоструктуратов фиброина и хитозана обеспечит оптимальные условия для роста и пролиферации

клеток, а, следовательно, для регенерации тканей. Для оценки поведения клеток в биополимерных носителях фибробласты мыши (линия L929) высевали в предварительно стерилизованные гидрогели и культивировали в течение 5 сут. Количественно рост клеток оценивали с помощью МТТ-теста. Из результатов МТТ-теста (рис. 9 б) видно, что полученные пористые материалы на основе полисахарида и белка поддерживали рост и пролиферацию мышинных фибробластов. Жизнеспособность клеток после культивирования в образцах из Фб-20 и Фб-30 не различалась. При этом максимальное количество клеток (83 ± 13 %) получили в образце композитного гидрогеля состава Фб-Хит.

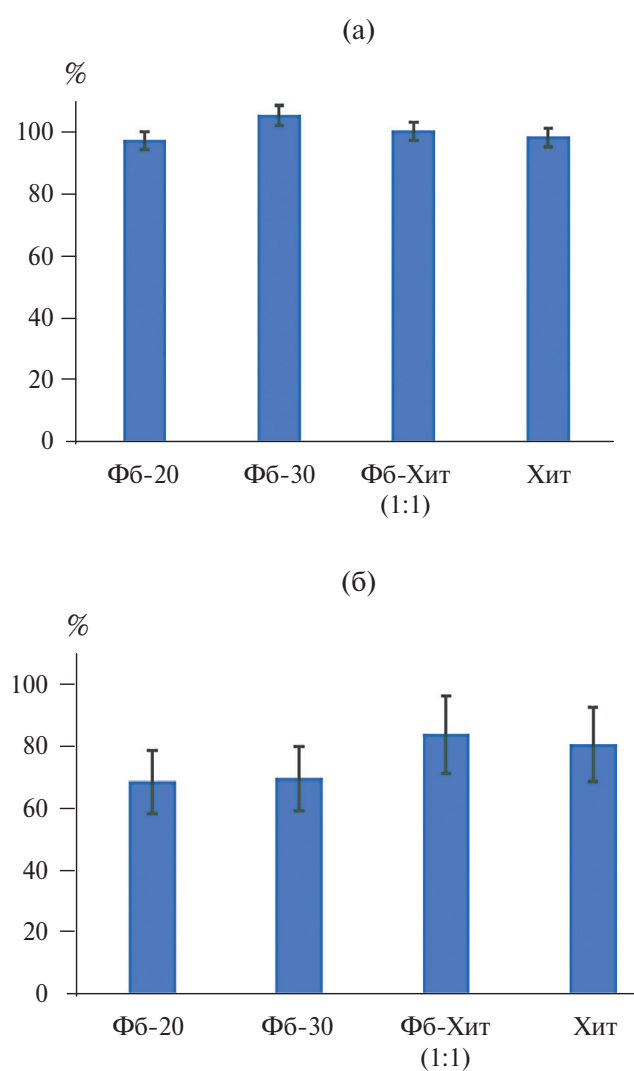


Рис. 9. Жизнеспособность фибробластов мыши L929 после 24 ч инкубации с экстрактами из гидрогелей (а), после 5 сут культивирования в гидрогелях (б) по результатам МТТ-теста. Контроль 100 % — монослой клеток

Fig. 9. Viability of mouse L929 fibroblasts after 24 h incubation with extracts from hydrogels (a), after 5 days of cultivation in hydrogels (b) according to MTT test results. Control 100% — cell monolayer

Изучение распределения клеток в образцах гидрогелей и качественную оценку морфологии клеток при прикреплении к поверхности макропористом носителе проводили с помощью конфокальной лазерной микроскопии на 5-й день культивирования (рис. 10). При этом жизнеспособные клетки были окрашены красителем Calcein AM (зеленый цвет), а структура гидрогелей визуализирована с помощью красителя DAPI (синий цвет). Из рис. 10 видно, что клетки росли и пролиферировали во всех образцах фиброин-хитозановых носителей. Кроме того, видно, что наиболее плотный слой клетки сформировался на поверхности гидрогелей на основе стабилизированных дженипином криоструктуратов из фиброина и хитозана (1:1), что хорошо согласовывалось с результатами МТТ-теста после 5 сут культивирования клеток на носителях. Можно заключить, что изменение условий формирования криоструктуратов за счет включения хитозана в виде ацетата в состав фиброиновой матрицы обеспечило наряду с биосовместимостью необходимую степень сшивки и включение фиброина в состав полимерной сетки геля, что способствовало формированию оптимальных биомеханических свойств носителей для культивирования клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучена возможность стабилизации структуры криоструктуратов на основе фиброина и его композиций с хитозаном путем сшивания дженипином в водно-спиртовом растворе и установлены особенности роста клеток на полученных материалах. Обоснованы условия формирования стабильного биополимерного материала: в 80%-ном водном растворе этанола реализуются условия для перераспределения водородных связей, сопровождающего конформационный переход в фиброине, а наличие хитозана способствует интенсификации процесса сшивки дженипином и включение макромолекул фиброина в трехмерную сетку сшитого биополимера. Полученные образцы на основе композиции фиброина и хитозана в набухшем состоянии представляли собой макропористые гидрогели с высокой влагоудерживающей способностью, обладающие развитой системой взаимосвязанных пор и улучшенными биомеханическими свойствами. Показано, что полученные макропористые носители способны поддерживать 3D рост и пролиферацию мышинных фибробластов при их длительном культивировании в течение 5 дней в модели *in vitro*.

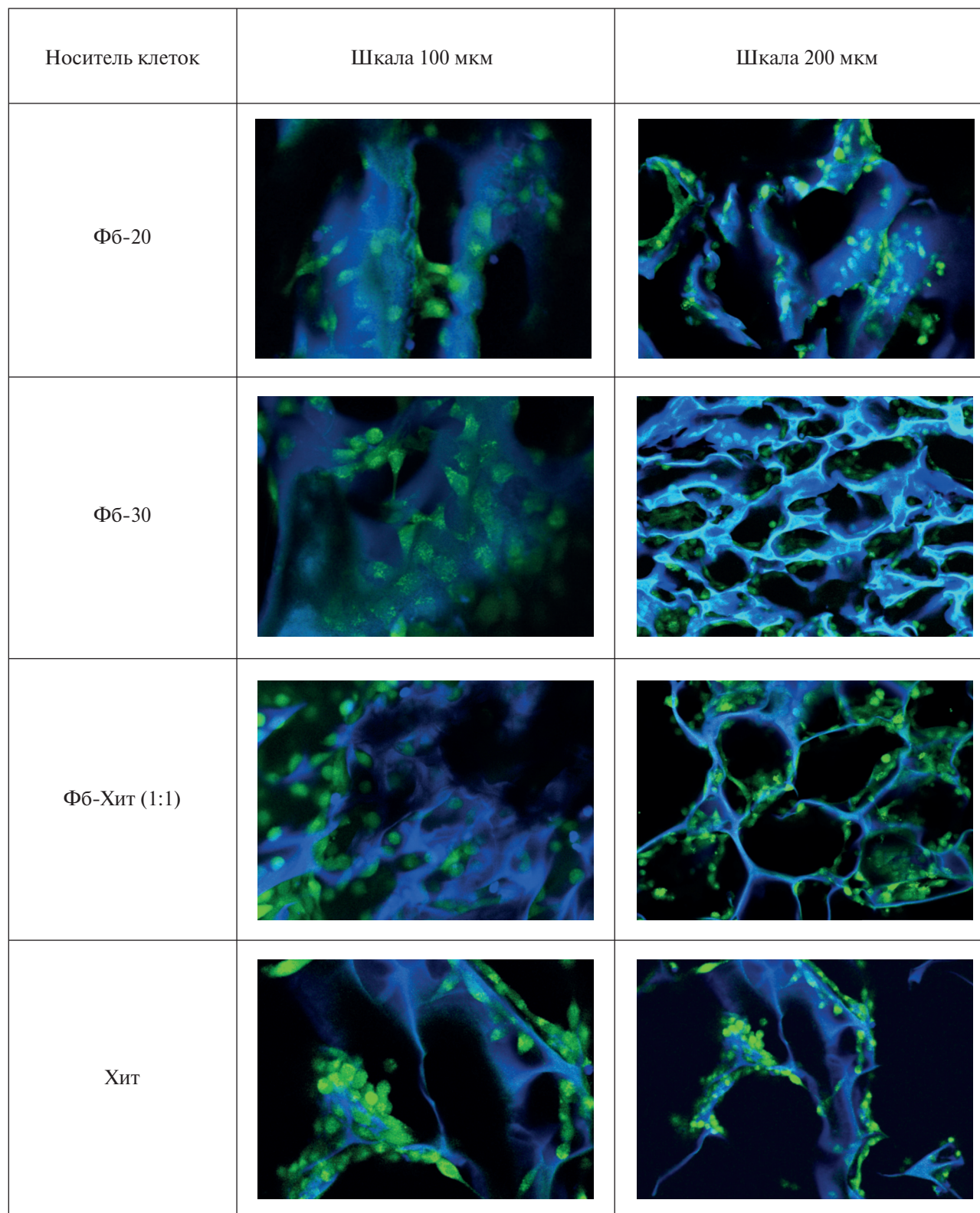


Рис. 10. Распределение и морфология клеток линии L929 в гидрогелях после 5 сут культивирования. Жизнеспособные клетки окрашены красителем Calcein AM (зеленый цвет), а гели визуализированы с помощью красителя DAPI (синий цвет)

Fig. 10. Distribution and morphology of L929 cells in hydrogels after 5 days of cultivation. Viable cells were stained with Calcein AM (green color), and the gels were visualized using DAPI dye (blue color)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Rockwood D.N., Preda R.C., Yücel T. et al.* // *Nat. Protoc.* 2011. V. 6. № 10. P. 1612–1631. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.379>
2. *Vepari C., Kaplan D.L.* // *Prog. Polym. Sci.* 2007. V. 32. № 8–9. P. 991–1007. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013>
3. *Utami Nike D., Md Fadilah N.I., Sallehuddin N. et al.* // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022. V. 10. P. 865014. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.865014>
4. *Chen Y.C., Chen R.N., Jhan H.J. et al.* // *Tissue Eng. Part C: Methods.* 2015. V. 21. № 9. P. 971–986. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2015.0036>
5. *Asakura T., Sugino R., Yao J., Takashima H., Kishore R.* // *Biochemistry.* 2002. V. 41. № 13. P. 4415–4424. <https://doi.org/10.1021/bi0119013>
6. *Wang X., Ding Z., Wang C. et al.* // *J. Mater. Chem. B.* 2018. V. 6. № 18. P. 2739–2746. <https://doi.org/10.1039/C8TB00607E>
7. *Kildeeva N., Sazhnev N., Drozdova M. et al.* // *Technologies.* 2023. V. 11. № 5. P. 146. <https://doi.org/10.3390/technologies11050146>
8. *Neffe A.T., Wischke C., Racheva M., Lendlein A.* // *Expert. Rev. Med. Devices.* 2013. V. 10. № 6. P. 813–833. <https://doi.org/10.1586/17434440.2013.839209>
9. *Fessel G., Cadby J., Wunderli S., Van Weeren R., Snedeker J.G.* // *Acta Biomaterialia.* 2014. V. 10. № 5. P. 1897–1906. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.048>
10. *Nam J., Park Y.H.* // *J. Appl. Polym. Sci.* 2001. V. 81. № 12. P. 3008–3021. <https://doi.org/10.1002/app.1751>
11. *Koh L.D., Cheng Y., Teng C.P. et al.* // *Prog. Polym. Sci.* 2015. V. 46. P. 86–110. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.02.001>
12. *Terada D., Yokoyama Y., Hattori S., Kobayashi H., Tamada Y.* // *Mater. Sci. Eng. C.* 2016. V. 58. P. 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.041>
13. *Lee M.C., Kim D.K., Lee O.J. et al.* // *J. Biomed. Mater. Res. Part B.* 2016. V. 104. № 3. P. 508–514. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33402>
14. *Muzzarelli R.A., El Mehtedi M., Bottegoni C., Aquili A., Gigante A.* // *Marine Drugs.* 2015. V. 13. № 12. P. 7314–7338. <https://doi.org/10.3390/md13127068>
15. *Croisier F., Jérôme C.* // *Eur. Polym. J.* 2013. V. 49. № 4. P. 780–792. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009>
16. *Sazhnev N.A., Drozdova M.G., Rodionov I.A. et al.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2018. V. 54. P. 459–467. <https://doi.org/10.1134/S0003683818050162>
17. *Elsabee M.Z., Naguib H.F., Morsi R.E.* // *Mater. Sci. Eng. C.* 2012. V. 32. № 7. P. 1711–1726. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.05.009>
18. *Bhardwaj N., Kundu S.C.* // *Biomaterials.* 2012. V. 33. № 10. P. 2848–2857. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.12.028>
19. *Altman A.M., Gupta V., Ríos C.N., Alt E.U., Mathur A.B.* // *Acta Biomaterialia.* 2010. V. 6. № 4. P. 1388–1397. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.10.034>
20. *Sashina E.S., Bochek A.M., Novoselov N.P., Kirichenko D.A.* // *Russ. J. Appl. Chem.* 2006. V. 79. P. 869–876. <https://doi.org/10.1134/S1070427206060012>
21. *Kildeeva N., Chalykh A., Belokon M. et al.* // *Polymers.* 2020. V. 12. № 5. P. 1086. <https://doi.org/10.3390/polym12051086>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Кильдеева Наталия Рустемовна — доктор химических наук, проф., зав. кафедрой химии и технологии полимерных материалов и нанокompозитов РГУ им. А.Н. Косыгина, Москва, Российская Федерация
E-mail: kildeeva@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-7951-4703>

ABOUT THE AUTHORS

Kildeeva, Natalia R. — Doctor of Chemical Sciences, Professor, Head of the Department of Chemistry and Technology of Polymer Materials and Nanocomposites, A.N. Kosygin Russian State University, Moscow, Russian Federation
E-mail: kildeeva@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-7951-4703>

Сажнев Никита Александрович — кандидат технических наук, доцент кафедры химии и технологии полимерных материалов и нанокompозитов РГУ им. А.Н. Косыгина, Москва, Российская Федерация

E-mail: nsazhnev@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-3880-9502>

Дроздова Мария Георгиевна — научный сотрудник ИБХ им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Российская Федерация

E-mail: drozdovamg@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-7858-0864>

Марквичева Елена Арнольдовна — доктор химических наук, г.н.с., ИБХ им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Российская Федерация

E-mail: markvicheva@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0001-6652-3267>

Иванова Анастасия Дмитриевна — студент ИБХ им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Российская Федерация

E-mail: ivanova.add@mail.ru

Свидченко Евгения Александровна — научный сотрудник, Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва, Российская Федерация

E-mail: svidchenko@ispm.ru

<https://orcid.org/0000-0002-5330-3596>

Сурин Николай Михайлович — кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник, Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва, Российская Федерация

E-mail: surinnm@ispm.ru

<https://orcid.org/0000-0003-1185-5699>

Лозинский Владимир Иосифович — доктор химических наук, главный научный сотрудник, Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Российская Федерация

E-mail: loz@ineos.ac.ru

<https://orcid.org/0000-0002-8111-1161>

Sazhnev, Nikita A. — Candidate of Technical Sciences, Associate Professor of the Department of Chemistry and Technology of Polymer Materials and Nanocomposites, A.N. Kosygin Russian State University, Moscow, Russian Federation

E-mail: nsazhnev@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-3880-9502>

Drozdova, Maria G. — research fellow at the Institute of Biochemistry acad. MM. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov RAS, Moscow, Russian Federation

E-mail: drozdovamg@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-7858-0864>

Markvicheva, Elena A. — Doctor of Chemical Sciences, Chief Researcher, M.M. Shemyakin & Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the RAS, Moscow, Russian Federation

E-mail: markvicheva@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0001-6652-3267>

Ivanova, Anastasia D. — student of the M.M. Shemyakin & Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the RAS, Moscow, Russian Federation

E-mail: ivanova.add@mail.ru

Svidchenko, Evgenia A. — researcher, N.S. Enikolopov Institute of Synthetic Polymer Materials, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

E-mail: svidchenko@ispm.ru

<https://orcid.org/0000-0002-5330-3596>

Surin, Nikolai M. — Cand. Sc. (Physics and Mathematics), Leading Researcher, N.S. Enikolopov Institute of Synthetic Polymer Materials, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

E-mail: surinnm@ispm.ru

<https://orcid.org/0000-0003-1185-5699>

Lozinsky, Vladimir I. — Doctor of Chemical Sciences, Chief Researcher, A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

E-mail: loz@ineos.ac.ru

<https://orcid.org/0000-0002-8111-1161>

Поступила в редакцию 30.06.2025 г.

После доработки 19.10.2025 г.

Принята к публикации 07.12.2025 г.

Received June 30, 2025

Revised October 19, 2025

Accepted December 07, 2025