

## РОЛЬ ТРЕХМЕРНЫХ МАТРИКСОВ, ИМИТИРУЮЩИХ РЕГЕНЕРИРУЮЩУЮ КОСТНУЮ ТКАНЬ В ФОРМИРОВАНИИ ПУЛА ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO*

© 2019 г. Л. С. Литвинова<sup>1</sup>, К. А. Юрова<sup>1\*</sup>, В. В. Шуплецова<sup>1</sup>,  
О. Г. Хазиахматова<sup>1</sup>, Е. С. Мелашенко<sup>1</sup>, В. В. Малащенко<sup>1</sup>,  
Е. О. Шунькин<sup>1</sup>, Ю. П. Шаркеев<sup>3</sup>, Е. Г. Комарова<sup>3</sup>, М. Б. Седельникова<sup>3</sup>,  
И. К. Норкин<sup>1</sup>, К. И. Прокин<sup>1</sup>, П. А. Иванов<sup>1</sup>, И. А. Хлусов<sup>2</sup>

\*E-mail: kristina\_kofanova@mail.ru

<sup>1</sup>Балтийский федеральный университет имени И. Канта, Калининград, Россия;

<sup>2</sup>Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия;

<sup>3</sup>Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск

Поступила: 27.07.2019. Принята: 30.08.2019

Исследование посвящено поиску критериев для создания новых биорезорбируемых материалов, формирующих ниши гемопоэтических стволовых клеток, обеспечивающих васкуляризацию регенерирующей костной ткани. В проведенном эксперименте выявлено, что формирование пула гемопоэтических стволовых клеток в условиях культивирования *in vitro* зависит от индекса шероховатости поверхности искусственного матрикса.

**Ключевые слова:** трехмерный матрикс, кальцийфосфатное покрытие, ММСК жировой ткани, гемопоэтические ниши, костная ткань

DOI: 10.31857/S102872210007088-1

**Адрес:** 236029 Калининград, ул. Гайдара, 6, «Балтийский федеральный университет им. И. Канта», Базовая лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий, Юрова Кристина Алексеевна. Тел.: 595–595 доб. 6634.

**E-mail:** kristina\_kofanova@mail.ru

**Авторы:**

**Литвинова Л. С.**, д.м.н., заведующая базовой лабораторией иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Юрова К. А.**, к.б.н., научный сотрудник базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Шуплецова В. В.**, к.б.н., научный сотрудник базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Хазиахматова О. Г.**, к.б.н., научный сотрудник базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Мелашенко Е. С.**, биолог центра медицинских биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Малащенко В. В.**, инженер исследователь центра медицинских биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Шунькин Е. О.**, инженер исследователь базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Шаркеев Ю. П.**, д.ф.-м.н., профессор, зав. лаб. физики наноструктурных биоконструктов ИФПМ СО РАН, Томск, Россия;

**Комарова Е. Г.**, к.т.н., младший научный сотрудник лаборатории физики наноструктурных биоконструктов ИФПМ СО РАН, Томск, Россия;

**Седельникова М. Б.**, д.т.н., старший научный сотрудник лаборатории физики наноструктурных биоконструктов ИФПМ СО РАН, Томск, Россия;

**Норкин И. К.**, аспирант БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Прокин К. И.**, студент БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Иванов П. А.**, научный сотрудник базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Хлусов И. А.**, д.м.н., профессор кафедры морфологии и общей патологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия.

Реконструкция возникающих травматических дефектов костной ткани является основной задачей травматологии и ортопедии. Современные фундаментальные исследования в области биологии стволовых клеток убедительно доказывают важную роль ниш гемопоэтических стволовых клеток, определяющих васкуляризацию регенерирующих органов и тканей, в формировании костной ткани. Согласно данным

научной периодики, нишевые территории гемопоэтических стволовых клеток в костной ткани могут образовываться *de novo* (Dellatore S. M. et al., 2008). Однако условия образования ниш гемопоэтических стволовых клеток, а также условия формирования пула гемопоэтических стволовых клеток, до сих неизвестны. Таким образом, целью настоящей работы явилось выявление условий формирования пула гемопоэтических стволовых клеток в условиях культивирования *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) были выделены из липоспирата человека (Разрешение № 7 от 09.12.2015 локального этического комитета Инновационного парка БФУ имени И. Канта) и соответствовали минимальным критериям, предъявляемым к ММСК. Двухмерная модель культивирования на пластике являлась контролем для оценки морфофункционального состояния клеток, культивируемых в присутствии трехмерного (3D) матрикса, имитирующего рельеф регенерирующей костной ткани.

Трехмерные матриксы размером 10x10x1 мм<sup>3</sup> с двусторонним покрытием из фосфатов кальция, имитирующим рельеф минерального вещества регенерирующей костной ткани, были изготовлены из коммерчески чистого титана VT1-0 (содержание составных элементов в весовых процентах: 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 (на базе Института физики прочности и материаловедения СО РАН, г. Томск) в анодном режиме.

Для оценки дифференцировки клеток в присутствии разработанных матриксов, ММСК культивировали в присутствии имплантов в 12-луночных стерильных пластиковых культуральных плоскодонных планшетах (Orange Scientific, Бельгия; площадь лунки 1,86 см<sup>2</sup>). Имплант помещали в центр лунки, клеточной суспензией ( $2 \times 10^4$  кл в 100 мкл полной питательной среды) аккуратно покрывали всю верхнюю плоскость импланта. Затем планшет с культурой оставляли на 120 минут во влажной камере для адгезии клеток, после чего в лунки добавляли по 1 мл полной питательной среды (90% DMEM/F12 (1:1) (Gibco Life Technologies, США), 10% FBS (Sigma-Aldrich, США), 50 мг/л гентамицина (Invitrogen, Великобритания), 280 мг/л L-глутамина (Sigma-Aldrich, США) и культивировали в течение 14 суток со сменой среды каждые 2–3 дня.

Проточную цитометрию для определения антигенных детерминант ММСК проводили с использованием MSC Phenotyping Kit human – 130-095-198 («MiltenyiBiotec», США) согласно протоколу фирмы-производителя, после чего клетки подвергали анализу на проточном цитофлуориметре MACS Quant («Miltenyi Biotec», Германия), обработку полученных данных выполняли с использованием программного обеспечения «KALUZA Analysis Software» («Beckman Coulter», США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исходная (до культивирования) средняя жизнеспособность культуры ММСК-ЖТ человека составила 95%. После окончания времени инкубации (14 суток) в 2D-культуре на пластике доля живых клеток варьировала в пределах 87–98% (в 10 лунках культуральных планшетов). После 14-дневного сокультивирования ММСК-ЖТ с 3D-матриксами, несущими рельефное кальцийфосфатное покрытие, процент жизнеспособных клеток составил 82–95% (14 тестируемых образцов 3D-матриксов с различной шероховатостью). Таким образом, 3D-матриксы не оказывали цитотоксического влияния на ММСК-ЖТ человека при 14-дневном культивировании.

По окончании 14 дней культивирования, значения, число клеток, экспрессирующих молекулы CD73, CD90 и CD105, составляло более 95%, содержание клеток с фенотипом CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD20 не превышало 3,21%, что соответствовало результатам, полученным до культивирования. Сокультивирование ММСК-ЖТ с трехмерными матриксами, имитирующими рельеф минерального вещества регенерирующей костной ткани, способствовало увеличению числа клеток, экспрессирующих маркеры гемопоэтических клеток (CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD20) в среднем, до 5,35% на фоне снижения клеток, несущих молекулу CD105. Важно отметить, что изменения коррелировали с индексом шероховатости кальцийфосфатного покрытия. Содержание кроветворных клеток, экспрессирующих CD45, CD34, CD14, CD20 детерминанты, напротив, увеличилось ( $p < 0.05$ ).

По результатам проведенного эксперимента было выявлено, что трехмерные матриксы с кальцийфосфатным покрытием, имитирующим рельеф минерального вещества регенерирующей костной ткани способствуют увеличению гемопоэтических клеток в условиях

культивирования *in vitro* на фоне снижения ММСК. Вероятно, искусственно созданные микротерритории выполняют роль гемопоэтических ниш, где популяция гемопоэтических клеток, выделенная с фракцией ММСК-ЖТ, могут пролиферировать, наращивая клеточную массу. Исследование выполнено при финан-

совой поддержке РНФ (Соглашение № 18-75-00071).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Dellatore S. M., Garcia A. S., Miller W. M.* Mimicking stem cell niches to increase stem cell expansion // Current opinion in biotechnology, 2008, 19 (5), P. 534–540.

## THE ROLE OF THREE-DIMENSIONAL MATRICES IMITATING BONE TISSUE REGENERATION IN THE FORMATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS POOL UNDER *IN VITRO* CULTIVATION CONDITIONS

© 2019 L. S. Litvinova<sup>1</sup>, K. A. Yurova<sup>1\*</sup>, V. V. Shupletsova<sup>1</sup>, O. G. Khaziakhmatova<sup>1</sup>, E. S. Melashchenko<sup>1</sup>, V. V. Malashchenko<sup>1</sup>, E. O. Shunkin<sup>1</sup>, Y. P. Sharkeyev<sup>3</sup>, E. G. Komarova<sup>3</sup>, M. B. Sedelnikova<sup>3</sup>, I. K. Norkin<sup>1</sup>, K. I. Prokin<sup>1</sup>, P. A. Ivanov<sup>1</sup>, I. A. Khlusov<sup>2</sup>

\*E-mail: kristina\_kofanova@mail.ru

<sup>1</sup>Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

<sup>2</sup>Siberian State Medical University, Tomsk, Russia;

<sup>3</sup>Institute of Strength Physics and Materials Science SB RAS, Tomsk, Russia

Received: 27.07.2019. Accepted: 30.08.2019

The study is devoted to the search criteria for creating new bioresorbable materials that form hematopoietic stem cell niches that provide vascularization of regenerating bone tissue. In the experiment, it was revealed that the formation of hematopoietic stem cells pool under *in vitro* cultivation conditions depends on the surface roughness index of the artificial matrix.

*Key words:* three-dimensional matrix, calcium phosphate coating, adipose tissue MSCs, hematopoietic niches, bone tissue

### Authors:

**Litvinova L. S.**, Doctor of Medical Science, Head of the Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

**Yurova K. A.**, Ph.D., Researcher at the Base Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia. E-mail: kristina\_kofanova@mail.ru;

**Shupletsova V. V.**, Ph.D., Researcher at the Base Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

**Haziakhmatova O. G.**, Ph.D., Researcher at the Base Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

**Melashchenko E. S.**, Biologist of the Center for Medical Biotechnology of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

**Malashchenko V. V.**, Researcher, Center for Medical Biotechnologies of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

**Shunkin E. O.**, Engineer Researcher Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

**Sharkeyev Yu. P.**, Doctor of Physics and Mathematics, Professor, Head of Laboratory of Physics of nanostructured biocomposites of Institute of Strength Physics and Materials Science SB RAS, Tomsk, Russia;

**Komarova E. G.**, Ph.D., Junior Researcher, Laboratory of Physics of Nanostructured Biocomposites of Institute of Strength Physics and Materials Science SB RAS, Tomsk, Russia;

**Sedelnikova M. B.**, Doctor of Technical Science, Doctor of Technical Sciences Senior Researcher, Laboratory of Physics of Nanostructured Biocomposites of Institute of Strength Physics and Materials Science SB RAS, Tomsk, Russia;

**Norkin I. K.**, Ph.D., student of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

**Prokin K. I.**, student of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

**Ivanov P. A.**, Researcher at the Base Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

**Khlusov I. A.**, Ph.D., Professor of the Department of Morphology and General Pathology of the Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russian Federation, Tomsk, Russia.