

## КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов

### СЕКРЕЦИЯ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ КРОВЕТВОРНЫХ НИШ В УСЛОВИЯХ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК, ИНДУЦИРОВАННОЙ РЕЛЬЕФНЫМ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫМ ПОКРЫТИЕМ

Л.С. Литвинова<sup>1\*</sup>, В.В. Шуплецова<sup>1</sup>, К.А. Юрова<sup>1</sup>, О.Г. Хазиахматова<sup>1</sup>, Н.М. Тодосенко<sup>1</sup>,  
В.В. Малащенко<sup>1</sup>, Е.О. Шунькин<sup>1</sup>, Е.С. Мелащенко<sup>1</sup>, М.Ю. Хлусова<sup>2</sup>, Е.Г. Комарова<sup>4</sup>,  
В.В. Чебодаева<sup>3,4</sup>, Ю.П. Шаркеев<sup>3,4</sup>, П.А. Иванов<sup>1</sup>, И.А. Хлусов<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Балтийский федеральный университет имени И. Канта,  
236016, Калининград, ул. А. Невского, 14; эл. почта: lalisalitinova@yandex.ru

<sup>2</sup>Сибирский государственный медицинский университет, Томск, 634050, ул. Московский тракт, 2

<sup>3</sup>Томский политехнический университет, Томск, 634050, пр. Ленина, 30

<sup>4</sup>Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск, 634055, пр. Академический, 2/4

С использованием мультиплекс-набора *in vitro* в культуре мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека (ММСК-ЖТ) в условиях её остеогенной дифференцировки, обусловленной 14-дневным контактом с кальций-фосфатной (КФ) поверхностью различной шероховатости, изучена секреция ряда цитокинов, хемокинов и факторов роста. Двустороннее рентгеноаморфное КФ-покрытие формировали на образцах из коммерчески чистого титана методом микродугового оксидирования в анодном режиме. Электролит состоял из водного раствора ортофосфорной кислоты (20 масс.%), карбоната кальция (9 масс.%) и нанопорошка (диаметр частиц 10-30 нм с отдельными агрегатами до 100 нм) синтетического гидроксиапатита (6 масс.%). После 4-х пассажей ММСК-ЖТ, выделенные из липоаспирата, сокультивировали в конечной концентрации  $1,5 \times 10^5$  жизнеспособных кариоцитов в 1,5 мл стандартной питательной среды (без остеогенных стимуляторов) с образцами в течение 14 (определение [CD45,34,14,20], CD73, CD90 и CD105 иммунофенотипа клеток; анализ секреторной активности) и 21 дней (окраска культуры ализариновым красным) при смене культуральной среды каждые 3-4 дня. Установлено, что в условиях контакта *in vitro* с КФ-покрытием ММСК-ЖТ дифференцируются в остеобласты, синтезирующие минерализованный костный матрикс. Это сопровождается 2-3-кратным увеличением доли [CD45,34,14,20]<sup>+</sup> кроветворных клеток. Сигнальными молекулами для наращивания *in vitro* гемопоэтического плацдарма в 14-дневной дифференцирующейся трёхмерной культуре ММСК-ЖТ являются гуморальные факторы кроветворных ниш: цитокины leukemia inhibitory factor (LIF) и stem cell factor (SCF) при среднем индексе шероховатости КФ покрытия  $R_a=2,4-2,6$  мкм либо stromal derived factor-1 (SDF-1 $\alpha$  (хемокин CXCL12)) при  $R_a=3,1-4,4$  мкм.

**Ключевые слова:** фактор стволовых клеток; фактор роста стволовых клеток; фактор стромы; *in vitro*; микродуговое покрытие; индекс шероховатости  $R_a$

**DOI:** 10.18097/PBMC20196504339

### ВВЕДЕНИЕ

Ростовые факторы, влияющие на ранние этапы кроветворения и участвующие в жизнедеятельности (самоподдержании, коммитировании, дифференцировке, миграции) гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), рассматриваются как важнейшие сигнальные молекулы в остеобластных и сосудистых кроветворных нишах [1, 2]. Наиболее известными и изученными являются хемокин CXCL12 (stromal derived factor-1, SDF-1) и фактор стволовых клеток (stem cell factor, SCF) [1, 3]. В 1997 г. описан фактор роста стволовых клеток (stem cell growth factor, SCGF) [4] с невыясненной ролью для ранних стадий гемопоэза у человека.

Остеобластные ниши ГСК располагаются в эндосте кости [5] и формируются в тесной кооперации мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) и остеобластов как клеток специализированного микроокружения (ниш) ГСК [2]. С определёнными допущениями структурно-функциональное состояние эндоста в различные фазы физиологического и репаративного ремоделирования

костной ткани можно симулировать *in vitro* с помощью культивирования стромальных клеток на подложках с рельефным кальций-фосфатным (КФ) покрытием [6, 7]. При этом в трёхмерной клеточной культуре ММСК жировой ткани человека (ММСК-ЖТ) обнаружен усиленный выход остеобластов и кроветворных клеток. Эти данные легли в основу гипотезы об *in vitro* взаимодействии ММСК, дифференцирующихся остеобластов и ГСК с образованием остеобластных (эндостальных) кроветворных ниш [8]. Однако молекулярные механизмы обнаруженного феномена неясны.

В связи с этим целью исследования было определение секреторной активности ММСК-ЖТ человека в условиях их остеогенной дифференцировки при контакте *in vitro* с КФ-поверхностью с различной шероховатостью.

### МЕТОДИКА

ММСК выделяли из липоаспирата здорового добровольца. Принадлежность выделенных клеток к пулу ММСК по морфологическим

## СИГНАЛИНГ КРОВЕТВОРНЫХ НИШ, ДИФФЕРЕНЦИРОВКА СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

критериям определяли согласно рекомендациям International Society for Cellular Therapy (ISCT), как описано ранее [8].

В эксперименте *in vitro* применяли образцы размером 10×10×1 мм<sup>3</sup>, несущие двустороннее рентгеноаморфное покрытие из фосфатов кальция. КФ-покрытие формировали на подложках из коммерчески чистого титана (масс. %: 99,58 Ti; 0,12 O; 0,18 Fe; 0,07 C; 0,04 N; 0,01 H) методом микродугового оксидирования на установке Microarc-3.0 в анодном режиме. Электролит состоял из водного раствора ортофосфорной кислоты (20 масс. %), карбоната кальция (9 масс. %) и нанопорошка (диаметр частиц 10-30 нм с отдельными агрегатами до 100 нм) синтетического гидроксипатита (6 масс. %). Формирование покрытий на титановых образцах, определение их среднего индекса шероховатости  $R_a$  по ГОСТ 2789-73 осуществляли, как описано ранее [7].

Для получения покрытий с высокими значениями  $R_a > 3$  мкм, поверхность титановых подложек предварительно подвергали пескоструйной обработке порошком оксида алюминия Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> с диаметром частиц 250-380 мкм. Толщину покрытий измеряли по микрофотографиям их кросс-секций, полученных при сканирующей электронной микроскопии (Philips SEM 515, Нидерланды), массу – путём взвешивания подложек до и после нанесения покрытий на электронных весах GR-202 (Япония). Перед биологическим тестированием изготовленные образцы стерилизовали в сухожаровом шкафу (BINDER ED 23, Германия) при 160°C в течение 1 ч.

По 1 образцу с КФ-покрытием с различным диапазоном шероховатости поверхности (табл. 1) помещали в центр лунки (площадь 1,86 см<sup>2</sup>) 12-луночных стерильных пластиковых культуральных плоскодонных планшетов (“Orange Scientific”, Бельгия), добавляли взвесь ММСК-ЖТ после 4-х пассажей (конечная концентрация жизнеспособных кардиоцитов 1,5×10<sup>5</sup>) в 1,5 мл питательной среды следующего состава: 90% DMEM/F12 (1:1) (“Gibco Life Technologies”, США), 10% фетальная сыворотка крови коровы (“Sigma-Aldrich”, США), 50 мг/л гентамицина

(“Invitrogen”, Великобритания), 280 мг/л L-глутамин (“Sigma-Aldrich”). Срок культивирования составил 14 суток (до образования клеточного монослоя при смене среды каждые 3-4 дня) при 100% влажности, 5% CO<sub>2</sub> и 37°C. Для оценки влияния КФ-покрытий на дифференцировку ММСК-ЖТ в остеобласты часть клеточных культур продолжали культивировать в указанных условиях до 21 суток (при смене среды каждые 3-4 дня) с тестируемыми образцами или без таковых (контроль).

Супернатанты из клеточных культур собирали на 14 сутки, центрифугировали в течение 10 мин при 500 g. Количественное определение хемокинов, факторов роста, про- и противовоспалительных цитокинов (LIF, SCF, SDF-1α, SCGF-β, M-CSF, MCP-3, MIF, MIG, TRAIL, GRO-α; IL-1a, IL-2ra, IL-3, IL-12(p40), IL-16, IL-18, HGF, TNF-β, β-NGF, IFN-α2, STACK) проводили методом флуоресцентной проточной цитометрии на автоматизированном анализаторе Bio-Plex Protein Assay System (“Bio-Rad”, США) с использованием коммерческой тест-системы Bio-Plex Pro Human cytokine Group II 21-Plex Panel (“Bio-Rad”). Статистические различия в исследуемых группах по про- и противовоспалительным интерлейкинам и большинству факторов роста отсутствовали. В связи с этим, анализ результатов проводили по 10 хемокинам, регулирующим клеточную миграцию, и сигнальным молекулам ранних этапов кроветворения (табл. 1).

Прилипшие к пластику ММСК-ЖТ обрабатывали 0,05% трипсином (“ПанЭко”, Россия) в 0,53 мМ ЭДТА (“Sigma-Aldrich”), дважды отмывали фосфатным буфером. После 30 мин инкубации с 10 мкл антител к CD14,20,34,45,73,90 или 105 (MSC Phenotyping Kit human - 130-095-198 (“Miltenyi Biotec”, США) клетки подвергали анализу на проточном цитофлуориметре MACS Quant (“Miltenyi Biotec”, Германия) согласно протоколу фирмы-производителя. По боковому и прямому светорассеянию выделяли фракцию жизнеспособных ММСК-ЖТ, в которой оценивали параметры флуоресценции в гейте изучаемых клеток, определяли количество клеток, презентующих изучаемые кластеры дифференцировки, с помощью

Таблица 1. Иммунофенотип (%) мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека в 14-дневной культуре в присутствии образцов, несущих на титановой подложке микродуговое кальций-фосфатное (КФ) покрытие с различной шероховатостью, Me (Q1-Q3)

№	Группа исследования	[CD45,34,14,20] <sup>+</sup>	CD73 <sup>+</sup>	CD90 <sup>+</sup>	CD105 <sup>+</sup>
1	Контроль культуры клеток (без образцов), n=5	0,32 (0,25-0,35)	95,73 (95,31-96,07)	98,70 (98,57-98,79)	98,91* (98,86-99,05)
2	КФ-покрытие с индексом шероховатости $R_a=2,4-2,6$ мкм, n=3	0,61* (0,60-0,82) $p_1 < 0,05$	93,73 (93,70-95,77)	97,31* (96,80-97,81) $p_1 < 0,05$	97,74* (97,05-98,21) $p_1 < 0,05$
3	КФ-покрытие с индексом шероховатости $R_a=3,1-4,4$ мкм, n=4	0,86* (0,63-1,27) $p_1 < 0,04$	85,99* (83,31-89,29) $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$	93,16* (90,80-94,32) $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$	94,02* (90,02-94,88) $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$

Примечание. Здесь и в таблице 2: n – число исследованных образцов (лунок планшета);  $p_1$  – статистически значимые различия с контролем;  $p_2$  – с группой 2 согласно U-критерию Манна-Уитни.

программы KALUZA Analysis Software (“Beckman Coulter”, США). Жизнеспособность клеток выявляли с помощью автоматического счётчика клеток Countess™ Automated Cell Counter (“Invitrogen”) с использованием 0,4% раствора трипанового синего (“Invitrogen”).

Прилипающие клетки в 21-дневной культуре после забора супернатантов сушили на воздухе и окрашивали вместе с образцами с КФ-покрытием 2% раствором ализаринового красного S (“Sigma-Aldrich”) для определения участков минерализации межклеточного матрикса в культуре ММСК-ЖТ. Оценку результата окраски на пластике проводили с использованием программы ZEN 2012 (“Carl Zeiss Microscopy”, США на оптическом микроскопе ZEISS Axio Observer A1 (“Carl Zeiss Microscopy”). Окрашенные клетки на непрозрачных КФ-покрытиях анализировали при помощи отражающего металлографического микроскопа Olympus GX-71 (“Olympus Corporation”, Япония).

При оценке полученных данных использовали методы статистического описания, а также методы проверки статистических гипотез. Нормальность распределения в выборке проверяли с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Рассчитывали параметры распределений: медиану (Me), 25%-ный ( $Q_1$ ) и 75%-ный ( $Q_3$ ) квартили. Для оценки статистической значимости различий применяли непараметрический критерий Манна-Уитни. Связь между исследуемыми показателями устанавливали методом корреляционного ( $r$ ) анализа по Спирмену. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В 14-дневной *in vitro* культуре жизнеспособные (93%) ММСК-ЖТ человека активно адгезировали к пластику, проявляли фибробластоподобную морфологию и высокую (более 95% клеток) экспрессию CD73, CD90 и CD105 антигенов на фоне негативной (0,32%) презентации маркеров кровяных клеток CD45,34,20,14 (табл. 1).

В соответствии с условиями постановки эксперимента, прямой и не прямой (через продукты потенциальной биодеградации фосфатов кальция и секреторной активности клеток) контакты (рис. 1) клеточной взвеси с КФ-поверхностью статистически значимо уменьшали (до 10%) число клеток с иммунофенотипическими признаками ММСК-ЖТ (табл. 1). При этом выход  $[CD45,34,14,20]^+$  популяции кровяных клеток повышался в 2-3 раза. Обнаружена тесная корреляционная связь роста  $R_a$  индекса шероховатости КФ-покрытий с возрастающей долей  $[CD45,34,14,20]^+$  клеток ( $r = 0,79$ ;  $p < 0,001$ ;  $n = 12$ ) и убывающим относительным количеством элементов, презентующих CD73 ( $r = -0,67$ ;  $p < 0,018$ ;  $n = 12$ ), CD90 ( $r = -0,91$ ;  $p < 0,00005$ ;  $n = 12$ ) и CD105 ( $r = -0,91$ ;  $p < 0,00005$ ;  $n = 12$ ) маркеры ММСК. В свою очередь, обратная корреляционная зависимость экспрессии  $[CD45,34,14,20]$  маркеров с CD90 ( $r = -0,80$ ;  $p < 0,002$ ;  $n = 12$ ) и CD105 ( $r = -0,76$ ;  $p < 0,004$ ;  $n = 12$ )

свидетельствовала о сопряженности процессов, происходящих в популяциях кровяных и стромальных клеток и обусловленных влиянием искусственного КФ-матрикса. В сравнении с контролем (рис. 1а) как вокруг образцов (рис. 1б-в), так и на их КФ-поверхности (рис. 1г), значительно усиливалась окраска стромальных клеток ализариновым красным, что характерно для секретирующих остеобластов, формирующих минерализованное межклеточное вещество регенерирующей костной ткани.

Изменение клеточного состава культуры ММСК-ЖТ сопровождалось вариациями спектра секретируемых хемокинов (табл. 2). В контрольной культуре отмечены высокие уровни секреции SCGF- $\beta$ , фактора ингибирования миграции макрофагов (macrophage migration inhibitory factor, MIF) и белка-3 хемотаксиса моноцитов (monocyte chemoattractant protein-3 – chemokine (C-C motif) ligand 7 (CCL7), MCP-3).

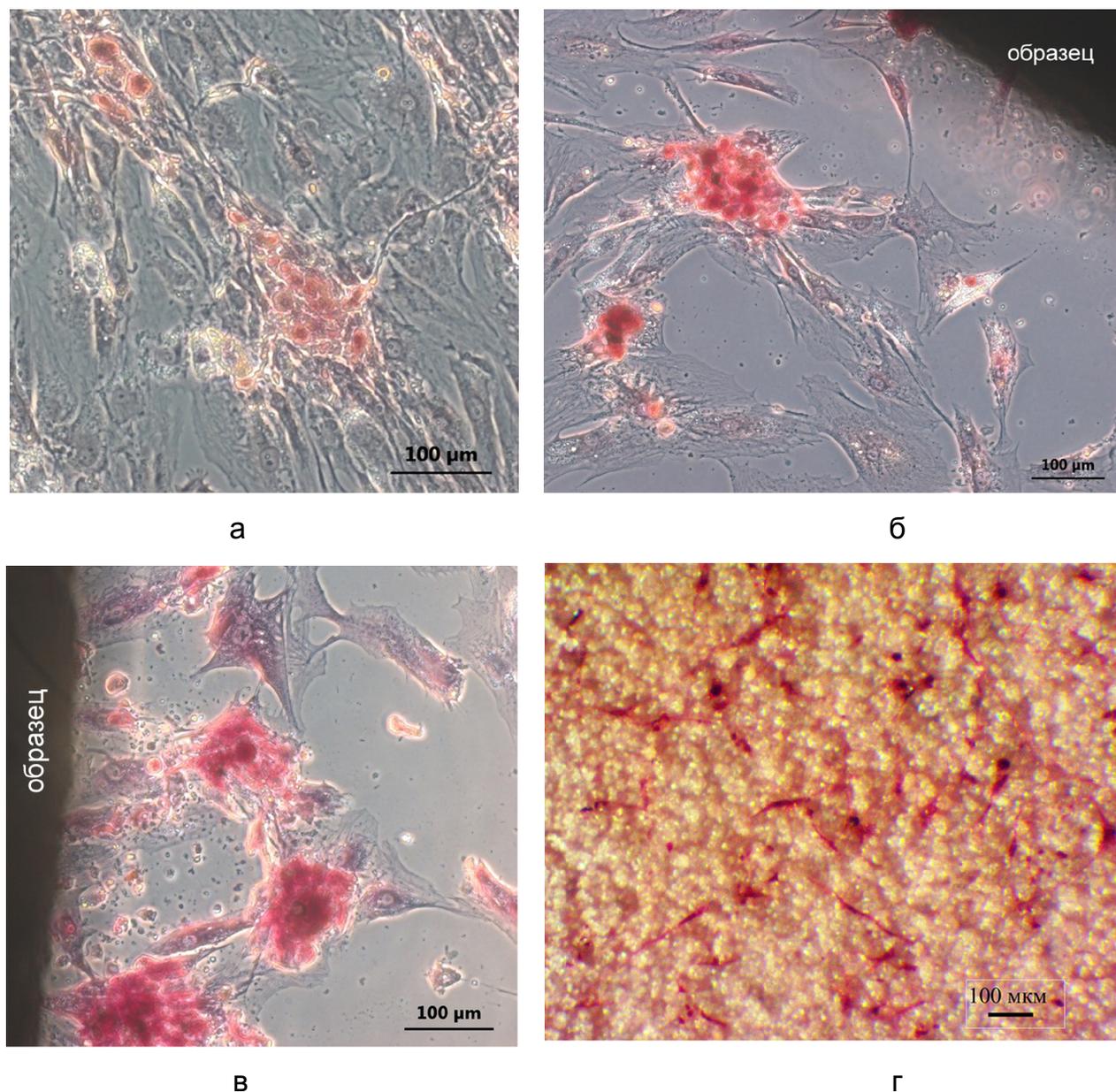
Образцы с шероховатым КФ-покрытием не влияли на концентрацию молекул, регулирующих клеточную миграцию: MCP-3; MIF; монокин, индуцируемый гамма-интерфероном (monokine induced by gamma interferon-chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9), MIG); регулирующий рост онкоген-альфа (growth regulated oncogene-alpha – chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1), GRO- $\alpha$ ). В то же время, на 150% в сравнении с контролем повышалась секреция SDF-1 $\alpha$  в 14-дневной культуре ММСК-ЖТ в присутствии КФ с высоким ( $R_a > 3$  мкм) индексом шероховатости.

Более варибельным оказалось модулирующее влияние образцов с  $R_a = 2-3$  мкм. Концентрации некоторых хемокинов, регулирующих ГСК, возрастали на 41% (лейкемию ингибирующий фактор, leukemia inhibitory factor, LIF) и 188% (SCF). Напротив, выход в супернатанты SCGF- $\beta$  цитокина, колониестимулирующего фактора моноцитов/макрофагов (M-CSF) и лиганда 10 суперсемейства фактора некроза опухоли (tumor necrosis factor ligand superfamily member 10 (TNF-related apoptosis-inducing ligand), TRAIL) снижался до 67%, 72% и 62% от соответствующих контрольных значений (табл. 2).

Корреляции секреции сигнальных молекул с шероховатостью КФ-поверхности и изменением спектра CD детерминант на ММСК-ЖТ, контактировавших с КФ-образцами, обнаружены только для концентраций SDF-1 $\alpha$ : прямая связь с  $R_a$  ( $r = 0,73$ ;  $p < 0,02$ ;  $n = 10$ ) и обратная – с экспрессией CD73, CD90 и CD105 ( $r = -0,86$ ;  $p < 0,02$ ;  $n = 7$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В 14-дневной культуре на пластиковой поверхности лунок в культуральных планшетах клетки проявляли типичные морфологические (рис. 1а) и иммунофенотипические (табл. 1) свойства ММСК-ЖТ [8] с низкой долей гемопоэтических клеток и невыраженной дифференцировкой части клеточной популяции в секретирующие остеобласты (рис. 1а).



**Рисунок 1.** Морфологическое состояние культуры ММСК-ЖТ при сравнительном окрашивании ализариновым красным участков минерализации межклеточного вещества на 21-е сутки: (а) контроль, (б-в) на пластике в присутствии образцов с КФ-покрытием при  $R_a=3,1-4,4$  и  $2,4-2,6$  мкм, соответственно; (г) на поверхности образцов с шероховатым КФ-покрытием. Линейка в правом углу снимков соответствует 100 мкм. Ув.  $\times 250$ .

При этом, согласно [9], установлена секреция (табл. 2): высоких (более 1 нг/мл) концентраций SCGF- $\beta$ ; средних (0,1-1 нг/мл) концентраций MCP-3 (CCL7) и MIF; низких (1-100 пг/мл) уровней остальных изучаемых хемокинов и гемопоэтических факторов роста. Таким образом, секреторная активность ММСК-ЖТ после 14-суточного культивирования обусловлена преимущественно продукцией фактора роста стволовых клеток SCGF- $\beta$ , сопоставимой с его уровнем в сыворотке крови [4], других гемопоэтинов пула стволовых клеток, а также плейотропных хемокинов, регулирующих, в том числе, миграцию и активность Т-хелперов 2-го (MCP-3) и 1-го (MIG) типов, макрофагов (MIF), нейтрофилов

(GRO- $\alpha$ ) [3]. По-видимому, подобный секрет с балансом активаторов клеточной жизнедеятельности и апоптоза (TRAIL), обуславливает наличие постоянной примеси кроветворных клеток в культуре ММСК-ЖТ (табл. 1 и 2).

Моделирование поведения клеток в трёхмерных (3D) условиях культивирования является современным трендом исследований *in vitro*. В одной из таких моделей симулируется граница раздела “кость/надкостница/костный мозг” посредством культивирования ММСК на рельефных искусственных материалах [2], имитирующих физико-химические свойства, объём и/или поверхность минерального матрикса регенерирующей костной ткани [7].

Таблица 2. Концентрации цитокинов, хемокинов и факторов роста при 14-дневном сокультивировании ММСК жировой ткани человека с образцами, несущими на титановой подложке микродуговое кальций-фосфатное (КФ) покрытие с различной шероховатостью, Me(Q1-Q3)

Свойства КФ-покрытия			Концентрация, пг/мл									
Ра, мкм	Толщина, мкм	Масса, мг	LIF	MCP-3 (CCL7)	M-CSF	MIF	MIG (CXCL9)	GRO- $\alpha$ (CXCL1)	SCF	SCGF- $\beta$	SDF-1 $\alpha$ (CXCL12)	TRAIL
Пластиковая поверхность культурального планшета, n=3												
0	0	0	14,3 (8,71-16,23)	141,21 (71,37-160,48)	15,03 (15,03-15,03)	795,31 (594,29-836,08)	12,8 (6,4-17,23)	42,43 (36,44-52,33)	3,92 (3,61-4,66)	19896 (18719-27279)	53,85 (33,12-66,38)	4,37 (3,04-5,37)
КФ-покрытие с $R_a=2,4-2,6$ мкм, n=3												
2,4 (2,3-2,6)	37 (32,5-38,5)	11 (10,9-11,5)	20,21* (16,35-21,17) $p_1<0,05$	83,84 (75,63-134,59)	10,87* (9,32-13,64) $p_1<0,05$	689,26 (313,31-754,69)	8,97 (8,97-10,89)	33,56 (29,39-65,34)	11,27* (4,68-11,3) $p_1<0,05$	13287* (8120-14077) $p_1<0,04$	58,11 (41,64-63,65)	2,71* (2,49-2,71) $p_1<0,05$
КФ-покрытие с $R_a=3,1-4,4$ мкм, n=4												
3,25 (3,15-3,95)	53,0 (52,0-61,75)	14,25 (13,6-16,0)	14,92 (13,93-38,0)	144,11 (132,60-167,45)	14,45 (10,97-15,95)	750,37 (643,4-839,99)	14,70 (10,25-19,13)	67,27 (51,76-77,39)	4,96 (4,43-8,33)	23268 (21645-28636) $p_2<0,05$	134,48* (113,65-160,54) $p_1<0,02$ $p_2<0,05$	5,24 (4,87-6,24) $p_2<0,05$

Примечание: LIF – leukemia inhibitory factor; MCP-3 – monocyte chemoattractant protein-3 – chemokine (C-C motif) ligand 7 (CCL7); M-CSF – моноцитарный колониестимулирующий фактор; MIF – macrophage migration inhibitory factor; MIG – monokine induced by gamma interferon – chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9); GRO- $\alpha$  – growth regulated oncogene-alpha-chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1); SCF – stem cell factor; SCGF- $\beta$  – stem cell growth factor beta; SDF-1 $\alpha$  – stromal derived factor 1 alpha – C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12); TRAIL – tumor necrosis factor ligand superfamily member 10 (TNF-related apoptosis-inducing ligand).

Результаты показали, что образцы с шероховатым КФ-покрытием, занимающие более 50% площади поверхности лунок, в значительной степени меняют секреторный профиль 14-дневной культуры ММСК-ЖТ в части сигнальных молекул, контролирующей жизнедеятельность ГСК в составе кроветворных микротерриторий (ниш) (табл. 2 и 3). По-видимому, именно с факторами регуляции ГСК связано возрастание в культуре ММСК-ЖТ доли клеток, несущих кроветворные маркеры [CD45,34,14,20]<sup>+</sup> (табл. 1 и 2). С другой стороны, снижение презентации CD73, CD90 и CD105 молекул ММСК-ЖТ в условиях контакта с КФ-поверхностью обусловлено, вероятнее всего, с дифференцировкой стромальных клеток в остеобласты на самих образцах и вокруг них (рис. 1б-г), что соответствует ранее полученным результатам [8].

В совокупности с корреляционным анализом логическая цепочка событий при диапазоне средней шероховатости КФ-поверхности  $R_a=3,1-4,4$  может быть следующей: увеличение рельефности КФ-поверхности – снижение экспрессии маркеров ММСК за счёт усиления их остеогенной дифференцировки – повышенная секреция SDF-1 $\alpha$  остеобластами – увеличенный выход ГСК в 14-дневной культуре ММСК-ЖТ.

В диапазоне средней шероховатости КФ-поверхности  $R_a=2,4-2,6$  мкм возможна качественно иная интерпретация результатов в связи с неоднозначным модулирующим влиянием образцов на секреторную активность культуры ММСК-ЖТ (табл. 2). Во-первых, в супернатантах уменьшалась концентрация SCGF- $\beta$  в 1,5-1,75 раза по сравнению с контрольной культурой и ММСК-ЖТ, контактировавшими с КФ-поверхностью с высоким индексом шероховатости (табл. 2). Снижался (до 72% от контроля,  $p<0,05$ ; таблица 2) также уровень M-CSF как фактора роста унипотентных прекурсоров моноцитопоэза и активатора зрелых моноцитов/макрофагов [3].

Напротив, концентрации LIF и SCF статистически значимо превышали таковые в контрольной культуре ММСК-ЖТ на пластике (табл. 2). При этом сохранялась общая для 3D культур тенденция накопления кроветворных клеток и остеобластов в популяции ММСК-ЖТ с параллельным снижением экспрессии стромальных CD-детерминант (табл. 1 и 2; рис. 1), но без корреляционной связи секреции гемопоэтинов с рельефом КФ поверхности и презентацией маркеров ММСК. Другими словами, при 14-дневном контакте *in vitro* ММСК-ЖТ с КФ-покрытием, имеющим индекс шероховатости

## СИГНАЛИНГ КРОВЕТВОРНЫХ НИШ, ДИФФЕРЕНЦИРОВКА СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Таблица 3. Гуморальные факторы гемопозитической ниши, секретируемые в культуре ММСК жировой ткани человека после 14-дневного *in vitro* контакта с шероховатой кальций-фосфатной поверхностью

Сигнальная молекула	Изменение (в сравнении с контролем) концентрации в супернатантах согласно таблице 2	Основные клеточные эффекты сигнальных молекул по данным литературы
<b>Диапазон индекса <math>R_a</math> шероховатости КФ-поверхности 2,4-2,6 мкм</b>		
LIF	прирост в 1,4 раза	Секретируется регуляторными Т-клетками [10], стромальными клетками костного мозга [11]. Обеспечивает: самоподдержание популяции и тотипотентности эмбриональных стволовых клеток (ЭСК); плюрипотентности гемопозитических стволовых клеток (ГСК) мыши [10], ограничение их дифференцировки [12]; стимуляцию пролиферации миелоидных клеток [13] и мегакариопоэза [10]; индукцию дифференцировки ММСК в остеобласты в противовес адипоцитам [14]; разрушение хряща [15]. Поддерживает равновесие между дифференцировкой ММСК в остеобласты и поддержанием ММСК-зависимого гемопоэза [16].
SCF	прирост в 2,9 раза	Ключевой компонент васкулярной ниши для самоподдержания популяции ГСК. Экспрессируется <i>in vitro</i> фибробластоподобными клетками костного мозга, эндотелиальными клетками, CXCL12 <sup>+</sup> стромальными клетками, нестин <sup>+</sup> ММСК [1]. <i>In vivo</i> предполагается как специфичная молекула эндотелиальных клеток для регуляции ГСК [17].
SCGF-β	снижение в 1,5 раза	Относительно недавно открытый хемокин [18]. Экспрессируется ГСК, стромальными клетками костного мозга, мононуклеарными лейкоцитами крови, хондробластами, клетками периоста. Способствует колониеобразованию грануломоноцитарных и эритроидных прекурсоров в комбинации с эритропоэтином и колонienstимулирующими факторами; может быть предиктором восстановления пула ГСК после трансплантации [4].
<b>Диапазон индекса <math>R_a</math> шероховатости КФ-поверхности 3,1-4,4 мкм</b>		
SDF-1α (CXCL12)	прирост в 2,5 раза	Секретируется стромальными механоцитами, нестин <sup>+</sup> ММСК, остеобластами, эндотелиальными и ретикулярными клетками костного мозга. Регулирует перераспределение ГСК между остеобластной и периваскулярной нишами в костном мозге, хоминг ГСК, способствует молчашему состоянию ГСК в остеобластной нише [1, 3, 19, 20].

$R_a=2,4-2,6$  мкм, формируются дискретные клеточные образования, нарушающие корреляционную зависимость процессов секреции LIF, SCF и SCGF-β от рельефности поверхности.

Ранее мы высказали предположение о существовании в рельефе КФ микродуговых покрытий искусственных (технологически созданных) микротерриторий, способствующих дифференцировке ММСК в остеобласты [7]. В свою очередь, остеобласты формируют ниши для кроветворных (в том числе, лимфоидных) стволовых клеток [2, 5], способны управлять их поведением в микротерриториях посредством клеточных контактов и секретируемых факторов роста. По крайней мере, результаты показали (табл. 1 и 2), что повышенный выход в культуре [CD45,34,14,20]<sup>+</sup> клеток, скорее всего, не связан с моноцитарными CD14 клетками вследствие уменьшения секреции M-CSF на фоне неизменной (в сравнении с контролем) продукции MIF и IFNα2.

Таким образом, LIF и SCF могут быть короткоранговыми гемопозитинами для наращивания плацдарма ГСК и лимфоидных прекурсоров (на фоне снижения секреции TRAIL фактора апоптоза, табл. 2) в остеобластных микротерриториях, формирующихся *in vitro* из ММСК-ЖТ на КФ-поверхности с индексом шероховатости  $R_a=2,4-2,6$  мкм. Невысокие уровни их секреции в проведённом эксперименте обусловлены большим объёмом культуральной среды (1,5 мл)

для супернатантов. В то же время, в пределах кроветворных микротерриторий с площадью в несколько сотен квадратных микрометров [2] локальные концентрации данных факторов роста могут достигать огромных значений. Данные, полученные *in vitro*, следует проверять экспериментами *in vivo*. В этом плане микродуговое КФ-покрытие с  $R_a=2,4-2,6$  мкм, в отличие от диапазона шероховатости  $R_a=3,1-4,4$ , показывало максимальную площадь ремоделирования системы “кость/костный мозг” мышей в эктопическом подкожном тесте [21].

Механизм описанного феномена связи шероховатости имплантатов и репаративной регенерации костной и кроветворной тканей остаётся неясным, как и не совсем однозначными являются описанные в литературе эффекты гемопозитинов в регуляции самоподдержания/коммитирования/дифференцировки/хomingа ГСК (табл. 3) и контроле состояния активных/молчащих кроветворных ниш [2]. Тем не менее, различный спектр факторов роста ГСК, секретируемых *in vitro* культурой ММСК, дифференцирующейся в остеогенном направлении, можно считать одним из молекулярных сигнальных путей, опосредующих физико-химическое и/или геометрическое влияние рельефа микродугового КФ-покрытия на стволовые клетки мезенхимного происхождения.

## ВЫВОДЫ

1. В условиях *in vitro* контакта с шероховатым КФ-покрытием ММСК-ЖТ дифференцируются в остеобласты, синтезирующие минерализованный костный матрикс, что сопровождается увеличением в 2-3 раза доли [CD45,34,14,20]<sup>+</sup> кроветворных клеток.

2. Сигнальными молекулами для наращивания *in vitro* гемопоэтического плацдарма в 14-дневной дифференцирующейся трёхмерной культуре ММСК-ЖТ являются гуморальные факторы кроветворных ниш: цитокины LIF и SCF при среднем индексе шероховатости КФ-покрытия  $R_a=2,4-2,6$  мкм либо SDF-1 $\alpha$  (CXCL12) при  $R_a=3,1-4,4$  мкм.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-15-10031).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данное исследование проведено с разрешения локального этического комитета Инновационного парка Балтийского федерального университета имени И. Канта №7 от 09.12.2015, с информированным согласием на использование биопробы для получения первичной культуры ММСК.

## ЛИТЕРАТУРА

1. He N., Zhang L., Cui J., Li Z. (2014) Bone Marrow Research, **2014**, 128436.
2. Khlusov I.A., Litvinova L.S., Khlusova M.Yu., Yurova K.A. (2018) Current Pharmaceutical Design, **24**(26), 3034-3054.
3. Симбирцев А.С. (2018) Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека, Фолиант, СПб, 512 с. [Simbirtzev A.S. (2018) Tzitokiny v patogeneze i lechenii zabolovaniy cheloveka, Foliant, SPb, 512 p.]
4. Ito C., Sato H., Ando K., Watanabe S., Yoshida F., Kishi K., Furuya A., Shitara K., Sugimoto S., Kohno H., Hiraoka A., Hotta T. (2003) Bone Marrow Transplantation, **32**, 391-398.
5. Zhang J., Niu C., Ye L., Huang H., He X., Tong W.G., Ross J., Haug J., Johnson T., Feng J.Q., Harris S., Wiedemann L.M., Mishina Y., Li L. (2003) Nature, **425**, 836-841.
6. Khlusov I.A., Shevtsova N.M., Khlusova M.Y. (2013) Methods Mol. Biol., **1035**, 103-119.
7. Khlusov I.A., Dekhtyar Yu., Sharkeev Yu.P., Pichugin V.F., Khlusova M.Y., Polyaka N., Tjulkins F., Vendinya V., Legostaeva E.V., Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A., Prosolov K.A. (2018) Materials, **11**, 978.
8. Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A., Malashchenko V.V., Melashchenko E.S., Todosenko N.M., Khlusova M.Y., Sharkeev Y.P., Komarova E.G., Sedelnikova M.B., Shunkin E.O., Khlusov I.A. (2018) Cell Tissue Biol., **12**(2), 112-119.
9. Van den Broek L.J., Kroeze K.L., Waaijman T., Breetveld M., Sampat-Sardjoepersad S.C., Niessen F.B., Middelkoop E., Scheper R.J., Gibbs S. (2014) Tissue Eng. Part A, **20**(1-2), 197-209.
10. Nicola N.A., Babon J.J. (2015) Cytokine Growth Factor Rev., **26**(5), 533-544.
11. Lorgeot V., Rougier F., Fixe P., Cornu E., Praloran V., Denizot Y. (1997) Cytokine, **9**(10), 754-758.
12. Smith A.G., Heath J.K., Donaldson D.D., Wong G.G., Moreau J., Stahl M., Rogers D. (1988) Nature, **336**, 688-690.
13. Moreau J.F., Bonneville M., Godard A., Gascan H., Gruart V., Moore M.A., Soullou J.P. (1987) J. Immunol., **138**, 3844-3849.
14. Walker E.C., McGregor N.E., Poulton I.J., Solano M., Pompolo S., Fernandes T.J., Constable M.J., Nicholson G.C., Zhang J.G., Nicola N.A., Gillespie M.T., Martin T.J., Sims N.A. (2010) J. Clin. Invest., **120**, 582-592.
15. Sims N.A., Johnson R.W. (2012) Growth Factors, **30**, 76-87.
16. Haynesworth S.E., Baber M.A., Caplan A.I. (1996) J. Cell Physiol., **766**(3), 585-592.
17. Nakamura-Ishizu A., Suda T. (2013) Biochim. Biophys. Acta, **1830**, 2404-2409.
18. Hiraoka A., Ohkubo T., Fukuda M. (1987) Cancer Res., **47**, 5025-5030.
19. Rankin S.M. (2012) Immunol. Letts., **145**, 47-54.
20. Caocci G., Greco M., La Nasa G. (2017) Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis., **9**(1), e2017032.
21. Gnedenkov S.V., Scharkeev Yu.P., Sinebryukhov S.L., Khrisanfova O.A., Legostaeva E.V., Zavidnaya A.G., Puz' A.V., Khlusov I.A. (2011) Inorganic Materials: Applied Research, **2**(5), 474-481.

Поступила в редакцию: 15. 06. 2019.

После доработки: 26. 06. 2019.

Принята к печати: 28. 06. 2019.

SECRETION OF NICHE SIGNAL MOLECULES IN CONDITIONS OF OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS INDUCED BY TEXTURED CALCIUM PHOSPHATE COATING

L.S. Litvinova<sup>1\*</sup>, V.V. Shupletsova<sup>1</sup>, K.A. Yurova<sup>1</sup>, O.G. Khaziakhmatova<sup>1</sup>, N.M. Todosenko<sup>1</sup>, V.V. Malashchenko<sup>1</sup>, E.O. Shunkin<sup>1</sup>, E.S. Melashchenko<sup>1</sup>, M.Yu. Khlusova<sup>2</sup>, E.G. Komarova<sup>4</sup>, V.V. Chebodaeva<sup>3,4</sup>, Yu.P. Sharkeev<sup>3,4</sup>, P.A. Ivanov<sup>1</sup>, I.A. Khlusov<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Immanuel Kant Baltic Federal University, 14 Nevsky str., Kaliningrad, 236016 Russia; \*e-mail: larisalitvinova@yandex.ru

<sup>2</sup>Siberian State Medical University, 2 Moskovsky trakt, Tomsk, 634050 Russia

<sup>3</sup>Tomsk Polytechnic University, 30 Lenina ave., Tomsk, 634050 Russia

<sup>4</sup>Institute of Strength Physics and Materials Science, the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 2/4 Akademicheskii ave., Tomsk, 634055 Russia

Secretion of 21 cytokines, chemokines and growth factors (LIF, SCF, SDF-1 $\alpha$ , SCGF- $\beta$ , M-CSF, MCP-3, MIF, MIG, TRAIL, GRO- $\alpha$ ; IL-1a, IL-2ra, IL-3, IL-12(p40), IL-16, IL-18, HGF, TNF- $\beta$ ,  $\beta$ -NGF, IFN- $\alpha$ 2, CTACK) has been studied *in vitro* in the culture of human adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells (hAMMSCs) in conditions of its osteogenic differentiation caused by 14-day contact with calcium phosphate (CP) surface with different roughness. Bilateral X-ray amorphous CP coatings were prepared on the samples of commercially pure titanium in the anodal regime using a micro-arc method. An aqueous solution prepared from 20 wt% phosphoric acid, 6 wt% dissolved hydroxyapatite nanopowder (particle diameter 10-30 nm with single agglomerates up to 100 nm), and 9 wt% dissolved calcium carbonate was used to obtain CP coating. hAMMSCs isolated from lipoaspirate were co-cultured after 4 passages with the CP-coated samples at final concentration of  $1.5 \times 10^5$  viable karyocytes per 1.5 mL of standard nutrition medium (without osteogenic stimulators) for 14 days (a determination of [CD45,34,14,20], CD73, CD90 и CD105 cell immunophenotype; an analysis of secretory activity) and 21 days (alizarin red S staining of culture) with medium replacement every 3-4 days. Under conditions of *in vitro* contact with rough CP coating hAMMSCs differentiated into osteoblasts synthesizing the mineralized bone matrix; this was accompanied by 2-3-fold increasing ratio of [CD45,34,14,20]<sup>+</sup> hemopoietic cells. The following humoral factors of hemopoietic niches acted as the signal molecules escalating *in vitro* the hemopoietic base in 14 days of differentiating three-dimensional culture of hAMMSCs: either leukemia inhibitory factor (LIF) and stem cell factor (SCF) cytokines under mean index of CP roughness  $R_a=2.4-2.6 \mu\text{m}$  or stromal derived factor-1 (SDF-1 $\alpha$ , CXCL12 chemokine) under  $R_a=3.1-4.4 \mu\text{m}$ .

**Key words:** stem cell factor; stem cell growth factor; stromal derived factor-1; *in vitro*; micro-arc coating; roughness index  $R_a$

**Funding.** The work has been financially supported by the Russian Science Foundation, Project no. 16-15-10031.

Received: 15.06.2019, revised: 26.06.2019, accepted: 28.06.2019.