

МЕТОДЫ

УДК 57.086.83+57.086.2

**ИНДУКЦИЯ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ
ОСТЕОБЛАСТОПОДОБНЫХ КЛЕТОК MG-63 ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ
В ТРЁХМЕРНЫХ УСЛОВИЯХ НА ФИБРОИНОВЫХ МИКРОНОСИТЕЛЯХ**

**М.С. Котлярова^{1,*}, В.А. Жуйков², Ю.В. Чудинова^{1,2}, Д.Д. Хайдапова³, А.М. Мойсенович⁴,
А.С. Коньков¹, Л.А. Сафонова^{1,5}, М.М. Боброва^{1,5}, А.Ю. Архипова⁴, А.В. Гончаренко⁴,
К.В. Шайтан¹**

¹ Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

² Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук; Россия, 119071, г. Москва, Ленинский просп., д. 33, стр. 2;

³ кафедра физики и мелиорации почв, факультет почвоведения, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

⁴ межкафедральная лаборатория конфокальной микроскопии, биологический факультет, Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

⁵ ФГБУ “Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова” Минздрава России; Россия, 123182, г. Москва, ул. Шуйкинская, д. 1

*e-mail: kotlyarova.ms@gmail.com

Получены микроносители на основе фиброина шёлка. Микроносители могут использоваться в качестве субстрата для культивирования клеток, для доставки клеток при проведении клеточной терапии, а также для создания тканеинженерных конструкций. Фиброиновые микроносители были минерализованы, что привело к появлению кристаллов фосфата кальция на их поверхности. Способность минерализованных и не минерализованных микроносителей поддерживать остеогенную дифференцировку остеобластоподобных клеток линии MG-63 была оценена по уровню активности щелочной фосфатазы, раннего маркера остеогенеза. Было показано, что клетки активно пролиферировали на поверхности как минерализованных, так и немодифицированных микроносителей. Культивирование MG-63 на поверхности фиброиновых микроносителей приводило к повышению активности щелочной фосфатазы, что указывало на остеогенную дифференцировку клеток MG-63 в отсутствие индукторов. Уровень щелочной фосфатазы был выше при использовании минерализованных микроносителей. При традиционном двухмерном культивировании клеток MG-63 активность щелочной фосфатазы была близка к нулевому уровню. В отличие от традиционного монослойного культивирования при использовании микроносителей клетки находятся в трёхмерных условиях, более близких к физиологическим. Это может оказывать значительное влияние на их морфологию и функциональные свойства. В ходе работы также были охарактеризованы механические свойства пористых скаффолдов, использованных для получения микроносителей.

Ключевые слова: фиброин, остеогенная дифференцировка, минерализация, трёхмерное культивирование, микроноситель.

Микроносители — это частицы, размеры которых, как правило, не превышают 500 мкм, используемые для культивирования субстрат-зависимых клеток. Микроносители характеризуются высоким соотношением площадь/объем и могут использоваться для динамического культивирования клеток в биореакторах [1]. Такие системы используются для наработки клеток [2] или клеточных продуктов [3]. Микроносители позволяют наращивать большие количества клеток для терапевтического использования [4]. Культивирование клеток на микроносителях из биodeградируемых материалов дает возможность трансплантировать клетки без снятия с подложки. В этом случае клетки лучше сохраняют жизнеспособность, что обеспечивает

большую эффективность клеточной терапии [2]. Также биodeградируемые микроносители могут быть использованы для доставки и контролируемого высвобождения не клеточных терапевтических препаратов [5].

Микроносители в сочетании с остеогенными клетками могут применяться для восстановления дефектов кости [6]. Также они могут быть использованы для получения макроскопических тканеинженерных конструкций [7].

Остеогенная дифференцировка стимулируется растворимыми индукторами остеогенеза, однако известно, что физическая и химическая структура поверхности биоматериала может влиять на пролиферацию и дифференцировку клеток [8].

Шёлк имеет долгую историю применения в медицине в качестве шовного материала, а сравнительно недавно нашел применение в тканевой инженерии. Фиброин шёлка тутового шелкопряда *Bombyx mori* также может быть использован в качестве материала для микроносителей. Данный материал не токсичен, характеризуется высокой биосовместимостью и способностью к биорезорбции [9]. Ранее нами было показано, что микроносители на основе фиброина шёлка поддерживают адгезию и пролиферацию фибробластов и кератиноцитов — основных клеток, участвующих в регенерации кожи [10, 11].

Механические свойства фиброина позволяют изготавливать из него скаффолды, являющиеся основой тканеинженерных конструкций для регенерации костной ткани [12]. Показано, что имплантация скаффолда на основе фиброина приводит к существенному ускорению регенерации дефекта кости [13].

В данной работе было продемонстрировано стимулирование остеогенной активности клеток линии MG-63 в условиях трёхмерного культивирования на фиброиновых микроносителях и минерализованных фиброиновых микроносителях, а также изучены механические свойства пористых скаффолдов, на основе которых получены исследуемые микроносители.

Материалы и методы

Изготовление скаффолдов и микроносителей.

Скаффолды изготавливали из водного раствора фиброина (20 мг/мл).

Микроносители получали путем криоизмельчения пористых матриц [11]. Полученную суспензию калибровали через лабораторные сита с диаметром отверстий 500, 250 и 100 мкм (ООО «Крафт», Россия). Для дальнейшей работы использовали фракцию частиц размером 100–250 мкм.

Минерализация микроносителей. Минерализацию микроносителей проводили путем осаждения фосфата кальция [14]. Процесс был разделен на две стадии: прекальцификация и кальцификация. Для стадии прекальцификации готовили раствор, содержащий 4 г NaCl, 0,139 г CaCl₂, 0,152 г MgCl₂·6H₂O, 0,176 г NaHCO₃ и 0,089 г Na₂HPO₄·2H₂O в 100 мл воды очищенной на установке MilliQ, («Millipore», Франция). Все соли производства Sigma-Aldrich, Германия. Раствор насыщали углекислым газом при 37°C. Микрочастицы помещали в приготовленный раствор и инкубировали при 37°C в течение суток.

Раствор для проведения кальцификации, содержащий 4 г NaCl, 0,139 г CaCl₂, 0,03 г MgCl₂·6H₂O, 0,088 г NaHCO₃ и 0,089 г Na₂HPO₄·2H₂O в 100 мл воды насыщали углекислым газом при 50°C. Микрочастицы помещали в приготовленный раствор и инкубировали при 50°C в течение суток.

Минерализацию оценивали по окрашиванию фосфата кальция ализариновым красным (ARS).

Для этого микрочастицы помещали в 0,5%-ный раствор ARS (Panreac, Испания) при pH = 4,1–4,3 и инкубировали в темноте в течение часа. Далее образцы отмывали водой и изучали на инвертированном микроскопе Axiovert 200M LSM510 META (Carl Zeiss, Германия).

Культивирование MG-63 на микроносителях.

Клетки линии MG-63 культивировали в среде Eagle's minimal essential medium (EMEM) производства Lonza, (Бельгия), содержащей 1% Non-Essential Amino Acid (NEAA) производства Lonza (Бельгия) и 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) производства HyClone (США). Микроносители стерилизовали 70%-ным спиртом и отмывали средой EMEM. В лунки 96-луночной круглодонной планки вносили по 50 мкл суспензии микроносителей и по 40 тыс. клеток MG-63 в 50 мкл в среды. Инкубировали 6 ч, затем переносили в лунки 24-луночной планки в 1 мл культуральной среды. Клетки на микроносителях культивировали при 37°C в присутствии 5% CO₂. Среду меняли каждые 3 сут.

Изучение клеток на поверхности микроносителей методом конфокальной микроскопии. На 1 и 4 сут культивирования клетки на микроносителях фиксировали 4%-ным формальдегидом. Ядра клеток окрашивали Sytox green (Sigma-Aldrich, Германия). Образцы изучали на микроскопе Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 (Nikon Corporation, Япония) с объективом Plan Apo VC DIC N2 с 20-кратным увеличением и лазером с длиной волны 488 нм. Диаметр конфокальной диафрагмы, установки лазера и анализирующих фильтров настраивали согласно рекомендации производителей. Получали серии оптических срезов по всей толщине микроносителя.

Определение активности щелочной фосфатазы при культивировании MG-63 на микроносителях на основе фиброина. Остеогенная дифференцировка клеток оценивалась по уровню активности щелочной фосфатазы (ALP) на 7 сут культивирования на микроносителях. В качестве контроля использовали клетки, выращенные на культуральном пластике (двухмерные условия). Клетки лизировали в растворе TGT (50 mM Tris, 100 mM глицина и 0,1% Triton X-100, pH 10,5). В лунки с лизатом вносили по 100 мкл раствора бесцветного р-нитрофенилфосфата 10 мг/мл, инкубировали в темноте в течение 30 мин, затем реакцию останавливали, добавляя в лунки по 50 мкл 0,2 М NaOH. Под воздействием ALP от нитрофенил-фосфата отщепляется фосфатная группа, в результате чего образуется р-нитрофенол, имеющий желтый цвет. Активность щелочной фосфатазы оценивали по оптической плотности раствора при 405 нм.

Реология матриц из фиброина. Эксперименты по изучению механических свойств проводились на реометре Anton Paar MCR 302 (Австрия). Исследования проводились на влажных образцах. Реометр был оборудован измерительной системой плита/плита. Типичная толщина исследуемых об-

разцов составила 3–4 мм (это на порядок больше характерного размера пор), диаметр — 2,5 см. Сначала проводили амплитудный тест, чтобы определить диапазон линейной вязкоупругости при угловой частоте 10 рад/с. Процедура выбора расстояния между двумя плитами (зазора), при котором свойства образца измеряются корректно, была аналогична описанной ранее [15]. После измерения характерного диапазона линейной вязкоупругости (0,3%) и оптимального зазора (относительная деформация 0,1–0,3) на другом образце проводили частот-

ный тест при угловой частоте от 0,1 до 100 рад/с. Во всех тестах измеряли модули сохранения G' и потерь G'' , а также их отношение — коэффициент демпфирования (тангенс механических потерь):

$$\tan(\delta) = G''/G'.$$

Результаты и обсуждение

Из фиброиновых скаффолдов были получены микроносители. Микроносители представляли из себя фрагменты пористых матриц размером от 100 до 250 мкм (рис. 1, А).

Микроносители были подвергнуты минерализации фосфатом кальция. Окрашивание ARS подтвердило наличие минерализации (рис. 1, Б). Поверхность минерализованных микроносителей была покрыта кристаллами фосфата кальция, что увеличивало её шероховатость (рис. 1, Б).

Для оценки способности микроносителей поддерживать остеогенную дифференцировку использовали клетки остеосаркомы человека MG-63. Клетки этой линии проявляют свойства остеобластов и часто используются для модельного изучения остеогенеза [16]. При культивировании как на фиброиновых, так и на минерализованных фиброиновых микроносителях клетки MG-63 активно пролиферировали на поверхности микрочастиц (рис. 2, А–Г). Данный результат согласуется с рабо-

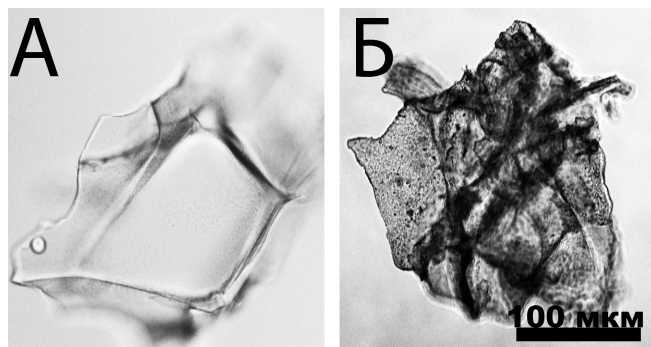


Рис. 1. Микрофотографии микроносителей, окрашенных али-
зазиновым красным, в проходящем свете: А — фиброиновый
микроноситель; Б — минерализованный микроноситель на
основе фиброина

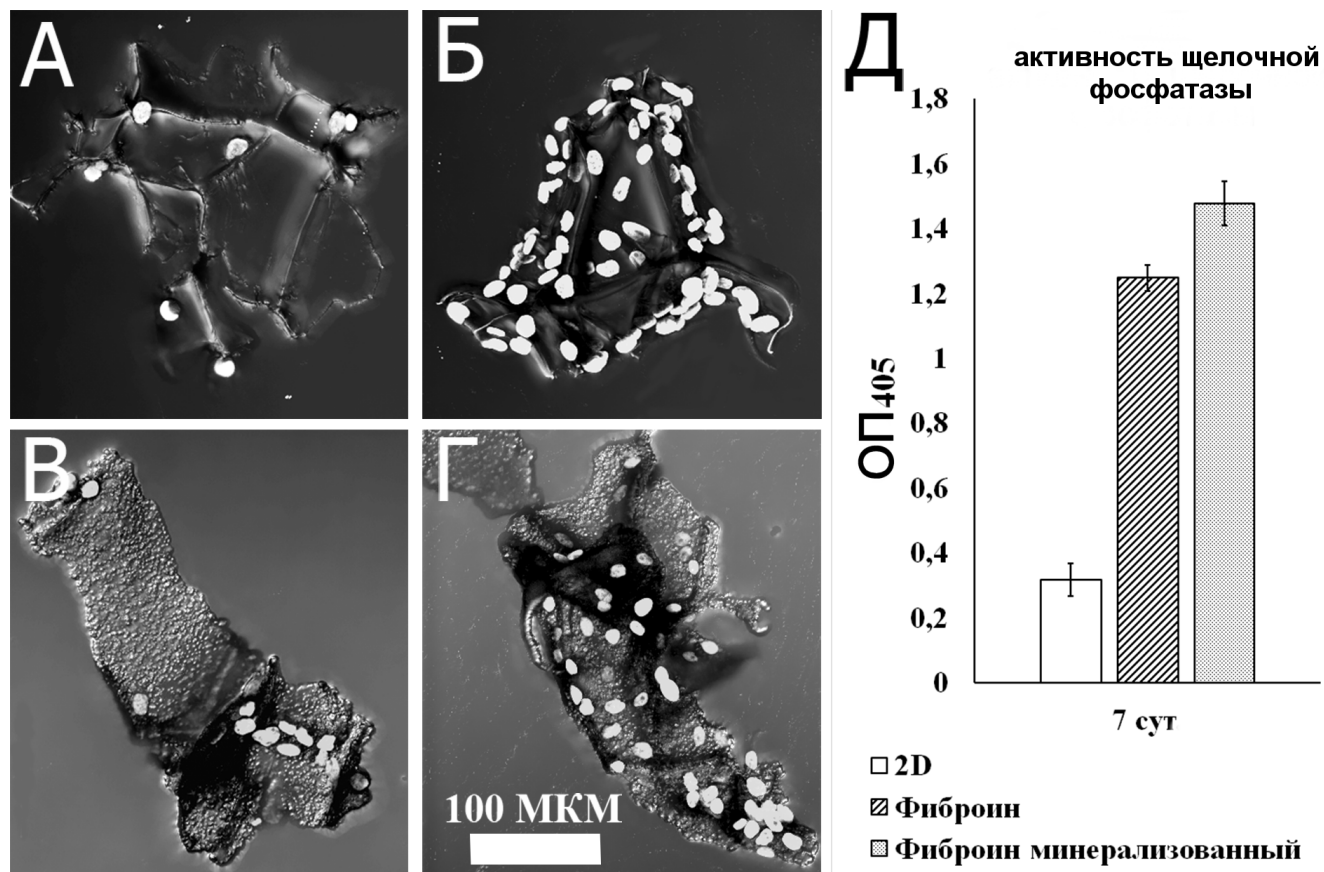


Рис. 2. А–Г — увеличение количества клеток на поверхности фиброиновых (А, Б) и минерализованных (В, Г) микроносителей на первые (А, В) и четвёртые (Б, Г) сутки культивирования (представлены изображения ядер клеток, окрашенных Sytox green, наложенные на изображения частиц в проходящем свете); Д — активность щелочной фосфатазы при культивировании MG-63 на микроносителях и в двухмерных условиях.

той, в которой было продемонстрировано увеличение скорости адгезии и пролиферации первичной культуры мышинных эмбриональных фибробластов на поверхности минерализованных трёхмерных пористых фиброиновых скаффолдов [17].

Трёхмерные условия, создаваемые микроносителями, являются одним из факторов, способствующих индукции остеогенеза. Так, человеческие мезенхимальные стволовые клетки (МСК) могут спонтанно дифференцироваться по остеогенной линии на микроносителях с коллагеновым покрытием [18]. На рис. 2, Д представлены данные по определению активности щелочной фосфатазы, раннего маркера остеогенеза, при культивировании MG-63 на пластике в трёхмерных условиях: на фиброиновых микроносителях и минерализованных фиброиновых микроносителях в среде без добавления индукторов остеогенеза.

Уровень активности щелочной фосфатазы при культивировании клеток на микроносителях, как минерализованных, так и немодифицированных, оказался значительно выше, чем на культуральном пластике (рис. 2, Д). Кроме того, минерализация также вызывает повышение уровня активности щелочной фосфатазы ($p < 0,05$). Следовательно, минерализация микроносителей способствует индукции остеогенеза. Одна из возможных причин этого — изменение жёсткости субстрата. На коллагеновых матриксах было показано, что минерализация приводит к увеличению жёсткости матриксов [19]. Жёсткость субстрата может оказывать значительное влияние на функции клеток. На примере МСК было показано, что эффективность адгезии выше на мягких субстратах, в то время как остеогенная дифференцировка более выражена на жёстких субстратах [20].

Также на остеогенную дифференцировку может оказывать влияние присутствие фосфата кальция на поверхности микроносителей. Было показано, что остеобластоподобные клетки MG-63 и МСК, культивируемые на поверхности, сформированной из фосфата кальция, способны дифференцироваться по остеогенной линии *in vitro* без добавления индукторов остеогенеза, чего не происходит при культивировании клеток на пластике. Авторы предположили, что такое влияние фосфата кальция опосредовано повышенной адсорбцией некоторых белков к поверхности [8].

Минерализация поверхности микроносителей привела к появлению шероховатости (рис. 1, Б), что было показано с помощью сканирующей электронной микроскопии (данные не представлены). Наличие шероховатости также является одним из факторов, стимулирующих остеогенез [21].

Изучение механических свойств субстрата является важной задачей, поскольку эти свойства оказывают существенное влияние, например, на скорость миграции клеток [22], а также на экспрессию генов, клеточное развитие [23] и выживаемость [24].

В данной работе для описания механических характеристик матриксов использовали ротационную реометрию для характеристики вязкоупругости образца. Чтобы определить диапазон линейной вязкоупругости, обычно используют амплитудный тест, а для измерения зависимости свойств материала от частоты воздействия — частотный тест [25]. В случае с пористыми образцами, находящимися во влажном состоянии, добавляется еще один важный шаг — выбор зазора между плитами, при котором проводятся измерения. При слишком большом зазоре растёт вероятность проскальзывания плиты по поверхности образца. При слишком маленьком зазоре возможно выталкивание воды из пор образца, а также изменение морфологии (уменьшение общего объема пор), что может влиять на измеряемые механические свойства [15].

Величина зазора (g) связана с относительной деформацией образца (ϵ) по формуле:

$$\epsilon = (g_0 - g)/g_0,$$

где g_0 — точка контакта образца с плитой реометра, т.е. величина зазора, при котором нормальная сила, действующая на верхнюю плиту, равна нулю. При разных значениях зазора (и, соответственно, деформации) проводили амплитудный тест для регистрации изменения коэффициента демпфирования ($\tan(\delta)$) при сжатии образца.

Зависимость коэффициента демпфирования от относительной деформации представлена на рис. 3, А. Аналогичная зависимость наблюдалась на гидрогелях из поли-2-гидроксиэтилметакрилата [15]. На них было показано, что выбор зазора (относительной деформации) по коэффициенту демпфирования может быть более удобным, чем по значениям G' и G'' . При относительной деформации от 0 до 0,1 значение $\tan(\delta)$ падало, что говорит об улучшении контакта плиты с поверхностью образца. Далее на графике возникало плато, которое соответствует стабильному контакту образца и плиты. В качестве оптимальных значений относительной деформации выбирали середину этого плато, приблизительно 0,2. Большую деформацию не использовали, т.к. при ней происходит выталкивание воды из образца и сжатие пор.

Типичные результаты измерения вязкоупругих свойств матриксов из фиброина представлены на рис. 3, Б. Показано, что матриксы из фиброина представляют собой вязкоупругие тела, так как модуль сохранения G' выше, чем модуль потерь G'' ; среднее значение модуля сохранения при угловой частоте в 10 рад/с составило $5,9 \pm 1,1$ кПа, а модуль потерь — $0,8 \pm 0,2$ кПа (усреднение по результатам измерений, проведенных на пяти образцах).

Результаты частотного теста (рис. 3, Б) показали, что при увеличении частоты воздействия на образец значения модулей сохранения и потерь возрастали, однако G'' увеличивался в меньшей степени. С уменьшением угловой частоты происходит уменьшение модуля сохранения G' и в мень-

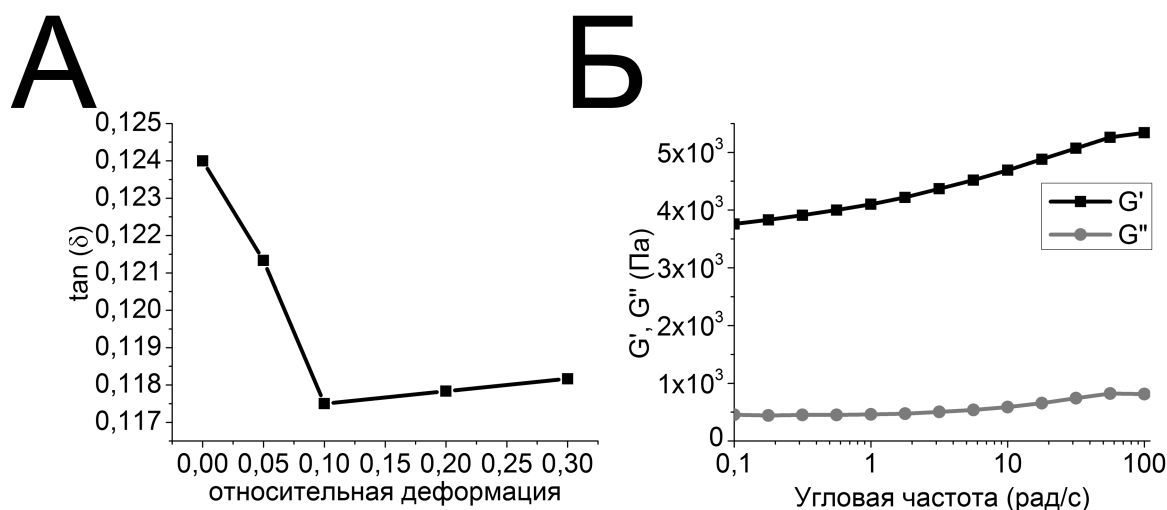


Рис. 3. А — зависимость коэффициента демпфирования от относительной деформации; Б — зависимость модуля сохранения (G') и модуля потерь (G'') от частоты воздействия.

шей степени модуля потерь G'' . Это говорит о том, что матриксы из фиброина не являются полностью сшитыми полимерами, для которых значения G' и G'' практически неизменны в широком диапазоне частот [25].

Таким образом, проведённые исследования показали, что разработанные нами фиброиновые микроносители являются превосходным субстратом для культивирования различных типов клеток, в том числе и остеогенных. За счет сложной формы, большой площади поверхности, микрорельефа и подходящих механических свойств микроносители формируют условия, способствующие остеогенной дифференцировке в отсутствие индукторов. Минерализация микроносителей приводит к улучшению остеогенных свойств субстрата, что может быть связано с появлением шероховатости на поверхности микроносителей, увеличением их жёсткости или остеиндуктивными свойствами фосфата кальция. Разработанные нами фиброиновые скаффолды, как в виде микроносителей, так и в виде

объемных пористых матриксов имеют большие перспективы в области тканевой инженерии регенерации костной ткани.

Работа осуществляется при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы” по Соглашению по предоставлению субсидии от 27 ноября 2014 г. № 14.604.21.0148 “Биорезорбируемые микроносители для доставки клеток в область заживления и регенерации ран”, уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60414X0148.

Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета и на оборудовании центра коллективного пользования Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Justice B.A., Badr N.A., Felder R.A. 3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays // *Drug Discov. Today*. 2009. Vol. 14. N 1. P. 102–107.
2. Sun L.Y., Lin S.Z., Li Y.S., Harn H.J., Chiou T.W. Functional cells cultured on microcarriers for use in regenerative medicine research // *Cell Transplant*. 2011. Vol. 20. N 1. P. 49–62.
3. Costa A.R., Withers J., Rodrigues M.E., McLoughlin N., Henriques M., Oliveira R., Rudd P.M., Azeredo J. The impact of microcarrier culture optimization on the glycosylation profile of a monoclonal antibody // *Springerplus*. 2013. Vol. 2. N 1. P. 25.
4. Chen A.K.-L., Reuveny S., Oh S.K.W. Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: achievements and future direction // *Biotechnol. Adv.* 2013. Vol. 31. N 7. P. 1032–1046.
5. Bonartsev A.P., Yakovlev S.G., Filatova E.V., Soboleva G.M., Makhina T.K., Bonartseva G.A., Shahtan K.V., Pov V.O., Kirpichnikov M.P. Sustained release of the antitumor drug paclitaxel from poly(3-hydroxybutyrate)-based microspheres // *Biochem. (Mosc.), Suppl., Ser. B Biomed. Chem.* 2012. Vol. 6. N 1. P. 42–47.
6. Yang Y., Rossi F.M.V., Putnins E.E. Ex vivo expansion of rat bone marrow mesenchymal stromal cells on microcarrier beads in spin culture // *Biomaterials*. 2007. Vol. 28. N 20. P. 3110–3120.
7. Chen M., Wang X., Ye Z., Zhang Y., Zhou Y., Tan W.-S. A modular approach to the engineering of a centimeter-sized bone tissue construct with human amniotic mesenchymal stem cells-laden microcarriers // *Biomaterials*. 2011. Vol. 32. N. 30. P. 7532–7542.
8. Müller P., Bulnheim U., Diener A., Lüthen F., Teller M., Klinkenberg E.-D., Neumann H.-G., Nebe B., Liebold A., Steinhoff G., Rychly J. Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells // *J. Cell. Mol. Med.* 2007. Vol. 12. N 1. P. 281–291.

9. Moisenovich M.M., Pustovalova O., Shackelford J., Vasiljeva T.V., Druzhinina T.V., Kamenchuk Y.A., Guzev V.V., Sokolova O.S., Bogush V.G., Debabov V.G., Kirpichnikov M.P., Agapov I.I. Tissue regeneration *in vivo* within recombinant spidroin 1 scaffolds // *Biomaterials*. 2012. Vol. 33. N 15. P. 3887–3898.
10. Arkhipova A.Y., Kotlyarova M.S., Novichkova S.G., Agapova O.I., Kulikov D.A., Kulikov A.V., Drutskaya M.S., Agapov I.I., Moisenovich M.M. New silk fibroin-based bioresorbable microcarriers // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016. Vol. 160. N 4. P. 491–494.
11. Moisenovich M.M., Kulikov D.A., Arkhipova A.Y., Malyuchenko N.V., Kotlyarova M.S., Goncharenko A.V., Kulikov A.V., Mashkov A.E., Agapov I.I., Palev F.N., Svistunov A.A., Kirpichnikov M.P. Fundamental bases for the use of silk fibroin-based bioresorbable microvehicles as an example of skin regeneration in therapeutic practice // *Ter. Arkh.* 2015. Vol. 87. N 12. P. 66–72.
12. Correia C., Bhumirata S., Yan L.-P., Oliveira A.L., Gimble J. M., Rockwood D., Kaplan D.L., Sousa R.A., Reis R.L., Vunjak-Novakovic G. Development of silk-based scaffolds for tissue engineering of bone from human adipose-derived stem cells // *Acta Biomater.* 2012. Vol. 8. N 7. P. 2483–2492.
13. Agapov I.I., Moisenovich M.M., Druzhinina T.V., Kamenchuk Y.A., Trofimov K.V., Vasilyeva T.V., Konkov A.S., Arkhipova A.Y., Sokolova O.S., Guzev V.V., Kirpichnikov M.P. Biocomposite scaffolds containing regenerated silk fibroin and nanohydroxyapatite for bone tissue regeneration // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2011. Vol. 440. N 1. P. 228–230.
14. Yang L., Hedhammar M., Blom T., Leifer K., Johansson J., Habibovic P., van Blitterswijk C.A. Biomimetic calcium phosphate coatings on recombinant spider silk fibres // *Biomed. Mater.* 2010. Vol. 5. N 4. 045002.
15. Karpushkin E., Dušková-Smrčková M., Remmler T., Lapčíková M., Dušek K. Rheological properties of homogeneous and heterogeneous poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels // *Polym. Int.* 2012. Vol. 61. N 2. P. 328–336.
16. Czekanska E.M., Stoddart M.J., Richards R.G., Hayes J.S. In search of an osteoblast cell model for *in vitro* research // *Eur. Cell. Mater.* 2012. Vol. 24. P. 1–17.
17. Moisenovich M.M., Arkhipova A.Y., Orlova A.A., Drutskaya M.S., Volkova S.V., Zacharov S.E., Agapov I.I., Kirpichnikov M.P. Composite Scaffolds containing silk fibroin, gelatin, and hydroxyapatite for bone tissue regeneration and 3D Cell Culturing // *Acta Naturae*. 2014. Vol. 6. N 1. P. 96–101.
18. Tseng P.C., Young T.H., Wang T.M., Peng H.W., Hou S.M., Yen M.L. Spontaneous osteogenesis of MSCs cultured on 3D microcarriers through alteration of cytoskeletal tension // *Biomaterials*. 2012. Vol. 33. N 2. P. 556–564.
19. Al-Munajjed A.A., Plunkett N.A., Gleeson J.P., Weber T., Jungreuthmayer C., Levingstone T., Hammer J., O'Brien F.J. Development of a biomimetic collagen-hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering using a SBF immersion technique // *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2009. Vol. 90B. N 2. P. 584–591.
20. Li X., Huang Y., Zheng L., Liu H., Niu X., Huang J., Zhao F., Fan Y. Effect of substrate stiffness on the functions of rat bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stem cells *in vitro* // *J. Biomed. Mater. Res. A* 2014. Vol. 102. N 4. P. 1092–1101.
21. Cheng Q., Rutledge K., Jabbarzadeh E. Carbon nanotube-poly(lactide-co-glycolide) composite scaffolds for bone tissue engineering applications // *Ann. Biomed. Eng.* 2013. Vol. 41. N 5. P. 904–916.
22. Zaari N., Rajagopalan P., Kim S.K., Engler A.J., Wong J.Y. Photopolymerization in microfluidic gradient generators: microscale control of substrate compliance to manipulate cell response // *Adv. Mater.* 2004. Vol. 16. N 23–24. P. 2133–2137.
23. Dupont S., Morsut L., Aragona M., Enzo E., Giulitti S., M. Cordenonsi, Zanconato F., Le Digabel J., Forcato M., Bicciato S., Elvassore N., Piccolo S. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction // *Nature*. 2011. Vol. 474. N 7350. P. 179–183.
24. Wang H.B., Dembo M., Wang Y.L. Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2000. Vol. 279. N 5. P. C1345–1350.
25. Шрамм Г. Основы практической реологии и реометрии. М: КолосС, 2003. 312 с.

Поступила в редакцию 19.07.2016

Принята в печать 29.08.2016

METHODS

INDUCTION OF OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF OSTEOBLAST-LIKE CELLS MG-63 DURING 3D CULTIVATION ON FIBROIN MICROCARRIERS

M.S. Kotlyarova^{1,*}, V.A. Zhuikov², Y.V. Chudinova^{1,2}, D.D. Khaidapova³, A.M. Moisenovich⁴, A.S. Kon'kov¹, L.A. Safonova^{1,5}, M.M. Bobrova^{1,5}, A.Y. Arkhipova⁴, A.V. Goncharenko⁴, K.V. Shaitan¹

¹ Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

² Research Center of Biotechnology, RAS, Leninsky prosp. 33–2, Moscow, 119071, Russia;

³ Department of Soil Physics and Reclamation, School of Soil Science, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

⁴ Laboratory of Confocal Microscopy, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

⁵ Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Health of the Russian Federation, Shchukinskaya ul. 1, Moscow, 113182, Russia

*e-mail: kotlyarova.ms@gmail.com

We have developed microcarriers made from silk fibroins. Microcarriers can be used as a substrate for cell cultivation and cell delivery during cell-based therapy, and for the construction of bioengineered tissue. Fibroin microcarriers were mineralized, which led to the appearance of

calcium phosphate crystals on their surface. The ability of mineralized and non-mineralized microcarriers to support osteogenic differentiation of the osteoblast-like cell line MG-63 was estimated by alkaline phosphatase activity, an early marker of bone formation. The experiment showed cells actively proliferating on the surface of both mineralized and non-modified microcarriers. Culturing MG-63 on the surface of fibroin microcarriers resulted in an increase of alkaline phosphatase activity indicative of osteogenic differentiation of MG-63 cells in the absence of inductors. The level of alkaline phosphatase was higher when mineralized microcarriers were used. Alkaline phosphatase activity of MG-63 cells cultivated using traditional two-dimensional approaches were close to zero. As opposed to conventional monolayer culturing, microcarriers culture cells in a three-dimensional environment that is closer to physiological conditions. This can have a significant impact on their morphology and functional properties. During this study we also characterized mechanical properties of porous scaffolds used for microcarriers.

Keywords: *fibroin, osteogenic differentiation, mineralization, three-dimensional culture, micro-carrier.*

Сведения об авторах

Котлярова Мария Сергеевна — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: kotlyarova.ms@gmail.com

Жуйков Всеволод Александрович — мл. науч. сотр. ФИЦ Биотехнологии РАН. Тел.: 8-495-939-23-74; e-mail: vsevolod1905@ya.ru

Чудинова Юлия Владимировна — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-00-06; e-mail yuli4_08@mail.ru

Хайдапова Долгор Доржиевна — доцент кафедры физики и мелиорации почв факультета почвоведения МГУ. Тел.: 8-495-939-36-84; e-mail dkhaydapova@yandex.ru

Мойсенович Анастасия Михайловна — соискатель межкафедральной лаборатории конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail a-moisenovich@mail.ru

Коньков Андрей Сергеевич — соискатель межкафедральной лаборатории конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-59-65; e-mail andrey.s.konkov@gmail.com

Сафонова Любовь Александровна — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, инженер лаб. бионанотехнологий ФГБУ “ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова”. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail saf.lyubov.msu@gmail.com

Боброва Мария Михайловна — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, инженер лаб. бионанотехнологий ФГБУ “ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова”. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: mariabobrova.msu@gmail.com

Архипова Анастасия Юрьевна — мл.науч.сотр. межкафедральной лаборатории конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: anastasia-yu-arkhipova@ya.ru

Гончаренко Анна Владимировна — вед. науч. сотр. межкафедральной лаборатории конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: pylaevanna@gmail.com

Шайтан Константин Вольдемарович — проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-23-74; e-mail shaytan49@ya.ru