ВЛИЯНИЕ 3D-МАТРИКСОВ, ИМИТИРУЮЩИХ РЕГЕНЕРИРУЮЩУЮ КОСТНУЮ ТКАНЬ, НА ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Кристина Алексеевна Юрова[1], Валерия Владимировна Шуплецова[1], Ольга Геннадьевна Хазиахматова[1], Владимир Владимирович Малащенко[1], Егор Олегович Шунькин[1], Юрий Петрович Шаркеев[2], Екатерина Геннадьевна Комарова[2], Валентина Вадимовна Чебодаева[2], Павел Александрович Иванов[1], Игорь Альбертович Хлусов[3], Лариса Сергеевна Литвинова[1]

[1] *Базовая лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта, Калининград, Россия;*

[2] *Институт физики прочности и материаловедения, Томск, Россия;*

[3] *Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия*

kristina_kofanova@mail.ru

Повреждение костной ткани вызывает активацию каскадного механизма регенерации. При проведении остеосинтеза костных переломов с использованием кальций-фосфатных (КФ) материалов медицинского назначения, клиническая эффективность их применения определяется соотношением специфической остеогенной активности и потенциальной токсичности фосфатов кальция, высвобождающихся при биодеградации имплантата.

В связи с этим, in vitro исследование поведения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) в присутствии искусственных материалов является важным этапом оценки цитотоксичности и (или) специфической активности имплантатов, предлагаемых к использованию в травматологии и ортопедии.

Эксперимент проведен с помощью разработанной модели трехмерного (3D) культивирования клеток in vitro с использованием подложек (10×10×1 мм^3) из коммерчески чистого титана с шероховатым (Ra=2–5 мкм) КФ покрытием. Клеточная линия ММСК жировой ткани (ММСК-ЖТ) была получена из липоаспирата человека. Иммунофенотипирование ММСК-ЖТ проводили на проточном цитометре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия). До начала культивирования число клеток, несущих молекулы CD105, CD73 и CD90 составляло более 95%, клеток, экспрессирующих маркеры CD45, CD34, CD20 и CD14 — менее 4%. Клетки инкубировали в стандартной культуральной среде DMEM/F12 (Gibco Life Technologies, США) в течение 14–21 суток при 37°С, 100% влажности в атмосфере 5% CO_2.

После окончания времени инкубации (14 суток) исследование фенотипического профиля культуры CD73CD90CD105$^+$ клеток после 14 дней культивирования не выявило статистически значимых различий при культивирования клеток в присутствии 3D-матриксов. В 2D-культуре на пластике доля живых клеток варьировала в пределах 87–98%. После 14-дневного сокультивирования ММСК-ЖТ с 3D-матриксами доля жизнеспособных клеток при окрашивании 0,4% трипановым синим, составила 82–95%. Негативное влияние шероховатости КФ покрытия на выживаемость клеток не установлено.

Через 21 сутки в 3D-культуре резко возрастала окраска межклеточного матрикса ализариновым красным, что свидетельствует в пользу дифференцировки ММСК в секретирующие остеобласты.

Таким образом, титановые подложки с рельефным КФ покрытием показали полезные остеоиндуктивные свойства при отсутствии цитотоксичности в отношении ММСК, что раскрывает их известную клиническую эффективность при остеосинтезе в случае переломов и заболеваний костной ткани.

Исследование выполнено при поддержке Гранта Президента (проект № МК-2452.2019.4).

СЕКРЕЦИЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ, УЧАСТВУЮЩИМИ В РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Кристина Алексеевна Юрова[1], Валерия Владимировна Шуплецова[1], Ольга Геннадьевна Хазиахматова[1], Елена Сергеевна Мелащенко[1], Юрий Петрович Шаркеев[2], Владимир Владимирович Малащенко[1], Егор Олегович Шунькин[1], Екатерина Геннадьевна Комарова[2], Валентина Вадимовна Чебодаева[2], Павел Александрович Иванов[1], Игорь Альбертович Хлусов[3], Лариса Сергеевна Литвинова[1]

[1] *Базовая лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта, Калининград, Россия;*

[2] *Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск, Россия;*

[3] *Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия*

larisalitvinova@yandex.ru

Повреждение костной ткани инициирует сигнальные каскады, запускающие механизм ее репаративной регенерации (Wang Y. et al., 2018). Мы предполагаем, что продукция провоспалительных цитокинов (IL-1b, IL-6, TNF-α) при остеосинтезе переломов зависит от типа клеток (мононуклеарные лейкоциты крови (МНК); мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК)) и свойств имплантатов с кальцийфосфатной (КФ) поверхностью.

В эксперименте были использованы подложки (10×10×1 мм^3) из коммерчески чистого титана, несущих рельефное (индекс шероховатости Ra = 2–5 мкм) КФ покрытие.

Выделение МНК проводилось методом центрифугирования на градиенте плотности фиколл-урографин (р=1,077 г/см3). Клетки (на 98–99% CD45CD3$^+$) и инкубировали в полной питательной среде 48 часов при 37°С, 5% CO_2 во влажной атмосфере. CD73CD90CD105$^+$ ММСК выделяли из жировой ткани человека (Litvinova L.S. et al., 2018) инкубировали 14 суток. Иммунофенотипирование клеток проводили методом проточной цитофлуориметрии (MACSQuant (Miltenyi Biotec, Германия) и анализировали с помощью «KALUZA Analysis Software» (Beckman Coulter, США). Концентрации цитокинов (IL-1b, IL-6, TNF-α; пг/мл) определяли методом проточной флюориметрии (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США).

По истечении времени культивирования в присутствии 3D-матриксов было выявлено увеличение числа МНК с фенотипом CD3CD4CD71$^+$ и резкое увеличение остеогенной дифференцировки ММСК. Число МНК, экспрессирующих маркеры активации (CD25, CD95) и дифференцировки (CD45RO, CD45RA), оставалось на уровне контрольных значений. В культуре МНК уровень провоспалительных цитокинов (IL-1b, IL-6) был повышен в 50 раз (P<0,05) в сравнении с 2D-культурами.