

ВЗАИМОВЛИЯНИЕ ММСК И МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ПРИ СОКУЛЬТИВИРОВАНИИ *IN VITRO* В ПРИСУТСТВИИ ТРЕХМЕРНОГО ИСКУССТВЕННОГО МАТРИКСА, ИМИТИРУЮЩЕГО РЕГЕНЕРИРУЮЩУЮ КОСТНУЮ ТКАНЬ

Юрова К.А., Норкин И.К., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В.,
Мелашченко О.Б., Иванов П.А., Лигатюк Д.Д., Хлусов И.А.,
Литвинова Л.С.

ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Резюме. Репарация и регенерация костной ткани – сложный процесс с участием множества клеток, регулируемый многими факторами. Иммуные клетки и цитокины играют решающую роль в регуляции баланса костеобразования и резорбции кости. Однако иммуномодулирующий механизм регенерации кости до сих пор неясен. Тем не менее достоверно известно о взаиморегулирующем влиянии иммунокомпетентных клеток и мезенхимальных стволовых клеток (МСК). МСК и иммунокомпетентные клетки секретируют несколько цитокинов, факторов роста и молекул внеклеточного матрикса, которые играют важную роль в регуляции кроветворения, ангиогенеза, иммунного и воспалительного ответа. Различные исследования подтверждают, что разные молекулы, экспрессируемые МСК, могут инициировать пролиферацию лимфоцитов. Таким образом, исследование взаимного влияния МСК и мононуклеарных клеток крови при совместном сокультивировании *in vitro*, в том числе в присутствии искусственного матрикса, имитирующего регенерирующую костную ткань, является актуальным и своевременным. В настоящем эксперименте были проведены исследования на границе раздела фаз живой / неживой материи, что имитировало систему «регенерирующая кость / кроветворное микроокружение». Был проведен цикл исследований, разделенных во времени, на пластиковой поверхности (2D-модель культивирования) и в присутствии трехмерных искусственных матриксов, имитирующих регенерирующую костную ткань (3D-модель культивирования).

Ключевые слова: ММСК, мононуклеарные клетки крови, 3D-матрикс, *in vitro*, ПЦР, мультиплексный анализ

Адрес для переписки:

Юрова Кристина Алексеевна
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет
имени Иммануила Канта»
236001, Россия, г. Калининград, ул. Гайдара, 6.
Тел.: 8 (921) 103-88-47.
E-mail: kristina_kofanova@mail.ru

Address for correspondence:

Kristina A. Yurova
Immanuel Kant Baltic Federal University
6 Gaidar St
Kaliningrad
236010 Russian Federation
Phone: +7 (921) 103-88-47.
E-mail: kristina_kofanova@mail.ru

Образец цитирования:

К.А. Юрова, И.К. Норкин, О.Г. Хазиахматова,
В.В. Малащенко, О.Б. Мелашченко, П.А. Иванов,
Д.Д. Лигатюк, И.А. Хлусов, Л.С. Литвинова
«Взаимовлияние ММСК и мононуклеарных клеток
крови при сокультивировании *in vitro* в присутствии
трехмерного искусственного матрикса, имитирующего
регенерирующую костную ткань» // Российский
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 443-448.
doi: 10.46235/1028-7221-13547-IBM

© Юрова К.А. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

K.A. Yurova, I.K. Norkin, O.G. Khaziakhmatova,
V.V. Malashchenko, O.B. Melashchenko, P.A. Ivanov,
D.D. Ligatyuk, I.A. Khlusov, L.S. Litvinova “Interaction
between MSCs and blood mononuclear cells during *in vitro*
co-cultivation in the presence of a three-dimensional artificial
matrix mimicking regenerating bone tissue”, Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023,
Vol. 26, no. 4, pp. 443-448.
doi: 10.46235/1028-7221-13547-IBM

© Yurova K.A. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-13547-IBM

INTERACTION BETWEEN MSCS AND BLOOD MONONUCLEAR CELLS DURING *IN VITRO* CO-CULTIVATION IN THE PRESENCE OF A THREE-DIMENSIONAL ARTIFICIAL MATRIX MIMICKING REGENERATING BONE TISSUE

Yurova K.A., Norkin I.K., Khaziakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Melashchenko O.B., Ivanov P.A., Ligatyuk D.D., Khlusov I.A., Litvinova L.S.

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Abstract. Bone tissue repair and regeneration is a complex process involving many cells and controlled by multiple factors. Immune cells and cytokines play a crucial role in regulating the balance of bone formation and resorption. However, the immunomodulatory mechanism of bone regeneration is still unclear. Nevertheless, the reciprocal regulatory influence of immunocompetent cells and mesenchymal stem cells (MSCs) is well known. MSCs and immunocompetent cells secrete various cytokines, growth factors, and extracellular matrix molecules that play important roles in regulating hematopoiesis, angiogenesis, immune and inflammatory responses. Several studies confirm that different molecules expressed by MSCs may induce lymphocyte proliferation. Therefore, the study of the mutual influence of MSCs and blood mononuclear cells during *in vitro* co-cultivation, even in the presence of an artificial matrix mimicking regenerating bone tissue, is relevant and expedient. In this experimental series, the studies were performed at the interface between living and non-living substrate phases thus mimicking the “regenerating bone / hematopoietic microenvironment” system. A series of separated in time experiments was performed on a plastic surface (2D culture model) and in the presence of three-dimensional artificial matrices mimicking regenerating bone tissue (3D culture model).

Keywords: mesenchymal stem cells, blood mononuclear cells, 3D matrix, in vitro, PCR, multiplex analysis

Исследование выполнено в рамках реализации проекта Государственного задания № FZWM-2020-0010.

Введение

Иммунная система играет важную роль в формировании тканей и резорбции костей. В последнее время многие исследования продемонстрировали сложные взаимодействия между иммунной и скелетной системами. Иммунные клетки и секретируемые ими цитокины способствуют регуляции костного гомеостаза, а костные клетки, включая остеобласты, остеокласты, остеоциты, также влияют на клеточные функции иммунных клеток.

Лейкоциты крови являются одними из первых клеток, мигрирующих в участок физиологической и, в большей степени, репаративной регенерации костной ткани [4]. Для исследования закономерностей функционирования МНК в подобных условиях была разработана *in vitro* 3D-гомеостатическая модель сокультивирования иммунных клеток с МСК в присутствии искусственного матрикса, имитирующего в трехмер-

ном масштабе минеральное вещество костной ткани.

Известно, что клетки существуют в тканях разной степени жесткости, от мягкой мозговой ткани до жесткой кортикальной кости. *In vitro* было показано, что жесткость матрикса или субстрата также играет важную роль в регуляции дифференцировки МСК [5]. Использование трехмерной (3D) пространственной организации клеточной культуры в условиях культивирования *in vitro* приближено к физиологическим параметрам клеточной жизнедеятельности [1].

В связи с вышесказанным, исследование физиологических механизмов, определяющих реакции МСК и иммунокомпетентных клеток на структурные и гуморальные сигналы микроокружения, является своевременным и актуальным.

В настоящее время появляется все больше данных, указывающих на то, что регуляция иммунного микроокружения является многообещающей терапевтической целью, способствующей функциональной регенерации костной ткани [6].

Таким образом, целью исследования явилось выявление функциональных особенностей МСК

и мононуклеарных клеток крови (МНК) при совместном сокультивировании *in vitro* в присутствии трехмерного искусственного матрикса, имитирующего регенерирующую костную ткань.

Материалы и методы

Для реализации настоящего эксперимента были проведены исследования на границе раздела фаз живой/неживой материи, что имитировало систему «регенерирующая кость / кровяное микроокружение». Был проведен цикл исследований, разделенных во времени, на пластиковой поверхности (2D-модель культивирования) и в присутствии трехмерных искусственных матрикс, имитирующих регенерирующую костную ткань (3D-модель культивирования).

В качестве нормальных иммунокомпетентных клеток, используемых для имитации модели физиологической регенерации *in vitro*, использовали мононуклеарные лейкоциты (МНК). Выделение МНК из лейкоцезы здоровых доноров проводилось стандартным методом центрифугирования на градиенте плотности фиколл-урографин (Pharmacia, Швеция) ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$). Разрешение на проведение исследования получено в локальном этическом комитете Инновационного парка БФУ имени И. Канта (№ 5 от 16 мая 2016 г.).

МСК выделялись из липоаспирата человека (Разрешение № 1 от 28.02.2019 г. локального этического комитета БФУ имени И. Канта), как описано [7].

Титановые подложки из коммерчески чистого титана ВТ1.0, размером $10 \times 10 \times 1 \text{ мм}^3$ и индексом шероховатости (Ra) 2-3 мкм, используемые для имитации *in vitro* состояние трехмерной (3D) культуры, имели двухстороннее покрытие из фосфатов кальция, нанесенное методом микродугового оксидирования на установке Microarc-3.0 (Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, г. Томск) в анодном режиме [3].

Для оценки иммунного ответа был произведен комплексный анализ функциональной активности мононуклеарных лейкоцитов в разных условиях культивирования *in vitro* по истечении 48 часов культивирования. На 14-е сутки культивирования оценивали особенности клеточного функционирования мезенхимальных стволовых клеток на пластике и в присутствии трехмерного матрикса. Для изучения особенностей клеточного взаимодействия МСК с клетками иммунной системы было проведено сокультивирование этих клеточных линий в разных условиях экспериментального исследования в соответствии с дизайном эксперимента.

Культивирование МНК, МСК и смешанных культур проводили в полной питательной сре-

де (ППС). ППС состояла из α -MEM (Sigma-Aldrich, США), 10% инактивированной (56 °C в течение 30 мин) сыворотки крови эмбрионов коров (Sigma-Aldrich, США), 2 мМ/л L-глутамин (Sigma-Aldrich, США), 100 Е/мкг/мл пенициллин/стрептомицин (Gibco Life Technologies, США). Культивирование проводилось в течение 48 часов/14 суток при 37 °C, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂.

В качестве контрольных моделей использовали монокультуру МНК на пластике, 3D-монокультуру МНК, МСК на пластике, 3D-монокультуру МСК.

Оценка морфофункционального состояния (активации, дифференцировки, созревания, пролиферации) клеточных культур в условиях 2D- и 3D-сокультивирования проводилась с помощью следующих методов:

1. Изучение антигенных детерминант с использованием метода проточной цитофлюориметрии с использованием коктейля моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD25, CD71, CD95, CD45, CD45RA, CD45RO (eBioscience, США), приготовленного *ex tempore*. А также MSC Phenotyping Kit human – 130-095-198 (Miltenyi Biotec, США) на проточном цитофлуориметре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия).

2. Количественное определение факторов роста, про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, FGF, G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , PDGF-BB, MIP-1 β , RANTES, TNF α , VEGF) в супернатантах исследуемых культур клеток проводилось методом проточной флюориметрии на автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем (Bio-PlexProHuman cytokine Group I Assays, Bio-Rad, США).

3. Определение экспрессии мРНК исследуемых генов, ассоциированных дифференцировкой (*U2af114*, *Gfi1*, *hnRNPLL*) иммунокомпетентных клеток проводили с методом полимеразной цепной реакции на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США).

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences).

Результаты и обсуждение

В смешанной модели 2D-культивирования, по истечении 14 суток, соотношения популяций CD4/CD8 соответствовало таковому в монокультуре МНК. Анализ количества клеток, несущих на своей поверхности маркеры ранней (CD25⁺,

CD71⁺) и длительной (CD95⁺) активации, показал увеличение клеток в смешанных 2D- и 3D-культурах по сравнению с данными, полученными при оценке краткосрочного (48 часов) культивирования монокультур МНК. Важно отметить, что присутствие трехмерных матриксов в смешанной культуре МСК + МНК статистически значимо увеличивало число клеток с фенотипом CD3⁺CD95⁺.

Также было выявлено увеличение Т-клеток с фенотипом CD3⁺CD45R0⁺ и переходных форм CD3⁺CD45R0⁺CD45RA⁺, которое отмечалось за счет реэкспрессии высокомолекулярной изоформы CD45 – CD45RA⁺.

По истечении 14 суток культивирования в 3D-монокультуре МСК, а также в смешанной модели культивирования (МСК + МНК), как в присутствии трехмерных образцов, имитирующих регенерирующую костную ткань, так и без них, было выявлено достоверное увеличение числа клеток, экспрессирующих маркеры гемопоэтических клеток CD (45⁺, 34⁺, 14⁺, 20⁺). Кроме того, в трехмерной модели монокультуры МСК, а также в обеих смешанных моделях культивирования отмечалось статистически значимое снижение числа клеток, несущих на своей поверхности молекулы CD105⁺ и CD90⁺ (на 14-е сутки) по сравнению со значениями, полученными в 2D-модели. Количество CD73⁺ клеток по окончании времени культивирования фиксировалось на уровне контрольных значений.

Оценка содержания факторов в культуре МСК человека показала, что действие искусственного трехмерного матрикса, имитирующего регенерирующую костную ткань, направлено, преимущественно, на снижение концентрации факторов с провоспалительной (IFN α , IFN γ , IL-6, IP-10, TNF α), хемоаттрактантной (RANTES) и проапоптотической (TRAIL) активностью.

В смешанной модели культивирования МСК + МНК концентрация исследуемых провоспалительных цитокинов статистически значимо увеличивалась, как в условиях культивирования на пластике, так и при добавлении трехмерных матриксов. Отличия были зафиксированы при сравнении с монокультурой мононуклеарных клеток, а также с монокультурой МСК. Важно отметить, что в смешанной 3D-культуре наблюдалась максимальная продукция IFN γ и RANTES. Максимальные значения IL-6 были задетектированы в смешанной двумерной модели культивирования.

В монокультуре МСК добавление трехмерного матрикса в среду культивирования статистически значимо снижало уровень концентрации противовоспалительных цитокинов IL-4, IL-10, IL-13. Однако в смешанной модели культивирования МСК + МНК уровни исследуемых моле-

кул статистически значимо повышались, как в условиях культивирования на пластике, так и в присутствии трехмерных матриксов.

Оценка уровня относительной экспрессии генов дифференцировки Т-лимфоцитов при сокультивировании с трехмерным матриксом в смешанной культуре показала достоверное увеличение экспрессии мРНК гена *U2af114* (в среднем на 87%). Увеличение транскрипции мРНК гена *U2af114* положительно коррелировало с числом Т-клеток с фенотипом CD3⁺CD45R0⁺ в смешанной 3D-культуре. Экспрессия мРНК генов *Gfi1*, *hnRNPLL* детектировалась на уровне значений трехмерной монокультуры МНК.

По результатам исследования смешанной двумерной (2D) культуры МСК и МНК на пластике было выявлено достоверное увеличение уровня концентрации многих исследуемых цитокинов, по сравнению с контрольными культурами. Спектр цитокинов, продуцируемых МСК, способствовал увеличению числа МНК, несущих на своей поверхности маркеры ранней (CD25) и поздней (CD71) активации, а также содержания дубль позитивных лейкоцитов, преимущественно за счет повышения числа CD45R0⁺ клеток. Рост содержания Т-клеток с фенотипом CD3⁺CD45R0⁺ в смешанной культуре был обусловлен увеличением транскрипции мРНК гена *U2AF26*, что подтверждено позитивной корреляционной взаимосвязью между исследуемыми параметрами ($r = 0,67$; $p < 0,05$). При этом транскрипция мРНК гена *Gfi1* оставалась на уровне значений, полученных при оценке монокультур МНК.

Нами было показано, что мононуклеарные клетки крови, в основном CD4⁺Т-клетки, обладали костимулирующим эффектом на продукцию ангиогенных и остеомодулирующих молекул [2].

Паракринное влияние МНК на МСК способствовало увеличению числа гемопоэтических стволовых клеток в смешанной культуре. Таким образом, при *in vitro* моделировании инфильтрации МНК из крови в ткани отмечен всплеск секреторной активности смешанной культуры стромальных клеток и лейкоцитов крови, что лежит в основе воспалительных и регенераторных процессов.

Также было выявлено, что 3D-матриксы с шероховатым КФ покрытием, в условиях моделирования воспалительного инфильтрата МНК, индуцирующего продуктивное воспаление и/или фазу пролиферации воспалительного процесса, способствуют регенерации костной ткани, посредством усиления функциональной (секреторной) активности смешанной культуры стромальных клеток и нормальных лейкоцитов крови.

Заключение

Резюмируя вышесказанное: 3D-матрицы выступают в роли активационных агентов, опосредованно запускающих изменение цитокинового

профиля микроокружения МСК и иммунокомпетентных клеток, что способствует инициации процессов активации, пролиферации и клеточной дифференцировки, необходимых для эффективной регенерации костной ткани.

Список литературы / References

1. Коршунов Д.А., Кондакова И.В. Современные достижения и проблемы в исследовании культур клеток // Успехи современной биологии, 2016. Т. 136, № 4. С. 347-361. [Korshunov D.A., Kondakova I.V. Modern achievements and problems in the study of cell cultures]. *Uspekhi sovremennoy biologii = Advances in Modern Biology*, 2016, Vol. 136, no. 4, pp. 347-361. (In Russ.)]
2. Khlusov I.A., Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Khaziakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Yurova K.A., Shunkin E.O., Krivosheev V.V., Porokhova E.D., Sizikova A.E., Safullina L.A., Legostaeva E.V., Komarova E.G., Sharkeev Y.P. Costimulatory effect of blood cells and rough calcium phosphate coating on the angiogenic and osteogenic features of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells in mixed culture as a model of postimplantation tissue repair. *Materials (Basel)*, 2020, Vol. 13, no. 19, 4398. doi: 10.3390/ma13194398.
3. Legostaeva E.V., Kulyashova K.S., Komarova E.G. Physical, chemical and biological properties of micro-arc deposited calcium phosphate coatings on titanium and zirconium-niobium alloy. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 2013, Vol. 44, no. 2-3, pp. 188-197.
4. Schell H., Duda G.N., Peters A. The haematoma and its role in bone healing. *J. Exp. Orthop.*, 2017, Vol. 4, 5. doi: 10.1186/s40634-017-0079-3.
5. Steward A.J., Kelly D.J. Mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation. *J. Anat.*, 2015, Vol. 227, no. 6, pp. 717-731.
6. Yang N., Liu Y. The role of the immune microenvironment in bone regeneration. *Int. J. Med. Sci.*, 2021, Vol. 18, no. 16, pp. 3697-3707.
7. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based. *Tissue Eng.*, 2001, Vol. 7, no. 2, pp. 211-228.

Авторы:

Юрова К.А. — к.м.н., старший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Норкин И.К. — к.б.н., техник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Хазиахматова О.Г. — к.б.н., старший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Малашченко В.В. — к.б.н., инженер Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Authors:

Yurova K.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Center for Immunology and Cellular Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Norkin I.K., PhD (Biology), Technician, Center for Immunology and Cellular Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Khaziakhmatova O.G., PhD (Biology), Senior Research Associate, Center for Immunology and Cellular Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Malashchenko V.V., Senior Research Associate, Engineer, Center for Immunology and Cellular Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Мелащенко О.Б. — научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Иванов П.А. — к.м.н., младший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Лигатюк Д.Д. — инженер Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Хлусов И.А. — д.м.н., главный научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Литвинова Л.С. — д.м.н., директор Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Melashchenko O.B., Research Associate, Center for Immunology and Cellular Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Ivanov P.A., PhD (Medicine), Junior Research Associate, Center for Immunology and Cellular Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Ligatyuk D.D., Engineer, Center for Immunology and Cellular Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Khlusov I.A., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Center for Immunology and Cellular Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Litvinova L.S., PhD, MD (Medicine), Director, Center for Immunology and Cellular Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Поступила 08.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 08.07.2023
Accepted 12.07.2023