

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(Н И У « Б е л Г У »)

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

КАФЕДРА БИОЛОГИИ

**ВЛИЯНИЕ ПОДСТИЛАЮЩЕЙ ПОВЕРХНОСТИ НА
ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ СТРОМАЛЬНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Выпускная квалификационная работа
обучающейся по направлению подготовки 06.03.01 Биология
очной формы обучения, группы 07001418
Беяевой Вероники Сергеевны

Научный руководитель
к.б.н., доцент
Наеждин С.В.

БЕЛГОРОД 2018

Оглавление

Введение.....	3
Глава 1. Обзор литературы по теме исследования.....	5
1.1. Пролиферация и дифференцировка стромальных стволовых клеток.....	5
1.2. Влияние подстилающей поверхности на стволовые клетки.....	11
1.3. Роль химического состава подстилающей поверхности.....	28
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	39
Глава 3. Полученные результаты и их обсуждение.....	46
Выводы.....	50
Список использованных источников.....	51

Введение

Согласно рекомендациям Международного общества клеточной терапии (ISCT) мультипотентные мезенхимальные стромальные стволовые клетки (ССК) должны обладать следующими признаками: иметь адгезию к пластику в стандартных условиях культивирования и обладать способностью к дифференцировке в остеобласты, адипоциты и хондробласты в стандартных условиях культивирования *in vitro*. Именно эти критерии были взяты в качестве основных, в данном исследовании, которые косвенно свидетельствуют о роли подстилающей поверхности в жизнедеятельности ССК.

Понимание того, как клетки взаимодействуют с материалами, является важной темой тканевой инженерии. Клетки реагируют на наноструктуры и микроструктуры, например, с помощью внеклеточного матрикса (ВКМ). Поскольку ВКМ состоит из множества специфических белков, а в случае кости из минеральных компонентов, клеточная среда обладает определенными химическими и механическими свойствами с которой костные клетки взаимодействуют и используют в своей жизнедеятельности. Таким образом ключевой проблемой инженерии костной ткани является эффективное взаимодействие и интеграция костных стволовых клеток со структурами матрицы или каркасами, которые могут быть имплантированы пациенту. Имплантация клеток, содержащихся в каркасе, может произойти сразу же после их заселения или может быть отложена до тех пор, пока не будет получена полноценная культура *in vitro*. Сократить временной период адаптации и ускорить заселение клетками каркаса имплантата можно при условии наличия оптимальных физико-химических свойств поверхности материала матрицы. При этом выявление и оптимизация этих свойств и условий может дать возможность для непосредственной дифференцировки ССК без регулировки культурной среды с помощью дорогостоящих факторов роста или факторов дифференцировки.

Цель работы – установить влияние подстилающей поверхности, имеющей различный нанорельеф на процесс деления и дифференцировки стромальных стволовых клеток.

Для достижения поставленной цели были определены задачи:

- определить нанорельеф пластиковой и стеклянной поверхностей с использованием атомно-силовой микроскопии;
- провести оценку пролиферации стромальных стволовых клеток на поверхности имеющей различный нанорельеф;
- осуществить оценку дифференцировки стромальных стволовых клеток на поверхности имеющей различный нанорельеф.

Выпускная квалификационная работа изложена на 60 страницах. Она состоит из содержания, введения, трех основных глав, заключения. Список использованных источников насчитывает 88 наименований. В работе используются 16 рисунков.

Глава 1. Обзор литературы по теме исследования

1.1. Пролиферация и дифференцировка стволовых клеток

В органах и тканях, нуждающихся в постоянном обновлении, имеются собственные унипотентные стволовые клетки – региональные стволовые клетки (РСК). Данные клетки узко специализированные, так как из них образуются только определенные типы клеток. К данным клеткам относят все тканеспецифичные стволовые клетки, а также клетки костного мозга. Тканеспецифичные стволовые клетки находятся в разнообразных видах тканей, данные клетки отвечают за обновление их клеточной популяции, активирующихся при повреждении. Стволовые клетки располагаются если не во всех, то в большинстве органов и тканей взрослого организма: в костном, головном и спинном мозге, крови, эпителии кожи и пищеварительного тракта, пульпе зубов, роговице и сетчатке глаза, эндотелии сосудов, скелетных мышцах, поджелудочной железе, печени и других системах органов.

Стволовые клетки взрослого организма обладают двумя качественными особенностями. Во-первых, стволовые клетки на протяжении всей жизни постоянно воспроизводят себе подобные клетки. Данная способность к пролиферации обеспечивает, постоянное самообновление и само-поддержание клеток. Во-вторых, они генерируют зрелые клетки с характерными морфологическими и функциональными свойствами. Основная роль стволовых клеток во взрослом живом организме складывается в поддержании и восстановлении тех тканей, в которых они располагаются.

Клетки взрослых организмов могут быть сгруппированы в три общие категории в отношении клеточной пролиферации.

1. Лабильные клетки: у них хорошо выражена пролиферация клеток, в следствии чего они способны быстро регенерировать и восстанавливать свою функцию. К данной группе клеток относят эпителиальную ткань, кровь, эпидермис и слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта.

2. Стабильные ткани: имеют умеренный механизм пролиферации, их способность к размножению и регенерации во многом ограничена. Клетки пролиферируют только в случае серьезного повреждения различных органов и тканей. К данным тканям относят поджелудочную и слюнные железы, печень, поперечнополосатую мускулатуру и др.

3. Статические клетки: к ним относят нервные клетки и кардиомиоциты. Данные клетки обходятся без пролиферации и не имеют способности к размножению и восстановлению [Мезен, 2014].

Неспециализированные стволовые клетки, дающие начало в специализированные клетки, проходят процесс, называющийся дифференциацией. Путь дифференцировки клетки проходит в несколько этапов, чтобы стать более специализированными на каждом этапе. Этот процесс дифференциации контролируется как внутренними, так и внешними факторами. Внутренние сигналы поступают из собственного гена клетки, а внешние сигналы, предоставляемые другими клетками, и их физический контакт с соседними клетками и некоторыми молекулами, которые представляют ниши стволовых клеток [Knoblich, 2008]. Эти сложные взаимодействия сигналов в процессе дифференцировки заставляют клетки приобретать врожденные изменения в их составе ДНК, переключая ответы вновь приобретенного фенотипа. Такой механизм называется механизмом эпигенетического изменения. Он ограничивает экспрессию ДНК в клетке, что может быть передано через деление клеток потомства. Структурные белки «ниши», включающие компоненты ЕСМ-цитоскелета, помогают в неравном разделении клеточных детерминантов [Broadus, 1997]. Ряд транскрипционных факторов, которые составляют нишу стволовых клеток, контролируют судьбу дочерних клеток, полученных при делении стволовых клеток.

Во время дифференцировки пролиферативный потенциал стволовых клеток теряется, поскольку приобретаются специализированные дифференцированные признаки. Для объяснения потенциала дифференцировки стволовых клеток предложены две основные модели: иерархическая модель

[Koeffler, 1981] и модель континуума [Chomarat, 2003]. Согласно иерархической модели, стволовые клетки генерируют дифференцированные клетки посредством однонаправленной серии переходов клеток предшественниц, происходящих из стволовых клеток через клетки-предшественники.

Самая примитивная стволовая клетка обладает высоким пролиферативным потенциалом, но имеет меньшую способность дифференцироваться, тогда как клетки-предшественники мало или вообще не обладают потенциалом распространения, но легко дифференцируются. С каждым шагом при переходе стволовых клеток в клетку-предшественницу пролиферативный потенциал уменьшается, а способность дифференцироваться увеличивается. В этой модели стволовые клетки находятся в состоянии покоя и остаются в фазе G0 клеточного цикла до тех пор, пока они не войдут в фазу G1 как произвольно, так и под воздействием окружающей среды, таких как факторы роста, действие цитокинов, молекулы адгезии или контакт «клетка-клетка», обеспечиваемые нитью стволовых клеток. После стимуляции пролиферации стволовые клетки могут либо прогрессировать через стадии предшественника, либо вернуться в спокойное состояние до появления нового раздражителя.

Однако клетки-предшественники и предшественники, которые когда-то были сформированы, не могут перейти в состояние стволовых клеток [Koeffler, 1981]. В модели континуума стволовые клетки непрерывно и обратимо изменяют свое состояние и фенотип стволовых клеток так же могут переходить из одного состояния в другое (рис. 1). Они также могут вернуться назад к оригинальному фенотипу, который называется де-дифференциацией. Предполагается, что это изменение состояния вызвано ремоделированием хроматина, связанным с изменениями клеточного цикла, которое последовательно изменяет поверхностный фенотип стволовых клеток, таким образом определяя способ реагирования стволовых клеток на экологические раздражители. Молчащие стволовые клетки могут стимулироваться, чтобы войти в фазу G1, а затем пройти через путь дифференцировки или вернуться в состояние покоя [Chomarat, 2003].

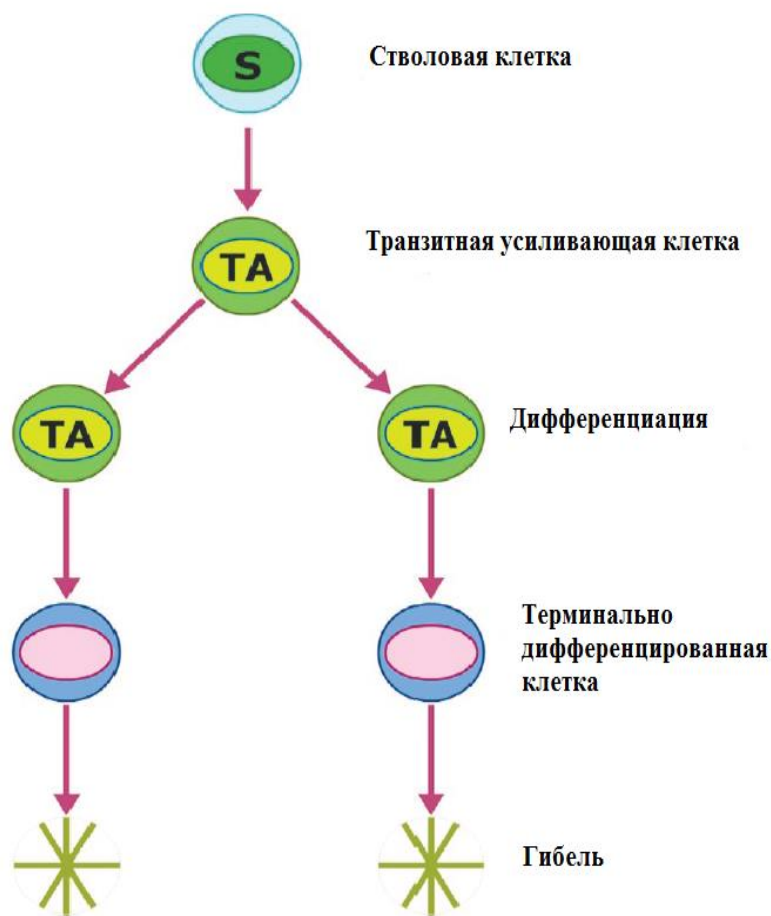


Рис. 1. Иерархическая модель деления стволовых клеток

Стволовые клетки могут разделяться асимметрично, чтобы поддерживать их число, в то же время, создавая транзитные усиливающие клетки (ТА). Они сокращаются с течением времени. Эти ТА-клетки окончательно дифференцируются (ТД) и запрограммированы на то, чтобы умереть в специфическом для ткани промежутке времени.

Интересно, что клетки, которые перешли на стадии предшественников, все же могут вернуться к состоянию стволовых клеток, тем самым открывая возможность для одной стволовой клетки генерировать клетки разных линий в зависимости от микрoэкологических стимулов (рис. 2).



Рис. 2. Непрерывное и обратимое изменение состояния стволовой клетки

Стволовые клетки непрерывно и обратимо изменяют свое состояние и фенотип в обратной корреляции между стволовыми клетками и клетками-предшественниками. Во время приживания стволовые клетки уменьшаются, а предшественники увеличиваются [Baglio, Pegtel, 2012].

Стволовые клетки могут быть индуцированы для дифференциации после удаления из фибробластов эмбриона мыши (MEF) и введения с помощью биоактивных сигналов. Это делается либо непосредственно, либо путем образования эмбрионидных тел (EBs). EBs – это небольшие скопления колоний стволовых клеток, выращенных в суспензии, которые образуют трехмерные (3D) сфероидные тела, представляющие модель дифференцирования с самым широким спектром типов клеток, которые могут быть достигнуты в условиях в пробирке. Дифференцирующиеся клетки в рамках EBs предполагают межклеточные взаимодействия и паракринные эффекты из трех зародышевых листков, в развивающейся 3D среде, которая имитирует временные и

пространственные процессы, происходящие в развивающемся эмбрионе. Несмотря на то, что дифференциация возможна, большинство систем дифференциации полагаются на формирование EB. После того как клетки начинают дифференцироваться, различные биоактивные манипуляции могут быть применены для контроля и управления процессом дифференциации (рис. 3).

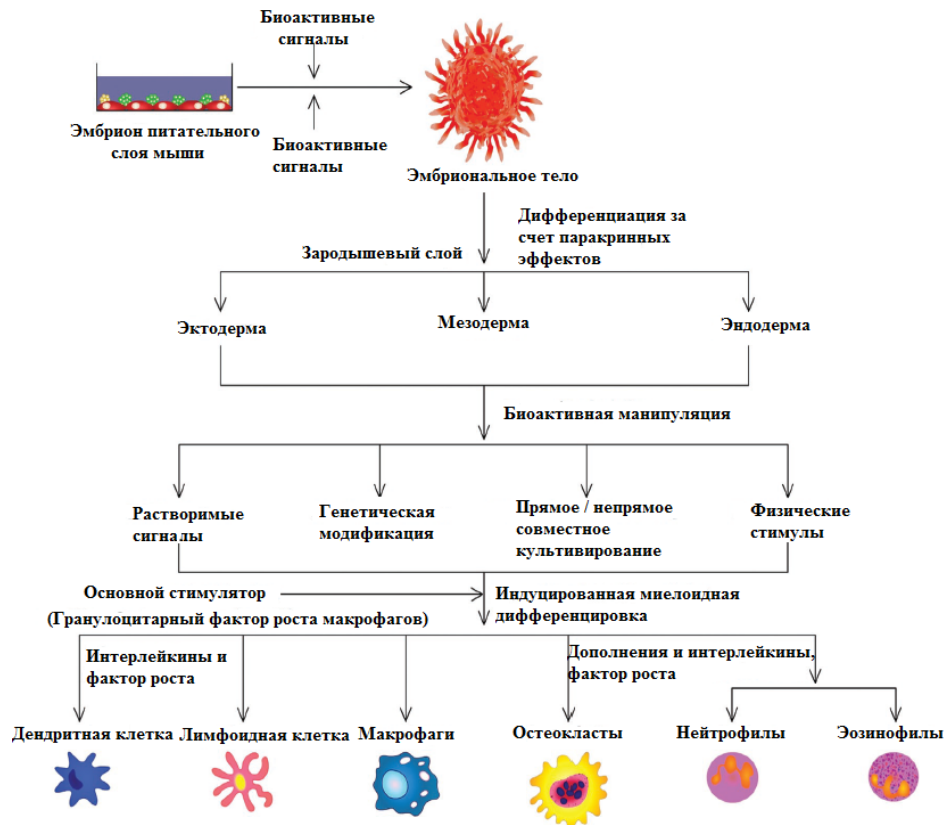


Рис. 3. Принципиальная схема протокола индуцированного дифференцирования, используемого для генерации миелоидных клеток из ESC и PSC

В целом, они включают:

- растворимые сигналы, такие как факторы роста, гормоны и кондиционированные клетки;
- генетические модификации, такие как избыточная экспрессия факторов транскрипции, которые, как известно, выводят стволовые клетки в нужный тип клеток;

- прямое или косвенное совместное культивирование с другими развивающимися или зрелыми популяциями соматических клеток;
- физические раздражители, такие как механические силы, температура и оксигенация. Независимо от того, разрешено ли дифференцирование происходить спонтанно или направленным образом, результирующая популяция клеток в большинстве известных протоколов по-прежнему гетерогенна.

1.2. Влияние подстилающей поверхности на стволовые клетки

Механизмы взаимодействия клеток с поверхностью. Большинство клеток в организме (за основным исключением клеток крови) поддерживаются внеклеточным матриксом. Клетки в костной ткани, которые образуют кость, остеобласты и клетки, которые разрушают кости, остеокласты, как прилипают, так и растут на внеклеточном матриксе, который состоит из белков (90 % коллагена и 10 % других белков) и протеогликанов, заполненных минералами фосфата кальция. *In vitro* эти клетки могут выживать только в том случае, если они могут прирастать к поверхности, и, таким образом, только если будет достигнут механизм адгезии, клетки могут продолжать расти и дифференцироваться. Первые взаимодействия между клеткой и поверхностью, как *in vitro*, так и *in vivo*, будут определять качество межфазного взаимодействия клетки с имплантатом и ткани с имплантатом. После всего лишь нескольких секунд контакта между поверхностью и жидкостью (культуральная среда *in vitro* или интерстициальные жидкости или кровь *in vivo*) поверхность покрывается водой и белками [Gieni, Hendzel, 2008]. Таким образом, остальные клетки будут ощущать поверхностные особенности внеклеточного матрикса через этот поглощенный слой. Клетки сначала придерживаются физико-химических взаимодействий, таких как ионные силы и силы Ван-дер-Ваальса, а затем через различные биомолекулы, как адсорбированные на поверхности, так и те, которые участвуют в реакции клеток на окружающую среду. Ключевыми молекулами в этом процессе являются поверхностные ре-

цепторы клеток, называемые интегринами, которые являются трансмембранными молекулами, которые в естественных условиях выступают как посредники при взаимодействии с молекулами внеклеточного матрикса. Интегрины представляют собой гетеродимеры, которые состоят из одной альфа- и одной бета-субъединицы, которые могут быть объединены с образованием рецепторов, специфичных для аминокислотных последовательностей, таких как аргинин-глицин-аспарагиновая кислота (RGD), присутствующий во многих белках внеклеточного матрикса. Эти рецепторы интегрин действуют как интерфейс между внутриклеточным и внеклеточным компартментами. На внеклеточной стороне они взаимодействуют с внеклеточным матриксом, на внутриклеточной стороне они взаимодействуют с молекулами цитоскелета и с сигнальными молекулами на сайтах адгезии, называемыми фокальными спайками (рис. 4).

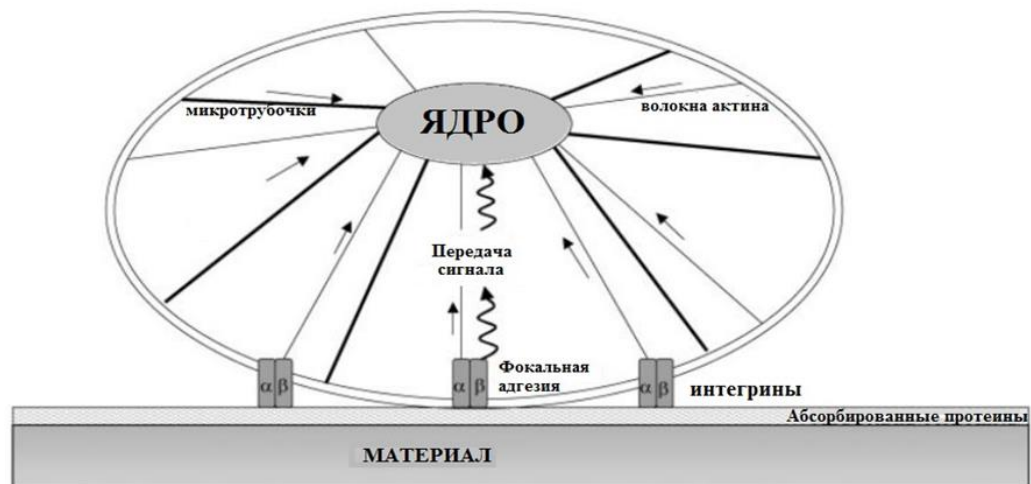


Рис. 4. Принципиальная схема белков, участвующих в адгезии эукариотических клеток на материалах (подстилающих поверхностях)

Интегрины представляют собой трансмембранные белки, которые образуют с другими внутриклеточными белками фокальную адгезию. На этих фокальных спайках располагаются актиновые волокна (тонкие линии), кото-

рые физически соединяются с клеточной мембраной и ядерной мембраной, такими как микротрубочки (жирные линии). Передача сигнала от клеточной мембраны к ядру может проходить через прямой путь механотрансдукции (прямые стрелки) или косвенно с помощью биохимической трансдукции сигнала (скрученные стрелки).

Таким образом, они могут передавать сигнал от внеклеточного матрикса к ядру через путь трансдукции биохимического сигнала. Эта сигнальная трансдукция приводит к накоплению и фосфорилированию нескольких белков, таких как FAK, Src, Rho GTPases, ERK, JNKetc [Siebers, 2005]. Альтернативно, сигнал может передаваться механически, так как существует физическая связь между сайтами очаговой адгезии и ядерной мембраной, созданной цитоскелетом. Когда рецепторы интегрина взаимодействуют с внеклеточным матриксом-адсорбируются биомолекулами, они группируются с образованием координационных спаек. В этот момент цитоскелет реорганизуется, чтобы обеспечить распространение клеток на субстрате. Цитоскелет состоит из трех различных молекул: актиновых волокон, тубулиновых микротрубочек и виментина, десмина или кератиновых микрофиламентов [Wang, 2009]. В очаговых спайках эти молекулы цитоскелета взаимодействуют с сигнальными молекулами, такими как талин, паксиллин, винкулин, тензин и протеинкиназы [Curtis, 2006].

Фокальные спайки представляют собой закрытые соединения, в которых расстояние между поверхностью подложки и клеточной мембраной составляет от 10 до 15 нм. Некоторые авторы называют их фокальными комплексами, когда они короче 1 мкм, фокальные спайки, когда расстояние между поверхностью подложки и клеточной мембраной составляет от 1 до 5 мкм, и супермарочные спайки, когда они более 5 мкм [Biggis, 2008]. В этих системах существует кинетическая активность в том, что возникающие близкие контакты превращаются в фокальные контакты, прежде чем они становятся фокальными (очаговыми) спайками [Cukierman, 2002]. Переход между этими разными фазами зависит от силы. Кроме того, в тканях или внутри трехмер-

ной конфигурации внеклеточного матрикса также были описаны фибриллярные спайки [Wozniak, 2004].

Другая группа существенных белков, которые вовлечены в способность клеток прилипать, распространяться, делиться и мигрировать, являются миозины. Они представляют собой моторные белки на основе актина, которые транслоцируют вдоль актиновых волокон и позволяют их сокращение.

После адгезии и распределения клеток на поверхности, стабильность их формы обеспечивается благодаря предварительному напряжению, которое поддерживается миозиновыми двигателями, передаваемыми актиновыми волокнами по всему телу клетки и уравновешенными микротрубочками [Baker, 1998]. При необходимости клетки могут мигрировать, чтобы найти более подходящее место для их дальнейшего развития [Ingber, 2006]. Кроме того, если точка на субстрате, на которой они культивируются, имеет анизотропную топографию, такую как канавки, клетки мигрируют и ориентируются в зависимости от оси канавки. Это явление называется «контактным управлением» и наблюдалось только *in vitro* [Treat, 2008].

Филоподии клетки, являются инструментом для изучения окружения вокруг неё. Филоподии исследуют область, окружающую выступы клеток перед продвижением в эту область. Было также показано, что, когда выступы клеток простираются перпендикулярно к оси канавки, они втягиваются быстрее, чем те, которые параллельны оси канавки. Таким образом, по-видимому, основным механизмом выравнивания клеток на канавках является не филоподиальное восприятие, а скорее втягивающая стадия клеточного выпячивания, связанная с качеством фокальных спаек [Anselme, 2011]. Все эти биохимические и механические взаимодействия позволяют передавать сигнал в ядро, которое либо индуцирует клеточную гибель через апоптоз, если адгезия невозможна, а рост клеток и их дифференцировку, если клеточная адгезия и распространение клеток могут быть достигнуты (рис. 5).

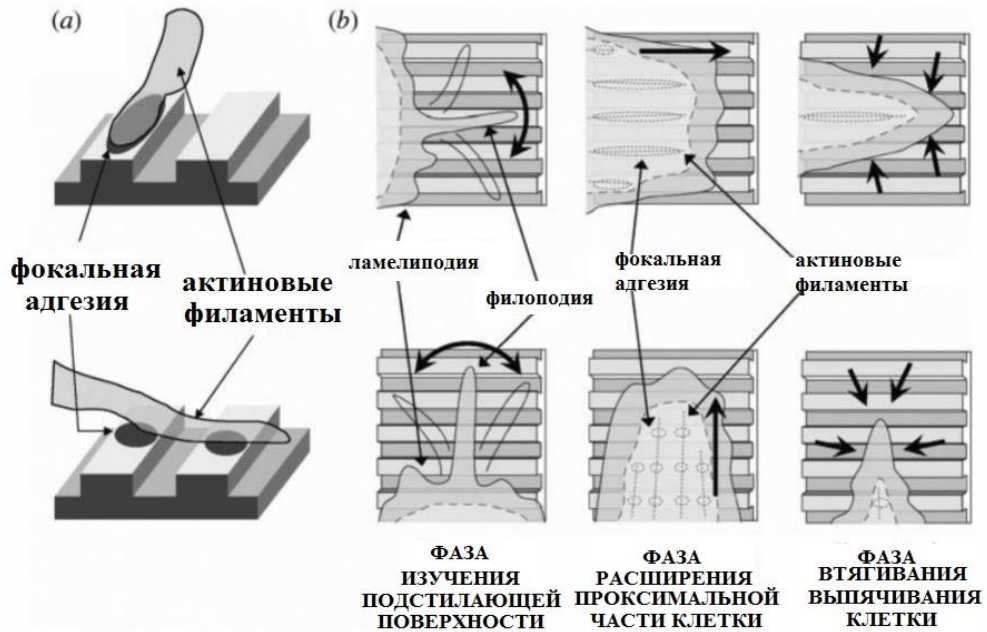


Рис. 5. Модель выравнивания клеток на рельефной подложке
 (а) образование широких фокальных спаек (б) изотропные движения
 филоподий клетки

После адгезии и миграции клетки делятся и размножаются по всей поверхности. Кроме того, они дифференцируются, что означает, что клетки синтезируют молекулы, и обычно синтезируют их в первоначальный тип ткани. Остеобласты синтезируют коллаген и другие белки, характерные для костной ткани. Они способны индуцировать собственную минерализацию *in vitro*, в определенных условиях культуральной среды и производить минерализованную костную ткань.

Как правило, исследование взаимодействий с клеточной поверхностью, как правило, сосредоточены на начальной фазе сцепления клеток и мало внимания уделяется клеточной поверхности после момента взаимодействия. В настоящее время авторы утверждают, что необходимо также учитывать влияние поверхностной топографии и химии на сложные взаимодействия между клеткой и внеклеточным матриксом. Разработаны различные методы количественной оценки адгезионной прочности клеточной поверхности. Ко-

гда внеклеточный матрикс не задействован, для отсоединения популяций клеток используются аспирация, центрифугирование и методы потока жидкости [Fujita, 2009].

Для отделения изолированных клеток использовались методы микроманипуляции на основе использования микропипеток, микрокантилеверов, оптических или магнитных пинцетов. Взаимодействие клеток с поверхностью также можно оценить с помощью метода ферментативной отслойки [Meurer, 2005]. Во-первых, количественная оценка адгезии остеобластов человека происходит через 24 часа и называется она кратковременной адгезией. В конце этой первой фазы все клетки распределяются по поверхности и их цитоскелет хорошо организован. Однако в этот момент они не имеют выраженных молекул интегрина $\beta 1$ и $\alpha 3$, ни синтезированных матричных белков. Кроме того, также может быть количественно определена долгосрочная адгезия, которая представляет собой прочность взаимодействия клеточного материала, образованного в течение 3 недель культивирования с участием белков внеклеточного матрикса, синтезированных самими клетками и контактами клеток друг с другом [Anselme, 2006]. Показано, что эта долгосрочная адгезия лучше коррелирует с рельефом, особенно с параметрами гибридной шероховатости, которая количественно определяет её организацию, тогда как на кратковременную адгезию больше влияет поверхностная химия [Anselme, 2000].

Другим важным моментом, который следует учитывать при изучении взаимодействий на поверхности клетки, является фенотип клеток, который связан с их первоначальным типом ткани. Клеточные линии, полученные из нормальной здоровой ткани, называются первичными клеточными линиями. Более того, они не могут быть культивированы в течение более чем нескольких недель и только для ограниченного количества пассажей (переход из одного культурального флакона в новый) [Anselme, 2006].

Другие клеточные линии, называемые постоянными, производятся путем иммортализации первичных клеточных линий или получены из опухолей

кости. Основными преимуществами этих постоянных клеточных линий являются их высокая способность к пролиферации и способность культивировать их в течение долгого времени. Однако их фенотип может несколько отличаться от исходного или нормального фенотипа. Часто наблюдалось, что фенотип клетки оказывает сильное влияние на клеточный ответ при взаимодействии с поверхностью материала. Например, очевидно, что механизм сцепления клеток крови отличается от клеток, происходящих из соединительных тканей, таких как фибробласты, кератиноциты или сосудистые клетки, поскольку внеклеточная среда в их тканях происхождения очень отличается. Первичные и постоянные клеточные линии также очень различны в плане их адгезии [Dalby, 2007].

Опухолевые клетки, как правило, теряют часть своей способности прикрепляться к внутриклеточному матриксу по мере увеличения числа пролифераций. Было показано, что как опухолевые клетки, так и иммортализованные клетки имеют более диффузный цитоскелет и эти клетки более деформируемы, чем нормальные клетки [Ben-Ze'ev, 1985]. Современные авторы недавно получили важные результаты с использованием двух клеточных линий, полученных из остеосаркомы, которые часто используются для анализа влияния рельефа поверхности на костные клетки: SaOs-2 и MG63 [Davidson, 2009]. Те клетки, которые культивировали на субстратах с поли-L-молочной кислотой (PLLA), демонстрировали ранее незарегистрированную обширную деформацию их ядра. Эта деформация не наблюдалась с использованием костного мозга человеческих мезенхимальных стволовых клеток (hMSCs). Форма ядра отражала форму микростолбов; как будто клетки выталкивали свои ядра между столбами. Удивительно, пока эта деформация должна повредить будущим росту и дифференцировке, две линии клеток остеосаркомы продемонстрировали способность к пролиферации и дифференцировке, сравнимую с той, которую они показывают на плоских субстратах PLLA [Davidson, 2010]. Эти результаты были воспроизведены с использованием иммортализованных клеточных линий, происходящих из кости и

других тканей, тем самым демонстрируя, что ответ как раковых, так и иммортализованных клеточных линий на рельеф может быть ненормальным [Reddy et al., 2008]. Примечательно, что эта деформация не обусловлена каким-либо внешним давлением и напоминает тип деформации, с которой может столкнуться раковая клетка, когда она подвергается метастатической миграции. Механические свойства раковых клеток могут быть связаны с их метастатическим потенциалом; клетки, которые с большей вероятностью образуют опухоли *in vivo*, более деформируемы. Кроме того, это изменение формы ядра является неожиданным, учитывая, что для ядра требуется определенное строение для правильного функционирования [Guck et al., 2005].

Действительно, было обнаружено, что локализация генов, близких к ядерной пластинке, индуцирует выключение генов, о которых идет речь. Деформация ядра увеличивает отношение поверхности к объему, и, следовательно, доля выключенных генов должна увеличиваться. Таким образом, было бы интересно продолжить изучение этих деформированных клеток, чтобы проверить, могут ли они выступать в качестве суррогатной системы для биологического поведения злокачественных клеток во время их метастатического распространения. Из этого раздела ясно, что нераковые и неиммортализованные клеточные линии должны быть предпочтительными для использования при изучении взаимодействия клеток с поверхностью и, в частности, для исследования влияния рельефа на костные клетки [Sexton et al., 2007].

Что касается механизмов реакции клеток на рельеф поверхности, то было предложено, что клетки реагируют на наличие разрывов на поверхности подложки или субстрата. Разрывы определены как структуры с радиусом кривизны меньше средней длины псевдоподий или дистанционной части чувствительных элементов, контролирующих движения клеток [Curtis, Wilkinson, 1997].

Таким образом, реакция на разрывы включает очаговые спайки актомиозина и цитоскелета и связана с механизмами механической чувствительности клеток. Когда клетка или псевдоподия встречает вогнутую или выпуклую

структуру, клеточные рецепторы и цитоскелет актомиозина подвергаются различной степени деформации или сжатия, и это вызывает организацию прикрепления и изменений в структурах цитоскелета. Dunn и Heath показали, что на фибробласты влияют выпуклые борозды в призматической подложке, если их угол больше 4° . В цитоскелетной системе пучка микрофиламентов клетки проявляли разрывы, которые совпадали с разрывами в субстрате. Показано также, что цитоскелет участвует во взаимодействии клеток с рифлеными поверхностями, демонстрируя тем самым чувствительность клеток к вогнутым поверхностям. Исследование показало, что реакция клеток на равноценные вогнутые и выпуклые структуры, выполненные в полиметилдисилоксане, различна. Клетки преимущественно прилипают и мигрируют по выпуклым структурам, а не к вогнутым структурам. Это окончательно подтверждает, что клетки способны идентифицировать и различать вогнутые и выпуклые поверхности. Другой предложенный механизм реакции клеток на топографию поверхности заключается в том, что штаммы, вводимые в цитоскелет, могут, в свою очередь, влиять на ионные каналы, как это наблюдается в распространении рецепторов в различных организмах [Ingber, 1997].

Реакция клеток на рельеф поверхности. Первые *in vitro* исследования реакций клеток на рельеф поверхности проводились на поверхностях, рельеф которых контролировался и измерялся в микронном масштабе. Когда цель состояла в том, чтобы сравнить поверхности с разной амплитудой шероховатости, очень часто авторы изменяли процесс без учета последствий такого изменения на морфологии поверхности или химии поверхности [Naji, Harmand, 1990].

Другой причиной недоразумений в этой области является практика определения поверхности по ее производственному процессу, а не ее точное определение по рельефным параметрам. Эта практика привела к ошибочным сопоставлениям поверхностей, поскольку известно, что процесс может индуцировать различные топографии, когда он применяется к различным материалам [Effect of..., 1995]. Действительно, в литературе крайне редко можно

правильно охарактеризовать рельеф поверхности: связывая амплитудные, частотные и гибридные параметры. В целом, амплитудные параметры (Ra, Rt, Rz) рассматриваются чаще, чем частотные и гибридные параметры. Следует отметить, что нынешние авторы вычисляют более 100 параметров шероховатости, а затем статистически сопоставляют эти параметры с биологическими параметрами, чтобы определить поверхностный параметр (параметры), на который реагируют клетки. С помощью этого подхода показано, что параметры, описывающие морфологию топографии и, в частности, степень ее организации, лучше коррелируют с адгезией первичных остеобластов человека [Nishimura, Kawai, 1998].

Сообщалось, что на потенциал пролиферации и дифференцировки клеток, полученных из MG-63-остеосаркомы, оказывает положительное влияние шероховатость поверхности, хотя уровень прикрепления при этом снижается. Эти выводы были независимо подтверждены в нескольких работах в литературе, однако есть работы, которые противоречат этим выводам. Это несоответствие подчеркивает влияние используемой клеточной модели и необходимость детальной характеристики неровностей подложек, которая должна быть выполнена для того, чтобы обеспечить достоверное сравнение результатов [Roughness..., 2002]. Рельеф субстратов обычно либо плохо определен, либо используется различные обработки поверхности (полировка, токарная обработка, струйная обработка, кислотное травление, плазменное напыление и т. д.) которые делают сравнения недействительными [MacDonald et al., 2004].

Предпринимались активные попытки выяснить механизмы, лежащие в основе реакции клеток MG-63 на рельеф. Было продемонстрировано, что клетки проявляют более дифференцированный фенотип на неровных поверхностях и что их реакция на системные факторы, такие как метаболит витамина D 1α , $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ или 17β -эстрадиол, также стимулируется шероховатостью [Anselme, Bigerelle, 2005]. Было показано, что в дополнение к тому, как клетки реагируют на экзогенные факторы, поверхностная неровность

также влияет на регуляторные факторы, синтезированные клетками, такими как простагландины (PGE1, PGE2), трансформирующий фактор роста $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) и остеопротегерин. Было показано, что этот эффект может быть опосредован белком протеинкиназой A и фосфолипазой A2 [Titanium..., 1998]. Эти эффекты были воспроизведены с использованием костных клеточных линий, полученных от мышей и крыс, которые имеют более дифференцированное состояние при созревании, чем клетки MG-63. Чувствительность к шероховатости, по-видимому, выше для незрелых клеток по сравнению с более зрелыми [Maturation..., 2000].

Было продемонстрировано, что интегрины $\alpha 5\beta 1$ и $\alpha 2\beta 1$ участвуют в реакции клеток MG-63 на титановые подложки с различными уровнями шероховатости поверхности. В частности, было отмечено, что $\alpha 5\beta 1$ в основном влияет на пролиферацию клеток, тогда как для дифференцировки клеток MG-63 требуется сигнализация $\alpha 2\beta 1$ [Integrin $\alpha 5$..., 2007]. Тем не менее, противоречивые результаты, не показывающие экспрессии субъединиц интегрин $\alpha 5$, $\alpha 3$ и $\alpha 6$ на пескоструйных субстратах титана и субъединицах $\alpha 5$ интегрин на полированных субстратах, но с субъединицами интегрин $\alpha 2$, $\alpha 4$, αv , $\beta 1$ и $\beta 3$, экспрессируемые на обоих субстратах, были опубликованы в литературе. Первичные остеобласты человека экспрессируют интегрины $\alpha 3\beta 1$, но не интегрины $\alpha 2\beta 1$, независимо от шероховатости титановых субстратов. Однако экспрессия субъединиц интегрин $\beta 1$ и $\beta 3$ первичными остеобластами человека и остеобластными клетками MG-63 наблюдалась в фибриллярных спайках, визуализированных с помощью иммунофлюоресценции на гладких структурированных титановых поверхностях, но не на более грубых поверхностях [Integrin $\beta 1$..., 2006]. Методом проточного цитометрического анализа установлено незначительное увеличение экспрессии интегринов $\beta 1$ и $\beta 3$ на клетках, отделенных от грубых поверхностей, по сравнению с гладкими. Эти наблюдения иллюстрируют сложность сравнения результатов, полученных различными экспериментальными методами или с использованием различных клеточных линий [Integrin $\alpha 2\beta$..., 2008]. Роль интегринов в реак-

ции остеобластов на костные материалы была всесторонне рассмотрена в дополнение к субстратам, обработанным классическими методами, используемыми для подготовки поверхности костного имплантата, были проведены некоторые эксперименты на рифленых субстратах с целью анализа влияния шероховатости на анизотропные рифленые поверхности, такие как винты или зубные имплантаты [Sinha, Tuan, 1996].

Наблюдалась систематическая ориентация клеток в направлении бороздок и выяснялось, что ориентация клеток не зависит от химической природы субстрата, хотя на морфологию клеток влияют как рельеф, так и химия. При сравнении изотропных рельефных поверхностей, полученных пескоструйным и кислотным травлением, с рифлеными поверхностями на последних поверхностях выделяли более высокую адгезию и пролиферацию остеобластных клеток. Было показано, что размер канавок также имеет решающее значение, и показано, что канавки размером около 10 мкм значительно повышают жизнеспособность и адгезию остеобластических клеток. Также, было показано, что наличие микрорельефа внутри канавок еще больше увеличивает ориентацию клеток [Anselme, Bigerelle, 2002].

Масштабный фактор. Очень важным параметром является шкала, используемая для вычисления параметра шероховатости относительно масштаба клетки. Поверхности, полученные электроэрозией, особенно благоприятны для долговременной адгезии остеобластических клеток человека.

Топография электропористых титановых поверхностей была проанализирована в двух разных масштабах: выше шкалы остеобластических клеток человека (>50 мкм) и ниже шкалы клеток (<50 мкм). Выше шкалы клеток, поверхности считались грубыми с «расплавленным» рельефом и гладкими краями, где, как и ниже шкалы клеток, эти поверхности были относительно гладкими и представляли плоскую область, позволяющую адгезию клеток в благоприятной среде, которая напоминает некий «бассейн» между рельефами. Таким образом, кажется, что шероховатые поверхности предпочтительны человеческими костными клетками; особенно когда они могут обеспечить

относительно плоские области в их собственном масштабе, которые помогают закреплению клеток. Чтобы контролировать химию поверхности, электропористые образцы были покрыты тонким (в нанометровом диапазоне) слоем золота. Предыдущие результаты были подтверждены демонстрацией того, что реакция клеток была исключительно эффектом, связанным с рельефом [Bigerelle, Anselme, 2002].

Интересным способом систематического изучения зависимости поверхностной химии от шероховатости поверхности является использование одного процесса для получения градиента шероховатости на одном образце. При использовании пескоструйной очистки с последующим химическим сглаживанием для создания поверхности на алюминиевом листе, значения R_a которого изменялись от 1 до 6 нм. Чтобы обеспечить постоянный химический состав поверхности, образцы снова реплицировали в эпоксидной смоле и покрывали титаном. Наблюдалось линейное увеличение пролиферации остеобластов, полученных от крыс, хотя фибробласты человеческих десен показали снижение пролиферации. Таким образом, оказывается, что для этого диапазона R_a и для той же организации поверхности реакция клетки линейно зависит от амплитуды шероховатости, но характер этого отклика также зависит от клетки. Опять же, это исследование иллюстрирует важность клеточного фенотипа [Systematic..., 2007]. Здесь фенотипы клеток влияли на клеточный ответ либо из-за их разного тканевого происхождения, либо из-за их разного размера и морфологии, поскольку остеобласты из костного мозга крысы меньше и имеют более кубическую морфологию, чем человеческие фибробласты [Fibroblast response..., 2004].

В последнее время, благодаря разработке методов нанопотоков, начинает изучаться влияние нанотопографии на клеточный ответ. Это особенно важно, так как реакция клеток на рельеф опосредуется белками, имеющими нанометровые масштабы. Используя нанофазы, полученные коллоидной литографией, Dalby изучал реакцию фибробластов на нано-колонны высотой 160 нм и диаметром 100 нм. Они продемонстрировали снижение адгезии кле-

ток и распространение на наноколоннах, характеризующихся меньшими, более слабыми очаговыми спайками и дезорганизацией цитоскелета. Andersson заметил, что на столбцах шириной 58, 91, 111 и 166 нм, с увеличением ширины столбцов, клетки больше простираются на поверхности. На поверхностях с нано-ямками диаметром 35, 75 и 120 нм фибробласты смогли определить рельеф вплоть до 35 нм с помощью своих филоподий [Influence of..., 2003].

На наноструктурированных полистирольных подложках с глубинами канавок от 5 до 350 нм и шириной от 20 до 1000 нм Loesberg пришел к выводу, что глубина является самым важным параметром, влияющим на выравнивание клеток, и что 35 нм является пороговым значением для фибробластов, поскольку ниже этого значения контактное руководство больше не проявляется. Этот размер может быть связан с оптимальным расстоянием для клеточной адгезии (58 нм), которое было определено в исследованиях на поверхностях, представляющих наночастицы, вместе с RGD-пептидами, участвующими в распознавании интегрина и разделенных контролируемым расстоянием [Dalby et al., 2004].

Одной из областей, представляющих значительный интерес, является определение порога размера для получения эффекта в клетках [Dalby, Pasqui, 2004]. Dalby продемонстрировал, что клетки способны реагировать на островки высотой 13 нм, и сообщал об увеличении количества филоподий и меньших фокальных контактах на островах длиной 10 нм по сравнению со значениями, полученными для плоских поверхностей [Dalby, Riehle, 2004]. Эти наблюдения были подтверждены Lim, который показал, что червоподобные структуры высотой 14 нм увеличивают прикрепление эмбриональных остеобластических клеток человека, их распространение, экспрессию субъединиц интегрина и синтез фокального адгезионного белка по сравнению с более высокими структурами (29, 45 нм) и плоскими поверхностями. В заключение, эти результаты показывают, что порог размера для обнаружения клеток может быть меньше 10 нм; однако контроль рельефа поверхности под этим порогом остается открытой проблемой [The regulation..., 2007].

В целом, материалы, используемые для имплантатов, имеют случайную нанотопографию, это означает, что поверхность не имеет какой-либо организации или направления. Процесс анодирования может быть использован для производства нанотрубок или наночастиц и было показано, что малые нанотрубки (диаметром 30 нм) способствуют адгезии остеобластов или hMSCs без заметного дифференцирования, тогда как более крупные нанотрубки (диаметром 70–100 нм) вызывают удлинение клеток, которое индуцирует цитоскелетный стресс и селективную дифференциацию [Swan, Porat, 2005]. Такой же процесс анодирования может быть использован для создания случайных наноразмерных узоров на оксидных слоях, таких как диоксид титана и оксид алюминия. Эксперимент выполнен на титановых подложках, микропаттернированных с использованием электрохимического микромашиного и дополнительно обработанных кислотным травлением и анодированием с целью изменения нанотопографии микроэлементов. Получены полусферические полости диаметром 10, 30 и 100 нм. После анодирования или кислотного травления полостей диаметром 30 нм было показано, что клетки MG-63 лучше прилипают и пролиферируют на обработанных полостях, чем на полированных, особенно после анодирования. Эти исследования подтверждают, что поверхности имплантатов должны контролироваться в любом масштабе, поскольку клетки способны идентифицировать и реагировать как на наноразмерные, так и на микроразмерные характеристики [Time-dependent..., 2004].

Предложено понятие о нанофазных материалах или наноматериалах для описания материалов со структурными единицами между 1–100 нм. В нескольких исследованиях сообщалось об улучшении адгезии остеобластов *in vitro* на поверхностях нанофазных материалов, созданных из широкого спектра материалов, включая керамику, металлы, полимеры и композиты. Показано, что этот эффект обусловлен улучшением адсорбционных характеристик белков, являющихся следствием их поверхностных энергетических свойств [Sato, Webster, 2004]. Однако до настоящего времени было проведено

лишь несколько исследований *in vivo* для проверки влияния нанофазных материалов на интеграцию в костную ткань. Наноструктурированные топографические особенности Al_2O_3 , применяемые к обработанным имплантам, способствовали большей экспрессии костно-специфических генов в тканях, прилегающих к имплантам, после имплантации в берцовые кости кролика и связанному с этим увеличению контакта кости с имплантатом и удалению крутящего момента [Nanostructured..., 2009]. Аналогично, большее количество новых костных образований наблюдалось при контакте с основанием на основе тантала, покрытым наногидроксиапатитом (нано-ГА), чем на основаниях, покрытых обычным гидроксиапатитом (ГА). Результаты, полученные на нано-га, были непоследовательными и, по-видимому, зависели от метода имплантации. Нано-ГА увеличивало образование костей, когда между костью и имплантатом не существовало разрыва, но не удалось улучшить формирование кости в модели заживления с наличием зазора [Liu, Webster, 2007].

Организация рельефа. Как обсуждалось ранее, когда клетки культивируют на анизотропной топографии, такой как канавка, клетки ориентируются вдоль оси канавки из-за явления контактного наведения. Кроме того, когда поверхность состоит из организованного массива столбов, клетки способны идентифицировать эту организацию и ориентироваться в ортогональном направлении. Обычно, трудно определить рельефную организацию для поверхностей имплантатов, подготовленных классическим процессом (плазменное напыление, пескоструйная обработка и другие), которые отображают довольно изотропную поверхность. Были предложены многочисленные подходы к решению проблемы определения степени организации на поверхности [An unscaled..., 2002].

По опыту современных авторов, наилучшими параметрами, описывающими организацию, являются те, которые коррелируют, например, с длительной адгезией на поверхности имплантата параметр порядка, описывающий с наибольшей актуальностью адгезию клеток остеобластов человека на электроэродированных поверхностях, представлен в работах и было показа-

но, что hMSCs лучше дифференцируются на поверхностях с незначительным нарушением нано-ямок диаметром 120 нм (со смещенной площадью размещения) по сравнению с гексагональным, квадратным или даже случайным размещением [The control of..., 2007]. Их дифференциация была сравнима с той, которая была получена с остеогенной средой, содержащей стимулирующие факторы, такие как дексаметазон и L-аскорбиновая кислота. Это подтверждает, что клетки чувствительны к поверхностной организации как на наномасштабных, так и микромасштабных, и что они предпочитают относительно неупорядоченные поверхности. Однако эти эксперименты проводились с клетками, полученными из кости, которые *in vivo* имеют относительно неорганизованную среду. Другие клетки, такие как кератоциты, фибробласты или эндотелиальные клетки, которые имеют довольно организованную среду в своей ткани происхождения, показывают другое поведение *in vitro*. Действительность результатов, полученных *in vitro*, должна быть подтверждена *in vivo*, поскольку ключевым фактором для использования исследований *in vitro* является улучшенная поверхность имплантата. *In vivo* было показано, что шероховатость имплантатов позволяет блокировать костную ткань за счет увеличения длины контакта кости с имплантатом, а также биомеханической интеграции с костью [Hamilton et al., 2007].

В систематическом обзоре литературы о влиянии шероховатости поверхности имплантата на костный ответ и фиксацию имплантата, Shalabi и др. пришли к выводу, что почти во всех работах сообщалось об усиленном контакте кости с имплантатом с увеличением шероховатости поверхности, а также о том, что была обнаружена значительная связь между силой выталкивания и шероховатостью поверхности [Cooper, 2000]. Единственной работой, посвященной сравнению рельефа поверхности, является статья Goransson и Wennerberg, в которой они рассматривали изотропные и анизотропные титановые имплантаты с одинаковыми уровнями шероховатости. В своем исследовании они не смогли продемонстрировать каких-либо различий при внед-

рении в кости двух имплантатов с разными поверхностями в течение первых 3 месяцев после имплантации [Implant surface..., 2006].

1.3. Роль химического состава подстилающей поверхности

Адаптация к химическому составу поверхности теперь возможна благодаря новым методам, таким как таких как самоорганизующиеся монослои (SAM), молекулярная трансплантация, полимерные «щетki», градиенты полимера и др. Однако, эти методы были разработаны на стеклянных или кремниевых субстратах и не легко переносятся на поверхности костного имплантата. Используя эти методы, было показано, что адгезия клеток *in vitro* предпочтительна от невысоких до высокогидрофильных субстратов. В частности, с помощью SAMs показано, что дифференцировка остеобластов выше на гидрофильных субстратах (ОН-и NH₂-ограниченных SAMs), чем на гидрофобных субстратах (COOH-и CH₃-ограниченных SAMs) [Keselowsky et al., 2005]. Это также было подтверждено *in vivo* с более толстыми фиброзными капсулами, образованными вокруг имплантатов, покрытых CH₃-ограниченными SAMs по сравнению с COOH-и ОН-ограниченными SAMs [Barbosa, Madureira, 2006]. Подготовлены и использованы градиенты полимеров с переменной поверхностной энергией для демонстрации влияния поверхностной энергии на адгезию, распространение и пролиферацию остеобластов плода человека и подтверждения того, что эти клетки предпочитают умеренные гидрофильные позиции в градиенте [Lim et al., 2004].

Подготовлены и использованы градиенты полимеров с переменной поверхностной энергией для демонстрации влияния поверхностной энергии на адгезию, распространение и пролиферацию остеобластов плода человека и подтверждения того, что эти клетки предпочитают умеренные гидрофильные положения в градиенте. Недавно были разработаны химические градиенты с использованием плазменных полимеров. Получен смешанный градиент от гидрофобной полимерной плазмы (гексан) к гидрофильному плазменному

полимеру (аллиламин), который используется для подтверждения того, что адгезия и пролиферация фибробластов выше на гидрофильной части градиента. В новаторских работах на немодельных поверхностях Schakenraad и др. продемонстрировали на 13 различных полимерах и стеклянных подложках, что распространение фибробластов человека достигло максимума на промежуточной поверхностной энергии [Zelzer et al., 2008].

Установлено, что при использовании полимерно-кальцийфосфатного композита дзета-потенциал влияет на дифференцировку остеобластных клеток, однако прямой связи между прикреплением и пролиферацией остеобластов на биоматериалах и с поверхностной энергией субстратов не обнаружено. *In vitro* были проведены исследования, которые сравнивали адгезию и пролиферацию остеобластных клеток на различных биоматериалах с почти одинаковой обработкой поверхности. Они показали лучшие результаты на более гидрофильных материалах, которые показали более высокую адсорбцию белка. Впоследствии было показано, что человеческие остеобласты способны идентифицировать и реагировать на небольшие изменения в химии поверхности [Schakenraad, Busscher, 1986]. Примечательно, что было продемонстрировано, что внутриклеточная сигнализация остеобластов человека была модифицирована на титане, имплантированном ионами Mg или Zn. Hallab совместно с другими соавторами, сравнил различные материалы с контролируемой поверхностной энергией и шероховатостью поверхности и сообщил, что существует примерно параболическая зависимость между фракционной полярностью (полярной составляющей, деленной на общую поверхностную энергию) и прочностью клеточной адгезии существовала грубая параболическая зависимость. Более высокая адгезионная прочность была снова получена для промежуточной фракционной полярности. Используя различные биоматериалы, Liu пришел к выводу, что адгезия hFOB1.19 остеобластов человека была задержана и ослаблена на гидрофобных поверхностях.

Из этих исследований можно сделать вывод, что в целом клетки остеобластов лучше прилипают и размножаются на умеренных или высокогидрофильных субстратах, что, вероятно, объясняет наблюдаемую более высокую адсорбцию белков, таких как фибронектин [Liu, Lim, 2007].

Новаторская работа *in vivo* показала, что имплантирование CoCrMo для создания различных состояний поверхностной энергии приводило к более тесной адгезии тканей при имплантах с высокой поверхностной энергией, тогда как между тканями и имплантатами с низкой поверхностной энергией существовало разделение. Большинство исследований *in vivo* и влияния химического состава имплантатов были выполнены с использованием имплантатов на основе титана [Zreiqat et al., 2005]. Для модификации химического состава поверхности титана могут быть использованы многочисленные методы обработки, включая кислотное травление, электрохимическое окисление, УФ-обработку и плазменную иммерсию/ионную имплантацию. Методы электрохимического окисления широко используются для изменения химического состава поверхности путем добавления ионов, таких как кальций, сера, фосфор или магний на нативный слой оксида титана, покрывающий имплантат. Такой подход приводит к «двусторонним» имплантатам с одной половиной стороны которого, эта поверхность покрыта оксидом, а другая имеет тестовую поверхность [The roles of..., 2009].

После имплантации в кортикальную большеберцовую кость кроликов изучали остеоинтеграцию имплантатов с помощью гистоморфометрии. Установлено, что остеоинтеграция модифицированной поверхности титана систематически выше, чем неизменная поверхность. Электрохимическая обработка, используемая для модификации химического состава поверхности, также изменяла рельеф поверхности, в некоторых работах было указано, что авторы считают, что их результаты были более вероятными в результате влияния изменений на химический состав поверхности и что произошло биохимическое связывание, которое способствовало быстрой и сильной инте-

грации имплантатов, характерных для ранних периодов заживления [Ultraviolet..., 2009].

Интересные результаты были получены в клинической стоматологической практике с использованием титановых имплантатов, обработанных пескоструйной обработкой крупными гранулами 0,25–0,50 мм с последующим кислотным травлением с помощью HCl-H₂SO₄ (поверхности SLA). Даже если остеоинтеграция этих имплантатов была хорошей, в нескольких исследованиях была рассмотрена модификация поверхностей SLA для достижения более быстрого и тесного связывания кости с имплантатом. Обработка поверхностей SLA с помощью ионной имплантации CO₂ или H₂O₂/HCl улучшила их остеоинтеграцию. Очень интересная модификация поверхности SLA для повышения поверхностной свободной энергии и гидрофильности имплантатов SLA была предложена Rupp. Эти модифицированные SLA-имплантаты (мод. SLA) получают так же, как и имплантаты SLA, но после процедуры кислотного травления их промывают в NaCl и хранят в изотоническом растворе NaCl под защитной атмосферой N₂, чтобы сохранить химически активную стадию до установки имплантата. Результаты *in vitro*, полученные с использованием мод. SLA, показывают, что остеобласты, выращенные на модифицированных поверхностях, демонстрируют более дифференцированный фенотип, а результаты *in vivo* подтверждают более высокую остеоинтеграцию и уменьшение времени заживления в клинических применениях [Enhancing..., 2006].

Эффективность имплантатов мод. SLA была объяснена с точки зрения однородного смачивания всей поверхности без образования воздушно-водного взаимодействия, тем самым облегчая взаимодействие поверхности имплантата с органическими молекулами, такими как белки, адсорбированные из крови. Обработанные ультрафиолетовым излучением и кислотным травлением поверхности титана показали, что УФ-обработка благоприятствует остеоинтеграции имплантата. Aita объяснил это наблюдение с точки зрения устранения кислородсодержащих углеводов с поверхности, что

привело к более высокой адсорбции белков из жидкостей организма [Zhao, Raines, 2007].

Роль адсорбированных или привитых белков в реакции клеток на материал подстилающей поверхности. Как обсуждалось ранее, поверхности, с которыми взаимодействуют клетки, почти всегда покрыты белками, поглощенными из биологических жидкостей. Способ, которым эти биомолекулы адсорбируются, и конформация, которую они принимают, будут "обуславливать", как клетки, распознающие их с помощью своих интегринов. Как обсуждалось ранее, изменения поверхностного рельефа или химического состава влияют на поверхностную энергию, которая, в свою очередь, изменяет способ адсорбции белков. Белки на поверхности различаются по качеству, количеству и конформации, все сигналы, которые клетки способны расшифровать с помощью своих интегринов [Wilson et al., 2005].

Поверхностный химический состав и поверхностная энергия влияют на адсорбцию белка, и они модифицируются адсорбированными белками. Показано, что поверхностная энергия 13 различных полимерных субстратов не оказывает влияния на адгезию фибробластов человека после адсорбции сывороточных белков на поверхности. SAMs удобные инструменты для изучения этого явления. Поверхностные заряды и, в частности, отрицательные заряды также являются важным фактором адсорбции и представления белка для интегринов. Обычно считается, что гидрофильные субстраты поглощают более низкие уровни белков и вызывают меньшую модификацию в их конформациях. Таким образом, белки сохраняют более активную конформацию на гидрофильных субстратах, чем на гидрофобных [Lee, Ducheyne, 2006]. Однако адсорбция альбумина больше и быстрее на гидрофобных субстратах. Эффект Вромана позволяет заменять быстро адсорбированный белок с низким сродством к поверхности, такой как альбумин, белком с более высоким сродством, таким как фибронектин. Когда альбумин и фибронектин смешиваются, альбумин адсорбируется на гидрофобных поверхностях, тогда как фибронектин адсорбируется на гидрофильных поверхностях. Сотрудниче-

ство также может существовать между различными белками [Baujard-Lamotte, Noinville, 2008].

Известно, что присутствие альбумина предотвращает конформационные изменения в адгезивных белках, таких как фибронектин, и позволяет им взаимодействовать с интегринами по их сайтам RGD. Известно, что ГА и в более общем случае фосфат кальция поглощают большое количество фибронектина и витронектина из сыворотки крови и что белки адсорбируются в конформации, способствующей связыванию hMSCs. Это один из случаев, происходящих на стыке между биоактивной керамикой и окружающей биологической средой [Ducheune, Qiu, 1999].

Для биоактивных материалов, таких как фосфатно-кальциевая керамика, биоактивное стекло и стеклокерамика, могут происходить следующие процессы:

- растворение от керамики;
- осаждение раствора на керамику;
- ионный обмен и структурная перегруппировка на границе керамики и ткани;
- диффузия от поверхностного пограничного слоя с керамикой;
- опосредованное действие на клеточную активность;
- осаждение либо минеральной фазы или органической фазы без интеграции в керамику;
- осаждение с интеграцией в керамику;
- хемотаксис на керамической поверхности;
- прикрепление и пролиферация клетки;
- клеточная дифференцировка;
- образование внеклеточного матрикса.

Эта последовательность событий считается движущей силой высокой остеointеграционной способности биоактивных материалов, так как первые четыре процесса создают устойчивую и высоко топографически сложную

поверхность в субмикронном масштабе, с которой может происходить соединение костей [Davies, 2007].

В дополнение к этой субмикронной поверхности микропористость в керамике также может существенно влиять на функцию клеток. Микропористый (поры с диаметром, <10 нм) ГА, бета-трикальцийфосфат (β tcp) и двухфазный фосфат керамики (BCP) могут в определенных условиях обладать остеоиндукционной способностью при имплантации отдельно (без hMSCs) в гетеротопических сайтах, т.е. в экстра-костных сайтах. Существует оптимальная удельная площадь поверхности и минимальный порог в микропористости, ниже которых кость не будет индуцироваться. Кроме того, способность распад керамики также является важным фактором в поведении остеоиндукционного материала, поскольку остеиндукция выше с BCPs, чем с ГА и значительно задерживается в биоматериалах, которые изначально не содержат фосфат кальция, а именно оксид алюминия и титан [Yuan et al., 1998].

Механизмы для этой остеоиндукционной емкости не выяснены, но предполагается, что осаждение апатита, которое происходит в биологически активных материалах могут сопровождаться, соосаждением факторов роста, таких как костных морфогенетических белков, полученных из жидкости организма, которые в свою очередь могут индуцировать клетки дифференцироваться в остеогенной линии. Однако важно отметить, что эта остеиндукция является временным явлением, которое исчезает во времени и не наблюдается последовательно для всех типов животных [Pegueroles et al., 2010].

Помимо адсорбции белков из биологических жидкостей, клетки сами синтезируют на субстрате свой собственный внеклеточный матрикс. Несколько работ в литературе подчеркивают, что организация внеклеточного матрикса отражает организацию клеточного слоя. Кроме того, недавно с помощью конфокальной микроскопии было показано, что предварительная адсорбция фибронектина на грубых титановых подложках приводит к неправильной структуре клеток с большим количеством белка на пиках, чем в желобках. Это объясняется физико-химической неоднородностью рельефных

поверхностей. Фибронектинные фибриллы, синтезированные клетками MG-63, накладывались поверх этого предварительно адсорбированного слоя фибронектина и не проникали в рельеф более чем на половину максимального расстояния от пика до желобка [Morra et al., 2003].

Функциональная подстилающая поверхность с покрывающими ее белками или пептидами. Модификация рельефа поверхности или химического состава поверхности титановых имплантатов индуцирует повышенную адсорбцию белка из биологических жидкостей и увеличение адгезии клеток на их поверхности. Другим подходом к улучшению адгезии клеток на имплантатах является иммобилизация белков или пептидов на их поверхности. Показано, что коллаген I типа значительно увеличивает рост кости и контакт кости с имплантатом после ковалентной трансплантации на гладких и грубых чистых титановых подложках. Покрытие титановой поверхности с помощью коллаген-миметического пептида GFOGER значительно улучшало реинтеграцию и остеоинтеграцию костной имплантации по сравнению с поверхностью, модифицированной коллагеном типа I. Аналогичным образом, трансплантация $\alpha 5\beta 1$ -интегрин-специфического фрагмента FNIII7-10 на титановый имплантат значительно увеличивала остеоинтеграцию по сравнению с RGD-функционализированной и не модифицированной поверхностью титана [Biomolecular..., 2007].

Эффект покрытия титановых имплантатов пептидами RGD широко изучен, и, как сообщается, улучшается остеоинтеграция имплантатов с покрытием RGD по сравнению с непокрытой поверхностью титана. Однако по сравнению с титановыми поверхностями, покрытыми либо коллагеном, либо коллаген-хондроитинсульфатом, титан с RGD-покрытием, по-видимому, менее эффективен для остеоинтеграции.

Исследована возможность ускорения остеоинтеграции покрытий ГА или спеченных дисков ГА с использованием покрытия RGD. Покрытие RGD, по-видимому, либо неэффективно, либо, по-видимому, ингибирует остеоинтеграцию имплантатов. Эти результаты были интерпретированы как обу-

словленные RGD-пептидами, предпочтительно связывающимися с интегринами, которые, таким образом, больше не доступны для связывания с адгезионными белками, адсорбированными на ГА, из биологических жидкостей. Поскольку комплексы интегрин-RGD имеют более низкую эффективность для выживаемости клеток, чем комплексы белков с интегрином-адгезией, остеоинтеграция имплантатов ГА с покрытием RGD, ниже, чем у непокрытого ГА. Таким образом, оказывается, что для материалов с высоким адсорбционным потенциалом для адгезионных белков из биологических жидкостей покрытие или трансплантация RGD-пептидов нецелесообразно [Rammelt, 2006].

Относительное влияние на клетки шероховатости и химического состава поверхности. Очень трудно выделить относительные влияния рельефа поверхности и химического состава поверхности на клетки. В новаторском исследовании Britland, были исследованы поверхности моделей, представляющие одновременные параллельные и ортогональные топографические (микрорытмы) и адгезивные ориентиры (аминосилановые дорожки), и сообщалось, что адгезивный ответ последовательно доминировал в реакции топографии. Nebe сравнил влияние шероховатости и поверхностной энергии полимерных и металлических поверхностей на адгезию фибробластов и пришел к выводу, что поверхностная энергия более важна, чем шероховатость поверхности при определении адгезии и пролиферации клеток [Britland et al., 1996].

Была обнаружена корреляция между адгезией клеток и свободной от поверхности энергией, а также шероховатостью поверхности. Однако последняя корреляция наблюдалась только тогда, когда субстраты были разделены на два класса материалов с высокой или низкой поверхностной энергией. Этот вывод позволяет предположить, что влияние рельефа на прочность сцепления клеток может быть вторичным по отношению к поверхностной энергии для материалов с высокой поверхностной энергией (металлы) [Nebe et al., 2007].

На никель-титановых сплавах наблюдали, что свободная энергия поверхности является доминирующим фактором клеточной адгезии и активности щелочной фосфатазы, тогда как клеточная пролиферация модулируется шероховатостью (этот эффект увеличивается во время клеточной культуры) и химией (этот эффект остается стабильным с течением времени) вместе.

Отмечали, что полное содержание белка и морфология клеток не зависят от обоих этих параметров. Также были проведены систематические корреляционные исследования, которые продемонстрировали, что несколько клеточных параметров, описывающих адгезию, распространение, экспрессию интегрина, пролиферацию и дифференцировку, количественно коррелируют с параметрами материала, описывающими шероховатость поверхности или электрохимические характеристики поверхности. Амплитуда рельефа поверхности (R_a) коррелирует с клеточной адгезией, $\beta 1$ интегрина фокального контакта, клеточным распространением и пролиферацией клеток, но не с дифференциацией клеток (экспрессия гена сиалопротеина кости). Кроме того, коррозионная стойкость (R_{corr}) отрицательно коррелировала с адгезией и сиалопротеином кости, то есть когда R_{corr} увеличивался в два раза параметры клеточной массы уменьшались [Anselme, Vigerelle, 2006].

Корреляция параметров поверхности клетки и материала также была использована для определения основных параметров, влияющих на реакцию клеток.

Проведено сравнение уровней кратковременной и долговременной адгезии остеобластов человека на металлических подложках с различными рельефами до и после нанесения тонкого (несколько нанометров) золото-палладиевого слоя с целью компапирования подложек с одинаковым химическим составом поверхности. Кратковременная адгезия в основном зависела от химического состава поверхности (по наличию покрытия), тогда как на долгосрочную адгезию влияла амплитуда шероховатости и морфология поверхности. Логично, что на распространение влияют оба фактора, поскольку оно связано как с краткосрочной, так и с долгосрочной адгезией. Эти иссле-

дования металлических материалов были также воспроизведены на керамических материалах. У ГА основным фактором был рельеф поверхности, который увеличивал клеточную дифференциацию, но уменьшал пролиферацию [Bigerelle, Anselme, 2005]. В этом случае чувствительность клеток к рельефу и химическому составу зависит от конкретного материала.

Исследование выполнялось с использованием стромальных стволовых клеток (ССК) крысы (линии Вистар) 3 пассажа выделенных из красного костного мозга, которые хранились в банке клеток ОПУ «Клеточные и вспомогательные репродуктивные технологии» технопарка «Высокие технологии БелГУ» НИУ «БелГУ» (рис. 6).



Рис. 6. Нанесение суспензии ССК на дно лунки пластикового 6 луночного планшета (фирмы SPL Lifesciences, Корея) и на покровные стекла размером 24×24мм (фирмы Menzel Glasser, Германия) помещенные на дно лунки пластикового 6 луночного планшета

Суспензию ССК размораживали в термостате при температуре 37 °С в течении 30 минут. Затем суспензию ССК в количестве 1 мл переливали в пробирки объемом 15 мл и приливали питательной среды DMEM/F12 (фирмы ПанЭко, РФ). Далее проводили центрифугирование в течение 5 мин. при

1000 об./мин. После центрифугирования полностью сливали питательную среду и приливали 5 мл свежей питательной среды DMEM/F12 (фирмы ПанЭко, РФ) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), ресуспендировали. Полученную суспензию выливали во флакон 25 см² (фирмы SPL Lifesciences, Корея) и приливали 15 мл питательной среды DMEM/F12 с 10% ЭТС (см. рис. 7). Флакон с ССК помещали в CO₂-инкубатор, клетки культивировали в течении 7 дней при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ и 100% влажности. После получения 80% конфлюэнта ССК снимали при помощи смеси трипсина (0,25%) и ЭДТА (0,02%).



Рис. 7. Питательные среды DMEM/F12 (фирмы ПанЭко, РФ); DMEM/F12 с 10% ЭТС и 10мМ β-глицерофосфата натрия (фирмы ПанЭко, РФ)

Полученную суспензию отмывали от трипсина и наносили на дно лунки пластикового 6 луночного планшета (фирмы SPL Lifesciences, Корея) и на покровные стекла размером 24×24 мм (фирмы Menzel Glasser, Германия) по-

мещенные на дно лунки второго пластикового 6 луночного планшета с плотностью 1×10^4 клеток/см².

ССК культивировали в течение 6 дней, при помощи инвертированного флуоресцентного микроскопа (Eclipse Ti- U, фирмы Nikon, Япония) оценивали динамику пролиферации клеток с использованием программного обеспечения EZ-C1 3.90 FreeViewer (фирмы Nikon, Япония) в 10 полях зрения. Затем в питательную среду добавляли β -глицерофосфат натрия (10 мМ) (фирмы ПанЭко, Россия) и продолжали культивирование клеток в течение 6 дней. После истечения данного времени культивирования к клеткам добавляли флуоресцентный краситель Calcium Green TM-1 AM (5 мМ) (Molecular Probes, США), в соответствии с инструкцией производителя.

Внутриклеточный краситель Calcium Green-1 AM окрашивает живые клетки, накапливающие в цитоплазме ионы кальция. Данный краситель свободно проникает через плазмалемму клетки и после разрушения клеточными эстеразами, ферментами, катализирующими гидролитическое расщепление сложных эфиров на спирты и кислоты при участии молекул воды, связывается с ионами кальция и флуоресцирует в зеленой области спектра (рис. 8).

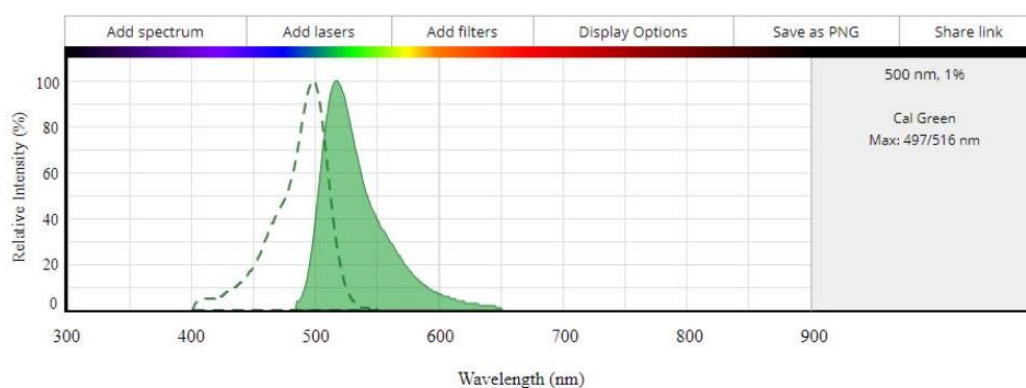


Рис. 8. Спектр флуоресценции красителя Calcium Green-1 AM

ССК культивировали в течение 40 минут в присутствии 5% CO₂ при температуре 37 °С. Затем клетки отмывали раствором Хенкса (фирмы

ПанЭко, Россия) и наблюдали флуоресценцию кальция при помощи инвертированного флуоресцентного микроскопа Eclipse Ti- U, фирмы Nikon (рис. 9).



Рис. 9. Флуоресцентный микроскоп (Eclipse Ti- U, фирмы Nikon, Япония)

Инвертированный микроскоп Eclipse Ti- U Nikon позволяет реализовать большую часть самых современных методов микроскопии. Уникальный модуль «внешнего фазового контраста» позволяет получать фазово-контрастные изображения с использованием объективов с высокой числовой апертурой, не имеющих встроенного фазового кольца. В данной системе внешнее фазовое кольцо встроено в корпус микроскопа и выведено из светового пути формирования эпифлуоресцентного сигнала, что позволяет получать с помощью одних и тех же объективов как высококачественные флуоресцентные, так и фазово-контрастные изображения с высоким разрешением.

Многофункциональное программное обеспечение NIS Elements, предназначенное для получения и обработки изображений, обеспечивает инте-

грацию микроскопа, камер, управляющих элементов и других периферийных устройств в единую систему. Двуслойная конфигурация обеспечивает точность экспериментов при сохранении высокой скорости захвата изображения [Инвертированный..., 2018].

Поверхности из пластика и стекла, на которые были высажены ССК предварительно были отсканированы при помощи атомно-силового микроскопа INTEGRA-AURA NT-MDT (рис. 10) используя контактный метод (кантилеверы серии CSG10).



Рис. 10. АСМ INTEGRA-AURA (NT-MDT, Россия)

Атомно-силовой микроскоп INTEGRA-AURA – это сканирующий зондовый микроскоп высокого разрешения. Принцип работы АСМ основан на регистрации силового взаимодействия между поверхностью исследуемого образца и зондом. Принцип работы атомно-силового микроскопа основан на регистрации силового взаимодействия между поверхностью исследуемого образца и зондом. В качестве зонда используется наноразмерное остриё, располагающееся на конце упругой консоли, называемой кантилевером. Сила, действующая на зонд со стороны поверхности, приводит к изгибу консоли.

Появление возвышенностей или впадин под остриём приводит к изменению силы, действующей на зонд, а значит, и изменению величины изгиба кантилевера (рис. 11). Таким образом, регистрируя величину изгиба, можно сделать вывод о рельефе поверхности.



Рис. 11. Принцип работы АСМ

Под силами, действующими между зондом и образцом, в первую очередь подразумевают дальнедействующие силы Ван-дер-Ваальса, которые сначала являются силами притяжения, а при дальнейшем сближении переходят в силы отталкивания.

В зависимости от характера действия силы между кантилевером и поверхностью образца выделяют три режима работы атомно-силового микроскопа: контактный, полуконтактный, бесконтактный.

В данной ВКР использовали контактный режим работы АСМ для изучения шероховатости подстилающей поверхности. При работе в контактном режиме атомно-силовой микроскоп является аналогом профилометра. Остриё кантилевера находится в непосредственном контакте между образцом и поверхностью. Сканирование осуществляется, как правило, в режиме постоянной силы, когда система обратной связи поддерживает постоянной величину изгиба кантилевера [Атомно-силовой..., 2018].

Сканировали 6 областей размером 20×20 мкм каждой подложки пластиковой (планшет фирмы SPL Lifesciences, Корея) и стеклянной (покровное стекло 24×24 мм фирмы Menzel Glasser, Германия).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы STATISTICA 6.0.

Глава 3. Полученные результаты и их обсуждение

В ходе сканирования поверхности при помощи СЗМ было установлено, что шероховатость дна лунки пластикового 6 луночного планшета составила $8,76 \pm 3,06$ нм, тогда как шероховатость поверхности покровного стекла была равна $34,16 \pm 7,51$ нм (рис. 12).

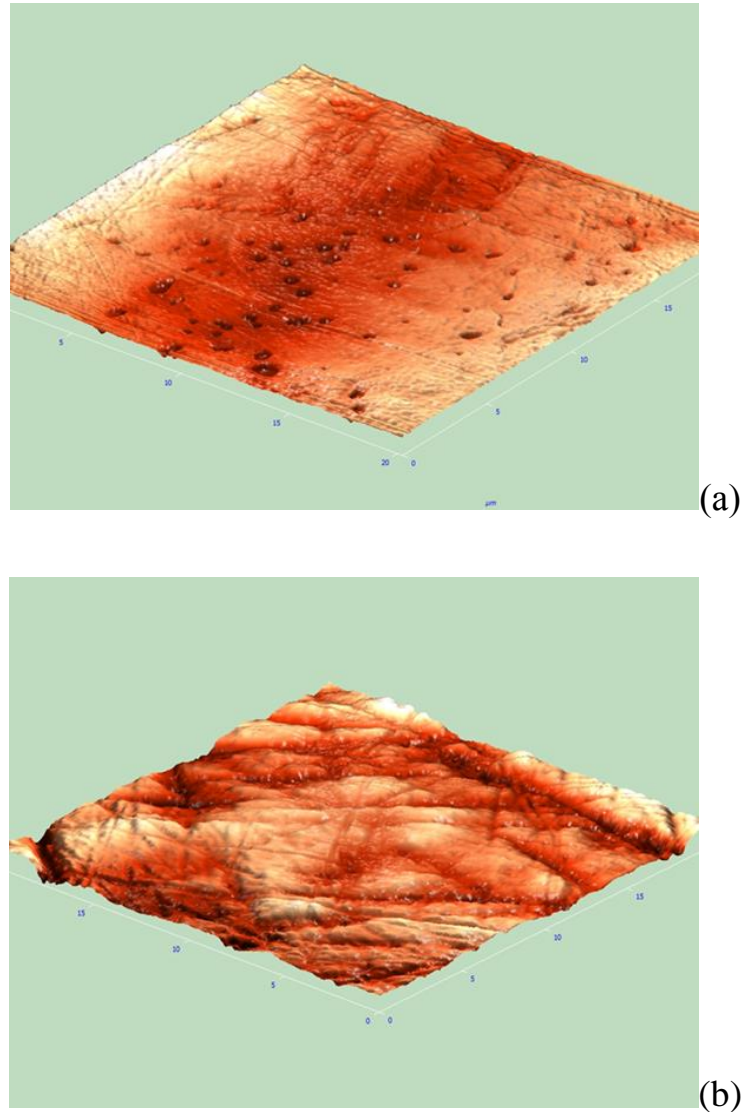


Рис. 12. Изображение пластиковой (а) и стеклянной (б) поверхностей

Исследование пролиферации на 6 день эксперимента показало, что размножение клеток делением идет более интенсивно на пластиковой поверхности по сравнению со стеклянной поверхностью покровного стекла (рис 13).

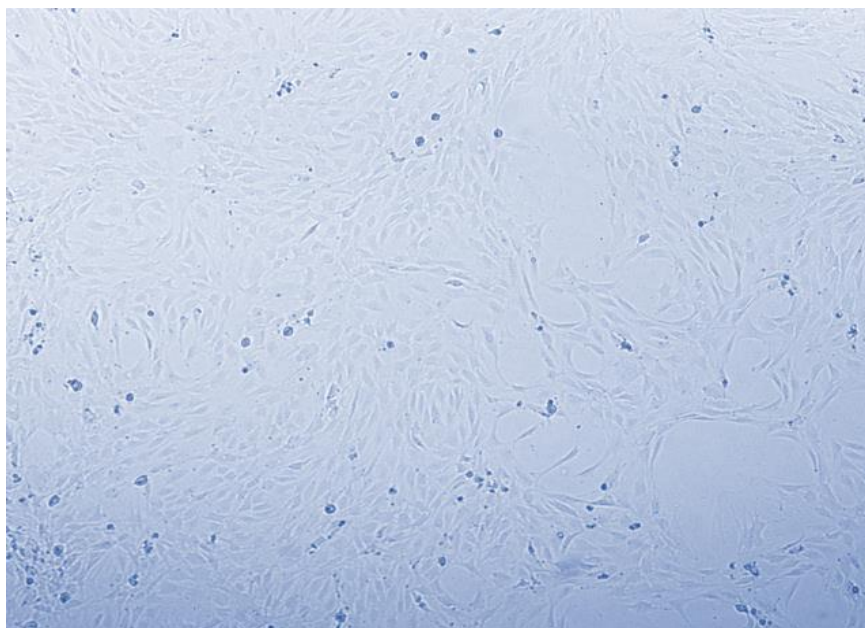


Рис. 13. Пролиферация ССК на пластиковой поверхности. Ув. $\times 40$
(микроскоп Eclipse Ti-U, фирмы Nikon, Япония)

Так, количество ССК на пластиковой поверхности составило 574 ± 80 штук в поле зрения, тогда как на стеклянной поверхности 464 ± 72 штук, при уровне значимости $p < 0,01$, что свидетельствует о достоверности данных (рис. 14).

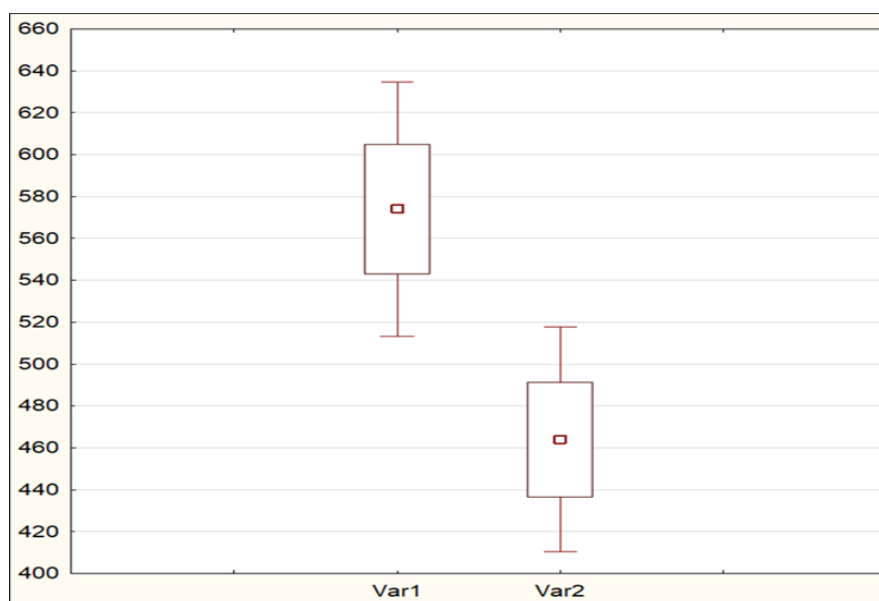


Рис. 14. Количество ССК на пластиковой поверхности – Var1, на стеклянной поверхности – Var2 (StatSoft STATISTICA 6.0)

В ходе анализа флуоресцентных изображений ССК окрашенных Calcium Green-1-AM интенсивность флуоресценции была больше у клеток, культивированных на предметных стеклах, чем на пластиковых поверхностях. Интенсивность флуоресценции ионов кальция в ССК на стеклянных подложках составила $868,25 \pm 117$ у.е., тогда как на пластиковых поверхностях она была равна $365,45 \pm 60,95$ у.е. при уровне значимости $p < 0,01$, что свидетельствует о достоверности данных (рис. 15).

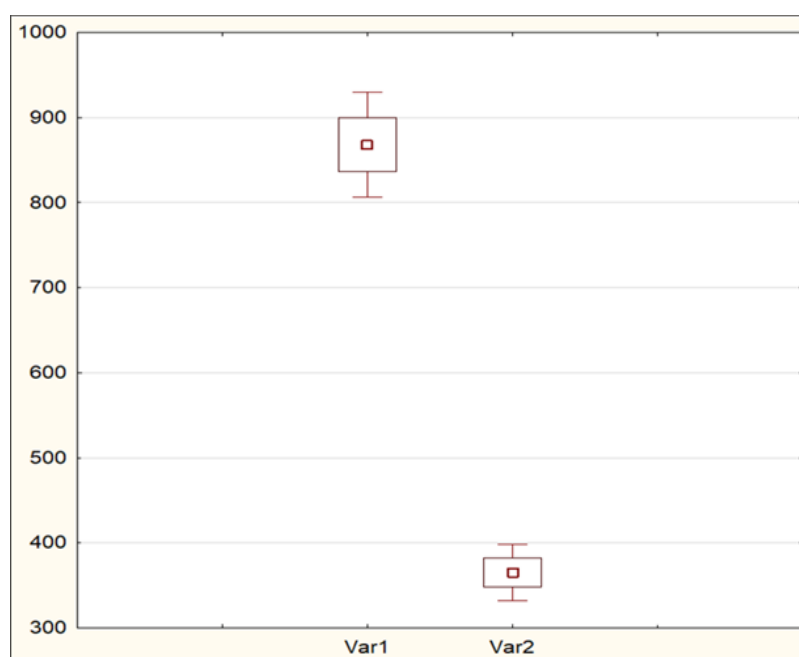


Рис. 15. Интенсивность флуоресценции ионов кальция на стеклянной поверхности – Var1, на пластиковой поверхности – Var2 (StatSoft STATISTICA 6.0)

У ССК, культивированных на стеклянных поверхностях в клетках, определяются отдельные кристаллы кальция (рис. 16).

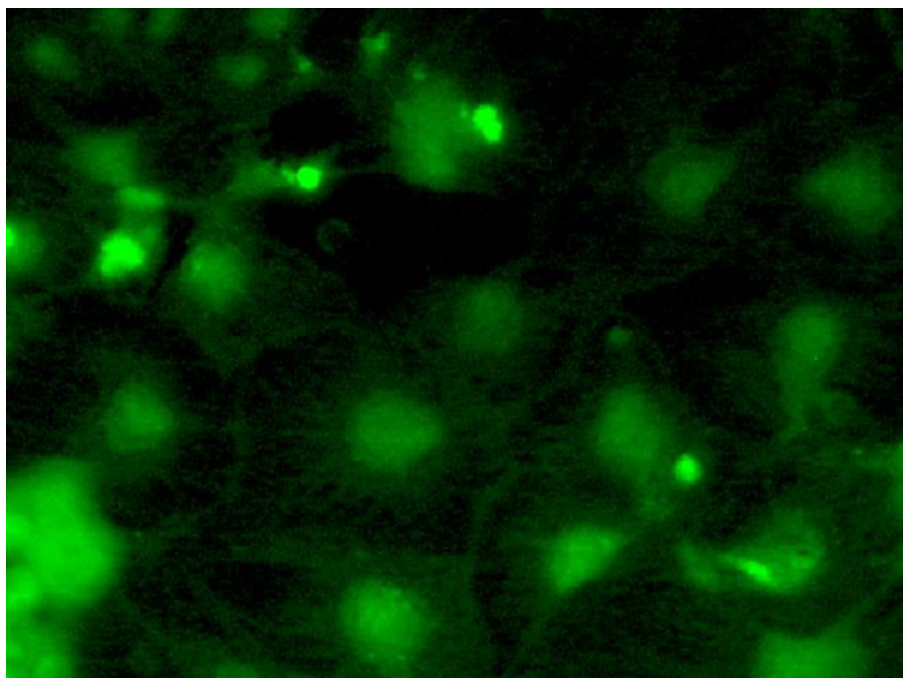


Рис. 16. Изображение МСК на стеклянной подложке. Ув. $\times 200$
(флуоресцентный микроскоп Eclipse Ti- U, фирмы Nikon, Япония)

Это свидетельствует о том, что дифференцировка стромальных стволовых клеток идет в остеогенном направлении.

Влияние рельефа (шероховатости) поверхности в нанометровом диапазоне является механическим стимулом для активации каскада биохимических реакций, запускающих комплекс кальций зависимых сигнальных путей в цитоплазме клеток – активаторов факторов транскрипции, участвующих в дифференцировке ССК. Таким образом, при работе с ССК необходимо учитывать нанорельеф подстилающей поверхности, очевидно, что менее шероховатая поверхность способствует сохранности мультипотентности ССК.

Выводы

1. Нанорельеф стеклянной поверхности имеет большую шероховатость по сравнению с пластиковой поверхностью.
2. Пролиферация ССК на пластиковой поверхности идет более интенсивно по сравнению со стеклянной поверхностью.
3. Более шероховатая поверхность способствует дифференцировке ССК в остеогенном направлении, тогда как менее шероховатая способствует сохранности мультипотентности ССК.

Список использованных источников

1. Атомно-силовой микроскоп (Сканирующий зондовый микроскоп) INTEGRA-AURA NT-MDT. URL: <https://www.ntmdtsi.ru/products/modular-afm/ntegra-ii> (дата обращения 25.05.2018).
2. Инвертированный флуоресцентный микроскоп Nikon Eclipse Ti-U. URL: https://www.nikoninstruments.com/ru_RU/Products/InvertedMicroscopes/Eclipse-Ti-U (дата обращения 25.05.2018).
3. Мезен Н. И., Квачева З. Б., Сычик Л. М. Стволовые клетки: учебно-методическое пособие. Минск: БГМУ, 2014. С. 4–35.
4. An unscaled parameter to measure the order of surfaces. A new surface elaboration to increase cells adhesion / M. Bigerelle, K. Anselme, E. Dufresne, et al. // *Biomol. Engng.* 2002. Vol. 19. Pp. 79–83.
5. Anselme K., Bigerelle M. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughness // *J. Biomed. Mater. Res.* 2000. Vol. 49. Pp. 155–166.
6. Anselme K., Bigerelle M. Effect of grooved titanium substratum on human osteoblastic cell growth // *J. Biomed. Mater. Res.* 2002. Vol. 60. Pp. 529–540.
7. Anselme K. Bigerelle M. Effect of a gold-palladium coating on the long-term adhesion of human osteoblasts on biocompatible metallic materials // *Surf. Coat. Technol.* 2006. Vol. 200. Pp. 6325–6330.
8. Anselme K., Bigerelle M. Modelling approach in cell/material interactions studies // *Biomaterials.* 2006. Vol. 27. Pp. 1187–1199.
9. Anselme K., Bigerelle M. Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion // *Acta. Biomater.* 2005. №1 Pp. 211–222.
10. Anselme K., Bigerelle M. Role of materials surface topography on mammalian cell response // *Int. Mater. Rev.* 2011. Vol. 56. Pp. 243–266.

11. Baglio S. R., Pegtel D. M. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy // *Frontiers in Physiology*. 2012. Vol. 3. P. 359.
12. Baker J. P., Titus M. A. Myosins matching functions with motors // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1998. Vol. 10. Pp. 80–86.
13. Barbosa J.N., Madureira P. The influence of functional groups of self-assembled monolayers on fibrous capsule formation and cell recruitment // *J. Biomed. Mater. Res.* 2006. Vol. 76. Pp. 737–743.
14. Baujard-Lamotte L., Noinville S. Kinetics of conformational changes of fibronectin adsorbed onto model surfaces // *Colloid. Surf. Biointerfaces*. 2008. Vol. 63. Pp. 129–137.
15. Ben-Ze'ev A. The cytoskeleton in cancer cells // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1985. Vol. 780. Pp. 197–212.
16. Bigerelle M., Anselme K. Improvement in the morphology of surfaces for cell adhesion a new process to double human osteoblast adhesion on Ti-based substrates // *Biomaterials*. 2002. Vol. 23. Pp. 1563–1577.
17. Bigerelle M. Anselme K. Statistical correlation between cell adhesion and proliferation on biocompatible materials // *J. Biomed. Mater. Res.* 2005. Vol. 72. Pp. 36–46.
18. Biggis M. J., Richards R.G., McFarlane S. K. Adhesion formation of primary human osteoblasts and the functional response of mesenchymal stem cells to 330 nm deep microgrooves // *J. R. Soc. Interface*. 2008. Vol.5. Pp. 1231–1242.
19. Biomolecular surface coating to enhance orthopaedic tissue healing and integration / C. Reyes, T. Petrie, K. Burns, et al. // *Biomaterials*. 2007. Vol. 28. Pp. 3228–3235.
20. Britland S., Morgan H., WojiakStodart B. Synergistic and hierarchical adhesive and topographic guidance of BHK cells // *Exp. Cell Res.* 1996. Vol. 228. Pp. 313–325.

21. Broadus J., Doe Q. Extrinsic cues, intrinsic cues and microfilaments regulate asymmetric protein localization in *Drosophila* neuroblasts // *Current Biology*. 1997. Vol. 7. Pp. 827–835.
22. Chomarat P., Pantin C., Bennet L. TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells // *J. Immunol.* 2003. Vol. 171. Pp. 2262–2269.
23. Cooper L. F. A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants // *J. Prosthet. Dent.* 2000. Vol. 84. Pp. 522–534.
24. Cukierman E., Pankov R., Yamada K. Cell interactions with three-dimensional matrices // *Curr. Opin. Biotech.* 2002. № 14. Pp. 633–639.
25. Curtis A. S., Wilkinson C. Topographical control of cells // *Biomaterials*. 1997. Vol. 18. Pp. 1573–1583.
26. Curtis A. S., Dalby M. J., Gadegaard N. Nanoprinting onto cells // *J. Res. Soc. Interface*. 2006. Vol. 3. Pp. 383–398.
27. Dalby M. J., Pasqui D. Cell response to nano-islands produced by polymer demixing a brief review // *IEE Proc. Nanobiotechnol.* 2004. Vol. 151. Pp. 53–61.
28. Dalby M. J., Riehle M. O., Johnstone H. Investigating the limits of filopodial sensing a brief report using SEM to image the interaction between 10 nm high nano-topography and fibroblast filopodia // *Cell Biol. Int.* 2004. Vol. 28. Pp. 229–236.
29. Dalby M. J., Gadegaard N., Riehle M.O. Investigating filopodia sensing using arrays of defined nano-pits down to 35 nm diameter in size // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004. Vol. 36. Pp. 2005–2015.
30. Dalby M. J., Gadegaard N., Curtis S. G. Nanotopographical control of human osteoprogenitor differentiation // *Curr. StemCell. Res. Ther.* 2007. Vol. 2. Pp. 129–138.

31. Davidson P., Ozcelik H., Hasirci V. Micro-structured surfaces cause severe but non-detrimental deformation of the cell nucleus // *Adv. Mater.* 2009. Vol. 21. Pp. 3586–3590.
32. Davidson P., Fromigue O., Anselme K. Topographically induced self-deformation of the nuclei of cells dependence on cell type and proposed mechanisms // *J. Mater. Sci. Med.* 2010. Vol. 31. Pp. 939–946.
33. Davies J. E. Bone bonding at natural and biomaterial surfaces // *Biomaterials.* 2007. Vol. 28. Pp. 5058–5067.
34. Ducheyne P., Qiu Q. Bioactive ceramics the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function // *Biomaterials.* 1999. Vol. 20. Pp. 2287–2303.
35. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis, of human osteoblasts like cells (MG-63) / J. Martin, Z. Schwartz, T. Hummert, et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* 1995. Vol. 29. Pp. 389–401.
36. Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces / F. Rupp, L. Scheideler, N. Olshanska, et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* 2006. Vol. 76. Pp. 323–334.
37. Fibroblast response to a controlled nanoenvironment produced by colloidal lithography / J. Dalby, M. Riehle, S. Sutherland, et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* 2004. Vol. 69. Pp. 314–322.
38. Fujita S., Ohshima M., Iwata H. Time-lapse observation of cell alignment on nanogrooved patterns // *J. R. Soc. Interface.* 2009. Vol. 6. Pp. 269–277.
39. Gieni R. S., Hendzel M. J. Mechanotransduction from the ECM to the genome: are the pieces now in place // *Cell Biochem.* 2008. Vol.104. Pp. 1964–987.
40. Guck J., Schinkinger S., Lincoln B. Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence // *Biophys. J.* 2005. Vol. 88. Pp. 3689–3698.

41. Hamilton D. W., Chehroudi B., Brunette D. M. Comparative response of epithelial cells and osteoblasts to microfabricated tapered pit topographies *in vitro* and *in vivo* // *Biomaterials*. 2007. Vol. 28. Pp. 2281–2293.
42. Implant surface roughness and bone healing: a systematic review / Shalabi M. M., Gortemaker A., Van't Hof M. A., et al. // *J. Dent. Res.* 2006. Vol. 85. Pp. 496–500.
43. Influence of systematically varied nanoscale topography on the morphology of epithelial cells / A. Andersson, J. Brink, U. Lidberg, et al. // *IEEE Trans. Nanobiosci.* 2003. Vol. 2. Pp. 49–57.
44. Ingber D. E. Tensegrity the architectural basis of cellular mechanotransduction // *Annu. Rev. Physiol.* 1997. Vol. 59. Pp. 575–599.
45. Ingber D. E. Cellular mechanotransduction putting all the pieces together again // *FASEBJ.* 2006. Vol. 20. Pp. 811–827.
46. Integrin $\alpha 2 \beta 1$ plays a critical role in osteoblast response to micron-scale surface structure and surface energy of titanium substrates / Olivares-Navarrete R., Raz P., Zhao G., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. Vol. 105. Pp. 767–772.
47. Integrin $\alpha 5$ controls osteoblastic proliferation and differentiation responses to titanium substrates presenting different roughness characteristics in a roughness independent manner / B. Keselowsky, L. Wang, Z. Schwartz, et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* 2007. Vol. 80. Pp. 700–710.
48. Integrin $\beta 1$ silencing in osteoblasts alters substrate-dependent responses to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ / L. Wang, G. Zhao, R. Olivares-Navarrete, et al. // *Biomaterials.* 2006. Vol. 27. Pp. 3716–3725.
49. Keselowsky B. G., Collard D. M., Garcia A. J. Integrin binding specificity regulates biomaterial surface chemistry effects on cell differentiation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. Vol. 102. Pp. 5953–5957.
50. Khobilich J. A. Mechanisms of asymmetric stem cell division // *J. of Stem Cell Research and Therapeutics.* 2008. Vol. 132. Pp. 583–597.

51. Koeffler H. P., Bar-Eli M., Territo M. C. Phorbol ester effect on differentiation of human leukemia cell lines blocked at different stages of maturation // *J. Cancer Res.* 1981. Vol.41. P. 919.
52. Lee M. H., Ducheyne P. Effect of biomaterial surface properties on fibronectin- $\alpha 5\beta 1$ integrin interaction and cellular attachment // *Biomaterials.* 2006. Vol. 27. Pp. 1907–1916.
53. Lim J. Y., Liu X., Vogler E. A. Systematic variation in osteoblast adhesion and phenotype with substratum surface characteristics // *J. Biomed. Mater. Res.* 2004. Vol. 68. Pp. 504–512.
54. Liu H., Webster T. J. Nanomedicine for implants a review of studies and necessary experimental tools // *Biomaterials.* 2007. Vol. 28. Pp. 354–369.
55. Liu X., Lim J. Y., Donahue H. J. Influence of substratum surface chemistry/energy and topography on the human fetal osteoblastic cell line hFOB1.19 phenotypic and genotypic responses observed *in vitro* // *Biomaterials.* 2007. Vol. 28. Pp. 4535–4550.
56. MacDonald W., Campbell P., Fisher J. Variation in surface texture measurements // *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 2004. Vol. 70. Pp. 262–269.
57. Maturation state determines the response of osteogenic cells to surface roughness and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ / C. Lohmann, L. Bonewald, A. Sisk, et al. // *J. Bone Miner. Res.* 2000. Vol. 15. Pp. 1169–1180.
58. Meyer U., Buchter A., Joss U. Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces // *Eur. Cells Mater.* 2005. № 9. Pp. 39–49.
59. Morra M., Cassinelli C., Cascardo G. Surface engineering of titanium by collagen immobilization. Surface characterization and *in vitro* and *in vivo* studies // *Biomaterials.* 2003. Vol. 24. Pp. 4639–4654.
60. Naji A., Harmand M. F. Study of the effect of the surface state on the cytocompatibility of a Co-Cr alloy using human osteoblasts and fibroblasts // *J. Biomed. Mater. Res.* 1990. Vol. 24. Pp. 864–871.

61. Nanostructured alumina-coated implant surface effect on osteoblast-related gene expression and bone-to-implant contact *in vivo* / G. Mendonca, D. Mendonca, L. Simoes, et al. // *Int. J. OralMaxillofac. Impl.* 2009. Vol. 24. Pp. 205–215.
62. Nebe J. G., Luethen F., Lange R. Interface interactions of osteoblasts with structured titanium and the correlation between physicochemical characteristics and cell biological parameters // *Macromol. Biosci.* 2007. Vol. 7. Pp. 567–578.
63. Nishimura N., Kawai T. Effect of microstructure of titanium surface on the behavior of osteogenic cell line MC3T3-E1 // *J. Mater. Sci. Med.* 1998. Vol. 9. Pp. 99–109.
64. Pegueroles M., Aparicio C., Bosio M. Spatial organization of osteoblast fibronectin matrix on titanium surfaces effects of roughness, chemical heterogeneity and surface energy // *ActaBiomater.* 2010. Vol. 6. Pp. 291–301.
65. Rammelt S., Illert T., Bierbaum, S. Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulfate // *Biomaterials.* 2006. Vol. 27. Pp. 5561–5571.
66. Reddy K. L., Zullo J. M., Bertolino E. Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina // *Nature.* 2008. Vol. 452. № 7184. Pp. 243–247.
67. Roughness parameters / E. Gadelmawia, M. Koura, I. Elewa, et al. // *J. Mater. Process. Technol.* 2002. Vol. 123. Pp. 133–145.
68. Sato M., Webster T. J. Nanobiotechnology implications for the future of nanotechnology in orthopedic applications // *Expert Rev. Med. Dev.* 2004. Vol. 1. Pp. 105–114.
69. Schakenraad J. M., Busscher H. J. The influence of substratum surface free energy on growth and spreading of human fibroblasts in the presence and absence of serum proteins // *J. Biomed. Mater. Res.* 1986. Vol. 20. Pp. 773–784.
70. Sexton T., Schober H., Fraser P. Gene regulation through nuclear organization // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007. Vol. 14. Pp. 1049–1055.

71. Siebers M. C., ter Brugge P. J. Integrins as linker proteins Between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review // *Biomaterials*. 2005. Vol. 26. Pp. 137–146.
72. Sinha R. K., Tuan R. S. Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials // *Bone*. 1996. Vol. 18. Pp. 451–457.
73. Swan E. E. L., Popat K. C., Grimes C. A. Fabrication and evaluation of nanoporous alumina membranes for osteoblast culture // *J. Biomed. Engng.* 2005. Vol. 72. Pp. 288–295.
74. Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients / T. Kunzler, T. Drobek, M. Schuler, et al. // *Biomaterials*. 2007. Vol. 28. Pp. 2175–2182.
75. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder / J. Dalby, N. Gadegaard, S. Tare, et al. // *Nat. Mater.* 2007. Vol. 6. Pp. 997–1003.
76. The regulation of integrin-mediated osteoblast focal adhesion and focal adhesion kinase expression by nanoscale topography / J. Lim, D. Dreiss, Z. Zhou, et al. // *Biomaterials*. 2007. Vol. 28. Pp. 1787–1797.
77. The roles of surface chemistry and topography in the strength and rate of osseointegration of titanium implants in bone / Y. Sul, B. Kang, C. Johansson, et al. // *Biomed. Mater. Res.* 2009. Vol. 89. Pp. 942–950.
78. Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale dependant morphology / O. Zinger, K. Anselme, A. Denzer, et al. // *Biomaterials*. 2004. Vol. 25. Pp. 2695–2711.
79. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG-63 osteoblast-like cells to $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ / B. Boyan, R. Batzer, K. Kieswetter, et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* 1998. Vol. 39. Pp. 77–85
80. Trepat X., Lenormand G., Fredberg J. J. Universality in cell mechanics // *Soft. Matter*. 2008. Vol. 4. Pp. 1750–1759.
81. Ultraviolet light-mediated photofunctionalization of titanium to promote human mesenchymal stem cell migration, attachment, proliferation and dif-

ferentiation / H. Aita, W. Att, T. Ueno, et al. // *Acta. Biomater.* 2009. Vol. 5. Pp. 3247–3257.

82. Wang N., Tytell J. D., Ingber D. E. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with nucleus // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009. Vol. 10. Pp. 75–82.

83. Wilson C. J., Clegg R. E., Leavesley D. I. Mediation of biomaterial–cell interactions by adsorbed proteins a review // *Tis. Engng.* 2005. Vol. 11. Pp. 1–18.

84. Wozniak M. Modzelewska K., et al. Focal adhesion regulation of cell behavior // *Biochimica et Biophysica Acta.* 2004. Vol. 1692. P. 103–119.

85. Yuan H., Zou P., Yang Z. Bone morphogenetic protein and ceramic-induced osteogenesis // *J. Mater. Sci. Med.* 1998. Vol. 9. Pp. 717–721.

86. Zelzer M., Majani R., Bradley J. W. Investigation of cell–surface interactions using chemical gradients formed from plasma polymers // *Biomaterials.* 2008. Vol. 29. Pp. 172–184.

87. Zhao G., Raines A. Requirement for both micron- and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography // *Biomaterials.* 2007. Vol. 28. Pp. 2821–2829.

88. Zreiqat H., Valenzuela S. M., Nissan B. B. The effect of surface chemistry modification of titanium alloy on signaling pathways in human osteoblasts // *Biomaterials.* 2005. Vol. 26. Pp. 7579–7586.