

УДК 616.5-001.17-003.93-092.9:611.018.013.395

Л.С. Литвинова^{1,*}, В.В. Шуплецова¹, О.Г. Хазиахматова¹,
К.А. Юрова¹, В.В. Малащенко¹, Н.М. Тодосенко¹, М.Ю. Хлусова²,
Ю.П. Шаркеев^{3,4}, Е.Г. Комарова⁴, М.Б. Седельникова⁴, М.В. Чайкина⁵, И.А. Хлусов^{1,6}

Миграционная способность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при культивировании с рельефным кальцийфосфатным покрытием

UDC 616.5-001.17-003.93-092.9:611.018.013.395

L.S. Litvinova^{1,*}, V.V. Shupletsova¹, O.G. Khaziakhmatova¹,
K.A. Yurova¹, V.V. Malashchenko¹, N.M. Todosenko¹, M.Yu. Khlusova²,
Y.P. Sharkeev^{3,4}, E.G. Komarova⁴, M.B. Sedelnikova⁴, M.V. Chaykina⁵, I.A. Khlusov^{1,6}

Migration Ability of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in Cultivation with Relief Calcium Phosphate Coating

Ключевые слова: стромальные клетки жировой ткани человека, подвижность, миграция, титановые подложки, кальцийфосфатное покрытие, микрорельеф.

Ключові слова: стромальні клітини жирової тканини людини, рухливість, міграція, титанові підложки, кальцієфосфатне покриття, микрорельеф.

Key words: stromal cells of human adipose tissue, motility, migration, titanium substrates, calcium phosphate coating, microrelief.

Миграционная способность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), контролируемая экстрацеллюлярным матриксом (ЭЦМ) [7], остается малоизученной из-за ограниченных технических возможностей неинвазивного исследования поведенческих реакций клеток в условиях культивирования *in vitro*.

Одним из современных инструментов клеточной биологии для непрерывного наблюдения за клетками является Cell-IQ-система непрерывной регистрации параметров жизнедеятельности клеточных популяций [5], позволяющая в режиме реального времени оценивать не только морфологию клеток, но и их функциональную активность (жизнеспособность, миграция, адгезия, пролиферация, дифференцировка,

The migration ability of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs), controlled by extracellular matrix (ECM) [7], has remained poorly studied due to restricted technical possibilities of noninvasive study of behavioral cell responses under *in vitro* culture conditions.

One of the contemporary tools in cell biology used for full-time cell monitoring is the Cell-IQ-system for continuous recording of cell population vital activity parameters [5], enabling a realtime evaluation of not only morphology of cells, but also their functional activity (viability, migration, adhesion, proliferation, differentiation, maturation), including the effect of various agents (pharmacological substances, biomolecules, viruses, *etc.*) as well [8].

¹Базова лабораторія імунології та клітинної біотехнології Балтійського федерального університету імені І. Канта, м. Калінінград, Росія

²Кафедра патофізіології Сибірського державного медичного університету, м. Томськ, Росія

³Кафедра експериментальної фізики Томського політехнічного університету, м. Томськ, Росія

⁴Лабораторія фізики наноструктурних біосумісних композитів Інституту фізики міцності та матеріалознавства СО РАН, м. Томськ, Росія

⁵Лабораторія інтеркаляційних і механохімічних реакцій Інституту хімії твердого тіла та механохімії СО РАН, м. Новосибірськ, Росія

⁶Кафедра морфології та загальної патології Сибірського державного медичного університету, м. Томськ, Росія

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. О. Невського, 14, м. Калінінград, Росія 236041;
тел.: (+7 4012) 59-55-95
електронна пошта: larisalitinova@yandex.ru

Надійшла 26.01.2018

Прийнята до друку 19.02.2018

© 2018 L.S. Litvinova et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

¹Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

²Chair of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

³Chair of Experimental Physics, Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia

⁴Laboratory of Physics of Nanostructured Biocompatible Composites, Institute of Strength Physics and Materials Science of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

⁵Laboratory of Intercalation and Mechanochemical Reactions of the Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁶Chair of Morphology and General Pathology of the Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

*To whom correspondence should be addressed:

14, O. Nevsky str., Kaliningrad, Russia 236041;
tel.: +7 4012 59 5595
e-mail: larisalitinova@yandex.ru

Received January, 26, 2018

Accepted February, 19, 2018

созревание), в том числе и при воздействии различных агентов (фармакологические вещества, биомолекулы, вирусы и т. п.) [8].

Экстрацеллюлярный матрикс, в том числе и его синтетические аналоги, в значительной степени контролирует поведение ММСК через молекулы адгезии [7], топографию своей поверхности и объема [2]. Для кальцийфосфатного ЭЦМ дополнительным регуляторным фактором являются ионы кальция и фосфора [6].

Целью настоящей работы было исследование миграционной способности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при непрямом контакте *in vitro* с рельефным кальцийфосфатным покрытием с использованием Cell-IQ-системы.

В эксперименте *in vitro* использовали образцы размером $10 \times 10 \times 1$ мм³, несущие двустороннее кальцийфосфатное (КФ) покрытие. Указанное покрытие формировали на подложке из коммерчески чистого титана (в масс. %: 99,58 Ti; 0,12 O; 0,18 Fe; 0,07 C; 0,04 N; 0,01 H) методом микродугового оксидирования [4] на установке «Microarc-3.0» (Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Россия) в анодном режиме. Электролит состоял из водного раствора ортофосфорной кислоты (20 масс. %), карбоната кальция (9 масс. %) и синтетического ГАП (6 масс. %). Индекс шероховатости КФ покрытий $Ra = 2,4-4,4$ мкм, определяемый с помощью профилометра «Talysurf 5-120» («Taylor Hobson Ltd.», Великобритания) согласно ГОСТ 2789-73, соответствовал биологически активному диапазону рельефа КФ покрытий для остеогенной дифференцировки ММСК *in vivo* [3].

Миграцию и адгезию ММСК жировой ткани (ММСК-ЖТ), полученных из липоаспирата человека (Разрешение №4 от 23.10.2013 ЛЭК БФУ им. И. Канта), изучали с использованием возможностей интегрированной платформы для непрерывной фазово-контрастной визуализации живых клеток в реальном времени Cell-IQ® v2 MLF («Technologies», Финляндия). По одной титановой подложке с двусторонним КФ покрытием устанавливали вертикально с одного края 12-луночных стерильных пластиковых культуральных плоскодонных планшетов с площадью лунки 1,86 см² («Orange Scientific», Бельгия) и крепили клипсой к стенке лунки. В таком положении образцы не смещались при передвижении планшетов на предметном столике прибора и не повреждали формирующийся клеточный слой. По центру лунки помещали 70 мкл клеточной взвеси (5×10^4 жизнеспособных кариоцитов) после 5-го пассажа, клетки выдерживали во влажной камере в течение 120 мин для их адгезии, неприкрепившиеся клетки смывали фосфатным буфером и осторожно добавляли 1,5 мл

The extracellular matrix, including its synthetic analogues, largely controls the behavior of MMSCs through adhesion molecules [7] and topography of its surface and volume [1]. The calcium and phosphorus ions are additional regulatory factors for calcium phosphate ECM [6].

This research was aimed to investigate the migration abilities of multipotent mesenchymal stromal cells in indirect contact *in vitro* with a relief calcium phosphate coating using the Cell-IQ system.

The $10 \times 10 \times 1$ mm³ specimens with bilateral calcium phosphate (CP) coating were used in an *in vitro* experiment. This coating was formed on a substrate of commercially pure titanium (in wt%: 99.58 Ti; 0.12 O; 0.18 Fe; 0.07 C; 0.04 N; 0.01 H) by microarc oxidation [3] using the Microarc-3.0 device (Institute of Strength Physics and Materials Science of Siberian Branch of RAS, Russia) in anodal regimen. The electrolyte consisted of an aqueous solution of orthophosphoric acid (20 wt%), calcium carbonate (9 wt%) and synthetic hydroxyl apatite (6 wt%). The roughness index of CP coatings, $Ra = 2.4-4.4$ μm, was determined using a profilometer Talysurf 5-120 (Taylor Hobson Ltd, UK), according to GOST 2789-73, corresponded to biologically active range of CP coating relief for osteogenic differentiation of MMSCs *in vivo* [2].

Migration and adhesion of MMSCs of adipose tissue (MMSCs-AT), derived from human lipoaspirate (Permit Nr4 of Local Ethics Committee, Innovation Park, Immanuel Kant Baltic Federal University of October 23, 2013) were studied using the integrated platform for continuous real time phasecontrast imaging of living cells Cell-IQ® v2 MLF (CM Technologies Oy, Finland). One of titanium substrate with a double-sided CP coating was placed in a well vertically at one edge of sterile 12-well plastic culture flat-bottom plates with 1.86 cm² well area (Orange Scientific, Belgium) and attached to the wall of the well with a clip. In this position, the specimens were not shifted when the plates were moved on the sample stage of the instrument and did not damage the forming cell layer. Then, 70 μl of cell suspension (5×10^4 viable karyocytes) after passage 5 were applied into the center of the well. The cells were exposed in a moist chamber for 120 min for adhesion. The non-adherent cells were washed out with phosphate buffer and the wells were carefully filled with 1.5 ml of a nutrient medium containing 90% MEM/F12 (1:1) (Gibco Life Technologies, USA), 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, USA), 50 mg/l Gentamicin (Invitrogen, UK), and 280 mg/l L-glutamine (Sigma-Aldrich). Cells were cultured for 14 days at 100% humidity in a 5% carbon dioxide atmosphere at 37°C.

After the manipulations the specimens were immersed by half in the culture medium (1/4 of the bilateral



питательной среды, состоящей из 90 % DMEM/F12 (1:1) («Gibco Life Technologies», США), 10% фетальной телячьей сыворотки («Sigma-Aldrich», США), 50 мг/л гентамицина («Invitrogen», Великобритания), 280 мг/л L-глутамина («Sigma-Aldrich»). Срок динамического культивирования в Cell-IQ-системе составил 14 суток при 100% влажности, 5% углекислого газа и 37°C.

В результате манипуляций образцы наполовину были погружены в культуральную среду (к клеточному слою была обращена 1/4 поверхности двустороннего покрытия), клетки в течение длительного времени не контактировали с покрытием напрямую, что обусловило опосредованное влияние (через растворенные вещества) на направленную миграцию клеток в направлении к образцам и/или от них. Контролем служила культура ММСК-ЖТ на пластиковой поверхности культуральных планшетов без добавления образцов с КФ покрытием.

Цифровые снимки клеточной культуры получали каждые 45 мин. Для эффективной идентификации клеток было создано несколько электронных библиотек их цифровых видеоизображений.

Полученные данные анализировали с помощью методов статистического описания и методов проверки статистических гипотез, использующихся в стандартных пакетах программы «Statistica 10.0» («StatSoft», США).

Экспериментальная культура стромальных клеток соответствовала морфологическим критериям ММСК-ЖТ. Система Cell-IQ позволила установить, что в результате применения синтетического КФ покрытия, в отличие от чистого TiO_2 , замедлялась (до 46% от контроля) скорость движения ММСК-ЖТ по пластиковой поверхности. К 14-м суткам в лунках, содержащих титановые образцы с КФ покрытием, формировалось в 10 раз меньше клеточной массы на границе с образцом по сравнению с контролем, что свидетельствовало о существенном торможении направленной миграции ММСК-ЖТ в сторону тестируемых объектов. К поверхности образцов мигрировали единичные клетки. Возле образцов, между мигрирующими ММСК-ЖТ, были обнаружены скопления частиц, вызванные, по-видимому, биодegradацией КФ покрытия (рис. 1).

Обнаруженный результат не был связан с токсичностью КФ покрытия, поскольку вдали от образцов с КФ покрытием подвижность клеток в экспериментальных пробах статистически значимо не отличалась от таковой в контрольной культуре.

Таким образом, Cell-IQ-системой зафиксирован выход микрочастиц в межклеточную жидкость, который визуально усиливался с увеличением шероховатости КФ покрытия в диапазоне $R_a = 2,4-4,4$ мкм,

coating surface faced the cell layer), the cells had no direct contact with the coating for a long time, which determined an indirect (via dissolved substances) influence on directed cell migration towards the specimens and/or away from them. The MMSCs-AT culture on plastic surface of culture plates with no added specimens with CP coating served as a control.

Digital photographs of cell culture were obtained every 45 min. Several electronic libraries of cell digital video images were created for their efficient identification.

The data obtained were processed with the methods of descriptive statistics and those for testing statistical hypothesis, used in Statistica 10.0 standard packages (StatSoft, USA).

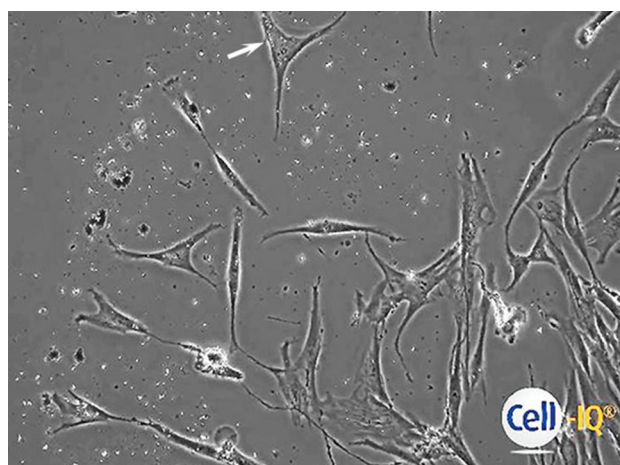


Рис. 1. Фазово-контрастное Cell-IQ-видеоизображение морфологического состояния культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека. Миграция клеток из 5-часовой зоны к 11 часам (по циферблату). Белой стрелкой отмечена фагоцитирующая клетка.

Fig. 1. Phase-contrast Cell-IQ-video image of morphological state of multipotent mesenchymal stromal cell culture of human adipose tissue. Migration of cells from a 5-hour zone to 11 hrs (by clock dial). A white arrow marks a phagocytosing cell.

The experimental culture of stromal cells corresponded to morphological criteria of MMSCs-AT. The Cell-IQ system enabled establishing the fact that, as a result of using a synthetic CP coating, in contrast to pure TiO_2 , the rate of MMSCs-AT movement along the plastic surface was slowed (down to 46% of the control). To day 14 in the wells, containing the CP-coated titanium specimens, a 10-times lower cell mass was formed at the specimen edge as compared to the control, testifying thereby to a significant inhibition of the MMSCs-AT directed migration towards the tested objects. Single cells migrated to the specimen's surface. Near the samples, between migrating MMSCs-AT, the clusters of

формируемой быстро растворимыми сферолитами (рис. 2). Как следствие, при увеличении R_a увеличивалась площадь растворимой части КФ поверхности, что, по-видимому, приводит к выходу частиц, оказывающих механическое препятствие движению ММСК-ЖТ при прохождении клеток между КФ кристаллитами. Оптическая система позволила зафиксировать фагоцитоз микрочастиц. Оба процесса способны тормозить скорость клеточной миграции.

Кроме того, в присутствии образцов с микродуговым КФ покрытием из синтетического ГАП может снижаться миграционная способность ММСК-ЖТ, вероятно, за счет продуктов биodeградации. Так, ионы кальция, активирующие кальцийчувствительный рецептор, способны стимулировать дифференцирование ММСК в остеобласты и минерализацию матрикса, что может ограничивать их двигательную активность [6].

Полученные результаты позволяют расшифровать клинические данные о различных механизмах остеоинтеграции КФ покрытий, влияющей на результаты остеоинтеграции при повреждениях и заболеваниях костной ткани [1].

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-15-10031, сравнительный анализ результатов культивирования клеток) и РФФИ (проект 15-03-07659, изготовление материалов для культивирования клеток и тестирование физико-химических свойств).

Литература

1. Ляхов Н.З., отв. редактор. Биоконпозиты на основе кальцийфосфатных покрытий, наноструктурных и ультрамелкозернистых биоинертных металлов, их биосовместимость и биodeградация. Томск: Издательский Дом Томского государственного университета, 2014; 596 с.
2. Curtis A., Wilkinson C. Topographical control of cells. *Biomaterials* 1997; 18: 1573–83.
3. Gnedenkov S.V., Scharkeev Yu.P., Sinebryukhov S.L. et al. Formation and properties of bioactive surface layers on titanium. *Inorganic Materials: Applied Research* 2011; 2(5): 474–481.
4. Legostaeva E.V., Kulyashova K.S., Komarova E.G. et al. Physical, Chemical and Biological Properties of Micro-arc Deposited Calcium Phosphate Coatings on Titanium and Zirconium-Niobium Alloy. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 2013; 44(2–3): 188–197.
5. Meindl C., Absenger M., Roblegg E., Frohlich E. Suitability of cell-based label-free detection for cytotoxicity screening of carbon nanotubes. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 564804.
6. Scadden D.T. The stem cell niche in health and leukemic disease. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20(1): 19–27.

particles were found, apparently caused by biodegradation of CP coating (Fig. 1).

This finding was not associated with the toxicity of CP coating, since in a distance from the CP-coated specimens the cell motility in experimental specimens did not statistically significantly differ from that in the control culture.

Thus, the Cell-IQ system recorded the release of microparticles into an intercellular fluid, which was visually enhanced with an increase in roughness of CP coating within the range of $R_a = 2.4–4.4 \mu\text{m}$, formed

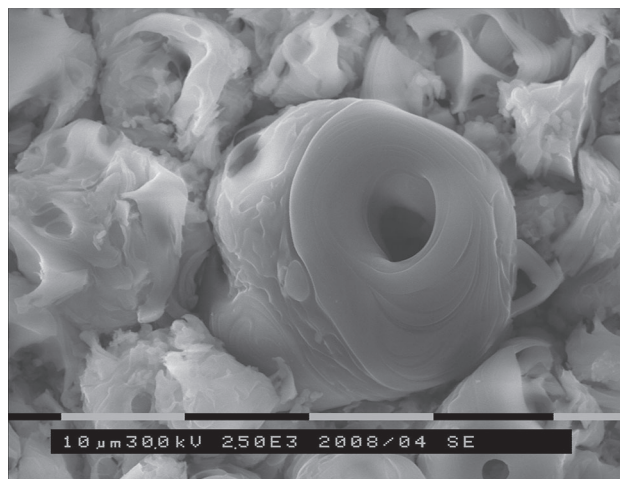


Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия сферолитов, формирующих рельеф кальцийфосфатного микродугового покрытия на титане; $\times 2500$.

Fig. 2. Scanning electron microscopy of spherulites, forming the relief of microarc calcium-phosphate coating on titanium; $\times 2500$.

by rapidly soluble spherulites (Fig. 2). As a consequence, with the R_a increase, the area of soluble part of CP surface augmented, which apparently resulted in the release of particles, causing a mechanical obstacle to the MMSCs-AT motion during cell passage between CP crystallites. The optical system made it possible to observe the phagocytosis of microparticles. Both processes are capable to inhibit the rate of cell migration.

In addition, in the presence of specimens with a microarc CP coating made from synthetic HA, a migration ability of MMSCs-AT may decrease probably due to biodegradation products. For example, the calcium ions, activating the calcium sensitive receptor, are able to stimulate the MMSCs differentiation into osteoblasts and matrix mineralization, which can limit their motor activity [6].

Our findings enable decoding the clinical data on various mechanisms of osseointegration of CP coatings, affecting the results of osteosynthesis in injuries and diseases of bone tissue [4].



7. Taichman R.S. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* 2005; 105(7): 2631–2639.
8. Teng Z., Kuang X., Wang J., Zhang X. Real-time cell analysis – A new method for dynamic, quantitative measurement of infectious viruses and antiserum neutralizing activity. *J Virol Meth* 2013; 193(2): 364–370.

The research performance was financially supported by the Russian Science Foundation (Project 16-15-10031, Comparative Analysis of Cell Culture Results) and RFFI (Project 15-03-07659, Manufacture and Testing of Physico-Chemical Features of Materials for Cell Culture).

References

1. Curtis A., Wilkinson C. Topographical control of cells. *Bio-materials* 1997; 18: 1573–83.
2. Gnednikov S.V., Scharkeev Yu.P., Sinebryukhov S.L. et al. Formation and properties of bioactive surface layers on titanium. *Inorganic Materials: Applied Research* 2011; 2(5): 474–481.
3. Legostaeva E.V., Kulyashova K.S., Komarova E.G et al. Physical, chemical and biological properties of micro-arc deposited calcium phosphate coatings on titanium and zirconium-niobium alloy. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 2013; 44(2–3): 188–197.
4. Lyakhov N.Z., editor-in-chief. *Biocomposites based on calcium phosphate coatings, nanostructured and ultrafine-grained bioinert metals, their biocompatibility and biodegradation*. Tomsk: Tomsk State University Publishing House, 2014.
5. Meindl C., Absenger M., Roblegg E., Frohlich E. Suitability of cell-based label-free detection for cytotoxicity screening of carbon nanotubes. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 564804.
6. Scadden D.T. The stem cell niche in health and leukemic disease. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20(1): 19–27.
7. Taichman R.S. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* 2005; 105 (7): 2631–2639.
8. Teng Z., Kuang X., Wang J., Zhang X. Real-time cell analysis – A new method for dynamic, quantitative measurement of infectious viruses and antiserum neutralizing activity. *J Virol Meth* 2013; 193(2): 364–370.