### МЕТОДЫ

УДК 57.089.67+57.086.2

# БИОРЕЗОРБИРУЕМЫЕ СКАФФОЛДЫ НА ОСНОВЕ ФИБРОИНА ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

# М.С. Котлярова<sup>1,\*</sup>, А.Ю. Архипова<sup>2</sup>, А.М. Мойсенович<sup>1</sup>, Д.А. Куликов<sup>3</sup>, А.В. Куликов<sup>4</sup>, А.С. Коньков<sup>1</sup>, М.А. Бобров<sup>3</sup>, И.И. Агапов<sup>5</sup>, М.М. Мойсенович<sup>2</sup>, А.В. Молочков<sup>3</sup>, А.В. Гончаренко<sup>2</sup>, К.В. Шайтан<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Кафедра биоинженерии и <sup>2</sup>межкафедральная лаборатория конфокальной микроскопии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

<sup>3</sup>Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского,

Россия, 129110, г. Москва, ул. Щепкина, д. 61/2, корп. 1;

<sup>4</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,

Россия, 142290, Московской обл., г. Пущино, ул. Институтская, д. 3;

<sup>5</sup>Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова

Минздрава России, Россия, 123182, г. Москва, ул. Щукинская, д. 1

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

Использование тканеинженерных конструкций на основе скаффолдов, имитирующих внеклеточный матрикс живой ткани, открывает новые возможности в лечении различных патологий и травм, связанных с повреждениями тканей и органов. Фиброин шёлка тутового шелкопряда Bombyx mori является биосовместимым, биорезорбируемым полимером, обладающим высокой механической прочностью и эластичностью, что позволяет создавать на его основе скаффолды для регенерации различных тканей, в том числе костной. В представленной работе были получены фиброиновые скаффолды в виде пористых губок, плёнок и гибридных скаффолдов, представляющих из себя бислойные конструкции, в которых трёхмерная структура, свойственная скаффолдам в виде губки, ограничена с одной стороны плёнкой. Были исследованы структура скаффолдов и их биосовместимость: показано, что иммортализованные и первичные фибробласты, а также остеобластоподобные клетки успешно прикрепляются к поверхности исследованных скаффолдов и пролиферируют на ней. В экспериментах in vivo на модели дефекта бедренной кости крысы через четыре недели после имплантации пористого фиброинового скаффолда в области имплантата наблюдались многочисленные очаги остеогенеза, что свидетельствует об остеокондукции скаффолдов.

**Ключевые слова:** регенерация, костные заменители, модель костного дефекта, фиброин, скаффолды, тканевая инженерия

Костная ткань характеризуется уникальной способностью при регенерации повреждений восстанавливать свою нативную структуру. Однако при наличии обширных повреждений, а также в пожилом возрасте и при некоторых патологических состояниях нормальная структура кости не может быть восстановлена. В таких случаях для активации процесса регенерации костной ткани используют костные имплантаты.

Способность к тканевой регенерации для костных имплантатов измеряется остеогенным, остеокондуктивным и остеоиндуктивным потенциалами [1]. Костные имплантаты должны обеспечивать структурную целостность кости, а также обладать способностью к остеокондукции, то есть способствовать восстановлению целостности кости за счет врастания ткани в материал [2]. Имплантаты, обладающие остеогенным потенциалом, содержат в себе остеобласты или их предшественники, восстанавливающие структуру кости [3]. При наличии у имплантата остеоиндуктивных свойств происходят миграция мезенхимальных стволовых клеток реципиента в зону повреждения и их дифференцировка в остеобласты, запускающие процесс регенерации [4].

Ауто- и аллотрансплантаты являются наиболее распространенным видом костных имплантатов, получаемых трансплантацией костной ткани в пределах одного организма или от донора. Аллотрансплантаты характеризуются остеокондуктивными и, в некоторых случаях, остеоиндуктивными свойствами, а аутотрансплантаты также обладают остеогенным потенциалом [2]. Однако использование таких имплантатов ограничено рисками инфекционных осложнений и отторжения в случае аллотрансплантатов, а также недостаточностью материала при использовании аутотрансплантатов [5]. В связи с этим активно развивается разработка костных заменителей.

Одним из вариантов решения этой задачи является использование тканеинженерных скаффолдов. Скаффолды поддерживают целостность ткани или органа, а также обеспечивают субстрат для адгезии, миграции и пролиферации клеток, участвующих в процессе регенерации [6]. Материал скаффолдов должен быть биорезорбируемым, что позволяет скаффолду рассасываться в процессе формирования новой ткани. Для формирования таких конструкций может быть использован фиброин шёлка. Большие надежды возлагаются на использование фиброина в качестве основы для создания костных имплантатов, так как данный материал является одним из наиболее прочных природных полимеров и при этом обладает высокой биосовместимостью, устойчивостью и способностью к управляемой биорезорбции [7].

В настоящей работе исследованы свойства различных фиброиновых скаффолдов: плоских скаффолдов в виде пленки (СП), обладающих сложной трёхмерной структурой скаффолдов в виде пористой губки (СПГ) и бислойных гибридных скаффолдов (ГС), представляющих собой пористые конструкции, сформированные на пленке. В ходе исследования были изучены некоторые аспекты применения данных скаффолдов для регенерации костной ткани.

#### Материалы и методы

**Формирование скаффолдов.** СПГ и СП получали из водных растворов фиброина согласно методике, описанной ранее [8].

ГС получали посредством формирования пористого скаффолда на поверхности СП.

Для введения флуоресцентной метки скаффолды инкубировали в растворе тетраметилромадинизотиоцианата (ТРИТЦ, Sigma), не связавшийся краситель отмывали солевым фосфатным буфером.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Структуру скаффолдов изучали на микроскопе Сатьсап S2 (Cambridge Instruments, Великобритания). При подготовке к исследованиям проводили дегидратацию образцов в возрастающих концентрациях этилового спирта и ацетоне, затем высушивали на приборе Hitachi critical point dryer HCP-2 (Hitachi, Ltd., Япония) и напыляли слой платины толщиной 20 нм с использованием прибора Ion Coater IB3 (Eiko Engineering Co., Япония).

Клеточные линии и условия культивирования. Выделение мышиных эмбриональных фибробластов (МЭФ), экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок (GFP, green fluorescent protein), проводили, как описано ранее [9]. МЭФ и иммортализованные мышиные фибробласты линии 3T3 культивировали в среде Игла в модификации Дульбекко (DMEM) производства ПанЭко (Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) производства HyClone (США). Остеобластоподобные клетки линии MG-63 культивировали на минимальной среде Игла (ЕМЕМ) производства Lonza (Бельгия), в которую добавляли 1% раствора заменимых аминокислот (NEAA) производства Lonza (Бельгия) и 10% ЭТС. Все типы клеток культивировали при 37°С в присутствии 5% СО<sub>2</sub>.

**Культивирование клеток на скаффолдах.** Все скаффолды стерилизовали в 70%-ном этаноле. Для проведения исследований *in vitro* отмывали скаффолды средами культивирования без добавления ЭТС. В лунки 24-луночных плашек помещали круглые фрагменты скаффолдов диаметром 15 мм и наносили на них клетки в 1 мл соответствующих сред культивирования. Через пять часов скаффолды переносили в чашки Петри диаметром 35 мм, содержащие по 2 мл среды. При культивировании клеток на скаффолдах каждые трое суток заменяли среды на свежие.

Фибробласты линии 3T3 культивировали на СП и на пористой поверхности ГС. Исходная плотность клеток составляла 20 тыс. клеток на скаффолд. На первые, третьи и седьмые сутки проводили МТТ-тест, как описано ранее [10].

Для культивирования МЭФ были использованы СП, СПГ, и ГС, меченные ТРИТЦ. На скаффолды наносили по 20 тыс. клеток. На первые, третьи и седьмые сутки культивирования клетки фиксировали и изучали образцы методом конфокальной микроскопии.

На меченные ТРИТЦ скаффолды всех типов наносили по 80 тыс. остеобластоподобных клеток MG-63 и культивировали их в течение суток. Затем фиксировали клетки 10%-ным формалином в солевом фосфатном буфере (БиоВитрум, Россия), окрашивали фаллоидином, конъюгированным с флуоресцеин-5-изотиоцианатом (фаллоидин-Alexa Fluor<sup>™</sup> 488) производства Invitrogen (США), для выявления актинового цитоскелета и дигидрохлоридом 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI, Sigma-Aldrich, США) для обнаружения ядер клеток. Полученные препараты изучали методом конфокальной микроскопии.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ). Исследования проводили на микроскопе Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 (Nikon, Япония). Получали серии оптических срезов с использованием объективов CFI Plan Apochromat VC 20x/0,75 и Plan Fluor DIC 40x/1,30 Oil.

Модель искусственного дефекта бедренной кости. Изучение регенерации костной ткани in vivo проводили на крысах породы Wistar под наркозом (смесь анестетика ZoletilT 100 (Virbac, Франция) и миорелаксанта Рометар (Bioveta, Чехия) в стерильном фосфатно-солевом буфере в концентрациях 10% и 20% по объему, соответственно) в стерильных условиях. После выбривания операционного поля и обработки кожи 70%-ным раствором этанола создавали линейный разрез длиной до 25 мм. Фасции бедренной мышцы расслаивали вдоль до доступа к бедренной кости. Костный дефект в диафизе кости формировали с помощью стоматологического бора, диаметр дефекта составлял 2 мм. В полость имплантировали фрагмент пористого скаффолда соответствующего размера.

Приготовление гистологических образцов. Материал фиксировали в 10%-ном растворе Буэна (насыщенный водный раствор пикриновой кислоты, формалин и уксусная кислота в соотношении 15:5:1). Дополнительно проводилась декальцинация в 25%ном растворе трилона Б. Фрагменты костных тканей, прилегающих к области повреждения, заливали в парафин и готовили срезы толщиной 5—6 µм. Затем срезы регидратировали, окрашивали гематоксилином и эозином, а затем заливали в бальзам. Препараты изучали на микроскопе Axiovert 200M LSM510 META (CarlZeiss, Германия) с использованием камеры AxioCam MRC 5 (Carl Zeiss, Германия).

#### Результаты

Получение различных типов скаффолдов из фиброина шёлка. Для изучения возможности создания биорезорбируемых костных заменителей на основе фиброина шелка были получены три типа скаффолдов: СП (рис. 1, А и Б), трёхмерные СПГ (рис. 1, В и Г) и бислойные ГС (рис. 1, Д и Е). С помощью СЭМ была охарактеризована структура поверхности полученных скаффолдов. Для СП был характерен микрорельеф (рис. 1, Б). Фиброиновые СПГ обладали трёхмерной пористой структурой со сложной топографией (рис. 1, Г). Особенностью ГС



Рис. 1. Скаффолды на основе фиброина шёлка: СП (А–Б), СПГ (В–Г), ГС (Д–Е). Слева расположены макрофотографии конструкций, справа – структура поверхности скаффолдов (СЭМ)

(рис. 1, Д и Е) является формирование пористого скаффолда на фиброиновой пленке, что приводит к образованию бислойной гибридной конструкции, на одной стороне имеющей открытую, пористую структуру, а на другой – плоскую поверхность.

Культивирование фибробластов и остеобластоподобных клеток на различных типах скаффолдов на основе фиброина. Для изучения способности изделий из фиброина шёлка поддерживать адгезию и пролиферацию клеток было проведено исследование адгезии и роста первичной культуры МЭФ, иммортализованных фибробластов 3Т3 и клеток остеосаркомы человека MG-63 на разных типах фиброиновых скаффолдов. На рис. 2, А представлено изображение МЭФ на поверхности губчатой части гибридного скаффолда, поверхность которой показана на рис. 2, Б. Пролиферацию клеток на поверхности скаффолдов оценивали посредством МТТ-теста (рис. 2, В). Результаты экспериментов показали способность СП, СПГ и ГС поддерживать адгезию и пролиферацию клеток всех использованных в эксперименте типов. При этом фибробласты линии 3T3 продолжали активно пролиферировать на пористой поверхности ГС до 7-х сут эксперимента, в то время как на СП прекращали рост после 3 сут культивирования.

При культивировании клеток остеосаркомы человека MG-63 на фиброиновых скаффолдах, имеющих трёхмерную структуру (СПГ и ГС), значительная часть клеток образовывала контакты с материалом скаффолда и другими клетками, лежащими в разных плоскостях (рис. 2, Д–3), что не было характерно для клеток, культивируемых на СП (данные не представлены).

Регенерация дефекта бедренной кости. Гистологический анализ области имплантации через 4 нед. после операции показал, что внутри скаффолда наблюдаются незначительная лимфоцитарная инфильтрация и очаги остеогенеза (рис. 3, А и Б). В области имплантата выявлялись остеогенные клетки — остеокласты, остеобласты и остеоциты.

#### Обсуждение

Создание различных типов биорезорбируемых скаффолдов для восстановления тканей является важной задачей для развития регенеративной медицины. В настоящей работе представлены три типа скаффолдов из фиброина (рис. 1), которые могут быть использованы для создания костных имплантатов на их основе.

Костные имплантаты, как правило, используются для заполнения объемных дефектов, что ограничивает применение плоских скаффолдов для этой цели. В основном они используются для модельных исследований и сравнения с трёхмерными конструкциями [11]. Тем не менее, СП также могут иметь свою область применения, в частности, для создания биорезорбируемых барьерных мембран, используемых при восстановлении периодонта. Их



Рис. 2. Адгезия и пролиферация клеток на разных типах фиброиновых скаффолдов. Верхний ряд (А – В) – фибробласты на поверхности фиброиновых скаффолдов: А – МЭФ на поверхности ГС (выявлен GFP, накапливающийся в клетках, данные КЛСМ), Б – губчатая поверхность ГС, окрашенного ТРИТЦ (данные КЛСМ), В – пролиферация фибробластов линии 3T3 на СП и ГС (данные МТТ-теста). Нижний ряд: (Г – Ж) – остеобластоподобные клетки MG-63 на поверхности СПГ, окрашенного ТРИТЦ (данные КЛСМ); Г – цитоскелет MG-63, выявленный фаллоидин – Alexa Fluor™ 488), Д – ядра клеток, визуализированные DAPI, Е – материал скаффолда, связанный с ТРИТЦ, Ж – наложение каналов Г–Е

функциональное значение состоит в том, чтобы физически отделить область дефекта от окружающих мягких тканей и не позволить быстро растущим эпителиальным клеткам заполнить ее раньше, чем в эту область врастут ткани периодонтальной связки и альвеолярных костей [12]. Также для этой цели могут быть использованы многослойные мембраны, имеющие с одной стороны гладкую поверхность для обеспечения барьерной функции, а с другой пористую – для адгезии и пролиферации специфических клеток периодонта [13]. Таким образом, использование ГС, имеющих подобную структуру, для восстановления тканей периодонта представляется достаточно перспективным. Такого же типа гибридные конструкции были успешно использованы для восстановления дефекта свода черепа крысы [14].

Для восстановления дефектов кости наиболее часто применяются пористые скаффолды [15, 16]. Пористая структура скаффолда важна для миграции и пролиферации клеток, участвующих в регенерации кости, а также васкуляризации новообразованной ткани [17].

Изучение роста различных типов клеток на поверхности исследуемых скаффолдов показало биосовместимость материала и способность поддерживать адгезию и пролиферацию разных типов клеток на их поверхности (рис. 2).

Фибробласты – резидентные клетки соединительных тканей, оказывающие огромное влияние на процессы регенерации различных тканей и ор-



Рис. 3. Применение фиброиновых скаффолдов для регенерации костной ткани. А–Б – гистологический анализ тканей, сформированных на месте дефекта бедренной кости крысы, закрытого фиброиновым СПГ, окраска гематоксилин-эозином. А – остеокласт (1), взаимодействующий с материалом скаффолда (\*), Б – остеобласты (2) и остеоциты (3) внутри материала скаффолда (\*)

ганов [18]. Способность скаффолдов поддерживать адгезию и пролиферацию этого типа клеток является важным показателем биосовместимости.

При использовании СПГ и ГС клетки обнаруживались на поверхностях скаффолда, также значительная часть клеток образовывала контакты с материалом скаффолда и другими клетками в разных плоскостях (рис. 2, Д–3). Такие клетки, как фибробласты и остеобласты, *in vivo* находятся в трёхмерной среде, где они могут образовать контакты с внеклеточным матриксом и другими клетками во всех плоскостях [19]. Таким образом, при культивировании клеток на СПГ и ГС клетки находятся в условиях, приближенных к физиологическим. Создание трёхмерной среды является одним из факторов, способствующих дифференцировке остеобластов [20, 21].

Имплантация пористого фиброинового скаффолда в область костного дефекта позволила в некоторой степени восстановить целостность кости, что способствовало сохранению ее функциональности в период регенерации. Через 4 нед. после операции в области имплантации были обнаружены клетки, участвующие в регенерации кости (рис. 3). Наблюдались остеобласты, вырабатывающие компоненты костного внеклеточного матрикса, в костных лакунах были выявлены остеоциты, обладающие характерной отростчатой формой. Также были обнаружены остеокласты, полинуклеарные макрофаги костной ткани, резорбирующие материал скаффолда.

Наличие остеоспецифических клеток, взаимодействующих с материалом скаффолда, указывает на его остеокондуктивные свойства, которые характеризуются способностью окружающей костной ткани врастать в имплантат [22].

Таким образом, разработанные фиброиновые скаффолды являются эффективным субстратом

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Albrektsson T., Johansson C.* Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration // Eur. Spine J. 2001. Vol. 10, suppl. 2. P. S96–S101.

2. Schroeder J.E., Mosheiff R. Tissue engineering approaches for bone repair: concepts and evidence // Injury. 2011. Vol. 42. N 6. P. 609–613.

3. *Fillingham Y., Jacobs J.* Bone grafts and their substitutes // Bone Joint J. 2016. Vol. 98, suppl. A. P. 6–9.

4. *Miron R.J., Zhang Y.F.* Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. // J. Dent. Res. 2012. Vol. 91. N 8. P. 736–744.

5. *Laurencin C., Khan Y., El-Amin S.F.* Bone graft substitutes // Expert Rev. Med. Devices. 2006. Vol. 3. N 1. P. 49–57.

6. *Wu S., Liu X., Yeung K.W.K., Liu C., Yang X.* Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering // Mater. Sci. Eng. R. Rep. 2014. Vol. 80. P. 1–36.

7. *Melke J., Midha S., Ghosh S., Ito K., Hofmann S.* Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering // Acta Biomater. 2016. Vol. 31. P. 1–16.

8. Bagrov D., Zhuikov V., Chudinova Y., Yarisheva A., Kotlyarova M., Arkhipova A., Khaydapova D., Moisenovich M., Shaitan K. Mechanical properties of films and three-dimensional scaffolds made of fibroin and gelatin // Biophysics. 2017. Vol. 62. N 1. P. 17–23.

9. Orlova A.A., Kotlyarova M.S., Lavrenov V.S., Volkova S.V, Arkhipova A.Y. Relationship between gelatin concentrations in silk fibroin-based composite scaffolds and adhesion and proliferation of mouse embryo fibroblasts // Bull. Exp. Biol. Med. 2014. Vol. 158. N 1. P. 88–91.

10. 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., Paleev 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. для адгезии и пролиферации клеток, участвующих в регенерации тканей. СПГ и ГС являются наиболее оптимальными для создания костных заменителей, так как они обладают трёхмерной пористой структурой, необходимой для восстановления этого типа ткани. Было показано, что имплантация пористого скаффолда в область дефекта в бедренной кости приводит к появлению очагов остеогенеза внутри имплантата.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки РФ по Соглашению о предоставлении субсидии от 27 октября 2015 г. № 14.607.21.0119 "Создание набора прототипов изделий из биоискусственной костной ткани и модуляторов остеогенеза для регенеративной медицины", уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60715X0119.

Исследование выполнено с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета на оборудовании Центра коллективного пользования МГУ имени М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

11. *Huang Y., Ren J., Ren T., Gu S., Tan Q., Zhang L., Lv K., Pan K., Jiang X.* Bone marrow stromal cells cultured on poly (lactide-co-glycolide)/nano-hydroxyapatite composites with chemical immobilization of ARG-GLY-ASP peptide and preliminary bone regeneration of mandibular defect thereof // J. Biomed. Mater. Res. A. 2010. Vol. 95. N 4. P. 993–1003.

12. Sheikh Z., Hamdan N., Ikeda Y., Grynpas M., Ganss B., Glogauer M. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review // Biomater. Res. 2017. Vol. 21, 9

13. *Liao S., Wang W., Uo M., Ohkawa S., Akasaka T., Tamura K., Cui F., Watari F.* A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration // Biomaterials. 2005. Vol. 26. N 36. P. 7564–7571.

14. Liao S., Yokoyama A., Zhu Y., Watari F., Ramakrishna S., Chan C.K. In vitro and in vivo behaviors of the threelayered nanocarbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite // J. Bioact. Compat. Polym. 2010. Vol. 25. N 2. P. 154–168.

15. Zhang W., Zhu C., Ye D., Xu L., Zhang X., Wu Q., Zhang X., Kaplan D.L., Jiang X. Porous silk scaffolds for delivery of growth factors and stem cells to enhance bone regeneration. // PLoS One. 2014. Vol. 9. N 7. e102371.

16. *Muraev A.A., Bonartsev A.P., Gazhva Yu.V. et. al.* Development and preclinical studies of orthotopic bone implants based on a hybrid construction from poly (3-hydroxybutyrate) and sodium alginate // Sovrem. Technol. Med. 2016. Vol. 8. N 4. P. 42–49.

17. Polo-Corrales L., Latorre-Esteves M., Ramirez-Vick J.E. Scaffold design for bone regeneration // J. Nanosci. Nanotechnol. 2014. Vol. 14. N 1. P. 15–56.

18. *Costa-Almeida R., Soares R., Granja P.L.* Fibroblasts as maestros orchestrating tissue regeneration // J. Tissue Eng. Regen. Med. 2017. DOI: 10.1002/term.2405.

19. Akhmanova M., Osidak E., Domogatsky S., Rodin S., Domogatskaya A. Physical, spatial, and molecular aspects of

ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 16. БИОЛОГИЯ. 2017. Т. 72. № 4

extracellular matrix of in vivo niches and artificial scaffolds relevant to stem cells research // Stem Cells Int. 2015. Vol. 2015. Article ID 167025.

20. 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.

21. Goncharenko A.V, Malyuchenko N.V, Moisenovich A.M., Kotlyarova M.S., Arkhipova A.Y., Kon'kov A.S., Agapov I.I., Molochkov A. V, Moisenovich M.M., Kirpichnikov M.P. Changes in morphology of actin filaments and expression of alkaline

phosphatase at 3D cultivation of MG-63 osteoblast-like cells on mineralized fibroin scaffolds // Dokl. Biochem. Biophys. 2016. Vol. 470. N 1. P. 368-370.

22. Oryan A., Alidadi S., Moshiri A., Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions // J. Orthop. Surg. Res. 2014. Vol. 9, 18.

> Поступила в редакцию 07.07.2017 г. Принята к печати 09.09.2017 г.

## **METHODS**

#### BIORESORBABLE SCAFFOLDS BASED ON FIBROIN FOR BONE TISSUE REGENERATION

M.S. Kotliarova<sup>1,\*</sup>, A.Yu. Arkhipova<sup>2</sup>, A.M. Moysenovich<sup>1</sup>, D.A. Kulikov<sup>3</sup>, A.V. Kulikov<sup>4</sup>, A.S. Kon'kov<sup>1</sup>, M.A. Bobrov<sup>3</sup>, I.I. Agapov<sup>5</sup>, M.M. Moisenovich<sup>2</sup>, A.V. Molochkov<sup>3</sup>, A.V. Goncharenko<sup>2</sup>, K.V. Shaitan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Bioengineering and <sup>2</sup>Laboratory of Confocal Microscopy, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskive gory 1-12, Moscow, 119234, Russia; <sup>3</sup>M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Shchepkina ul. 61/2-1. Moscow. 129110. Russia:

<sup>4</sup>Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of Russian. Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushino, 142290, Moscow region, Russia;

<sup>5</sup>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

The use of tissue-engineering constructs based on scaffolds that imitate the extracellular matrix of living tissue unveils new opportunities in the treatment of various pathologies and injuries associated with tissue and organ damage. Silk fibroin of silkworm Bombyx mori is a biocompatible and bioresorbable polymer with high mechanical strength and elasticity. These features allow creating scaffolds on its basis for regeneration of various tissues, including bone tissue. In the present work fibroin scaffolds were obtained in form of porous sponges, films and hybrid scaffolds. The last ones are bilayer structures in which the porous sponges intrinsic three-dimensional structure is limited on the one side by the film. The structure of scaffolds and their biocompatibility was studied. The tests showed that immortalized and primary fibroblasts, as well as osteoblast-like cells, successfully adhere and proliferate on the surface of the studied scaffolds. Numerous osteogenesis foci were observed in the implant region in the *in vivo* experiments on the rat femoral bone defect model four weeks after the implantation of the fibroin porous scaffold. These results indicate the osteoconduction of the scaffolds.

Keywords: regeneration, bone substitutes, bone defect model, fibroin, scaffolds, tissue engineering

#### Сведения об авторах

Котлярова Мария Сергеевна – аспирантка кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: kotlyarova.ms@gmail.com

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

Мойсенович Анастасия Михайловна — аспирантка кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: a-moisenovich@mail.ru

Куликов Дмитрий Александрович — канд. мед. наук, уч. секретарь Московского областного научно-исследовательского клинического института имени М.Ф. Владимирского. Тел.: 8-495-681-93-90; e-mail: d.kulikov@monikiweb.ru

Куликов Александр Владимирович — докт. биол. наук, зав. лабораторией клеточнотканевых механизмов компенсации функций биообъектов Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Тел.: 8-496-773-91-94; e-mail: 29.04.55@mail.ru

Коньков Андрей Сергеевич — соискатель кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-59-65; e-mail: andrey.s.konkov@gmail.com

*Бобров Максим Александрович* — науч. сотр. патологоанатомического отделения Московского областного научно-исследовательского клинического института имени М.Ф. Владимирского. Тел.: 8-495-631-74-22; e-mail: m.a.bobrov@yandex.ru

*Агапов Игорь Иванович* – докт. бил. наук, зав. лабораторией бионанотехнологий Федерального научного центра трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова. Тел.: 8-499-190-66-19; e-mail: igor agapov@mail.ru

*Мойсенович Михаил Михайлович* — канд. биол. наук, зав. межкафедральной лабораторией конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Teл.: 8-495-939-13-65; e-mail: mmoisenovich@mail.ru

*Молочков Антон Владимирович* – докт. мед. наук, проф. кафедры дерматовенерологии и дерматоонкологии, зам. директора по науке и международным связям Московского областного научно-исследовательского клинического института имени М.Ф. Владимирского. Тел.: 8-495-681-55-85; e-mail: a.molochkov@monikiweb.ru

*Гончаренко Анна Владимировна* — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. межкафедральной лаборатории конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: pylaevanna@gmail.com

Шайтан Константин Вольдемарович – докт. физ.-мат. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-23-74; e-mail: shaytan49@ya.ru